

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 602**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01) C12N 15/62	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01) C12N 15/66	(2006.01)
A61K 51/00	(2006.01) C12N 15/86	(2006.01)
C12N 5/00	(2006.01)	
A61N 5/10	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 51/10	(2006.01)	
C07K 16/30	(2006.01)	
C12N 5/09	(2010.01)	
C12N 5/10	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2014 PCT/US2014/047854**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15013429**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2014 E 14828921 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3024486**

54 Título: **Procedimientos y composiciones relacionados con los fragmentos de anticuerpos monocatenarios que se unen a la glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72)**

30 Prioridad:

23.07.2013 US 201361857511 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.01.2021

73 Titular/es:

**OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION
(100.0%)
1524 North High Street
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

**MAGLIERY, THOMAS J.;
SULLIVAN, BRANDON J.;
ALLEN, HEATHER C.;
MARTIN, EDWARD W.;
HITCHCOCK, CHARLES L.;
ALTEN, E. DAVID y
LONG, NICHOLAS E.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 800 602 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

Procedimientos y composiciones relacionados con los fragmentos de anticuerpos monocatenarios que se unen a la glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72)

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense n.º 61/857.511, presentada el 23 de julio de 2013.

ANTECEDENTES

Más del 10% de las muertes son causadas por cáncer; por lo tanto, es imperativo que la investigación científica mejore e innove el estado de la técnica en prevención, diagnóstico, imagenología, terapéutica y cirugía (Jemal 2011). Las técnicas tradicionales de estudios de imagen del cáncer se basan en la tomografía computarizada (TC) y la tomografía por emisión de positrones (TEP). Ambos procedimientos adolecen de baja resolución y relaciones señal-ruido bajas. La detección y cirugía radioinmunoguiada (RIGS) es una potente modalidad para cartografiar con precisión las superficies de tejido canceroso, pero el catálogo actual de anticuerpos que se unen al cáncer no es ideal para estas aplicaciones (Sun 2007).

Se han desarrollado varias generaciones de anticuerpos monoclonales contra el epítipo sialil-Tn. Los dos primeros, B72.3 (Thor 1986 y Thor 1987) y CC49 (Muraro 1988; Colcher 1988), entraron en ensayos clínicos para cirugía radioinmunoguiada (RIGS), pero una fracción significativa de pacientes desarrolló anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) (Dvigi 1995). En respuesta, se construyó una variante humanizada de CC49 (AKA) (Yoon 2006; Kashmiri 1995). Ninguno de los 21 pacientes experimentó HAMA cuando el procedimiento se realizó con AKA, pero el anticuerpo de tercera generación perdió más de dos veces su afinidad de unión. En 2008, Yoon y col. construyeron una biblioteca Fab en CDR3 de AKA (Yoon 2006). Este estudio produjo un Fab con unión mejorada que luego se convirtió en una IgG de longitud completa llamada 3E8.

La última generación de IgG sialil-Tn (antígenos asociados a tumores) no son inmunogénicas y se unen al epítipo sialil-Tn con notable afinidad. Sin embargo, para satisfacer todos los requisitos para los estudios de imagen, estos anticuerpos de longitud completa requieren una reducción al armazón scFv más pequeño. Esta etapa restante no es trivial, lo que probablemente describe por qué estos agentes de estudios de imagen no son comunes en los hospitales. Los dominios variables son estabilizados por los dominios constantes que están vacíos en el scFv truncado.

Independientemente, los dominios VH y VL solo están débilmente asociados por interacciones no covalentes (y posiblemente enlaces disulfuro), por lo tanto, se requiere un enlazador de aminoácidos para ensamblar el sitio de unión al antígeno completo. A menudo, estas proteínas modificadas sufren pérdida de afinidad, heterogeneidad en la estructura cuaternaria y disminución de la estabilidad. YOON SUN OK Y COL.: "Construction, affinity maturation, and biological characterization of an anti-tumor-associated glycoprotein-72 humanized antibody", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 281:11 (17 March 2006) expone un anticuerpo humanizado con afinidad mejorada frente a TAG-72. HOMBACH Y COL.: "Generation of the Single Chain Antibody Fragment Conserves the Idiotypic Profile of the Anti-CD30 Monoclonal Antibody HRS3" Scandinavian Journal of Immunology, 1 de noviembre 1998 p497-501 expone la ingeniería de los fragmentos scFv de un anticuerpo completo. YU Y COL.: "Preparation and Characterization of Moab SZ118 and SZ118-scFv Against Platelet Glycoprotein VI" Blood Journal 16 de noviembre 2005 expone la

producción de un scFv a partir de una inmunoglobulina completa. KESHENG Y COL.: "Generation and characterization of recombinant single chain Fv antibody that recognizes platelet glycoprotein Ib[alpha]" Thrombosis Research 109:2-3 1 de enero de 2003 expone el desarrollo de un formato scFv a partir de un anticuerpo monoclonal completo. CHENG Y COL.: "Radioiodinated anti-TAG-72 non-covalently linked CC49 divalent single-chain Fv antibody - Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD - NCBI Bookshelf" 7 de enero de 2008 expone el anticuerpo scFv

TAG72 para el epítipo específico sialil-Tn denominado CC49. Lo que se necesita en la técnica es un scFv 3E8 estabilizado de forma sustancial.

RESUMEN

En esta invención se describe un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72). El fragmento de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo variable monocatenario (scFv) que se une al epítipo sialil-Tn de TAG-72, que comprende la SEQ ID NO: 1 o 2, según la reivindicación 1. En otra realización de la presente invención, se proporciona un fragmento de anticuerpo scFv que se une específicamente a la glucoproteína-72 asociada a tumor (TAG-72) con mayor estabilidad en comparación con el anticuerpo de longitud completa (IgG) y/o dominios de unión a antígeno de fragmento (Fab), donde dicho fragmento de anticuerpo comprende

una identidad del 90% con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, según la reivindicación 2. Otros aspectos de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes. Cualquier aspecto que quede fuera de las reivindicaciones se proporciona a modo de descripción. El fragmento de anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10, y una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 11.

También se describen secuencias de ácido nucleico correspondientes a los fragmentos de anticuerpos descritos en esta invención que se unen específicamente a TAG-72. Por ejemplo, se describen secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

Se describen composiciones que comprenden los fragmentos de anticuerpos descritos en esta invención que se unen específicamente a TAG-72 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen composiciones adecuadas para el tratamiento del cáncer que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72.

Se describe además una composición adecuada para la detección *in vivo* o *in vitro* de cáncer que comprende una cantidad diagnósticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72.

Se describe un procedimiento para el tratamiento *in vivo* de un mamífero que tiene un cáncer que expresa TAG-72 que comprende una etapa consistente en administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72.

Se describe un procedimiento de inmunodetección *in vitro* de células cancerosas que expresan TAG-72 que comprende una etapa de puesta en contacto de las células cancerosas con una composición adecuada de detección *in vitro* de cáncer que comprende una cantidad diagnósticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72.

Se describe un procedimiento de inmunodetección *in vivo* de células cancerosas que expresan TAG-72 que comprende una etapa de puesta en contacto de las células cancerosas con una composición adecuada de detección *in vitro* de cáncer que comprende una cantidad diagnósticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72.

En esta invención se describe un procedimiento de tratamiento *in vivo* del cáncer que comprende las etapas de: (a) administración por vía intravenosa de un fragmento de anticuerpo marcado con radionúclido que se une específicamente a TAG-72; (b) posteriormente detección de células tumorales usando una sonda de actividad de radionúclidos; y (c) a continuación eliminación de las células tumorales detectadas por escisión quirúrgica.

En esta invención se describen kits que comprenden un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72 e instrucciones para su uso.

Se describe un procedimiento para fabricar un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72, que comprende: (a) cultivo de una célula aislada en condiciones tales que se exprese dicho fragmento de anticuerpo; y (b) recuperación de dicho fragmento de anticuerpo de la célula.

También se describen procedimientos para tratar el cáncer que comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de una composición que comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72, donde la fracción efectora es un agente quimioterapéutico.

Se describe un procedimiento para pronosticar la recurrencia del cáncer en un sujeto previamente tratado para el cáncer, comprendiendo el procedimiento: (a) aislamiento de una muestra biológica que comprende células de un sujeto con cáncer; (b) puesta en contacto de la muestra biológica con una composición que comprende un fragmento de anticuerpo en condiciones suficientes para que la composición se una a un epítipo presente en un tumor y/o una célula cancerosa, si está presente, en la muestra biológica; y (c) identificación en la muestra biológica de una o más células que se unen a la composición que comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TAG-72, por lo que se pronostica la recurrencia de un cáncer en el sujeto.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un esquema que describe la producción, exportación y purificación de scFv. El péptido de señal se muestra en rojo con el sitio de escisión de TEV en azul. Debe tenerse en cuenta que la etiqueta 6xHis y la proteasa TEV se eliminan mediante una segunda columna de agarosa Ni-NTA.

La figura 2 muestra la purificación de muestra de 3E8.scFv de pCOLD IV. Pista 1: Esferoplastos, Pista 2: Fracción periplásmica después de la unión de Ni-NTA, Pista 3: Lavado, Pista 4: 6xHis-TEV-3E8.scFv eluido, Pista 5: 3E8.scFv después de la escisión de la proteasa TEV para eliminar 6xHis-tag, Pista 6: Proteína purificada de Ni-NTA después de la eliminación de la proteasa TEV y 6xHis-tag.

5 Las figuras 3A y B muestran la purificación de 3E8.scFv.Cys a partir de su fragmento proteolítico usando cromatografía de intercambio catiónico. Las dos especies se eluyeron a partir de una columna Resource S a NaCl 450 y 600 mM, con elución primero del producto auténtico. Esto fue confirmado por SDS-PAGE. Las pistas 1 y 12 son de escalera USB, Pista 2: 3E8.scFv.Cys antes de la cromatografía de intercambio iónico, Pistas 3-4: fracciones 1 y 2, Pistas 5-8: 10 fracciones 3-6, Pistas 9-11: fracciones 7-9. El producto deseado se indica con un asterisco.

La figura 4 muestra la optimización de la extracción del periplasma. Las fracciones osmótica (O) y periplásmica (P) se comparan en nueve procedimientos de purificación. El procedimiento de lisozima modificado produjo los mejores resultados. La banda tenue por encima del producto deseado es scFv con secuencia líder PelB. Cuando se digiere 15 con proteasa TEV, las dos bandas de proteínas se resuelven en una sola especie. Todas las muestras purificadas son 3E8.scFv de pCOLD IV en DH10B.

La figura 5 muestra la filtración de gel de fragmentos de anticuerpos. CC49.scFv es una muestra heterogénea que contiene monómero y dímero. Además, el fragmento se eluye como una proteína ligeramente más grande que su peso 20 molecular calculado, lo que muestra cierto grado de despliegue o expansión. El 3E8.scFv se eluye como una especie única con un peso molecular correspondiente a un monómero bien plegado.

La figura 6 muestra la estabilidad de anticuerpos y fragmentos. A. La propensión a la agregación se mide al aumentar la temperatura. 3E8.scFv tiene una estabilidad intermedia entre el CC49.scFv menos estable y el 3E8.IgG más estable. 25 B. HTTS muestra resultados similares a los referidos por DLS, con una segunda transición de desarrollo para 3E8.IgG. Los dominios de unión de 3E8.scFv y 3E8.IgG se despliegan a 66°C.

La figura 7 muestra la unión de anticuerpos y fragmentos. A. El ensayo de inmunotransferencia puntual muestra que tanto CC49.scFv como 3E8.scFv se unen a BSM (sialil-Tn), pero no a BSA. B. El ensayo de inhibición con IgG 30 fluorescente y scFv no marcado muestra que el scFv se une ~ 16 veces menos intensamente que la IgG bivalente. (-) * se realizó con IgG 0,25 µM sin BSM. (-)** se realizó usando fluoresceína libre en ausencia de anticuerpos. C. Sensogramas SPR para cada variante.

La figura 8 muestra el ensayo de inmunotransferencia puntual usando peroxidasa de rábano picante como reportero. 35 En este caso, el scFv se une específicamente a la sección de nitrocelulosa que se sometió a inmunotransferencia con mucina que contenía el epítipo TAG-72. El color marrón es el resultado de la reacción química catalizada por la peroxidasa de rábano picante, que está unida al scFv por la interacción biotina-estreptavidina.

La figura 9 muestra la tinción inmunohistoquímica del cáncer de colon humano. El scFv tiñe intensamente la mucina 40 extracelular y las vacuolas intracelulares que contienen el epítipo TAG-72.

La figura 10 muestra la NHS-PEGilación de 3E8.scFv. Pista 1: Escalera USB, Pistas 2 y 3: Fragmento de anticuerpo no modificado, Pista 4: Reacción con exceso molar de 5 veces de PEG, Pista 5: Reacción con exceso molar de 20 45 veces de PEG.

La figura 11 muestra el marcado fluorescente de fragmentos de anticuerpos con y sin etiquetas 6x-His. Las muestras con etiquetas de hexahistidina (3E8H6d y CC49H6d) generan señales más intensas debido a las mayores concentraciones de fragmento de anticuerpo.

50 La figura 12 muestra la PEGilación específica de 3E8.scFv.Cys. El fragmento de anticuerpo se marcó específicamente en el residuo de cisteína en el extremo C usando química de maleimida. El scFv estaba casi cuantitativamente PEGilado. Pista 1: parcialmente purificado, reducido 3E8.scFv.Cys, Pista 2: 3E8.scFv.Cys PEGilado. Pista 3: no relacionado. Pista 4: escalera.

55 La figura 13 muestra la caracterización biofísica de 3E8.scFv.

La figura 14 muestra estudios de unión para 3E8.scFv. Una unión estimada del 50% a 4 µM, es decir, 3E8.scFv es aproximadamente un ligante 16 veces peor que 3E8.IgG (K_D = 0,65 nM) por lo que su K_D estimado = 10,4 nM.

60 La figura 15 muestra la resonancia por plasmones superficiales.

La figura 16 muestra la inmunohistoquímica. La biotina unida a 3E8.scFv a través de lisinas se puede acoplar a un

complejo enzimático cromogénico que produce un producto marrón. Usando este esquema, se puede visualizar 3E8.scFv unido a su epítipo. Los histólogos pueden usar esta técnica para analizar muestras quirúrgicas para determinar el éxito de los procedimientos quirúrgicos.

5 La figura 17 muestra los resultados de PEGilación. Se muestran las PEGilaciones de T4L con PEG de 2 kDa. Los PEG polidispersados producen manchas de productos PEGilados; los PEG discretos producen una escalera de distintos productos PEGilados.

La figura 18 muestra el disacárido Sialil-Tn y la proteína TAG-72.

10

La figura 19 muestra armazones de anticuerpos representados en gris unidos al antígeno (estrellas negras). También se muestra el esquema del gen scFv.

15 La figura 20 muestra la estructura de ScFv, A. Los análisis de longitud de onda de CD de scFv es consistente con el pliegue del dominio de inmunoglobulina. B. La filtración de gel muestra una sola especie monomérica para 3E8.scFv, pero CC49 está ligeramente expandido y existe como un scFv.

20 La figura 21 muestra que la mucina es una gran glucoproteína expresada y secretada por células sanas y enfermas. Se ha demostrado que la mucina de los adenocarcinomas sobreexpresa el disacárido, sialil-Tn. Este epítipo está dirigido con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

25 Las figuras 22A y 22B muestran la PEGilación. figura 22A: Modelo de 3E8.scFv: las regiones determinantes complementarias son los bucles responsables de la unión del antígeno. La cisteína en el extremo C se muestra en esferas azules opuestas al sitio de unión. figura 22B: La PEGilación aumenta el radio hidrodinámico de las proteínas, puede reducir la inmunogenicidad, disminuir la agregación y proteger el fragmento de anticuerpo de las proteasas séricas.

La figura 23 muestra la modelización en bruto de 3E8.scFv que revela cuatro lisinas dentro de las CDR responsables de la unión al antígeno.

30

La figura 24 muestra 3E8cys.scFv PEGilado. Los fragmentos de anticuerpos modificados se muestran en un gel SDS-PAGE. Las muestras de 40 kD se cargan en concentraciones 2x y 1x. Los polímeros PEG no interaccionan intensamente con SDS; por lo tanto, sus masas aparentes son anómalas por SDS-PAGE en comparación con las escaleras de proteínas. Se muestra un PEG de 1,8 kD lineal y ramificado.

35

La figura 25 muestra réplicas de 3E8cys.scFv + unión de Y-40 kD a TAG-72 inmovilizada en papel de nitrocelulosa. El antígeno se observó en la esquina del papel indicado por la marca de lápiz. El extremo derecho es el control negativo, donde se realizaron todas las etapas experimentales, pero el papel se incubó con tampón en lugar de fragmento de anticuerpo.

40

La figura 26 muestra la correlación entre las vidas medias en suero y estudio de imagen microTEP/TC. La radiactividad de la sangre (%ID) de cada ratón individual se representa con respecto a su intensidad tumoral normalizada en estudios de imagen TEP. Panel superior, estudio de imagen microTEP/TC a las 5 h; panel inferior, estudio de imagen microTEP/TC a las 24 h. 5 y 24h son los puntos temporales apropiados para un radiofármaco ¹²³I-SPECT/TC.

45

La figura 27 muestra que 3E8cys.scFv se conjugó con un PEG lineal de 30 kD. Se PEGilaron y purificaron tres partes alícuotas de fragmentos de anticuerpos. La muestra C proporcionó el mayor rendimiento y pureza, por lo tanto, se usó para estudios de imagen de tumores.

50 La figura 28 muestra que las vidas medias en suero se pueden ajustar con la conjugación de polietilenglicol (PEG). Los fragmentos de anticuerpos PEGilados se muestran usando lisinas (química de éster NHS) y cisteínas (química de maleimida).

55 Las figuras 29A-C muestran la resección quirúrgica de prueba de concepto con estudio de imagen intraoperatorio a través del fragmento de anticuerpo marcado con ¹²³I. A. Imagen tomada antes de la cirugía (tumores con flechas). B. Se toma una segunda imagen para evaluar el procedimiento quirúrgico. Puede observarse que el tumor residual permanece en el flanco derecho. C. Imagen tomada después de la eliminación completa del tejido canceroso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

60

Las composiciones y los procedimientos descritos en esta invención pueden entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de los aspectos específicos de la materia descrita y a los Ejemplos y figuras

incluidos en esta invención.

Antes de divulgar y describir las presentes composiciones y procedimientos, debe entenderse que los aspectos descritos a continuación no se limitan a los procedimientos específicos de síntesis o a los reactivos específicos, dado
5 que estos, por supuesto, varían. También se debe entender que la terminología usada en esta invención tiene el propósito de describir realizaciones concretas y no pretende ser limitante.

Además, a lo largo de la presente memoria descriptiva se hace referencia a diversas publicaciones.

10 Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia. Procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta invención se pueden usar en la práctica o en las pruebas de la presente descripción. En la
15 presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen se hará referencia a una serie de términos que se definirán con los siguientes significados:

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y otras formas de la palabra, tales como "que comprende" y "comprende" significa que incluye, pero no se limita a, y no pretende excluir, por ejemplo,
20 otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

Tal como se usan en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye mezclas de dos o más anticuerpos, la referencia a "una composición" incluye mezclas de
25 dos o más composiciones.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el hecho o circunstancia descrito a continuación puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en que el hecho o circunstancia tiene lugar y los casos en los que no.

A menos que se indique lo contrario, se debe comprender que todas las cifras que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y otras usadas en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones se encuentran modificadas en todos los casos por la expresión "aproximadamente". Tal como se usa en esta invención, se entiende que el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor mensurable tal como una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje, comprende variaciones de en algunas realizaciones $\pm 20\%$,
30 en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0,5\%$ y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ con respecto a la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos descritos y/o emplear las composiciones descritas. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos que se indican en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar según las propiedades deseadas
40 que se busque obtener con la descripción.

Tal como se usa en esta invención, el término "y/o" cuando se usa en el contexto de una lista de entidades, se refiere a las entidades que están presentes individualmente o en combinación. Así, por ejemplo, la frase "A, B, C y/o D" incluye A, B, C y D individualmente, pero también incluye todas y cada una de las combinaciones y subcombinaciones
45 de A, B, C y D.

Con respecto a los términos "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en", cuando uno de estos tres términos se usa en esta invención, el objeto descrito y reivindicado puede incluir el uso de cualquiera de los otros dos términos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el objeto descrito se refiere a composiciones que comprenden anticuerpos. Un experto en la materia entenderá, después de revisar la presente descripción, que el
50 objeto descrito comprende así composiciones que consisten esencialmente en los anticuerpos del objeto descrito en esta invención, así como composiciones que consisten en los anticuerpos del objeto descrito en esta invención.

El término "sujeto", tal como se usa en esta invención, se refiere a un miembro de cualquier especie de invertebrado o vertebrado. En consecuencia, el término "sujeto" pretende comprender en algunas realizaciones a cualquier miembro del reino Animalia, incluidos, entre otros, el filo Chordata (por ejemplo, miembros de las clases Osteichthyes (peces óseos), Amphibia (anfibios), Reptilia (reptiles), Aves (aves) y Mammalia (mamíferos), y todos los órdenes y familias incluidas en los mismos.

Las composiciones y procedimientos del objeto descrito son especialmente útiles para vertebrados de sangre caliente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el objeto descrito se refiere a mamíferos y aves. Más en particular se proporcionan composiciones y procedimientos derivados de y/o para su uso en mamíferos tales como seres humanos

y otros primates, así como aquellos mamíferos importantes debido a su peligro de extinción (como los tigres siberianos), de importancia económica (animales criados en granjas para consumo humano) y/o de importancia social (animales mantenidos como mascotas o en zoológicos) para los seres humanos, por ejemplo, carnívoros que no sean humanos (como gatos y perros), porcinos (cerdos, cerdos salvajes y jabalíes), rumiantes (como vacas, bueyes, ovejas, 5 jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos), roedores (como ratones, ratas y conejos), marsupiales y caballos. También se proporciona el uso de los procedimientos y composiciones descritos en aves, incluidos los tipos de aves en peligro de extinción, mantenidas en zoológicos, así como aves, y más particularmente aves domesticadas, por ejemplo, aves de corral, como pavos, pollos, patos, gansos y gallinas de Guinea, ya que también son de importancia económica para los seres humanos. Por lo tanto, también se proporciona el uso de los procedimientos y composiciones 10 descritos en ganado, que incluyen, pero no se limitan a cerdos domesticados (cerdos y cerdos salvajes), rumiantes, caballos y aves de corral.

Análogamente, todos los genes, nombres de genes y productos génicos descritos en esta invención pretenden corresponder a homólogos de cualquier especie para la cual son aplicables las composiciones y procedimientos descritos en esta invención. Así, los términos incluyen, pero no se limitan a, genes y productos génicos de seres 15 humanos y ratones. Se entiende que cuando se describe un gen o producto génico de una especie en particular, esta descripción pretende ser solo ilustrativa, y no debe interpretarse como una limitación a menos que el contexto donde aparece lo indique claramente. Así, por ejemplo, para los genes presentados en GENBANK® n.º acceso: AAA60019 y NP_004976, las secuencias de aminoácidos humanos descritas pretenden comprender genes y productos génicos 20 homólogos de otros animales lo que incluye, pero no se limita a, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. También se incluyen todas y cada una de las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos descritas, incluidas, entre otras, las descritas en las correspondientes entradas de GENBANK® (es decir, J05582.1 y NM_004985, respectivamente).

25 Los términos "cáncer" y "tumor" se usan indistintamente en esta invención y pueden referirse tanto a tumores sólidos primarios como a metástasis y carcinomas de cualquier tejido en un sujeto, lo que incluye, pero no se limita a, mama; colon; recto; pulmón; orofaringe; hipofaringe; esófago; estómago; páncreas; hígado; vesícula biliar; conductos biliares; intestino delgado; vías urinarias que incluyen riñón, vejiga y urotelio; aparato genital femenino que incluye cuello uterino, útero, ovarios (por ejemplo, coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional); aparato genital masculino 30 que incluye próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de células germinales; glándulas endocrinas que incluyen tiroides, glándulas suprarrenales e hipófisis; piel (por ejemplo, hemangiomas y melanomas), huesos o tejidos blandos; vasos sanguíneos (por ejemplo, sarcoma de Kaposi); encéfalo, nervios, ojos y meninges (por ejemplo, astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas y meningiomas). Tal como se usa en esta invención, los términos "cáncer" y "tumor" también pretenden referirse a tumores 35 multicelulares, así como a células neoplásicas o preneoplásicas individuales. En algunas realizaciones, un cáncer o un tumor comprende un cáncer o tumor de un tejido epitelial tal como, pero sin limitarse a, un carcinoma. En algunas realizaciones, un tumor es un adenocarcinoma, que en algunas realizaciones es un adenocarcinoma de páncreas, mama, ovario, colon o recto, y/o una célula metastásica derivada de los mismos.

40 Tal como se usa en esta invención en el contexto de las moléculas, el término "efector" se refiere a cualquier molécula o combinación de moléculas cuya actividad se desea suministrar y/o localizar en una célula. Los efectores incluyen, sin limitarse a, marcadores, citotoxinas, enzimas, factores de crecimiento, factores de transcripción, fármacos, etc.

Tal como se usa en esta invención en el contexto de las células del sistema inmunitario, el término "efector" se refiere 45 a una célula del sistema inmunitario que puede ser inducida a realizar una función específica asociada con una respuesta inmunitaria a un estímulo. Las células efectoras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, células citolíticas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos (linfocitos Tc).

Tal como se usa en esta invención, el término "vector de expresión" se refiere a una secuencia de ADN capaz de dirigir 50 la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula hospedadora apropiada, que comprende un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que está operativamente vinculada a las señales de terminación. El vector también puede contener secuencias requeridas para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótidos. La construcción que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérica. La construcción también puede ser tal que se produzca de forma natural, pero se ha obtenido en una forma 55 recombinante útil para la expresión heteróloga.

Tal como se usa en esta invención, el término "hibridoma" se refiere a una célula o línea celular que se produce en el laboratorio a partir de la fusión de un linfocito productor de anticuerpos y una célula cancerosa no productora de anticuerpos, generalmente una célula de mieloma o linfoma. Como es conocido para los expertos en la materia, un 60 hibridoma puede proliferar y producir un suministro continuo de un anticuerpo monoclonal específico. Los procedimientos para generar hibridomas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988).

Tal como se usan en esta invención, los términos "operativamente unidos" y "operablemente unidos" se refieren a elementos reguladores de la transcripción (tales como, sin limitarse a, secuencias promotoras, secuencias terminadoras de la transcripción, etc.) que están conectados a una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de codificación o marco de lectura abierto) de tal manera que la transcripción de la secuencia de nucleótidos esté controlada y regulada por ese elemento regulador transcripcional. De manera similar, se dice que una secuencia de nucleótidos está bajo el "control transcripcional" de un promotor al que está unida operativamente. En la técnica se conocen técnicas para unir operativamente una región promotora a una secuencia de nucleótidos.

Tal como se usa en esta invención, el término "profármaco" se refiere a un análogo y/o un precursor de un fármaco (por ejemplo, un agente citotóxico) que carece sustancialmente de la actividad biológica del fármaco (por ejemplo, una actividad citotóxica) hasta que se somete a una etapa de activación. Las etapas de activación pueden incluir escisión enzimática, etapas de activación química como la exposición a un reductor y/o etapas de activación física como la fotólisis. En algunas realizaciones, la activación ocurre *in vivo* dentro del organismo de un sujeto,

Tal como se usa en esta invención, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina incluyen normalmente los genes de región constante kappa (κ), lambda (λ), alfa (α), gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) y mu (μ), así como infinidad de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como κ o λ . Las cadenas pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ o ϵ , que definen a su vez las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Otras especies tienen otros genes de cadena ligera y pesada (por ejemplo, algunas aves produjeron lo que se conoce como IgY, que es un tipo de inmunoglobulina que las gallinas depositan en las yemas de sus huevos), que están incluidos de manera similar por el objeto descrito. En algunas realizaciones, el término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que está presente en un antígeno tumoral.

Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto normalmente por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (que tiene normalmente un peso molecular de alrededor de 25 kiloDalton (kDa)) y una cadena "pesada" (que tiene normalmente un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa). Los dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos se mantienen unidos en forma dimérica mediante enlaces disulfuro que están presentes dentro de la región de la cadena pesada. El extremo N de cada cadena define una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos (a veces referidos como "parátomos"). Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como una cantidad de fragmentos bien caracterizados que pueden producirse mediante digestión con diversas peptidasas. Por ejemplo, la digestión de una molécula de anticuerpo con papaína escinde el anticuerpo en una posición en el extremo N de los enlaces disulfuro. Así se producen tres fragmentos: dos fragmentos "Fab" idénticos, que tienen una cadena ligera y el extremo N de la cadena pesada, y un fragmento "Fc" que incluye el extremo C de las cadenas pesadas unidas por los enlaces disulfuro. La pepsina, por otro lado, digiere un anticuerpo en el extremo C para el enlace disulfuro en la región bisagra para producir un fragmento conocido como fragmento "F(ab')₂", que es un dímero de los fragmentos Fab unidos por el enlace disulfuro. El F(ab')₂ se puede reducir en condiciones moderadas para romper el enlace disulfuro en la región bisagra y así convertir el dímero (Fab')₂ en un monómero de "Fab". El monómero Fab es esencialmente un fragmento Fab con parte de la región bisagra (véase, por ejemplo, Paul, 1993, para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Con respecto a estos diversos fragmentos, los fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fab' incluyen al menos un dominio de unión a antígeno intacto (parátomo), y por lo tanto son capaces de unirse a antígenos.

Si bien diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la materia observará que varios de estos fragmentos (lo que incluye, pero no se limita a, fragmentos Fab') pueden sintetizarse de novo químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término "anticuerpo", tal como se usa en esta invención, incluye fragmentos de anticuerpos producidos por modificación de los anticuerpos completos y/o sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante. En algunas realizaciones, el término "anticuerpo" comprende un fragmento que tiene al menos un dominio de unión a antígeno (parátomo).

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Tal como se usa en esta invención, el término "policlonal" se refiere a anticuerpos que están presentes juntos en una colección dada de anticuerpos y que se derivan de diferentes células productoras de anticuerpos (por ejemplo, linfocitos B). Los anticuerpos policlonales de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellos anticuerpos que se unen a un antígeno particular y que se encuentran en la sangre de un animal después de que ese animal haya producido una respuesta inmunitaria contra el antígeno. Sin embargo, se entiende que una preparación policlonal de anticuerpos también se puede preparar artificialmente mezclando al menos dos anticuerpos no idénticos. Por lo tanto, los anticuerpos policlonales incluyen normalmente

diferentes anticuerpos que se dirigen contra (es decir, se unen a) los mismos y/o diferentes epítomos (a veces denominados "determinante antigénico" o simplemente "determinante") de cualquier antígeno dado.

Tal como se usa en esta invención, el término "monoclonal" se refiere a una sola especie de anticuerpo y/o una población sustancialmente homogénea de una sola especie de anticuerpo. Dicho de otra manera, "monoclonal" se refiere a anticuerpos individuales o poblaciones de anticuerpos individuales en los cuales los anticuerpos son idénticos en especificidad y afinidad, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Normalmente, un anticuerpo monoclonal (AMc o AMoc) es generado por un solo linfocito B o una célula de progenie del mismo (aunque el objeto descrito en esta invención también comprende anticuerpos "monoclonales" que se producen mediante técnicas de biología molecular como se describe en esta invención). Los anticuerpos monoclonales (AMc o AMoc) son altamente específicos, y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, un AMc dado se dirige normalmente contra un único epítipo en el antígeno.

Además de su especificidad, los AMc pueden ser ventajosos para algunos fines, ya que pueden ser sintetizados sin contaminar por otros anticuerpos. Sin embargo, el adjetivo "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento en particular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los AMc del objeto descrito en esta invención se preparan usando la metodología de hibridoma descrita por primera vez por Kohler y col., 1975, y en algunas realizaciones se preparan usando procedimientos de ADN recombinante en células procariontas o eucariotas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567). Los AMc también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos.

Los anticuerpos, fragmentos y derivados del objeto descrito en esta invención también pueden incluir anticuerpos quiméricos. Tal como se usa en esta invención en el contexto de anticuerpos, el término "quimérico", y sus variantes gramaticales, se refiere a derivados de anticuerpos que tienen regiones constantes derivadas sustancial o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpos de una especie y regiones variables derivadas sustancial o exclusivamente de la secuencia de la región variable de otra especie.

La región variable permite que un anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a los epítomos de los antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH, o el subconjunto de las regiones de determinación de complementariedad (CDR) dentro de estos dominios variables de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternario forma el sitio de unión a antígenos presente en el extremo de cada brazo del anticuerpo. Más específicamente, el sitio de unión a antígenos está definido por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL. En algunos casos, por ejemplo, algunas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélidos o modificadas genéticamente con base en inmunoglobulinas de camélidos, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir únicamente en cadenas pesadas, sin cadenas ligeras.

En los anticuerpos de ocurrencia natural hay seis CDR presentes en cada dominio de unión al antígeno que son secuencias cortas y no contiguas de aminoácidos que están colocadas específicamente para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional. En un entorno acuoso el resto de los aminoácidos en los dominios de unión al antígeno, a los que se hace referencia como regiones "marco", muestra menos variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida conformación β -lámina y las CDR forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura β -lámina. De este modo, las regiones marco actúan para formar una estructura que proporciona el posicionamiento de las CDR en una orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre cadenas. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo afín. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, se pueden identificar fácilmente para cualquier dominio variable de cadena ligera o pesada determinado por un experto en la materia, dado que estos han sido definidos con precisión (véase, por ejemplo, Chothia y Lesk, 1987; Kabat y col., 1991; Martin, 1996; Johnson y Wu, 2000).

Un tipo particular de anticuerpo quimérico es un anticuerpo "humanizado", donde los anticuerpos se producen sustituyendo las CDR de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, por las CDR de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente internacional PCT n.º WO 1992/22653). Por lo tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado tiene regiones constantes y regiones variables distintas de las CDR que se derivan sustancial o exclusivamente de las regiones correspondientes de un anticuerpo humano, y las CDR que se derivan sustancial o exclusivamente de un mamífero distinto de un ser humano.

Los anticuerpos del objeto descrito en esta invención pueden ser anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpos monocatenarios, tales como fragmentos variables monocatenarios. Los fragmentos de anticuerpos monocatenarios contienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos una de las regiones variables y/o CDR de

los anticuerpos completos descritos en esta invención, pero carecen de algunos o todos los dominios constantes de esos anticuerpos. Estos dominios constantes no son necesarios para la unión al antígeno, pero constituyen una parte importante de la estructura de los anticuerpos completos. En la presente invención, las SEQ ID NO: 10 y 11 constituyen los fragmentos de la cadena ligera y la cadena pesada.

5

Los fragmentos de anticuerpos monocatenarios pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen una parte o la totalidad de un dominio constante. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos monocatenarios suelen estar libres de interacciones no deseadas entre moléculas biológicas y la región constante de cadena pesada, y/u otras actividades biológicas no deseadas. Además, los fragmentos de anticuerpos monocatenarios son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y, por lo tanto, pueden caracterizarse por una mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos completos, lo que permite que los fragmentos de anticuerpos monocatenarios se localicen y se unan a los sitios de unión a antígeno más eficientemente. Además, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir a una escala relativamente grande en las células procariotas, lo que facilita su producción. Además, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpos monocatenarios los hace menos propensos que los anticuerpos completos a provocar una respuesta inmunitaria en un receptor. Los fragmentos de anticuerpos monocatenarios del objeto descrito en esta invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de fragmentos monocatenarios variables (scFv) y derivados de los mismos, tales como, pero sin limitarse a, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem, minianticuerpos y minicuerpos.

Los fragmentos Fv corresponden a los fragmentos variables en el extremo N de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina. Los fragmentos Fv parecen tener menor energía de interacción de sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para estabilizar la asociación de los dominios VH y VL, se pueden vincular con péptidos (véase, por ejemplo, Bird y col., 1988; Huston y col., 1988), puentes disulfuro (véase, por ejemplo, Glockshuber y col., 1990), y/o mutaciones de "botón en ojal" ("knob in hole") (véase, por ejemplo, Zhu y col., 1997). Los fragmentos ScFv pueden producirse mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Whitlow y col., 1991; Huston y col., 1993).

Un "fragmento variable monocatenario" (scFv) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de las inmunoglobulinas, conectadas con un péptido enlazador corto. El enlazador puede ser rico en glicina para flexibilidad, así como en serina o treonina para solubilidad, y puede conectar el extremo N de la VH con el extremo C de la VL o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador. scFv puede producirse en células bacterianas como *E. coli* o en células eucariotas.

35 **Procedimientos y composiciones**

scFv y ácidos nucleicos de los mismos

En esta invención se describen scFv que se unen específicamente a la glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72). Aún más específicamente, pueden unirse al epítipo sialil-Tn de TAG-72. Estos scFv altamente estables, de alta afinidad y que se expresan bacterianamente son capaces de unirse específicamente a un epítipo de glucoformo sialil-Tn encontrado en TAG-72, una glucoproteína de tipo mucina encontrada en adenocarcinomas humanos. Este epítipo rara vez se expresa en el microentorno del tejido sano y, por lo tanto, proporciona una diana específica para estudio de imagen y detección. Los anticuerpos radiomarcados que se unen específicamente a Sialil-Tn permiten estudios de imagen a nivel molecular y proporcionan la capacidad de mejorar la atención al paciente. Diversas moléculas, B72.3, CC49, huCC49, 3E8, demuestran la utilidad de los anticuerpos anti-TAG-72 en el diagnóstico y la imagenología del cáncer.

En esta invención se describen 3E8.scFv, un scFv que incorpora componentes del sitio estructural y de unión de un scFv CC49 y el anticuerpo 3E8, así como otras características de secuencia para la expresión y purificación bacteriana. También se describe en esta invención la secuencia de ADN, la secuencia de proteínas y el procedimiento de expresión y purificación de *Escherichia coli*.

En esta invención se muestra la estabilidad del scFv y su unión a TAG-72 en mucina. También se muestra el uso de 3E8.scFv biotinilado en inmunohistoquímica contra una muestra de cáncer de colon humano. Finalmente, en esta invención se describe la construcción de un mutante Cys en el extremo C, 3E8.scFv.Cys, y se demuestra que puede conjugarse específicamente con un PEG de maleimida. Dado que 3E8.scFv se deriva de un anticuerpo humanizado, no es probable que provoque una respuesta inmunitaria humana.

Los scFv descritos en esta invención tienen las siguientes propiedades: unión estrecha y específica al epítipo del cáncer, sialil-Tn (Thor 1986; Thor 1987), mayor estabilidad para una vida útil más larga, rendimiento durante la aplicación, resistencia a las proteasas séricas; expresión mejorada y purificación de bacterias; susceptibilidad a una

mayor ingeniería; inmunogenicidad reducida; y una mayor penetración en el tejido sobre anticuerpos de longitud completa (IgG) y dominios de unión a antígeno de fragmento (Fab) (Yokota 1992). Varias de estas propiedades existen en una o más proteínas de unión a sialil-Tn, pero hasta la fecha, ninguna molécula combina todas las características deseadas (Colcher 1999; Yoon 2006).

- 5
- Específicamente, los scFv descritos en esta invención pueden tener una vida útil de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años más que un anticuerpo de longitud completa (IgG) o dominio Fab. Los scFv descritos en esta invención pueden ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, o cualquier cantidad más pequeña, más grande o intermedia, más resistentes a las proteasas séricas. Pueden tener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, o cualquier cantidad menor, mayor o intermedia, de inmunogenicidad reducida en comparación con un dominio IgG o Fab de longitud completa. Pueden tener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, o cualquier cantidad menor, mayor o intermedia, de aumento de penetración en los tejidos en comparación con un dominio IgG o Fab de longitud completa. Pueden tener 1, 2 o 3 o más de estas características.
- 10
- 15 Para generar un agente de detección y estudio de imagen del cáncer con las características anteriores, se diseñó un fragmento variable monocatenario (scFv) (las SEQ ID NOS 1 y 2 son ejemplos). Los anticuerpos de longitud completa son grandes (~160 kDa) y poseen funciones efectoras innatas que no son necesarias ni deseables para el estudio de imagen y la detección (reciclaje de FcRn e internalización celular, citotoxicidad, etc.). Los fragmentos variables monocatenarios carecen de los dominios constantes responsables de las funciones efectoras, pero mantienen los dominios de unión al antígeno completos (Bird, 1988). Su pequeño tamaño (~25 kDa) y su falta de complejidad son más propensos a la producción bacteriana y a la ingeniería y detección de alto rendimiento (Sandhu 1992; Pini 2000). Además, la compacidad de los scFv y la falta de absorción celular mejoran la penetración del tejido y proporcionan semividas en suero más flexibles. Las tasas de eliminación son más rápidas que las IgG que se desean cuando se usan radionúclidos dañinos, pero pueden extenderse mediante PEGilación para complementar un emparejamiento más amplio de isótopos (Yang 2003). Los scFv inspirados en 3E8 descritos en esta invención están humanizados para una inmunogenicidad reducida, se expresan bien en bacterias, son 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20°C más estables que el CC49.scFv clínicamente probado y se unen al antígeno sialil-Tn con baja afinidad nanomolar.
- 20
- 25
- 30 Los scFv descritos en esta invención se pueden preparar de varias maneras, como apreciará un experto en la materia. En su forma más esencial, el fragmento de anticuerpos puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 11, o un fragmento de la SEQ ID NO: 10 y 11. Por ejemplo, se puede producir un scFv que tiene 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 10, y 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 11. El scFv puede ser funcionalmente equivalente a los encontrados en las SEQ ID NO: 10 y 11.
- 35

Los scFv pueden tener una afinidad de unión a antígeno por sialil-Tn que es al menos un 25% de 3E8. 3E8 ha demostrado un efecto terapéutico antitumoral en ratones atímicos con xenoinjertos de adenocarcinoma de colon humano (Yoon 2006).

- 40
- El objeto descrito en esta invención incluye equivalentes funcionales de los anticuerpos del objeto descrito en esta invención. Tal como se usa en esta invención, la frase "equivalente funcional", cuando se refiere a un anticuerpo, se refiere a una molécula que tiene características de unión que son comparables a las de un anticuerpo dado. En algunas realizaciones, los anticuerpos quimerizados, humanizados y monocatenarios, así como sus fragmentos, se consideran equivalentes funcionales de los anticuerpos correspondientes en los que se basan.
- 45

- Los equivalentes funcionales también incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables de los anticuerpos del objeto descrito en esta invención. Tal como se usa en esta invención con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos, la frase "sustancialmente igual" se refiere a una biosecuencia con en algunas realizaciones al menos el 80%, en algunas realizaciones al menos el 85%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 90%, en algunas realizaciones al menos el 91%, en algunas realizaciones al menos el 92%, en algunas realizaciones al menos el 93%, en algunas realizaciones al menos el 94%, en algunas realizaciones al menos el 95%, en algunas realizaciones al menos el 96%, en algunas realizaciones al menos el 97%, en algunas realizaciones al menos el 98%, y en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con otra secuencia de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos, según lo determinado por el procedimiento de búsqueda FASTA según Pearson y Lipman, 1988. En algunas realizaciones, el cálculo del porcentaje de identidad se realiza sobre la longitud total de la secuencia de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos de un anticuerpo del objeto descrito en esta invención.
- 50
- 55

- 60 En esta invención se describe específicamente una secuencia de aminoácidos que comprende un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1. También se describe una secuencia de aminoácidos aislada que comprende un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. Además se describe una secuencia de ácidos nucleicos a partir de la cual se puede expresar

un fragmento de anticuerpo, tal como los anticuerpos scFv descritos en esta invención. También se describe la secuencia de ácidos nucleicos a partir de la cual se pueden expresar los fragmentos de anticuerpo de la presente invención. En esta invención se describe una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 7. También se describe una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 8. También se describe un vector que comprende los ácidos nucleicos descritos en esta invención. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, un segmento de ácido nucleico desnudo, un segmento de ácido nucleico asociado a un portador, una nucleoproteína, un plásmido, un virus, un viroide o un elemento transponible. También se describe una célula que produce el fragmento de anticuerpo de la presente invención.

10 *Procedimientos de tratamiento*

En esta invención se describen composiciones que comprenden un scFv y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se describen composiciones útiles para el tratamiento del cáncer que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un scFv. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede asociarse, directa o indirectamente, o unirse a una fracción efectora que tiene actividad terapéutica, y la composición es adecuada para el tratamiento del cáncer. La fracción efectora puede ser un radionúclido, una enzima terapéutica, un fármaco anticancerígeno, una citocina, una citotoxina o un agente antiproliferativo.

En esta invención se describe un procedimiento para tratamiento *in vivo* de un mamífero que tiene un cáncer que expresa TAG-72 que comprende una etapa de administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un scFv.

También se describe un procedimiento para suprimir el crecimiento tumoral en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto portador de un tumor de una cantidad efectiva de una composición de scFv, donde el scFv está acoplado a una composición antitumoral. Por "suprimir el crecimiento tumoral" se entiende que un tumor crece menos de uno que no se trata (un control). Por ejemplo, el crecimiento tumoral suprimido puede significar que el tumor que se está tratando crece el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% menos que el crecimiento medido de un control en el mismo período de tiempo.

30 *Administración*

Los scFv de la invención pueden administrarse a un mamífero según los procedimientos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir dicho efecto con un efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico. Dichos anticuerpos de la invención pueden administrarse a dicho mamífero en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo de la invención con un soporte o vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas para formar una suspensión, una solución inyectable u otra formulación. Un experto en la materia reconocerá que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de ingrediente activo con el que se combinará, la vía de administración y otras variables bien conocidas.

Las formulaciones farmacéuticamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, un disolvente adecuado, conservantes tales como alcohol bencílico si se desea, y un tampón. Un disolvente útil puede incluir, por ejemplo, agua, alcoholes acuosos, glicoles y ésteres de fosfato y carbonato. Dichas soluciones acuosas no contienen más del 50% en volumen de disolvente orgánico. Las formulaciones de tipo suspensión pueden incluir un medio de suspensión líquido como vehículo, por ejemplo, polivinilpirrolidona acuosa, aceites inertes como aceites vegetales o aceites minerales altamente refinados, o éteres de celulosa acuosos como carboximetilcelulosa acuosa. También puede estar presente un espesante tal como gelatina o un alginato, se pueden usar uno o más tensioactivos naturales o sintéticos o agentes antiespumantes, y se pueden emplear uno o más agentes de suspensión tales como sorbitol u otro azúcar. Dichas formaciones pueden contener uno o más adyuvantes.

La vía de administración del scFv de la invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral como se usa en esta invención incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. Generalmente se prefieren las formas subcutánea, intravenosa e intramuscular de administración parenteral. Los regímenes de dosificación diaria parenteral y oral para emplear anticuerpos humanizados de la invención profiláctica o terapéuticamente estarán en general en el intervalo de aproximadamente 0,005 a 100, pero preferentemente de aproximadamente 0,5 a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal al día.

El scFv de la invención también se puede administrar por inhalación. Por "inhalación" se entiende la administración por inhalación intranasal y oral. Las formas de dosificación apropiadas para dicha administración, tales como una formulación de aerosol o un inhalador de dosis medida, se pueden preparar mediante técnicas convencionales. La cantidad de dosificación preferida de un compuesto de la invención para su empleo está generalmente dentro del

intervalo de aproximadamente 0,1 a 1000 miligramos, preferentemente de aproximadamente 10 a 100 miligramos/kilogramo de peso corporal.

El scFv de la invención también puede administrarse por vía tópica. Por administración tópica se entiende administración no sistémica. Esto incluye la administración de una formulación de anticuerpo humanizado (o fragmento de anticuerpo humanizado) de la invención externamente a la epidermis o la cavidad bucal, y la instilación de dicho anticuerpo en el oído, los ojos o la nariz, y donde no entra significativamente en el torrente sanguíneo. Por administración sistémica se entiende inyección oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular. La cantidad de un anticuerpo requerido para el efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico variará, por supuesto, con el anticuerpo elegido, la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando y el animal que se está tratando, y en última instancia queda a criterio del médico. Una dosis tópica adecuada de un anticuerpo de la invención generalmente estará dentro del intervalo de aproximadamente 1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal al día.

15 *Formulaciones*

Si bien es posible administrar un fragmento de anticuerpo en solitario, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica. El ingrediente activo puede comprender, para administración tópica, del 0,001% al 10% p/p, por ejemplo, del 1% al 2% en peso de la formulación, aunque puede comprender hasta un 10% p/p, pero preferentemente no más del 5% p/p y más preferentemente del 0,1% al 1% p/p de la formulación. Las formulaciones tópicas de la presente invención pueden comprender un ingrediente activo junto con uno o más vehículos aceptables, y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico. El vehículo o los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de que sean compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no sean perjudiciales para su receptor.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones sólidas, líquidas o semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel en el sitio donde se requiere tratamiento, tales como linimentos, lociones, cremas, ungüentos o pastas y gotas adecuadas para la administración en ojos, oídos o nariz. Las gotas según la presente invención pueden comprender soluciones acuosas u oleosas estériles y pueden prepararse disolviendo el ingrediente activo en una solución acuosa adecuada de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado, y preferentemente incluyendo un agente activo de superficie. La solución resultante puede clarificarse después por filtración, y transferirse al recipiente mediante una técnica aséptica. Algunos ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para su inclusión en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002%), cloruro de benzalconio (0,01%) y acetato de clorhexidina (0,01%). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

Las lociones según la presente invención incluyen las adecuadas para la aplicación en la piel o en los ojos. Una loción para los ojos puede comprender una solución acuosa estéril que opcionalmente contiene un bactericida o conservante preparado mediante procedimientos similares a los usados para la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para la aplicación a la piel también pueden incluir un agente para acelerar el secado y para enfriar la piel, tal como un alcohol o acetona, y/o un hidratante tal como glicerol, o aceite tal como aceite de ricino o aceite de cacahuete.

Las cremas, ungüentos o pastas según la presente invención son formulaciones semisólidas del ingrediente activo para aplicación externa. Pueden elaborarse mezclando el ingrediente activo en forma finamente dividida o en polvo, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con la ayuda de maquinaria adecuada, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico; un mucílago; un aceite de origen natural tal como aceite de almendra, de maíz, de cacahuete, de ricino o de oliva, grasa de lana o sus derivados, o un ácido graso tal como ácido esteárico u oleico junto con un alcohol tal como propilenglicol o macrogeles. La formulación también puede comprender un agente activo de superficie adecuado, por ejemplo un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico tal como un glicol o derivados de polioxietileno del mismo. También se pueden incluir agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceas, y otros ingredientes tales como lanolina.

Los kits según la presente invención incluyen scFv como se describe en esta invención, e instrucciones para su uso. Los fragmentos de anticuerpos humanizados congelados o liofilizados que se reconstituirán, respectivamente, por descongelación (opcionalmente seguido de una dilución adicional) o por suspensión en un vehículo líquido (preferentemente tamponado) también se pueden usar en estos kits. Los kits también pueden incluir tampón y/o soluciones excipientes (en forma líquida o congelada) o tampón y/o preparaciones excipientes en polvo para reconstituir con agua con el fin de mezclarlas con los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos humanizados para producir una formulación adecuada para la administración. Por lo tanto, preferentemente los kits que contienen los anticuerpos humanizados o los fragmentos de anticuerpos humanizados se congelan, liofilizan, diluyen o mezclan previamente a una concentración tal que la adición de una cantidad predeterminada de calor, agua o una solución proporcionada en el kit dará como resultado una formulación de concentración y pH suficientes para

- que sea eficaz para el uso *in vivo* o *in vitro* en el tratamiento o diagnóstico de cáncer. Preferentemente, dicho kit también comprenderá instrucciones para reconstituir y usar el anticuerpo humanizado o la composición de fragmento de anticuerpo humanizado para tratar o detectar cáncer. El kit también puede comprender dos o más partes componentes para la composición activa reconstituida. Por ejemplo, un segundo componente, además de los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos humanizados, puede ser quelante bifuncional, quelato bifuncional o un agente terapéutico como un radionúclido, que cuando se mezcla con los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos humanizados forma un conjugado sistema con el mismo. Los tampones, excipientes y otras partes componentes mencionados anteriormente se pueden vender por separado o junto con el kit.
- 10 Un experto en la materia también reconocerá que la cantidad y el intervalo óptimos de las dosificaciones individuales de un compuesto peptídico se determinarán por la naturaleza y el alcance de la afección que se está tratando, la forma, la vía y el sitio de administración, y el paciente en particular que está siendo tratado, y que dichos parámetros óptimos pueden ser determinados por técnicas convencionales. Un experto en la materia también apreciará que el curso óptimo de tratamiento, es decir, el número de dosis de un compuesto administrado al día durante un número
- 15 definido de días, puede determinarse usando pruebas convencionales de determinación del tratamiento.

Agentes activos

- Las composiciones del objeto descrito en esta invención pueden comprender un agente activo, donde el agente activo comprende una fracción terapéutica, una fracción de diagnóstico y/o una fracción biológicamente activa. Tal como se usa en esta invención, la frase "agente activo" se refiere así a un componente de las composiciones descritas en esta invención que proporciona un beneficio terapéutico a un sujeto, permite la visualización de células o tejidos en los que se acumulan las composiciones del objeto descrito en esta invención, la detección de epítomos a los que se unen los scFv descritos en esta invención y/o la mejora cualquiera de estas actividades. En algunas realizaciones, un agente
- 20 activo del objeto descrito en esta invención se selecciona de entre el grupo que consiste en una molécula radiactiva (que incluye, pero no se limita, a radionúclidos y radioisótopos), una molécula sensibilizadora, un agente de estudio de imagen u otro agente detectable, una toxina, una citotoxina, un agente antiangiogénico, un agente antitumoral, un agente quimioterapéutico, un inmunomodulador, una citocina, un grupo reportero y combinaciones de los mismos. Se entiende que estas categorías no pretenden ser mutuamente excluyentes, ya que algunas moléculas radiactivas, por
- 25 ejemplo, también son agentes quimioterapéuticos, algunos inmunomoduladores son citocinas, etc.

- En algunas realizaciones, un agente activo comprende un quimioterapéutico. El experto en la materia conoce varios quimioterapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, agentes de alquilación como mostazas nitrogenadas (por ejemplo, Clorambucilo, Ciclofosfamida, Isofamida, Mecloretamina, Melfalán, mostaza de uracilo), aciridinas (por ejemplo, Tiotepa), ésteres de metanosulfonato (por ejemplo, Busulfán), ureas nitrosas (por ejemplo, Carmustina, Lomustina, Estreptozocina), complejos de platino (por ejemplo, Cisplatino, Carboplatino) y agentes de alquilación biorreductores (por ejemplo, Mitomicina C, Procarbina); agentes de rotura de cadenas de ADN (por ejemplo, Bleomicina); inhibidores de la ADN topoisomerasa I (por ejemplo, camptotecina y derivados de la misma que incluyen, pero no se limitan a, 10-hidroxycamptotecina), inhibidores de ADN topoisomerasa II (por ejemplo, Amsacrina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Doxorrubicina, Idarrubicina, Mitoxantrona, Etopósido, Tenipósido, Podofilotoxina);
- 35 ligantes de surco de ADN menor (por ejemplo, Plicamicina); antimetabolitos tales como antagonistas de folato (por ejemplo, Metotrexato y trimetrexato), antagonistas de la pirimidina (por ejemplo, Fluorouracilo, Fluorodesoxiuridina, CB3717, Azacitidina, Citarabina, Floxuridina), antagonistas de la purina (por ejemplo, Mercaptopurina, 6-Tioguanina, Fludarabina, Pentostatina), análogos de azúcares modificados (por ejemplo, Cictabina, Fludarabina) e inhibidores de
- 40 ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxiaurea); agentes de interacción de tubulina (por ejemplo, Vincristina, Vinblastina, Paclitaxel); corticoesteroides suprarrenales (por ejemplo, Prednisona, Dexametasona, Metilprednisolona, Prednisolona); agentes de bloqueo hormonal como estrógenos y compuestos relacionados (por ejemplo, Etinil Estradiol, Dietilestilbesterol, Clorotrianiseno, Idenestrol), progestinas (por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, Medroxiprogesterona, Megestrol), andrógenos (por ejemplo, Testosterona, propionato de testosterona;
- 45 Fluoximesterona, Metiltestosterona), agentes de hormona de liberación de la hormona luteinizante y/o antagonistas de la hormona de liberación de la gonadotropina (por ejemplo, acetato de leuprolida; acetato de goserelina), agentes antiestrogénicos (por ejemplo, Tamoxifeno), agentes antiandrogénicos (por ejemplo, Flutamida) y agentes antitusuprarrenales (por ejemplo, Mitotano, Aminoglutetimida). Otros quimioterapéuticos incluyen, entre otros, Taxol, ácido retinoico y derivados de los mismos (por ejemplo, ácido 13-cis-retinoico, ácido todo-trans-retinoico y ácido 9-cis-retinoico), sulfatiazol, mitomicina C, ácido micofenólico, sulfadietoxano y gemcitabina (4-amino-1- (2-desoxi-2,2-
- 50 difluoro--D-eril/7ro-pentofuranosil)pirimidin-2(1H)-on-2',2'-difluoro-2'-deoxicitidina).

- El scFv objeto también puede administrarse en combinación con otros agentes anticancerígenos, por ejemplo, otros anticuerpos o fármacos. Además, el scFv humanizado objeto puede unirse directa o indirectamente al efector que
- 60 tiene actividad terapéutica. Las fracciones efectoras adecuadas incluyen, por ejemplo, citocinas (IL-2, TNF, interferones, factores estimuladores de colonias, IL-1, etc.), citotoxinas (exotoxina de Pseudomonas, ricina, abrina, etc.), radionúclidos, tales como ^{90}Y , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I , entre otros, fármacos (metotrexato, daunorrubicina,

doxorubicina, etc.), inmunomoduladores, enzimas terapéuticas (por ejemplo, beta-galactosidasa), agentes antiproliferativos, etc. La fijación de anticuerpos a los efectores deseados es bien conocida. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.435.990 de Cheng y col. Por otra parte, los enlazadores bifuncionales para facilitar dicha unión son bien conocidos y están ampliamente disponibles. Además, los agentes de quelación (quelantes y quelatos) que proporcionan la unión de radionúclidos son bien conocidos y están disponibles.

Las composiciones del objeto descrito en esta invención pueden comprender además un vehículo farmacológico para facilitar la preparación y administración del fármaco. Se puede usar cualquier vehículo o soporte de administración de fármacos adecuado, que incluye pero no se limita a un vector de terapia génica (por ejemplo, un vector vírico o un plásmido), una microcápsula, por ejemplo una microesfera o una nanoesfera (Manome y col., 1994; Hallahan y col., 2001 b; Saltzman y Fung, 1997), un péptido (patentes de EE.UU. n.º 6.127.339 y 5.574.172), un glicosaminoglicano (patente de EE.UU. n.º 6.106.866), un ácido graso (patente de EE.UU. n.º 5.994.392), una emulsión grasa (patente de EE.UU. n.º 5.651.991), un lípido o derivado lipídico (patente de EE.UU. n.º 5.786.387), colágeno (patente de EE.UU. n.º 5.922.356), un polisacárido o derivado del mismo (patente de EE.UU. n.º 5.688.931), una nanosuspensión (patente de EE.UU. n.º 5.858.410), una micela polimérica o conjugado (Goldman y col., 1997; patentes de EE.UU. n.º 4.551.482; 5.714.166; 5.510.103; 5.490.840; y 5.855.900), y un polisoma (patente de EE.UU. n.º 5.922.545).

Los scFv descritos también se pueden acoplar a fármacos o soportes de fármacos usando procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, conjugación de carbodiimida, esterificación, oxidación de perydato de sodio seguido de alquilación reductora y reticulación de glutaraldehído (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.071, 890; y la patente europea n.º 0 439 095).

Procedimientos de detección

Se describen composiciones adecuadas para la detección *in vivo* o *in vitro* de cáncer que comprende una cantidad diagnósticamente efectiva de un scFv descrito en esta invención. El scFv puede asociarse, directa o indirectamente, con un marcador detectable o vincularse a ella, y la composición puede ser adecuada para la detección de cáncer. También se describe un procedimiento para la inmunodetección *in vitro* de células cancerosas que expresan TAG-72 que comprenden una etapa de puesta en contacto de las células cancerosas con una composición que comprende un scFv de la presente invención. El scFv puede estar vinculado a un soporte sólido, por ejemplo.

También se describe un procedimiento de inmunodetección *in vivo* de células cancerosas que expresan TAG-72 en un mamífero que comprende una etapa de administración al mamífero de una cantidad diagnósticamente efectiva de una composición que comprende el scFv de la presente invención.

Para aplicaciones de diagnóstico, se administra a un sujeto una cantidad detectable de una composición del objeto descrito en esta invención. Una "cantidad detectable", tal como se usa en esta invención para referirse a una composición, se refiere a una dosis de dicha composición en que la presencia de la composición puede determinarse *in vivo* o *in vitro*. Una cantidad detectable variará según diversos factores, que incluyen, pero no se limitan a, las características químicas de la composición que se marca, el marcador detectable, los procedimientos de marcado, el procedimiento de imagen y los parámetros relacionados con el mismo, el metabolismo del fármaco marcado en el sujeto, la estabilidad del marcador (que incluye, entre otros, la semivida de un marcador de radionúclido), el tiempo transcurrido después de la administración de la composición antes del estudio de imagen, la vía de administración, el estado físico y el historial médico previo del sujeto, y el tamaño y la longevidad del tumor o tumor sospechoso. Por lo tanto, una cantidad detectable puede variar y puede adaptarse a una aplicación en particular. Después del estudio de la presente descripción, está dentro de la habilidad de un experto en la materia determinar dicha cantidad detectable.

Tal como se usa en esta invención, los términos "fracción detectable", "marcador detectable" y "agente detectable" se refieren a cualquier molécula que pueda ser detectada por cualquier fracción que pueda agregarse a un fragmento de anticuerpo que permita la detección del fragmento de anticuerpo *in vitro* y/o *in vivo*. Las fracciones detectables representativas incluyen, pero no se limitan a, cromóforos, fracciones fluorescentes, enzimas, antígenos, grupos con reactividad específica, fracciones quimioluminiscentes y fracciones electroquímicamente detectables, etc. En algunas realizaciones, los anticuerpos están biotinilados.

La detección y estudio de imagen del fragmento de anticuerpo es ajustable, de modo que el estudio de imagen se puede realizar en menos de 1, 2, 4, 6, 12 o 18, 24, 36 o 48 horas, o cualquier cantidad por debajo, por encima o entre esta cantidad. Se ha demostrado que PEG/fragmentos mayores aumentan la semivida del suero en el 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100%, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces en comparación con un fragmento más pequeño. Esto permite realizar estudios de imagen en diferentes puntos temporales. Para fines terapéuticos, permite un aumento en la ventana terapéutica.

Fracciones detectables

En algunas realizaciones, una fracción detectable comprende un fluoróforo. Se puede emplear cualquier fluoróforo con las composiciones del objeto descrito en esta invención, siempre que la conjugación de fluoróforo dé como resultado una composición que sea detectable *in vivo* (por ejemplo, después de la administración a un sujeto) y/o *in vitro*, y además no afecte negativamente a la capacidad del fragmento de anticuerpo para unirse a su epítipo. Los fluoróforos representativos incluyen, pero no se limitan a, ácido 7-dimetilaminocoumarin-3-carboxílico, cloruro de dansilo, nitrobenzodiazolamina (NBD), cloruro de dabsilo, ácido cinámico, ácido fluoresceínico-carboxílico, azul de Nilo, tetrametilcarboxirodamina, tetraetilsulfodamina, 5-carboxi-X-rodamina (5-ROX) y 6-carboxi-X-rodamina (6-ROX). Se entiende que estos fluoróforos representativos son solo ilustrativos, y también se pueden emplear fluoróforos adicionales. Por ejemplo, en este caso la serie de colorantes ALEXA FLUOR® incluye al menos 19 colorantes diferentes que se caracterizan por diferentes espectros de emisión. Estos colorantes incluyen ALEXA FLUOR® 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700 y 750 (disponible en Invitrogen Corp., Carlsbad, California, Estados Unidos de América), y el experto en la materia puede elegir qué colorante emplear después de considerar la especificación instantánea basada en criterios que incluyen, pero no se limitan a, las composiciones químicas del ALEXA FLUOR® específico, si se van a emplear múltiples fracciones detectables y los espectros de emisión de cada una, la técnica de detección para su empleo, etc.

En algunas realizaciones, una fracción detectable comprende un colorante de cianina. Los ejemplos no limitativos de colorantes de cianina que pueden conjugarse con los fragmentos de anticuerpos del objeto descrito en esta invención incluyen los ésteres de succinimida Cy5, Cy5.5 y Cy7, suministrados por Amersham Biosciences (Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos de América).

En algunas realizaciones, una fracción detectable comprende un colorante de infrarrojo cercano (NIR). Los ejemplos no limitativos de colorantes de infrarrojo cercano que se pueden conjugar con el scFv del objeto descrito en esta invención incluyen NIR641, NIR664, NIT7000 y NIT782.

En algunas realizaciones, los anticuerpos biotinilados se detectan usando un anticuerpo secundario que comprende un grupo avidina o estreptavidina y también se conjuga con un marcador fluorescente que incluye, pero no se limita a Cy3, Cy5, Cy7 y cualquiera de la serie ALEXA FLUOR® de marcadores fluorescentes disponibles en INVITROGEN™ (Carlsbad, California, Estados Unidos de América). En algunas realizaciones, el scFv se marca directamente con un marcador fluorescente y las células que se unen al fragmento de anticuerpo se separan mediante clasificación celular activada por fluorescencia. El experto en la materia conoce estrategias de detección adicionales.

Para aplicaciones de diagnóstico (incluidas, pero sin limitarse a, aplicaciones de detección y aplicaciones de estudio de imagen), los anticuerpos del objeto descrito en esta invención pueden marcarse con una fracción detectable. La fracción detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, una fracción detectable puede ser un radioisótopo, como, pero sin limitarse a, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²⁵I o ³1; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente tal como, pero sin limitarse a, isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como, pero sin limitarse a, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

El objeto descrito en esta invención proporciona además procedimientos para diagnosticar un tumor, donde una muestra de tumor o biopsia se evalúa *in vitro*. En algunas realizaciones, un ligando de direccionamiento del objeto descrito en esta invención comprende un marcador detectable tal como un marcador fluorescente, un marcador de epítipo o un marcador radiactivo, cada uno de los cuales se describe brevemente a continuación.

Detección de un marcador de epítipo

Si se ha usado un marcador de epítipo, se puede usar una proteína o compuesto que se una al epítipo para detectar el epítipo. Un marcador de epítipo representativo es la biotina, que puede detectarse mediante la unión de un fluoróforo conjugado con avidina, por ejemplo avidina-FITC. Alternativamente, el marcador puede detectarse mediante la unión de un conjugado de estreptavidina avidina-rábano picante (HRP), seguido de la detección colorimétrica de un producto enzimático HRP. La producción de un producto/conjugado colorimétrico o luminiscente puede medirse usando un espectrofotómetro o un luminómetro, respectivamente.

Detección autorradiográfica

En el caso de un marcador radiactivo (por ejemplo, ¹³¹I o ^{99m}Tc), la detección se puede realizar mediante autorradiografía convencional o usando un Phosphorimager como es conocido por un experto en la materia. Un procedimiento autorradiográfico preferido emplea placas de estudio de imagen de luminiscencia fotoestimulables (Fuji Medical Systems de Stamford, Connecticut, Estados Unidos de América). Brevemente, la luminiscencia fotoestimulable es la cantidad de luz emitida por las placas de fósforo irradiado después de la estimulación con un

láser durante el barrido. La respuesta luminiscente de las placas es linealmente proporcional a la actividad.

Se puede emplear cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar un anticuerpo con una fracción detectable.

5

Inmunohistoquímica

En esta invención se describen procedimientos para usar inmunohistoquímica (IHC) usando los scFv descritos en esta invención para detectar cáncer. La IHC detecta moléculas diana a través de complejos antígeno-anticuerpo en una muestra patológica usando antígenos o anticuerpos ligados a enzimas. La presencia de la molécula diana se puede detectar a través de un inmunoensayo enzimático.

Con la IHC frente a la inmunofluorescencia tradicional se obtienen numerosos beneficios. Por ejemplo, a diferencia de la inmunofluorescencia, el IHC se puede usar con muestras de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina de uso común. En la patología diagnóstica se usan comúnmente muestras patológicas, incluidas secciones de tejido histológico, y/u otras preparaciones biológicas, como las células de cultivo de tejidos y los frotis de PAP y se pueden examinar fácilmente mediante IHC. Además, la tinción con IHC es permanente y preserva la morfología celular. Una comparación de la morfología celular y la proliferación de antígenos en dos diapositivas diferentes puede ser útil para controlar la progresión de una enfermedad.

20

Una vez que se ha unido un anticuerpo marcado, ya sea directa o indirectamente, a la muestra, se añade a la muestra un sustrato específico para la enzima. Cuando se añade el sustrato, el marcador enzimático convierte el sustrato causando un cambio de color que se puede ver con microscopia óptica. La presencia de un cambio de color indica la presencia de la molécula diana y permite que un observador determine, evalúe y diagnostique el nivel y la gravedad de la enfermedad.

25

Estudios de imagen in vivo

Los scFv del objeto descrito en esta invención también son útiles para estudios de imagen *in vivo*, donde se administra un anticuerpo marcado con una fracción detectable tal como un agente radiopaco y/o un radioisótopo a un sujeto, en algunas realizaciones mediante administración intravenosa, y se analiza la presencia y ubicación del anticuerpo marcado en el hospedador. Esta técnica de estudio de imagen puede ser útil en la estadificación y el tratamiento de neoplasias malignas.

Por tanto, se describe un procedimiento de tratamiento *in vivo* de cáncer que comprende las etapas de: (a) administración intravenosa de un scFv marcado por radionúclidos; (b) posteriormente detección de células tumorales usando una sonda de actividad de radionúclidos; y (c) a continuación eliminación de las células tumorales detectadas por escisión quirúrgica.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, una composición del objeto descrito en esta invención comprende un marcador que puede detectarse *in vivo*. El término "*in vivo*", tal como se usa en esta invención para describir los procedimientos de estudio de imagen o detección se refiere a procedimientos generalmente no invasivos, tales como procedimientos de gammagrafía, resonancia magnética, ecografía o fluorescencia, cada uno de los cuales se describe brevemente a continuación. El término "procedimientos no invasivos" no excluye los procedimientos que emplean la administración de un agente de contraste para facilitar los estudios de imagen *in vivo*.

En algunas realizaciones, la fracción detectable puede conjugarse o asociarse de otro modo con el scFv del objeto descrito en esta invención, un agente terapéutico, un agente de diagnóstico, un vehículo farmacológico o combinaciones de los mismos como se expone con más detalle anteriormente. Después de la administración de la composición marcada a un sujeto, y después de un tiempo suficiente para la unión, se puede visualizar la biodistribución de la composición. El término "tiempo suficiente para la unión" se refiere a una duración temporal que permite la unión del agente marcado a una molécula diana inducida por radiación.

Estudios de imagen de gammagrafía

55

Los procedimientos de estudio de gammagrafía incluyen SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único), TEP (tomografía por emisión de positrones), estudios de imagen con gammacámara y exploración rectilínea. Una gammacámara y un aparato de exploración rectilíneo representan instrumentos que detectan la radiactividad en un solo plano. La mayoría de los sistemas SPECT se basan en el uso de una o más gammacámaras que giran en torno al objeto de análisis y, por lo tanto, integran la radiactividad en más de una dimensión. Los sistemas de TEP comprenden una serie de detectores en un anillo que también detectan radiactividad en múltiples dimensiones.

60

Los instrumentos de estudio de imagen adecuados para practicar la detección y/o procedimientos de estudio de imágenes del objeto descrito en esta invención, así como las instrucciones para su uso, están fácilmente disponibles en fuentes comerciales. Por ejemplo, un aparato SPECT se puede usar con un aparato de TC, con el registro conjunto de imágenes. Como en TEP/TC, esto permite la localización de tumores o tejidos que pueden verse en la gammagrafía

5 SPECT, pero que son difíciles de localizar con precisión con respecto a otras estructuras anatómicas. Los sistemas TEP y SPECT son ofrecidos por ADAC de Milpitas, California, Estados Unidos de América, y Siemens de Hoffman Estates, Illinois, Estados Unidos de América. También se pueden usar dispositivos relacionados para estudios de imagen de gammagrafía, tales como un dispositivo de estudio de radioimagen que incluye una pluralidad de sensores con estructuras de colimación que tienen un foco de fuente común.

10

Cuando se emplean estudios de imagen de gammagrafía, el marcador detectable comprende en algunas realizaciones un marcador de radionúclido, en algunas realizaciones, un marcador de radionúclido seleccionada de entre el grupo que consiste en ^{18}F , ^{64}Cu , ^{65}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , $^{80\text{m}}\text{Br}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{107}Hg , ^{203}Hg , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{99\text{m}}\text{Re}$, ^{105}Re , ^{101}Re , ^{186}Re , ^{188}Re , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm y formas de nitrógeno u

15 óxido derivadas de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador de radionúclidos comprende ^{131}I o $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Los procedimientos para el marcado de radionúclidos de una molécula para su uso según los procedimientos descritos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, una molécula de direccionamiento puede derivatizarse para que un radioisótopo pueda unirse directamente a ella. Alternativamente, se puede agregar un enlazador que permita la

20 conjugación. Los enlazadores representativos incluyen isotiocianato de pentaacetato de dietilentriamina (DTPA), clorhidrato de nicotinato de succinimidil 6-hidracinio (SHNH) y oxima de hexametilpropilenoamina (patente de EE.UU. n.º 6.024.938). Se pueden encontrar procedimientos adicionales en la patente de EE.UU. n.º 6.080.384.

Cuando la fracción de marcado es un radionúclido, se pueden agregar estabilizadores para prevenir o minimizar el

25 daño radiolítico, como el ácido ascórbico, el ácido gálico u otros antioxidantes apropiados, a la composición que comprende la molécula de direccionamiento marcada.

Resonancia magnética (RM)

30 Las técnicas basadas en resonancia magnética crean imágenes basadas en las tasas de relajación relativa de los protones del agua en entornos químicos únicos. Tal como se usa en esta invención, el término "resonancia magnética" se refiere a técnicas de fuente magnética que incluyen resonancia magnética convencional, estudios de imagen de transferencia de magnetización (MTI), espectroscopia de resonancia magnética de protones (MRS), estudios de imagen ponderados por difusión (DWI) y resonancia magnética funcional.

35

Los agentes de contraste para los estudios de imagen de fuente magnética incluyen, entre otros, iones paramagnéticos o superparamagnéticos, partículas de óxido de hierro y agentes de contraste solubles en agua. Los iones paramagnéticos y superparamagnéticos se pueden seleccionar de entre el grupo de metales que incluyen hierro, cobre, manganeso, cromo, erbio, europio, disprosio, holmio y gadolinio. Los metales preferidos son hierro, manganeso

40 y gadolinio; el más preferido es el gadolinio.

Los expertos en la materia del marcado de diagnóstico reconocen que los iones metálicos pueden unirse mediante fracciones de quelación, que a su vez pueden conjugarse con un agente terapéutico según los procedimientos del

45 dietilentriaminopentaacético (DTPA). Los iones lantánidos están quelados por compuestos de tetraazaciclododocano. Véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.738.837 y 5.707.605. Alternativamente, se puede transportar un agente de contraste en un liposoma.

Las imágenes derivadas de una fuente magnética se pueden adquirir usando, por ejemplo, un magnetómetro de

50 dispositivo de interferencia cuántica superconductora (SQUID, disponible con instrucciones de Quantum Design de San Diego, California, Estados Unidos de América; véase también patente de EE.UU. n.º 5.738.837).

Ecografía

55 La ecografía se puede usar para obtener información cuantitativa y estructural de un tejido diana, incluido un tumor. La administración de un agente de contraste, como las microburbujas de gas, puede mejorar la visualización del tejido diana durante un examen de ecografía. En algunas realizaciones, el agente de contraste puede dirigirse selectivamente al tejido diana de interés, por ejemplo, usando un péptido para la administración guiada de fármacos (por ejemplo, administración radioguiada de fármacos) como se describe en esta invención. Los agentes

60 representativos para proporcionar microburbujas *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, burbujas lipofílicas o a base de lípidos llenas de gas (por ejemplo, patentes de EE.UU. n.º 6.245.318; 6.231, 834; 6.221, 018; y 5.088.499). Además, el gas o el líquido pueden quedar atrapados en partículas inorgánicas porosas que facilitan la liberación de

microburbujas tras la entrega a un sujeto (patentes de EE. UU. n.º 6.254.852 y 5.147.631).

Los gases, líquidos y combinaciones de los mismos adecuados para su uso con el objeto descrito en esta invención incluyen aire; nitrógeno; oxígeno; dióxido de carbono; hidrógeno; óxido nítrico; un gas inerte tal como helio, argón, xenón o criptón; un fluoruro de azufre tal como hexafluoruro de azufre, decafluoruro de diazofre o pentafluoruro de trifluorometilazufre; hexafluoruro de selenio; un silano opcionalmente halogenado tal como tetrametilsilano; un hidrocarburo de bajo peso molecular (por ejemplo, que contiene hasta 7 átomos de carbono), por ejemplo un alcano como metano, etano, un propano, un butano o un pentano, un cicloalcano tal como ciclobutano o ciclopentano, un alqueno tal como propeno o un buteno, o un alquino tal como acetileno; un éter; una cetona; un éster; un hidrocarburo halogenado de bajo peso molecular (por ejemplo, que contiene hasta 7 átomos de carbono); o una mezcla de cualquiera de los anteriores. Los gases de hidrocarburos halogenados pueden mostrar una vida útil prolongada y, por lo tanto, se prefieren para algunas aplicaciones. Los gases representativos de este grupo incluyen decafluorobutano, octafluorociclobutano, decafluoroisobutano, octafluoropropano, octafluorociclopropano, dodecafluoropentano, decafluorociclopentano, decafluoroisopentano, perfluoropexano, perfluorociclohexano, perfluoroisohexano, hexafluoruro de azufre y perfluorooctinas, perfluorononanos; perfluorodecanos, opcionalmente bromados.

La unión de ligandos de direccionamiento a burbujas lipofílicas se puede lograr a través de agentes de reticulación química según procedimientos estándar de unión de proteína-polímero o proteína-lípido (por ejemplo, a través de carbodiimida (EDC) o tiopropionato (SPDP)). Para mejorar la eficacia del direccionamiento, se pueden acoplar grandes burbujas llenas de gas a un ligando de direccionamiento usando un brazo espaciador flexible, como un polímero sintético ramificado o lineal (patente de EE.UU. n.º 6.245.318). Se puede unir un ligando de direccionamiento a las partículas inorgánicas porosas mediante recubrimiento, adsorción, estratificación o reacción de la superficie exterior de la partícula con el ligando de direccionamiento (patente de EE.UU. n.º 6.254.852).

25 Estudios de imagen de fluorescencia

Los procedimientos de estudios de imagen no invasivos también pueden comprender la detección de un marcador fluorescente. Un fármaco que comprende un componente lipofílico (agente terapéutico, agente de diagnóstico, vector o vehículo farmacológico) puede marcarse con cualquiera de una variedad de colorantes lipofílicos que son adecuados para estudios de imagen *in vivo*. Los marcadores representativos incluyen, pero no se limitan a, colorantes de carbocianina y aminoestirililo, preferentemente dialquilcarbocianinas de cadena larga (por ejemplo, DiI, DiO y DiD disponibles en Molecular Probes Inc. de Eugene, Oregón, Estados Unidos de América) y colorantes de dialquilaminoestirililo. Los marcadores fluorescentes lipofílicos se pueden incorporar usando procedimientos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las soluciones de marcado celular VYBRANT™ son efectivas para el marcado de células cultivadas de otros componentes lipofílicos (Molecular Probes Inc. de Eugene, Oregón, Estados Unidos de América).

Un marcador fluorescente también puede comprender colorantes de cianina sulfonados, incluidos Cy5.5 y Cy5 (disponibles en Amersham de Arlington Heights, Illinois, Estados Unidos de América), IRD41 e IRD700 (disponibles en Li-Cor, Inc. de Lincoln, Nebraska), NIR-1 (disponible en Dejindo de Kumamoto, Japón) y LaJolla Blue.

Además, un marcador fluorescente puede comprender un quelato orgánico derivado de iones lantánidos, por ejemplo quelatos fluorescentes de terbio y europio (patente de EE.UU. n.º 5.928.627). Dichos marcadores pueden conjugarse o unirse covalentemente a un fármaco como se describe en esta invención.

Para la detección *in vivo* de un marcador fluorescente, se crea una imagen usando espectros de emisión y absorbancia que son apropiados para el marcador en particular usado. La imagen se puede visualizar, por ejemplo, mediante espectroscopia óptica difusa. Se describen procedimientos y sistemas de estudio de imagen adicionales en las patentes de EE.UU. n.º 5,865,754; 6.083.486; y 6.246.901, entre otros lugares.

Radioimmunoguided System® (RIGS)

Otra aplicación preferida de los scFv se encuentra en el Radioimmunoguided System®. Esta técnica, también conocida como sistema RIGS®, implica la administración intravenosa de un anticuerpo monoclonal radiomarcado o su fragmento antes de la cirugía. Después de permitir la absorción del tumor y el aclaramiento sanguíneo de la radiactividad, el paciente es llevado a la sala de operaciones donde se realiza la exploración quirúrgica con la ayuda de una sonda de actividad gamma portátil, por ejemplo, Neoprobe® 1000. Esto ayuda al cirujano a identificar las metástasis tumorales y a mejorar las complicaciones de la escisión. El sistema RIGS® es ventajoso porque permite la detección de tumores que de otro modo no se pueden detectar mediante inspección visual y/o palpación. Véase, O'Dwyer y col., Arch. Surg. 121:1 391-1394 (1986). Esta técnica se describe en detalle en Hinkle y col., Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 4:(3)339-358 (1991) (citando numerosas referencias que describen esta técnica). Esta referencia también describe el uso de esta técnica con el propio anticuerpo monoclonal CC49. Esta

técnica es particularmente útil para los cánceres de colon, mama, páncreas y ovarios.

En algunas realizaciones, los scFv del objeto descrito en esta invención se emplean para estudios de imagen *in vivo* de tumores, donde una composición del objeto descrito en esta invención que se ha marcado con una fracción de estudios de imagen tal como un agente radiopaco, un radioisótopo u otro agente de estudio de imagen se administra a un sujeto, y se analiza la presencia y ubicación de la composición marcada de forma detectable en el sujeto. Esta técnica de estudio de imagen puede ser útil en la estadificación y el tratamiento de neoplasias malignas. En algunas realizaciones, un anticuerpo se marca con cualquier fracción que sea detectable *in situ* en un sujeto, por ejemplo mediante resonancia magnética nuclear, radiología u otros procedimientos de detección conocidos en la técnica.

De este modo, el objeto descrito en esta memoria también proporciona procedimientos para detectar tumores en sujetos. En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en esta memoria comprenden (a) administración al sujeto de una composición que comprende el scFv del objeto descrito en esta memoria conjugada con un marcador detectable; y (b) detección del marcador detectable para detectar de ese modo el tumor.

Procedimientos para predecir la recurrencia y/o progresión del cáncer en un sujeto

En algunas realizaciones, el objeto descrito en esta invención también proporciona procedimientos para predecir la recurrencia del cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden (a) aislamiento de una muestra biológica que comprende células de un sujeto con un cáncer; (b) puesta en contacto de la muestra biológica con scFv del objeto descrito en esta invención; y (c) identificación en la muestra biológica de una o más células que se unen al scFv del objeto descrito en esta invención, por lo que se predice la recurrencia de un cáncer en el sujeto. Con respecto a estos procedimientos, la identificación de células que se unen a los scFv del objeto descrito en esta invención puede ser indicativa de una recurrencia del cáncer de un sujeto cuando el sujeto había dado previamente resultados negativos para dichas células circulantes. En algunas realizaciones, la presencia de células que se unen a uno o más de los fragmentos de anticuerpos del objeto descrito en esta invención indica que el sujeto tiene un riesgo aumentado de enfermedad metastásica en relación con un sujeto que da resultado negativo para dichas células.

Procedimientos para pronosticar la progresión del cáncer

El objeto descrito en esta invención proporciona también procedimientos para pronosticar la progresión del cáncer en sujetos. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden el aislamiento de una muestra biológica que comprende células de un sujeto con un cáncer; la puesta en contacto de la muestra biológica con el scFv del objeto descrito en esta invención en condiciones suficientes para que el scFv se una a un epítipo presente en una célula tumoral y/o cancerosa, si estuviera presente, en la muestra biológica; y la identificación en la muestra biológica de una o más células que se unen al scFv, con lo que en el sujeto se pronostica la progresión de un cáncer. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende una muestra de sangre, una muestra de linfa o una fracción de la misma. En algunas realizaciones, el cáncer es un adenocarcinoma o un cáncer de colon.

Tal como se usa en esta invención, la frase "pronóstico de progresión de un cáncer" se refiere a evaluar indicios de una enfermedad cancerosa en un momento dado y compararlos con los indicios de la enfermedad cancerosa tomados en un punto temporal anterior, donde la comparación es indicativa de una progresión del cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, la progresión del cáncer comprende metástasis del cáncer en el sujeto.

Otros usos

Los anticuerpos del objeto descrito en esta invención también pueden emplearse en diversos procedimientos de ensayo, tales como, pero sin limitarse a, ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (véase, por ejemplo, Zola, 1987; Harlow y Lane, 1988).

Los anticuerpos del objeto descrito en esta invención también son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, uno o más anticuerpos se inmovilizan en un soporte adecuado (tal como, pero sin limitarse a, una resina Sephadex o papel de filtro) usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988.

Preparación de scFv

También se describen procedimientos para preparar scFv que comprenden: (a) cultivo de una célula aislada que comprende un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un scFv como se describe en esta invención, en condiciones tales que dicho scFv se exprese; y (b) recuperación de dicho scFv de la célula.

Tal como se describe en esta invención, los scFv descritos en esta invención pueden prepararse mediante diversos

procedimientos. Es importante destacar que los dominios VH y VL están presentes y están unidos entre sí. Los dominios VH y VL pueden comprender las SEQ ID NO: 10 y 11, por ejemplo.

Una vez descrita la invención en general, se entenderá más fácilmente con referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1: Secuencias y procedimientos de purificación para fragmentos de anticuerpos monocatenarios de alta afinidad estables que se unen al marcador de adenocarcinoma humano TAG-72

Secuencias de proteínas para 3E8.scFv y 3E8.scFv.Cys

3E8.scFv

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAAHHHHHHHGSSGGGENLYFQGSSGD
IVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPLTFGG
GTKVEIKLSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTDHAHWVRQAPGQRLEWMGYFSPGNDDFKYSQKFQGRVT
ITADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWIMQYWQGQTLVTVSS (SEQ ID
NO: 1)

15

3E8.scFv.Cys

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAAHHHHHHHGSSGGGENLYFQGSSGD
IVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPLTFGG
GTKVEIKLSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTDHAHWVRQAPGQRLEWMGYFSPGNDDFKYSQKFQGRVT
ITADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWIMQYWQGQTLVTVSS (SEQ
ID NO: 2)

Las secuencias incluyen la secuencia líder pelB para la exportación periplásmica con la secuencia de peptidasa de señal subrayada (MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 3)), una etiqueta escindible 6xHis con secuencia de reconocimiento de proteasa TEV (AHHHHHHHGSSGGGENLYFQ (SEQ ID NO: 4)), un enlazador corto (GSSG (SEQ ID NO: 5)), el dominio VL derivado de 3E8, un enlazador conocido como 205C (LSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDL (SEQ ID NO: 6)) derivado de un CC49 scFv, y el dominio VH derivado de 3E8.

20

Secuencias de ADN para expresión de 3E8.scFv y 3E8.scFv.Cys

25

3E8.scFv (SEQ ID NO: 7)

5'CATATGAAATATCTGTTACCTACTGCTGCTGCGGGCCTGCTATTA
TTAGCGGCACAACCAGCAATGGCGGCGCATCATCATCATCATGCGGTC
CTCGGGCGGTGGCGAAAATCTGTATTTTCAGGGTAGCAGCGGCGATATTG
TGATGACCCAGAGCCCGGATAGTTTGGCCGTTAGCCTGGGCGAACGTGCG
ACGATTAATTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTTTACAGCAGCAACAATAA
GAATTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCCGGCCAGCCGCCGAACTTT
TGATTTATTGGGCGAGCACCCGTGAAAGCGGCGTGCCGGATCGTTTCTCG
GGCTCAGGCAGCGGGACCGATTTTACGCTGACCATCAGCAGCCTTCAGGC
GGAGGATGTCGCGGTGTACTACTGCCAGCAGTATTACAGCTATCCGTTGA
CCTTTGGGGGAGGCACCAAAGTGGAGATCAAACCTGAGCGCGGATGATGCT
AAGAAAGATGCGGCGAAGAAGGACGATGCGAAAAAAGACGACGCAAAA
AAGGATCTGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGTGCGGAAGTGAAGAAAC
CTGGGGCGTCCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATACCTTTACC
GATCATGCGATTTCATTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCCAGCGTCTGGAATG
GATGGGCTATTTTCCCCAGGCAACGATGATTTCAAGTATTCCCAGAAGTT
CCAAGGGCGCGTGACCATTACCGCCGATAAAAGCGCAAGCACCGCGTATA
TGGAGCTGTCCAGCCTGCGTAGCGAAGATACAGCGGTTTACTATTGCGCA
CGGAGCTGGATTATGCAATACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAG
CAGCTAAGGATCC3'

3E8.scFv.Cys (SEQ ID NO: 8)

5'CATATGAAATATCTGTTACCTACTGCTGCTGCGGGCCTGCTATTA
TTAGCGGCACAACCAGCAATGGCGGCGCATCATCATCATCATGCGGTC
CTCGGGCGGTGGCGAAAATCTGTATTTTCAGGGTAGCAGCGGCGATATTG
TGATGACCCAGAGCCCGGATAGTTTGGCCGTTAGCCTGGGCGAACGTGCG
ACGATTAATTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTTTACAGCAGCAACAATAA
5 GAATTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCCGGCCAGCCGCCGAACTTT

TGATTTATTGGGCGAGCACCCGTGAAAGCGGCGTGCCGGATCGTTTCTCG
 GGCTCAGGCAGCGGGACCGATTTTACGCTGACCATCAGCAGCCTTCAGGC
 GGAGGATGTCGCGGTGTACTACTGCCAGCAGTATTACAGCTATCCGTTGA
 CCTTTGGGGGAGGCACCAAAGTGGAGATCAAAGTGGAGCGCGGATGATGCT
 AAGAAAGATGCGGCGAAGAAGGACGATGCGAAAAAAGACGACGCAAAA
 AAGGATCTGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGGTGCGGAAGTGAAGAAAC
 CTGGGGCGTCGGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATACCTTTACC
 GATCATGCGATTCAATTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCCAGCGTCTGGAATG
 GATGGGCTATTTTCCCCAGGCAACGATGATTTCAAGTATTCCCAGAAGTT
 CCAAGGGCGCGTGACCATTACCGCCGATAAAAGCGCAAGCACCGCGTATA
 TGGAGCTGTCCAGCCTGCGTAGCGAAGATACAGCGGTTTACTATTGCGCA
 CGGAGCTGGATTATGCAATACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAG
 CAGCTGTAAAGGATCC3'

Esta secuencia se ha subclonado en plásmidos pCOLD IV (bajo el control del promotor cspA) y pHLIC (bajo el control del promotor T7), en ambos casos entre los sitios de restricción NdeI y BamHI. Se ha demostrado la expresión de 3E8.scFv de pCOLD IV y pHLIC y 3E8.scFv.Cys de pCOLD IV y pHLIC.

Procedimiento de expresión y purificación

Los dos scFv se producen a partir de la expresión bacteriana con exportación al periplasma, purificación IMAC y escisión proteolítica de la etiqueta 6xHis (Fig. 1).

Expresión de pCOLD IV: los plásmidos resistentes a ampicilina (3E8.scFv o 3E8.scFv.Cys) se transformaron en DH10B para la expresión de choque por frío. Las células se cultivaron a 37°C en matraces con agitación 2xYT hasta DO600 = 0,7-1,0. A mediados de la fase logarítmica, los matraces se sumergieron en agua con hielo durante 10 minutos. A continuación, las células se indujeron con IPTG 0,2 mM y se movieron a 4°C durante 20 minutos. Después del choque por frío, los matraces se devolvieron al agitador y se cultivaron durante ~16 horas a 16°C.

Expresión de pHLIC: los plásmidos resistentes a ampicilina se transformaron en cepas bacterianas DE3 (expresión exitosa lograda en BL21 (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3), C43 (DE3) pLysS, T7 Express LysY (NEB), T7 Express LysY/Iq (NEB)) para la expresión de choque por frío. Las células se cultivaron a 37°C en matraces de agitación 2xYT a DO600 = ~1,0-1,5. En la fase logarítmica tardía los matraces se sumergieron en agua con hielo durante 10 minutos. A continuación, las células se indujeron con IPTG 0,05 mM y se movieron a 4°C durante 20 minutos. Después del choque por frío, los matraces se devolvieron al agitador y se cultivaron durante 16 horas aproximadamente a 16°C.

Purificación a partir de bacterias: las células se recogieron por centrifugación a 8.000 g y se resuspendieron (40 mL/1 L de cultivo) en Tris 30 mM•HCl, sacarosa al 20%, pH 8. Se aislaron esferoplastos de 1 L de cultivo mediante la adición de 30 mg de lisozima, 0,05 mg de RNasa (Pierce), 100 U de DNasa (Fisher) y MgCl₂ 2 mM. La suspensión se mezcla a 4°C con una barra de agitación magnética durante 20 minutos antes de la dilución con 80 mL de agua con hielo. La muestra diluida se agita durante otros 30 minutos a 4°C antes de la centrifugación a 8.000 g. El fragmento de anticuerpo se purifica a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Por cada litro de cultivo, se añade 1 mL de agarosa Ni-NTA al 50% (Thermo) a una columna preajustada (Bio-Rad). A continuación, se pasa el sobrenadante a través de la resina y se lava el material ligado (Tris 50 mM•HCl, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM pH 8,0) antes de la elución (Tris 50 mM•HCl, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM pH 8,0). El 6xHis-TEV-3E8.scFv se digiere durante toda la noche con la proteasa TEV marcada con 6xHis con DTT 1 mM. Después de la escisión, la muestra se dializa en fosfato de potasio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8. La etiqueta de hexahistidina y la proteasa TEV fusionada 6xHis se eliminan mediante una segunda columna de Ni-NTA. La concentración y la pureza se analizan mediante SDS-PAGE y absorbancia a 280 nm.

Purificación de 3E8.scFv.Cys: la variante de cisteína en el extremo C se purifica de forma idéntica a 3E8.scFv con las siguientes modificaciones. (1) Todas las soluciones se suplementan con TCEP 1 mM para evitar enlaces disulfuro no deseados entre los residuos de cisteína en el extremo C. (2) El 3E8.scFv.Cys se purifica conjuntamente con un

producto de degradación. Para eliminar esta proteína, el 6xHis-3E8.scFv.Cys se dializó en acetato 50 mM pH 5, NaCl 15 mM, TCEP 1 mM y se realizó cromatografía de intercambio iónico con columna Resource S (GE). La proteína se eluye con concentraciones crecientes de NaCl en acetato 50 mM pH 5, TCEP 1 mM. El scFv de longitud completa se eluye a NaCl 450 mM y se separa fácilmente del contaminante que se eluye a NaCl 600 mM. Después de la elución, las fracciones deseadas se dializan en fosfato de potasio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8 y TEV digeridas durante toda la noche. La etiqueta 6xHis y la proteasa TEV se eliminan mediante una segunda columna de Ni-NTA.

Adición de alanina adicional después del sitio de escisión de la peptidasa de señal

- 10 La purificación inicial de 3E8.scFv produjo rendimientos pobres con la mayoría del fragmento de anticuerpo que reside en la fracción insoluble. Aparentemente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 era un sustrato pobre para la peptidasa de señal. Para mejorar la reacción de escisión, se insertó un segundo codón de alanina en la secuencia de ADN. El producto de proteína resultante,
- 15 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPMAAAHHHHHGGSSGGGENLYFQGSSGDIV (SEQ ID NO: 9), aumenta la fracción de fragmento de anticuerpo soluble (liberado por membrana).

Optimización de la extracción de periplasma

- 20 La metodología de purificación referida en esta invención es el resultado de una optimización empírica que se desvía significativamente de los protocolos estándar de purificación periplásmica. El enfoque más común consiste en resuspender las células en el tampón TSE (Tris-Sacarosa-EDTA). En este protocolo, después de la incubación en TSE, las células se recogen de la fracción osmótica por centrifugación y se resuspenden en agua suplementada con magnesio. Después de la incubación en agua, la muestra se centrifuga para separar la fracción periplásmica y las células. La fracción periplásmica se dializa para eliminar el EDTA residual antes de IMAC. Este proceso genera volúmenes excesivamente grandes que complican las etapas de diálisis o requieren concentración. Además, algunas o todas las proteínas pueden perderse en la fracción osmótica. 3E8.scFv se purificó con bajo rendimiento al ejecutar este protocolo estándar.
- 30 Para mejorar el rendimiento, se optimizó el procedimiento de purificación y se cuantificó la cantidad de proteína recuperada de las fracciones osmótica y periplásmica. Se cree que la diálisis es necesaria para eliminar el EDTA residual antes de aplicar la proteína a la columna de Ni-NTA. De hecho, cuando se omitió la etapa de diálisis, la cantidad de proteína recuperada disminuyó tanto en la fracción osmótica como en la periplásmica. A continuación, se cuestionó si el EDTA mismo era necesario o no. La EDTA efectúa la quelación de cationes divalentes lo que produce desestabilización de la membrana. Cuando el procedimiento se repitió en ausencia de EDTA, la etapa de diálisis ya no era necesaria. Así, se obtuvo una recuperación incrementada en la fracción osmótica, pero se aisló material mínimo de la fracción periplásmica. A continuación, se planteó la hipótesis de que la lisozima podría desestabilizar la membrana en lugar de EDTA. Una vez más, no se requirió diálisis y se observaron mayores rendimientos en las dos fracciones. Finalmente, el protocolo de lisozima se modificó omitiendo la etapa de centrifugación y recogida entre Tris-sacarosa y agua. Así se generó proteína pura con el mayor rendimiento.

Efecto del vaso de expresión

- Las primeras preparaciones de scFv periplásmicos produjeron un crecimiento lento y una lisis celular significativa.
- 45 Para prevenir la lisis celular, el protocolo se cambió de matraces con deflector de aireación a matraces Erlenmeyer estándar y se redujo la agitación de 200 rpm a 100 rpm. Estas adaptaciones condujeron a valores DO600 más altos con una lisis mínima.

Propiedades físicas

- 50 *Estado oligomérico*

- Se informó de que el CC49 scFv de Pavlinkova (1999) es una mezcla de monómero y dímero. Se sometió a ensayo la estructura cuaternaria de los dos scFv por cromatografía de filtración de gel. 3E8.scFv tiene un peso molecular de 28 kDa, y se eluye como una sola especie con un peso molecular calculado de 25 kDa. El scFv modificado por ingeniería genética de 3E8 es monomérico sin dímero visible o formación de oligómeros superiores. CC49.scFv se eluye antes con un peso molecular calculado de 31 kDa, lo que sugiere cierto grado de despliegue/expansión. Además, el cromatograma CC49 tiene un segundo pico más pequeño con una masa molecular calculada de 64 kDa, que corresponde a cierta formación de dímero. El CC49.scFv existe como una mezcla heterogénea y puede expandirse o desplegarse ligeramente.

Estabilidad

La IgG de longitud completa y los dos scFv se analizaron para determinar su estabilidad a la agregación mediante dispersión de luz estática diferencial (DSL) y exploración térmica de alto rendimiento (HTTS). DSL mide la difracción de la luz de 600 nm con el aumento de la temperatura. A medida que las proteínas se despliegan y se añaden, los productos de precipitación difractan la luz, lo que conduce a altos valores de DO600. CC49.scFv experimenta una única transición cooperativa con Tagg = 54,0°C (temperatura a la que se añade la mitad de la proteína). Se observa una transición similar en 3E8.scFv, pero la variante diseñada es ~12°C más estable (66,0°C). El anticuerpo de longitud completa, 3E8.IgG es 21°C adicionales más estable que su contrapartida troncada. Estos resultados muestran que el 3E8.scFv es significativamente más estable a la agregación que CC49.scFv, pero más propenso a la agregación que la IgG correspondiente.

Una segunda técnica para medir la estabilidad de la proteína se basa en la unión de colorantes hidrófobos de productos intermedios desnaturalizados térmicamente (HTTS). En este caso, se informa de que los valores de THTTS (temperatura a la que se despliega la mitad de la proteína) son altamente concordantes con los valores de Tagg mostrados para los dos scFv (55,4°C - CC49.scFv y 66,0°C - 3E8.scFv). La IgG de longitud completa muestra dos transiciones desplegables: una a 66,2°C y otra a 83,6°C. La primera transición se superpone al episodio de despliegue visto para 3E8.scFv y puede describir los dominios variables de despliegue. La segunda transición, por lo tanto, corresponde al despliegue de dominios constantes. Estos datos, tomados junto con los valores de DSL, muestran que la mayor estabilidad de los dominios constantes evita que la IgG se agregue, pero tanto el scFv de 3E8 como la IgG se inactivan a 66°C. Por lo tanto, se ha producido con éxito un fragmento variable monocatenario que es sustancialmente más estable que CC49.scFv e igual a la estabilidad de 3E8.IgG.

Unión

25 *Inmunotransferencia puntual por fluorescencia*

La mucina submaxilar bovina es positiva para el epítipo TAG-72, sialil-Tn. Para analizar cualitativamente la unión, se detectó BSM en una membrana de nitrocelulosa y a continuación se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA). Los anticuerpos y fragmentos se marcaron inespecíficamente en lisinas con el éster NHS de fluoresceína, y a continuación se añadieron a las inmunotransferencias puntuales. Después de un lavado suave, se sometieron las muestras a estudio de imagen usando Phosphorimager Typhoon. El círculo más oscuro indica un resultado positivo para la unión de sialil-Tn y se observó tanto para CC49.scFv como para la variante de ingeniería de los autores, 3E8.scFv (Fig. 7A).

35 *Inmunotransferencia puntual competitiva*

Se realizó un experimento de transferencia puntual similar usando concentraciones constantes de BSM y 3E8 IgG marcado con fluoresceína. Los ensayos se realizaron con concentraciones crecientes de 3E8.scFv sin marcar. Si scFv e IgG reconocen el mismo epítipo en BSM, y la afinidad scFv es comparable a la IgG, se debería ver una disminución de la fluorescencia para concentraciones crecientes de scFv. Se realizaron dos controles negativos en paralelo. En primer lugar, la membrana de nitrocelulosa se preparó usando solo BSA para mostrar que los anticuerpos no se unen a la nitrocelulosa o BSA de forma inespecífica. En segundo lugar, se añadió fluoresceína libre a los puntos BSM para mostrar que la interacción no está mediada por el fluoróforo. Como se muestra en la Fig. 7B, la IgG 3E8 se une fuertemente hasta ~2 µM compitiendo con 3E8.scFv. Para 4 µM de scFv, aproximadamente la mitad de la IgG se desplaza y para 8 µM la inmunotransferencia puntual se parece al control negativo. Este análisis estima que 3E8.scFv se une aproximadamente de forma 16 veces más débil que 3E8.IgG y que los dos se unen al mismo epítipo. Se espera una ligera pérdida de afinidad ya que la IgG nativa es bivalente frente al scFv monovalente.

Resonancia por plasmones superficiales

Para confirmar aún más los datos de unión, se realizó una resonancia por plasmones superficiales en 3E8 IgG, CC49.scFv y 3E8.scFv (Fig. 7C). Se ha informado previamente de que la 3E8 IgG se une al epítipo sialil-Tn con una KD de ~1 nM (Yoon 2006). La 3E8 IgG preparada comercialmente se analizó mediante SPR y se determinó que la afinidad era similar, 4 ± 2 nM. CC49.scFv se une en el rango medio nanomolar con una constante de disociación de 30 ± 8 nM. 3E8.scFv se unió 2 veces con más fuerza que CC49.scFv y solo 4 veces más débilmente que la IgG bivalente. A 16 ± 4 nM, 3E8.scFv se une mejor que las variantes de CC49 IgG y scFv clínicamente probadas de CC49, y tiene propiedades biofísicas más deseables que los anticuerpos de longitud completa.

IHC

3E8.scFv se biotinó inespecíficamente (usando NHS-biotina) para investigar su candidatura a inmunohistoquímica (IHC) y validar su capacidad de unión a sialil-Tn en tejido humano. Generalmente, el anticuerpo se incubó con tejido

antes del lavado suave y la adición de un anticuerpo secundario biotinilado. A continuación, se añadió peroxidasa de rábano picante unida a estreptavidina (HRPO) al tejido en presencia de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB). La oxidación de DAB da como resultado un producto cromogénico que tiñe el tejido localizado. El fragmento se marcó directamente con biotina en las lisinas superficiales. Antes de teñir el tejido humano, se realizó con éxito una inmunotransferencia puntual de nitrocelulosa análoga a la Fig. 8A.

El colon enfermo se obtuvo de la resección quirúrgica y se embebió en parafina antes del corte. La muestra se tiñó con el kit comercial B72.3 (Biocare Medical) y 3E8.scFv. Las dos muestras tiñeron intensamente la mucina extracelular, así como las vesículas intracelulares llenas de mucina (Fig. 9). No se detectó unión inespecífica en las dos muestras de colon analizadas.

El tejido embebido en parafina se cortó a 4 μ m y las secciones se colocaron en portaobjetos cargados positivamente. Los portaobjetos se colocaron a 60°C durante una hora, se enfriaron, se desparafinaron y se rehidrataron a través de xileno y soluciones graduadas de etanol en agua. Todos los portaobjetos se inactivaron durante 5 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear la peroxidasa endógena. La recuperación del antígeno se realizó mediante la recuperación del epítipo inducido por calor (HIER), donde los portaobjetos se incubaron en una Target Retrieval Solution pH 6 (Dako) durante 25 minutos a 96°C. Los portaobjetos se tiñeron con scFv 5 μ M usando un sistema de inmunotinción Dako Autostainer a temperatura ambiente. Los portaobjetos se contratiñeron en hematoxilina de Richard-Allan, se deshidrataron a través de una solución de etanol graduada, se aclararon con xileno y se cubrieron con un cubreobjetos.

Conjugación de 3E8.scFv y 3E8.scFv.Cys

NHS-PEG

Se PEGiló 3E8.scFv inespecíficamente en lisinas de superficie usando química de éster de NHS. Se hizo reaccionar un PEG discreto con un peso molecular de 1,8 kD (Quanta BioDesign - 10910) con el fragmento de anticuerpo a un exceso molar de 0, 5x y 20x. La reacción se realizó en solución salina con tampón de fosfato durante 1 hora a temperatura ambiente antes de inactivar con etanolamina. El PEG sin reaccionar se eliminó por diálisis. También se mostró la conjugación de un PEG deuterado para detección por espectroscopia Raman o IR.

NHS-Fluoresceína

Se marcó 3E8.scFv inespecíficamente con fluoresceína en lisinas de superficie usando química de éster de NHS. Se hizo reaccionar una fluoresceína NHS (Pierce - 46410) con el fragmento de anticuerpo con un exceso molar de 20x. La reacción continuó en solución salina con tampón de fosfato durante 2 horas a 4°C. El fluoróforo sin reaccionar se eliminó por diálisis.

NHS-biotina

Se marcó 3E8.scFv inespecíficamente con biotina en lisinas de superficie usando química de éster de NHS. Se hizo reaccionar una NHS-biotina (Sigma - H1759) con el fragmento de anticuerpo con un exceso molar de 5x. La reacción continuó en solución salina con tampón de fosfato durante 1 hora a temperatura ambiente. La biotina sin reaccionar se eliminó por diálisis.

Maleimida-PEG

Se PEGiló 3E8.scFv.Cys específicamente en la cisteína en el extremo C usando química de maleimida. Se hizo reaccionar un PEG discreto con un peso molecular de 2,7 kD (Quanta BioDesign - 10931) con el fragmento de anticuerpo a un exceso molar de 20 veces. La reacción continuó en solución salina con tampón de fosfato durante 1 hora a temperatura ambiente. El PEG sin reaccionar se eliminó por diálisis.

Ejemplo 2: Mejora de la proteína terapéutica a través de la PEGilación: anticuerpos de estudio de imagen contra el cáncer

Un sistema moderno de imágenes de cáncer, la cirugía radioinmunoguiada (RIGS), usa anticuerpos marcados con radionúclidos que se unen a un epítipo presente solo en ciertas células cancerosas. Los estudios sobre la unión covalente de las moléculas de polietilenglicol (PEG) a las proteínas indican que la PEGilación puede mejorar la efectividad terapéutica. En esta invención se describen los efectos de la PEGilación (usando diferentes tipos de PEG) con el objetivo final de mejorar 3E8.scFv como un anticuerpo RIGS. En esta invención se describe lo que hacen realmente los PEG en la proteína a la que están unidos. Se examina la diferenciación entre dos modelos, interacción PEG-proteína: perlas similares a polímeros cerca del punto de unión frente a la envoltura alrededor del hilo similar a

la proteína. Se usa una proteína modelo (lisozima T4, T4L) para observar el comportamiento general de las proteínas PEGiladas y para comparar los diferentes tipos de PEG. Se analiza un análisis de los efectos de la PEGilación con electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (PAGE) y un ensayo de actividad de lisozima. El dicroísmo circular se usa para hacer un análisis en profundidad y medir el plegamiento; cromatografía de filtración de gel para medir el tamaño; dispersión de luz estática diferencial y escaneo térmico de alto rendimiento para medir la estabilidad; y ultracentrifugación analítica y dispersión de rayos X de ángulo pequeño para medir el tamaño/forma.

Se ha desarrollado un procedimiento de PEGilación que une los PEG activados a T4L o 3E8.scFv. El análisis SDS-PAGE indica proteínas con números enteros de PEG unidos. La actividad de T4L y la unión de 3E8.scFv (PEGilada y no PEGilada) se ha evaluado usando un ensayo de actividad basado en fluorescencia y resonancia por plasmones superficiales y ensayos de unión de inmunohistoquímica, respectivamente.

Las aplicaciones clínicas de RIGS incluyen que RIGS se puede realizar durante la cirugía, eliminando horas de imágenes preoperatorias y postoperatorias. Además, se puede ajustar la semivida en suero de las proteínas PEGiladas cambiando la cantidad de PEGilación. También se puede ajustar la semivida del radionúclido para que coincida con la semivida del anticuerpo.

La imagenología tradicional del cáncer incluye TC y TEP, y no es muy sensible o específica. La imagenología moderna del cáncer usa la cirugía radioinmunoguiada (RIGS), que usa anticuerpos radiomarcados generados contra un disacárido (sialil-TN) presente en la glucoproteína asociada al tumor (TAG-72) que está presente en la superficie de muchas células cancerosas. Es muy sensible y muy específico. El anticuerpo usado actualmente es CC49. 3E8 es un buen ligante, y puede modificarse en un fragmento variable monocatenario (scFv) como se describe en esta invención.

Se ha demostrado que unir los PEG a las proteínas puede mejorar las propiedades terapéuticas de la proteína. Se puede unir a proteínas (como la proteína modelo, llamada T4L), en los residuos de lisina usando la química del éster de NHS; en residuos de cisteína usando química de maleimida. Cuando se unen a las proteínas, los PEG: no son inmunogénicos, disminuyen la agregación y la proteólisis, y aumentan la semivida en suero.

Los PEG existen como mezclas polidispersas de moléculas, moléculas discretas (homogéneas) (dPEG de Quanta Biodesign) y moléculas lineales y ramificadas, así como moléculas neutras y cargadas. 3E8.scFv es un monómero correctamente plegado. Es tan estable como el dominio de unión de 3E8.IgG. Tiene un $K_D = 16,4 \text{ nM}$ y se une correctamente. El 3E8.scFv PEGilado también se une al tejido correcto. T4L PEGilado puede ser PEGilado con números enteros de PEG en residuos de lisina.

Ejemplo 3: Diseño y caracterización biofísica de un fragmento de anticuerpo variable monocatenario estabilizado que se une a la glucoproteína-72 asociada al tumor Resultados

Construcción y purificación

Se descubrió un agente de detección y estudio de imagen para adenocarcinomas que expresan el epítipo TAG-72, sialil-Tn. En esta invención se describe un scFv inspirado en 3E8 con secuencias enlazadoras cuidadosamente seleccionadas y protocolos mejorados de expresión y purificación. El dominio ligero variable (VL) se fusiona con el dominio pesado variable (VH) mediante la secuencia enlazadora 205C (Denzin 1991). El scFv se produce como una fusión de hexahistidina escindible y se transfiere al periplasma para mejorar el plegamiento (Fig. 18). Finalmente, el gen de longitud completa se subclona en el vector de expresión pCOLD para usar el sistema de chaperona de choque por frío (Takara Bio, Inc.).

Los scFv se purifican a partir de la fracción periplásmica mediante digestión con lisozima y choque osmótico. Se prefiere el protocolo modificado a los procedimientos estándar por su falta de grandes volúmenes, eliminación de etapas de diálisis y compatibilidad con la purificación de Ni-NTA. Se ha demostrado que el EDTA desestabiliza la membrana mediante la quelación de calcio divalente, pero debe eliminarse antes de la unión del níquel (Prachayasittkul 2007). En cambio, la membrana externa se ve perturbada por una digestión de lisozima leve. Después del choque osmótico, la fracción periplásmica puede unirse directamente a la agarosa Ni-NTA y purificarse por medios estándar. La adición de la proteasa TEV y un segundo paso de IMAC produce fragmentos variables monocatenarios nativos.

En condiciones de choque por frío, los autores de la invención pueden expresar y purificar $>2 \text{ mg L}^{-1}$ de 3E8.scFv en matraces de agitación, con la capacidad de aumentar la producción a través de la fermentación. También construyen CC49.scFv referidos en la bibliografía como un control que en las mismas condiciones produce $\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$ (Pavlinkova 1999).

Estructura

- Las IgG de longitud completa consisten en cuatro cadenas de polipéptidos que incluyen dos cadenas pesadas (~50 kDa) y dos cadenas ligeras (~ 25 kDa). Las dos cadenas pesadas interaccionan entre sí y con la cadena ligera a través de contactos no covalentes y enlaces disulfuro. La unión al antígeno se logra usando los bucles variables en los dominios en el extremo N de las cadenas pesada y ligera, que pertenecen al pliegue de inmunoglobulina. Un pliegue de inmunoglobulina se compone de 7-9 cadenas β antiparalelas (Bork 1994). Estas estructuras secundarias forman dos láminas β con arquitectura de clave griega. Para estabilizar la interacción V_H y V_L en scFv, se usa un enlazador de aminoácidos para conectar el extremo C del dominio V_L al extremo N del dominio V_H . Para evaluar las características estructurales generales de 3E8.scFv y CC49.scFv se realizó difracción circular (CD) (Fig. 20a). CC49.scFv tiene los mínimos esperados alrededor de 215-220 nm para las cadenas β . 3E8.scFv tiene un espectro de forma similar, pero también muestra un pico positivo grande alrededor de 205 nm consistente con dominios de inmunoglobulina. Se predice que el enlazador 205C posee cierta estructura en espiral que puede conducir una señal mejorada a 222 nm.
- 15 A continuación, se sometió a ensayo la estructura cuaternaria de los dos scFv por filtración de gel. 3E8.scFv tiene un peso molecular de 28 kDa, y se eluye como una sola especie con un peso molecular calculado de 25 kDa (Fig. 20b). El scFv modificado por ingeniería genética de 3E8 es monomérico sin formación visible de dímeros o trímeros, ni agregación. CC49.scFv se eluye antes con un peso molecular calculado de 31 kDa, que es 3 kDa mayor que la masa predicha que muestra cierto grado de despliegue o expansión.

20

Unión

- La regulación ascendente de los genes metabólicos en las células cancerosas conduce a un aumento en la presentación de disacáridos sialil-Tn en la mucina (Kjeldsen 1988). Las moléculas dirigidas a este epítipo proporcionan un medio potente para distinguir tejidos cancerosos y sanos. La mucina submaxilar bovina es positiva para el epítipo TAG-72, sialil-Tn. Para analizar cualitativamente la unión, se detectó BSM en una membrana de nitrocelulosa y a continuación se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA). Los anticuerpos y fragmentos se marcaron inespecíficamente en lisinas con fluoresceína, y a continuación se añadieron a las inmunotransferencias puntuales. Después de un lavado suave, se sometieron las muestras a estudio de imagen usando Phosphorimager Typhoon. El círculo más oscuro indica un resultado positivo para la unión de sialil-Tn y se observó tanto para el control positivo, CC49.scFv, como para la variante de ingeniería de los autores, 3E8.scFv (Fig. 7a).

- A continuación, se llevó a cabo un experimento similar de inmunotransferencia puntual usando concentraciones constantes de BSM y 3E8.IgG marcado por fluorescencia. Los ensayos se realizaron con concentraciones crecientes de 3E8.scFv sin marcar. Si scFv e IgG reconocen el mismo epítipo en BSM, y la afinidad scFv es comparable a la IgG, se debería ver una disminución de la fluorescencia para concentraciones crecientes de scFv. Se realizaron dos controles negativos en paralelo. En primer lugar, la membrana de nitrocelulosa se preparó usando solo BSA para mostrar que los anticuerpos no se unen a la nitrocelulosa o BSA de forma inespecífica. En segundo lugar, se añadió fluoresceína libre a los puntos BSM para mostrar que la interacción no está mediada por el fluoróforo. Como se muestra en la Fig. 7b, la 3E8.IgG se une fuertemente hasta ~2 μ M compitiendo con 3E8.scFv. Para 4 μ M de scFv, aproximadamente la mitad de la IgG se desplaza y para 8 μ M la inmunotransferencia puntual se parece al control negativo. Este análisis estima que 3E8.scFv se une aproximadamente de forma 16 veces más débil que 3E8.IgG y que los dos se unen al mismo epítipo. Se espera una ligera pérdida de afinidad ya que la IgG nativa es bivalente frente al scFv monovalente.

45

- Para confirmar aún más los datos de unión, se realizó una resonancia por plasmones superficiales en 3E8.IgG, CC49.scFv y 3E8.scFv (Fig. 7c). Se ha referido anteriormente que el 3E8.IgG une el epítipo sialil-Tn con una K_d de ~1 nM⁷. Se analizó 3E8.IgG por SPR y se determinó que la afinidad era similar, 4 ± 2 nM. A continuación, se midió la afinidad del scFv de CC49. CC49.scFv se une en el rango nanomolar medio con una constante de disociación de 30 ± 8 nM. Finalmente, SPR se realizó en 3E8.scFv y se encontró que se unía 2 veces mejor que CC49.scFv y solo 4 veces más débil que la IgG bivalente. A 16 ± 4 nM, 3E8.scFv se une mejor que las variantes de CC49 IgG y scFv clínicamente probadas de CC49, y tiene propiedades biofísicas más deseables que los anticuerpos de longitud completa.

55 Inmunohistoquímica

- El fragmento variable monocatenario de 3E8 se biotiniló inespecíficamente para investigar su candidatura para inmunohistoquímica (IHC), y para validar su capacidad de unirse a sialil-Tn en tejido humano. Generalmente, el anticuerpo se incubó con tejido antes del lavado suave y la adición de un anticuerpo secundario biotinilado. A continuación, se añadió peroxidasa de rábano picante unida a estreptavidina (HRPO) al tejido en presencia de tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (Dab). La oxidación de Dab da como resultado un producto cromogénico que tiñe el tejido localizado. Debido a que el scFv carece del dominio constante donde se une el anticuerpo secundario,

el fragmento se marcó directamente con biotina en las lisinas superficiales. Antes de teñir el tejido humano, se realizó con éxito una inmunotransferencia puntual de nitrocelulosa.

- 5 El colon enfermo se obtuvo de la resección quirúrgica y se embebió en parafina antes del corte. La muestra se tiñó con el kit comercial B72.3 y 3E8.scFv. Las dos muestras tiñeron intensamente la mucina extracelular, así como las vesículas intracelulares llenas de mucina (Fig. 9).

Estabilidad

- 10 El objetivo fue diseñar un fragmento variable monocatenario con mayor estabilidad y resistencia a la agregación. La IgG de longitud completa y los dos scFv se analizaron para determinar la estabilidad mediante dispersión de luz estática diferencial (DSL) (Senisterra 2009) y exploración térmica de alto rendimiento (HTTS) (Lavinder 2009). DSL mide la difracción de la luz de 600 nm con el aumento de la temperatura (Fig. 6a). A medida que las proteínas se despliegan y se añaden, los productos de precipitación difractan la luz, lo que conduce a altos valores de DO_{600} .
- 15 CC49.scFv experimenta una única transición cooperativa con $T_{agg} = 54,0^{\circ}C$ (temperatura a la que se añade la mitad de la proteína). Se observa una transición similar en 3E8.scFv, pero la variante diseñada es $\sim 12^{\circ}C$ más estable ($66,0^{\circ}C$). El anticuerpo de longitud completa, 3E8.IgG es $21^{\circ}C$ adicionales más estable que su contrapartida truncada. Estos resultados solo muestran que el 3E8.scFv es significativamente más estable que CC49.scFv.
- 20 Una segunda técnica para medir la estabilidad de la proteína se basa en la unión de colorante hidrófobo de productos intermedios desnaturalizados térmicamente (HTTS). En este caso, se informa de que los valores de T_{HTTS} (temperatura a la que se despliega la mitad de la proteína) son altamente concordantes con los valores de T_{agg} mostrados para los dos scFv ($55,4^{\circ}C$ - CC49.scFv y $66,0^{\circ}C$ - 3E8.IgG). La IgG de longitud completa muestra dos transiciones desplegables: una a $66,2^{\circ}C$ y otra a $83,6^{\circ}C$ (Fig. 6b). La primera transición se superpone al episodio de despliegue visto para 3E8.scFv y puede describir los dominios variables de despliegue. La segunda transición, por lo tanto,
- 25 corresponde al despliegue de dominios constantes. Estos datos, tomados junto con los valores de DSL, muestran que la mayor estabilidad de los dominios constantes evita que la IgG se agregue, pero tanto el scFv de 3E8 como la IgG se inactivan a $66^{\circ}C$. Por lo tanto, se ha producido con éxito un fragmento variable monocatenario que es sustancialmente más estable que CC49.scFv e igual a la estabilidad de 3E8.IgG.

30

Materiales y procedimientos

Diseño y construcción

- 35 Los genes scFv se diseñaron como fusiones V_L -enlazador- V_H . Los genes codifican la secuencia líder de PelB para el tráfico periplásmico, una etiqueta de hexahistidina para la purificación y el sitio de reconocimiento de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) para eliminar la etiqueta de purificación. Los genes de ADN de longitud completa se encargaron a Genewiz, Inc. (South Plainfield, NJ) y se subclonaron en pCOLD IV (Takara Bio, Japón). El anticuerpo monoclonal, 3E8.IgG fue recibido como un regalo de Enlyton, Ltd. (Columbus, OH).

40

Expresión y purificación de proteínas

- Los plásmidos resistentes a la ampicilina se transformaron en DH10 β para expresión por choque por frío. Las células se cultivaron a $37^{\circ}C$ en matraces de agitación 2xYT a $DO_{600} = \sim 0,7$. En la fase logarítmica media los matraces se
- 45 sumergieron en agua con hielo durante 10 minutos. A continuación, las células se indujeron con IPTG 0,3 mM y se movieron a $4^{\circ}C$ durante 30 minutos. Después del choque por frío, los matraces se devolvieron al agitador y se cultivaron durante ~ 16 horas a $16^{\circ}C$.

- Se recogieron las células por centrifugación a 8.000 g y se resuspendieron (40 mL/1 L de cultivo) en Tris 30 mM•HCl, sacarosa al 20%, pH 8. Se generaron esferoplastos de 1 L de cultivo mediante la adición de 30 mg de lisozima, 0,05 mg de RNasa (Pierce), 100 Unidades de DNasa (Fisher) y $MgCl_2$ 1,5 mM. Se mezcló la suspensión a $4^{\circ}C$ con una barra de agitación magnética durante 30 minutos antes de la dilución con 160 mL de agua enfriada con hielo. Se agitó la muestra diluida durante otros 30 minutos a $4^{\circ}C$ antes de la centrifugación a 8.000 g. El sobrenadante se decantó y se preparó para la unión de Ni-NTA añadiendo 4 mL de imidazol 0,5 M y 1 mL de agarosa Ni-NTA (Qiagen) al 50%.
- 55 Después de 1 hora de unión de níquel a $4^{\circ}C$, la fracción periplásmica se vertió en una columna presinterizada (Bio-Rad) y se lavó (Tris 50 mM•HCl, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM pH 8,0) antes de la elución (Tris 50 mM•HCl, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM pH 8,0). Se digirieron los 6xHis-TEV-scFv durante toda la noche con 6xHis-TEV proteasa con DDT 5 mM. Después de escisión, se dializó la muestra en fosfato de potasio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8. Se eliminó la etiqueta de hexahistidina y 6xHis-TEV mediante una segunda columna de Ni-NTA. Se sometieron a ensayo
- 60 la concentración y la pureza de las proteínas mediante SDS-PAGE y absorbancia a 280 nm.

Dicroísmo celular

Los espectros se registraron en un espectrómetro Jasco J-185 en proteína 10 μM en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 μM , tensioactivo P20 al 0,005% (GE Healthcare). Los análisis de longitud de onda se recogieron por triplicado de 190 a 275 nm con una integración de 2 segundos a 100 nm min^{-1} de velocidad de exploración. Se descartaron los datos recogidos con una tensión HT superior a 600 V.

Filtración de gel

La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó en un Purificador AKTA de GE Pharmacia. Se inyectaron fragmentos de anticuerpos a 10 μM y se eluyeron a partir de una columna Superdex 75 10/300 (GE Amersham) con Tris 50 mM•HCl, NaCl 100 mM, pH 8 a 0,4 mL min^{-1} . Los pesos moleculares para scFv se calcularon basándose en ajustes de estándares conocidos: aprotinina (6,5 kDa-14,6 mL), citocromo c (12,5 kDa-12,9 mL), anhidrasa carbónica (29,0 kDa-11,21 mL) y albúmina de suero bovino (66,5 kDa- 9,2 mL).

15 *Estabilidad*

La estabilidad del anticuerpo de longitud completa y scFv se determinó mediante exploración térmica de alto rendimiento (HTTS). En este caso, se incubó proteína 5 μM con 5x de colorante SYPRO Orange (Invitrogen). Las masas fundidas se analizaron usando un ciclador térmico Bio-Rad C1000 con una velocidad de rampa de 1°C min^{-1} a intervalos de 0,2°C. Los datos se exportaron a Microsoft Excel 2010. Los T_{RTTS} se calcularon como la temperatura con la pendiente máxima determinada a partir de una ventana de 5°C alrededor de cada punto.

La temperatura de agregación se analizó mediante dispersión de luz estática diferencial (DSLS) usando la característica de absorbancia del espectrómetro Jasco J-185 para proteína 10 μM en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 μM , tensioactivo P20 al 0,005% (GE Healthcare). Los datos se recogieron en etapas de 1°C con 6 segundos de equilibrio de temperatura, 1°C min^{-1} de rampa y 2 segundos de integración. Todas las fusiones se exportaron a Microsoft Excel 2010. Los T_{Agg} se calcularon como la temperatura con la pendiente máxima determinada a partir de una ventana de 5°C alrededor de cada punto.

30 *Marcado*

El anticuerpo y los fragmentos se marcaron inespecíficamente en lisinas superficiales con un exceso 20 molar de NHS-fluoresceína (53209-Pierce). El marcado se confirmó con un fluorímetro Olis DM-45P. ScFv se marcó en lisinas expuestas a la superficie con un exceso 3 molar de NHS-biotina (H1759-Sigma). El exceso de reactivo de marcado se eliminó por diálisis en fosfato de potasio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.

Unión

La unión cualitativa a sialil-Tn se sometió a ensayo mediante inmunotransferencia puntual. Primero, se detectaron 2 μL de 5 mg mL^{-1} de mucina submaxilar bovina (M3895-Sigma) en una membrana de nitrocelulosa. La membrana se dejó secar durante toda la noche antes de bloquear con 5 mg mL^{-1} de BSA. Después de la incubación durante toda la noche, se eliminó el exceso de BSA mediante lavado antes de la adición de scFv marcados con fluoresceína. Los scFv se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente antes del lavado. Se observó fluorescencia usando un Phosphorimager Typhoon con excitación a 488 nm.

Se sometió a ensayo la unión del epítipo del 3E8.scFv por su capacidad para inhibir la unión del 3E8.IgG. En este caso, 0,25 μM de 3E8.IgG marcado compitieron con concentraciones crecientes de 3E8.scFv no marcado (0 a 8 μM). Se observó la pérdida de fluorescencia usando el Phosphorimager Typhoon con excitación de 488 nm.

Los parámetros de unión se evaluaron usando resonancia por plasmones superficiales (SPR). BSM se inmovilizó en un chip sensor de dextrano CM5 usando el kit de acoplamiento de amina de GE Pharmacia (BR-1000-50). Las condiciones de exploración fueron 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BSM en acetato de sodio 100 mM, pH 4 para el canal 2, y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BSA en acetato de sodio 100 mM, pH 4 para el canal 1. El protocolo de inmovilización continuó hasta que se obtuvieron 700 RU. La unión se midió como 2-1. El anticuerpo y los fragmentos se dializaron en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 μM , tensioactivo P20 al 0,005% (GE Healthcare) y se analizaron de 0-400 nM. Las muestras se unieron durante 120 segundos a 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ y se midió la disociación durante 180 segundos. El chip CM5 se regeneró entre ensayos con guanidina 6 M y ácido acético 200 mM sin pérdida de actividad. Los parámetros de unión promedio se evaluaron usando el software de BIAevaluation.

60 *Inmunohistoquímica*

El tejido embebido en parafina se cortó en 4 μm y las secciones se colocaron en portaobjetos con carga positiva. Los

portaobjetos se colocaron a 60°C durante una hora, se enfriaron, se desparafinaron y se rehidrataron a través de xileno y soluciones graduadas de etanol en agua. Todos los portaobjetos se inactivaron durante 5 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear la peroxidasa endógena. La recuperación del antígeno se realizó mediante la recuperación del epítipo inducido por calor (HIER), donde los portaobjetos se incubaron en una Target Retrieval Solution pH 6 (Dako) durante 25 minutos a 96°C. Los portaobjetos se tiñeron con scFv 5 µM usando un sistema de inmunotinción Dako Autostainer a temperatura ambiente. Los portaobjetos se contratiñeron en hematoxilina de Richard-Allan, se deshidrataron a través de una solución de etanol graduada, se aclararon con xileno y se cubrieron con un cubreobjetos.

10 Ejemplo 4: Fragmentos variables monocatenarios de 3E8, PEGilación y conjugación a 3E8cys.scFv

Diseño y clonación de fragmentos de anticuerpos

Un fragmento variable monocatenario (scFv) de primera generación basado en el anticuerpo humanizado optimizado por afinidad, 3E8 (Yoon 2006). Se ha referido que el anticuerpo original se une al epítipo sialil-Tn que se encuentra en la glucoproteína-72 asociada a tumor (TAG-72) con una constante de disociación en el intervalo de 5-10 nM (Thor 1986; Thor 1987; Muraro 1988; Colcher 1988). Los fragmentos scFv son fusiones monoméricas y dimericas, respectivamente, de los dominios de unión del anticuerpo, y tienen pesos moleculares en el intervalo de 25 y 50 kD, respectivamente (Bird 1988; Kortt 2001). A diferencia de los fragmentos de IgG y Fab de longitud completa, estos fragmentos más pequeños se pueden expresar en bacterias (Sandhu 1992; Pini 2000).

Los dominios variables de 3E8 se conectaron mediante el enlazador 205C con la siguiente orientación: V_L-205C-V_H (Denzin, 1991). La secuencia se agregó con la secuencia líder de PelB para dirigir la proteína hacia el periplasma de *E. coli*, una etiqueta de hexahistidina para la purificación y el sitio de proteasa TEV para la posterior eliminación de la etiqueta de hexahistidina. El marco de lectura abierto de longitud completa se clonó en el plásmido pHLIC para sobreexpresión (Durani 2012). Se generó una segunda construcción, 3E8cys.scFv, por PCR de la construcción original con cebadores mutagénicos. Esta variante coloca una única cisteína en el extremo C de 3E8.scFv para permitir la PEGilación específica del sitio mediante la química de maleimida. Las dos construcciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

Expresión y purificación de fragmentos de anticuerpos

Las construcciones se transformaron en *Escherichia coli* C43 (DE3) para la sobreexpresión bajo el promotor T7 (Miroux 1996). Los cultivos se cultivaron a 37°C hasta DO₆₀₀=1,0 antes del choque por frío y la inducción con IPTG 0,05 mM. Las células continuaron expresando proteínas durante toda la noche a 16°C. A la mañana siguiente, las células fueron cosechadas, resuspendidas y lisadas por un Avestin Emulsiflex. La fracción soluble se recuperó por centrifugación y se purificó por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). Las etiquetas de hexahistidina se escindieron mediante la proteasa TEV y se purificaron adicionalmente mediante una segunda etapa IMAC (Fig. 20), con una pureza superior al 90%. Se requirió una columna de intercambio iónico adicional para purificar 3E8cys.scFv hasta casi la homogeneidad debido a la presencia de lo que parece ser un contaminante proteolítico. En este caso, una columna de intercambio catiónico Resource S separó el producto deseado del contaminante de 17 kD (Fig. 4). En estas condiciones, se purificaron ~2 mg L⁻¹ de cada variante scFv, y se han generado >10 mg de una sola purificación de material de 6 L de medio en matraces de agitación.

45 Selección de PEG y conjugación

Se ha demostrado que la PEGilación aumenta la semivida en suero de los fragmentos de anticuerpos al elevar el radio hidrodinámico de la molécula, disminuyendo la filtración renal (Chen 2011; Veronese 2008). Además, se ha referido que la PEGilación disminuye la proteólisis, la inmunogenicidad y la agregación. Los PEG pueden unirse a proteínas en lisinas y cisteínas a través de PEG activados con éster de NHS o maleimida, respectivamente. El modelado en bruto de 3E8.scFv revela cuatro lisinas dentro de las CDR responsables de la unión al antígeno (Fig. 23A). Se diseñó 3E8cys.scFv, que añade una cisteína en el extremo C. Se espera que esta cisteína sea el único tiol libre dentro del fragmento de anticuerpo, permitiendo la PEGilación específica del sitio del scFv en un sitio distal a la superficie de interacción con el antígeno.

Se eligió PEGilato 3E8cys.scFv para PEGilación con los PEG 10484 y 11451 de Quanta BioDesign. Los dos PEG son discretos, lo que significa que cada molécula tiene un número exacto de unidades de polímero repetidas ((-CH₂-CH₂-O)_n), a diferencia de los PEG polidispersos que contienen una distribución de números de unidades monoméricas. El primer PEG (10484) tiene un peso molecular de exactamente 8.323,78 Da. Es un PEG neutro con tres brazos grandes, cada uno con tres ramas más. El segundo PEG (11451) tiene un peso molecular de exactamente 4.473,17 Da. Tiene tres ramas, cada una de las cuales termina en un ácido carboxílico cargado negativamente. Para explorar los efectos de PEG aún más grandes, se obtuvieron PEG de 40 kD lineales y en forma de Y (ramificados) de JenKem Technology

USA. Estos PEG grandes son polidispersos, pero el índice de polidispersidad para estas moléculas es 1,03, lo que significa que las moléculas de PEG tienen masas estrechamente distribuidas alrededor de 40.000 Da. Todos los PEG se activaron con grupos funcionales maleimida (figura 24 y Tabla 1).

5

Tabla 1:

	Masa (kD)	Tipo	Forma	Carga
10.484	8,3	discreto	múltiples ramas	neutro
11.451	4,5	discreto	ramificado	-3
40-L	~40	polidisperso	lineal	neutro
40-Y	~40	polidisperso	ramificado (forma de Y)	neutro

Las muestras de proteínas se dializaron en solución salina con tampón de fosfato (PBS) con TCEP 1 mM para mantener las cisteínas en el extremo C reducidas para la PEGilación. Las reacciones avanzaron hasta cerca de la finalización durante toda la noche en presencia de ~50 veces de exceso molar de PEG. El PEG sin reaccionar y el 3E8cys.scFv sin modificar se eliminaron por cromatografía de intercambio iónico seguido de diálisis en PBS. Se generaron entre 150-350 µg de cada compuesto.

15 Unión de 3E8.scFv y fragmentos de anticuerpos PEGilados

Los fragmentos de anticuerpos purificados se analizaron para determinar la unión a la mucina submaxilar bovina inmovilizada (BSM), que es positiva para el epítipo Sialil-Tn, por resonancia por plasmones superficiales (SPR) (Goel 2000). A partir de estos datos, se puede determinar la velocidad de asociación (k_a), la velocidad de disociación (k_d) y la constante de disociación de equilibrio (K_D).

El scFv de 3E8 se une al epítipo Sialil-Tn con baja afinidad nanomolar (12 nM). De hecho, el scFv se une casi tan bien como la IgG bivalente (4 nM). Las tres construcciones no PEGiladas se unen mejor al antígeno que la CC49 IgG investigada clínicamente (~30 nM)¹⁵. 3E8cys.scFv muestra una afinidad de unión aparente ligeramente inferior (K_D 3 veces mayor), pero a la par con CC49. La unión de 3E8cys.scFv se mejora ligeramente cuando se PEGila con 10484 y 11451; cuando se PEGila con los PEG de 40 kD más grandes, la unión no se altera.

Además, la unión de estas moléculas ha sido validada por inmunotransferencias puntuales contra la mucina submaxilar bovina (Fig. 25). En este caso, el papel de nitrocelulosa se detecta con mucina (positivo para TAG-72) y se bloquea con BSA. Las proteínas están marcadas con biotina para unirse a la estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) y la química del desarrollo de HRP. Un color marrón indica la localización del fragmento de anticuerpo para TAG-72.

Se ha demostrado la capacidad de 3E8.scFv para atacar el tejido canceroso mediante tinción inmunohistoquímica (IHC) del tejido del colon. En este caso, el tejido resecado se adquirió de un paciente con cáncer de colon avanzado. El tejido embebido en parafina se cortó a 4 µm y las secciones se colocaron en portaobjetos cargados positivamente. 3E8.scFv se marcó de forma inespecífica en lisinas con NHS-biotina y se aplicó al tejido con un sistema de inmunotinción Dako. A continuación, se añade al tejido HRP unida a estreptavidina en presencia de DAB. La oxidación de DAB por HRP da como resultado un producto coloreado que tiñe el tejido marrón localizado. La figura 9 muestra la tinción intensa de la mucina extracelular cancerosa, así como las vesículas intracelulares que contienen TAG-72. El scFv de 3E8 se dirigió a los mismos sitios que B72.3 de uso clínico.

Estabilidad de fragmentos de anticuerpos

Los fragmentos de anticuerpos con mayor estabilidad pueden tener propiedades farmacocinéticas más favorables y resistir la agregación. Los 3E8.IgG y scFv de longitud completa basados en 3E8 y CC49 se analizaron para determinar la estabilidad mediante dispersión de luz estática diferencial (DSL) y fluorimetría de barrido diferencial (DSF/HTTS) (Senisterra 2009; Lavinder 2009). DSL mide la dispersión de la luz de 600 nm con el aumento de la temperatura (Fig. 10a), que está relacionado con la agregación. CC49.scFv experimenta una única transición cooperativa con $T_{agg} = 54,0^\circ\text{C}$ (temperatura a la que se añade la mitad de la proteína). Se observa una transición similar en 3E8.scFv, pero la variante diseñada es ~12°C más estable (66,0°C). El anticuerpo de longitud completa, 3E8.IgG es 21°C adicionales más estable que su contrapartida truncada. Estos resultados solo muestran que el 3E8.scFv es significativamente más estable que CC49.scFv.

Una segunda técnica para medir la estabilidad de la proteína se basa en la unión de colorante hidrófobo de productos intermedios desnaturalizados térmicamente (DSF/HTTS). En este caso, se informa de los valores de T_{DSF} (temperatura a la que la mitad de la proteína se ha desplegado) que son altamente concordantes con los valores de T_{agg} mostrados para los dos scFv (55,4°C-CC49.scFv y 66,0°C-3E8.scFv). La IgG de longitud completa muestra dos transiciones desplegables: una a 66,2°C y otra a 83,6°C (Fig. 10b). La primera transición se superpone al episodio de despliegue visto para 3E8.scFv y por tanto describe probablemente los dominios variables de despliegue. La segunda transición, por lo tanto, correspondería al despliegue de dominios constantes. Estos datos, tomados junto con los valores de DSLS, muestran que la mayor estabilidad de los dominios constantes evita que la IgG se agregue, pero tanto el scFv de 3E8 como la IgG se inactivan a 66°C. Por lo tanto, se ha producido un fragmento variable monocatenario que es sustancialmente más estable que CC49.scFv e igual a la estabilidad funcional de 3E8.IgG.

Radiomarcado y propiedades farmacocinéticas

Los fragmentos de anticuerpos se radiomarcaron primero mediante el procedimiento estándar de Iodogen (Bailey 1996; Paus 1982). El yodo radiactivo libre se separó del anticuerpo marcado mediante cromatografía de exclusión por tamaño y las fracciones con la mayor radiactividad se usaron para curvas de sangre animal.

Radiomarcado

En un experimento típico de radiomarcado, se transfirieron ~50 - 100 µg de proteína a un tubo de Iodogen (Pierce, Rockford, IL) que contenía 100 µL de tampón de fosfato (0,1 M, pH 7,4) seguido de la adición de cantidades conocidas de ^{125}I Na (Perkin Elmer, Waltham MA) o ^{123}I Na (Nordion, Ottawa, Ontario, Canadá) en NaOH 0,02 M. A continuación, se añadieron a la mezcla 50 µE adicionales de tampón de fosfato (0,1 M, pH 7,4), se cubrió con parafilm y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 a 45 minutos con agitación ocasional. La proteína marcada se cargó en una columna de exclusión por tamaño Sephadex G-25 (PD-10) y se eluyó con solución salina con tampón de fosfato (PBS) para separar la proteína marcada de la libre. $^{125}\text{I}/^{123}\text{I}$. Se recogieron varias fracciones, que contenían aproximadamente 10 gotas, y las fracciones que contenían la mayor radiactividad se recogieron y agruparon en un vial de plástico pesado previamente.

La cantidad de radiactividad se determinó usando un calibrador de dosis. El porcentaje de rendimiento del radiomarcado se calculó dividiendo la radiactividad total de las muestras agrupadas por la cantidad de radiactividad añadida al tubo de Iodogen. La pureza de las muestras se determinó mediante tiras de cromatografía de capa fina (TLC) (Whatman) eluidas con mezcla de metanol al 85%: agua al 15%. La proteína ligada no migró y el yoduro no unido se movió al frente del solvente.

Biodistribución y farmacocinética

Las moléculas CC49 ^{124}I -Fab'-dPEG se estudiaron usando estructuras dPEG similares o idénticas a las usadas en este estudio actual. Se usaron los mismos tumores (LS-174T) y el mismo objetivo TAG-72. En el estudio Fab'-dPEG de 4 moléculas diferentes, se midieron las curvas de depuración sanguínea de 1 a 24 horas y se sometió todo el cuerpo a estudio de imagen microTEP/TC. Se encontró una correlación sólida entre la radiactividad de la sangre a las 5 y 24 horas y la intensidad del tumor en estudios de imagen microTEP/TC a las 5 y 24 horas después de la administración (Fig. 25). Estos puntos temporales (5 y 24 horas) son tiempos de estudio de imagen de ^{123}I -SPECT/TC. Las curvas de sangre de ratón de 1 a 24 horas fueron, por lo tanto, buenos indicadores cuantitativos de la captación y retención tumoral temprana. Los datos completos de biodistribución de tejidos se recogen a las 24 horas.

Para evaluar el aclaramiento de la sangre, a las 0,5, 1, 3, 6 y 24 h, se anestesió a los ratones con isoflurano y se esterilizó la piel de las patas con una almohadilla de etanol al 70%. Se puncionó la vena safena con una aguja de jeringa 25G y se recogieron 5-10 µL de sangre usando un tubo capilar. La radiactividad de las muestras de sangre se contó usando el contador gamma Wiz II y se calculó %ID/g usando los mismos procedimientos mencionados anteriormente. Se usó un factor de sangre de 78 mL/kg para calcular el %ID de cada ratón según el peso individual del ratón. Se determinó el valor medio de %ID para cada grupo de dosis en cada punto temporal.

Los ratones fueron sacrificados después del punto temporal de 24 h. Se disecaron órganos y tejidos, incluidos corazón, pulmones, bazo, hígado, riñones, páncreas, aparato gastrointestinal (GI), músculo, piel, sangre, cola y carcasa. A continuación, se pesaron los órganos y tejidos, y se contó la radiactividad usando un contador gamma (Perkin Elmer Wizard II, Modelo 2480, Waltham, MA).

Se ha demostrado así que 3E8.scFv puede ajustarse desde semividas en suero muy cortas a muy largas modulando la longitud y el tipo de polímero PEG.

Resultados farmacocinéticos

Inclusión de un PEG lineal de 30 kD

El scFv no modificado se filtró rápidamente, y la conjugación a 11.451 y 10.484 no extendió la semivida en suero del
 5 fragmento de anticuerpo de 25 kD. Se estudiaron dos conjugados de 40 kD que aumentan la masa total a 65 kD, lo
 que se aproxima a la masa de corte para el aclaramiento renal de primer paso. Estas dos moléculas mostraron
 aumentos espectaculares en la permanencia en suero. De hecho, a las 24 horas se registraron el 8 y el 18% de
 actividad sérica para los PEG lineales y en forma de Y, respectivamente.

10 *Modelo tumoral animal*

Los estudios en animales se realizaron de conformidad con los protocolos para animales aprobados en el Recurso de
 Animales de Laboratorio de la Universidad Estatal de Ohio. La línea celular de adenocarcinoma de colon humano LS-
 174T se obtuvo de American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se mantuvo en McCoy's 5A (Invitrogen,
 15 Carlsbad, CA) suplementado con FBS al 10% (Invitrogen) y penicilina y estreptomicina al 1% (Invitrogen) a 37°C con
 CO₂ al 5%. La línea celular LS-174T se pasó dos veces por semana después de lavarla con PBS y tripsinización. Para
 cada fragmento de anticuerpo, se inyectaron subcutáneamente a siete ratones hembra nu/nu atímicos de 4-6 semanas
 (Charles River Laboratories, MA) 6×10^6 células LS-174T en 100 µL de PBS en los flancos derecho e izquierdo. Se
 permitió que los tumores crecieran durante 10 días y se reclutaron cinco ratones con tamaños adecuados en ambos
 20 flancos en los siguientes estudios. El yoduro de potasio (UPSHER-SMITH, MN) estuvo en ClearH₂O HydroGels a 290
 mg/L 24 horas antes de la inyección para bloquear la captación tiroidea de yodo metabolizado.

Estudios de imagen con MicroSPECT/TC

25 **Se inyectaron proteínas de fragmento 3E8 marcadas con ¹²⁵I** a 1,8 mCi para conjugado 3E8cys.scFv + 30 kD, por
 ratón a través de la cola en 200 µL de PBS. N = se realizó estudio de imagen en 4 ratones. Se llevó a cabo estudio de
 imagen Micro-SPECT/TC (Inveon, Siemens Preclinical, Knoxville, TN) de ratones 5-7 y 20 h después de la inyección
 i.v. Se anestesió a los animales mediante inhalación de isoflurano con el 5% de vaporizador de dial para inducción y
 el 1,5-2% para mantenimiento. El proceso de exploración microSPECT/TC duró una hora en el punto temporal de 5 h
 30 y dos horas en el punto temporal de 20 h. La diferencia se debió a la descomposición de ¹²⁵I durante la semivida (13
 h) y, por lo tanto, a tasas de recuento mucho más bajas a 20 h. Los estudios de TC duraron tres minutos. Las imágenes
 de microSPECT/TC se reconstruyeron con el algoritmo OSEM3D para intentar reducir los posibles artefactos debido
 al contenido de la vejiga y a los bajos recuentos de localización. La discrepancia en el umbral se debió a una baja
 relación señal-ruido (RSR) y a diferencias en el rendimiento del agente. Estos niveles dieron el mejor intervalo en
 35 todas las muestras para mostrar la eliminación y el sustrato en los tejidos circundantes. Grandes cantidades de
 absorción en el estómago y el contenido de la vejiga contribuyeron a una visualización deficiente. Sin embargo, este
 hecho a menudo no interfirió con las evaluaciones de la región de interés (ROI) de los tumores. En todos los casos, el
 estudio de TC se usó para ayudar en la determinación del volumen del tumor. Las fascias y la grasa subcutánea dieron
 suficiente contraste tisular para separar el xenoinjerto en los volúmenes de TC.

40 Si bien el objeto de esta invención se ha descrito mediante un lenguaje específico de las características estructurales
 y/o los actos metodológicos, se debe comprender que el objeto de esta invención definido en las reivindicaciones
 adjuntas no está limitado necesariamente a las características o los actos específicos descritos anteriormente. Por el
 contrario, los elementos y actos específicos descritos anteriormente se describen como ejemplos de formas de
 45 implementación de las reivindicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA Cancer J
 50 Clin 61, 69-90.
2. Sun, D., Bloomston, M., Hinkle, G., Al-Saif, O. H., Hall, N. C., Povoski, S. P., Arnold, M. W. & Martin, E. W., Jr. (2007).
 Radioimmunoguided surgery (RIGS), PET/CT image-guided surgery, and fluorescence image-guided surgery: past,
 present, and future. J Surg Oncol 96, 297-308.
3. Thor, A., Ohuchi, N., Szpak, C. A., Johnston, W. W. & Schlom, J. (1986). Distribution of oncofetal antigen tumor-
 associated glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B72.3. Cancer Res 46, 3118-24.
4. Thor, A., Viglione, M. J., Muraro, R., Ohuchi, N., Schlom, J. & Gorstein, F. (1987). Monoclonal antibody B72.3
 60 reactivity with human endometrium: a study of normal and malignant tissues. Int J Gynecol Pathol 6, 235-47.
5. Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M. & Schlom, J. (1992). Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and

comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52, 3402-8.

6. Colcher, D., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B. J. & Batra, S. K. (1999). Single-chain antibodies in pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* 880, 263-80.
- 5 7. Yoon, S. O., Lee, T. S., Kim, S. J., Jang, M. H., Kang, Y. J., Park, J. H., Kim, K. S., Lee, H. S., Ryu, C. J., Gonzales, N. R., Kashmiri, S. V., Lim, S. M., Choi, C. W. & Hong, H. J. (2006). Construction, affinity maturation, and biological characterization of an anti-tumor-associated glycoprotein-72 humanized antibody. *J Biol Chem* 281, 6985-92.
- 10 8. Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. & Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-6.
9. Sandhu, J. S. (1992). Protein engineering of antibodies. *Crit Rev Biotechnol* 12, 437-62.
- 15 10. Pini, A. & Bracci, L. (2000). Phage display of antibody fragments. *Curr Protein Pept Sci* 1, 155-69.
11. Yang, K., Basu, A., Wang, M., Chintala, R., Hsieh, M. C., Liu, S., Hua, J., Zhang, Z., Zhou, J., Li, M., Phyu, H., Petti, G., Mendez, M., Janjua, H., Peng, P., Longley, C., Borowski, V., Mehlig, M. & Filpula, D. (2003). Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation. *Protein Eng* 20 16, 761-70.
12. Muraro, R., Kuroki, M., Wunderlich, D., Poole, D. J., Colcher, D., Thor, A., Greiner, J. W., Simpson, J. F., Molinolo, A., Noguchi, P. & et al. (1988). Generation and characterization of B72.3 second generation monoclonal antibodies reactive with the tumor-associated glycoprotein 72 antigen. *Cancer Res* 48, 4588-96.
- 25 13. Colcher, D., Minelli, M. F., Roselli, M., Muraro, R., Simpson-Milenic, D. & Schlom, J. (1988). Radioimmunolocalization of human carcinoma xenografts with B72.3 second generation monoclonal antibodies. *Cancer Res* 48, 4597-603.
- 30 14. Divgi, C. R., Scott, A. M., Dantis, L., Capitelli, P., Siler, K., Hilton, S., Finn, R. D., Kemeny, N., Kelsen, D., Kostakoglu, L. & et al. (1995). Phase I radioimmunotherapy trial with iodine-131-CC49 in metastatic colon carcinoma. *J Nucl Med* 36, 586-92.
15. Kashmiri, S. V., Shu, L., Padlan, E. A., Milenic, D. E., Schlom, J. & Hand, P. H. (1995). Generation, characterization, and in vivo studies of humanized anticarcinoma antibody CC49. *Hybridoma* 14, 461-73.
- 35 16. Denzin, L. K., Whitlow, M. & Voss, E. W., Jr. (1991). Single-chain site-specific mutations of fluorescein-amino acid contact residues in high affinity monoclonal antibody 4-4-20. *J Biol Chem* 266, 14095-103.
- 40 17. Prachayasittikul, V., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Tantimongkolwat, T., Nantasenamat, C. & Galla, H. J. (2007). EDTA-induced membrane fluidization and destabilization: biophysical studies on artificial lipid membranes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39, 901-13.
18. Pavlinkova, G., Beresford, G. W., Booth, B. J., Batra, S. K. & Colcher, D. (1999). Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts. *J Nucl Med* 45 40, 1536-46.
19. Bork, P., Holm, L. & Sander, C. (1994). The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* 242, 309-20.
- 50 20. Kjeldsen, T., Clausen, H., Hirohashi, S., Ogawa, T., Iijima, H. & Hakomori, S. (1988). Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2----6 alpha-N-acetylgalactosaminyl (sialosyl-Tn) epitope. *Cancer Res* 48, 2214-20.
- 55 21. Senisterra, G. A. & Finerty, P. J., Jr. (2009). High throughput methods of assessing protein stability and aggregation. *Mol Biosyst* 5, 217-23.
22. Lavinder, J. J., Hari, S. B., Sullivan, B. J. & Magliery, T. J. (2009). High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *J Am Chem Soc* 131, 3794-5.
- 60 23. Kortt, A.A., Dolezal, O., Power, B.E., Hudson, P.J. (2001). Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFv for cancer targeting. *Biomol Eng* 18, 95-108.

24. Pini, A. & Bracci, L. (2000). Phage display of antibody fragments. *Curr Protein Pept Sci* 1, 155-69.
25. Durani, V., Sullivan, B.J., Magliery, T.J. (2012) Simplifying protein expression with ligation-free, traceless and tag-switching plasmids. *Protein Expr Purif* 85, 9-17.
26. Miroux, B., Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260, 289-98.
- 10 27. Chen, C., Constantinou, A., Deonarain, M. (2011) Modulating antibody pharmacokinetics using hydrophilic polymers. *Exper Opin Drug Deliv* 8, 1221-36.
28. Veronese, F.M., Mero, A. (2008) The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* 22, 315-29.
- 15 29. Goel, A., Colcher, D., Baranowska-Kortylewicz, et al. (2000) Genetically engineered tetravalent single-chain Fv of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49: Improved biodistribution and potential for therapeutic application. *Cancer Res* 60, 6964-71.
30. Bailey, G. S. (1996) The Iodogen Method for Radiolabeling Protein, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- 20 31. Paus, E. B., O.; Nustad, K. (1982) Radioiodination of proteins with the Iodogen method, International Atomic Energy Agency, Vienna.
32. Maddalena, M. E., Fox, J., Chen, J., Feng, W., Cagnolini, A., Linder, K. E., Tweedle, M. F., Nunn, A. D., and Lantry, L. E. (2009) ¹⁷⁷Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 50, 2017-24
- 25 33. Wedeking, P., and Tweedle, M. (1988) Comparison of the Biodistribution of Gd-153-Labeled Gd(Dtpa)²⁻, Gd(Dota)⁻, and Gd(Acetate)^N in Mice. *Nuclear medicine and biology* 15, 395-402.
- 30

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 (3E8.scFv)

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPMAAAHHHHHHGSSGGGENLYFQGSSGDI
VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPLTFGGGTK
VEIKLSADDAKKDAKKDDAKKDDLQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC
KASGYTFTDHAHWVRQAPGQRLEWMGYFSPGNDDFKYSQKFQGRVTITADK
SASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWIMQYWGGTGLTVTVSS

35

SEQ ID NO: 2 (3E8.scFv.Cys)

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPMAAAHHHHHHGSSGGGENLYFQGSSGDI
VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPLTFGGGTK
VEIKLSADDAKKDAKKDDAKKDDLQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC
KASGYTFTDHAHWVRQAPGQRLEWMGYFSPGNDDFKYSQKFQGRVTITADK
SASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWIMQYWGGTGLTVTVSSC

SEQ ID NO: 3

40 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA

ES 2 800 602 T3

SEQ ID NO: 4

AHHHHHHGSSGGGENLYFQ

5 SEQ ID NO: 5

GSSG

SEQ ID NO: 6

10 LSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDL

SEQ ID NO: 7 (3E8.scFv)

CATATGAAATATCTGTTACCTACTGCTGCTGCGGGCCTGCTATTATTA
GCGGCACAACCAGCAATGGCGGCGCATCATCATCATCATGCGTCCTCG
GGCGGTGGCGAAAATCTGTATTTTCAGGGTAGCAGCGGCGATATTGTGATG
ACCCAGAGCCCGGATAGTTTGGCCGTTAGCCTGGGCGAACGTGCGACGATT
AATTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTTTACAGCAGCAACAATAAGAATTAC
CTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCCGGCCAGCCGCCGAAACTTTTGATTTATT
GGGCGAGCACCCGTGAAAGCGGCGTGCCGGATCGTTTCTCGGGCTCAGGCA
GCGGGACCGATTTTACGCTGACCATCAGCAGCCTTCAGGCGGAGGATGTCG
CGGTGTACTACTGCCAGCAGTATTACAGCTATCCGTTGACCTTTGGGGGAGG
CACCAAAGTGGAGATCAAACCTGAGCGCGGATGATGCTAAGAAAGATGCGG
CGAAGAAGGACGATGCGAAAAAAGACGACGCAAAAAAAGGATCTGCAGGTG
CAGCTGGTGCAGTCGGGTGCGGAAGTGAAGAAACCTGGGGCGTCGGTGAAA
GTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATACCTTTACCGATCATGCGATTCATTGGG
TGCGTCAAGCGCCAGGCCAGCGTCTGGAATGGATGGGCTATTTTTCCCCAGG
CAACGATGATTTCAAGTATTCCCAGAAGTTCCAAGGGCGCGTGACCATTACC
GCCGATAAAAGCGCAAGCACCGCGTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTAGC
GAAGATACAGCGGTTTACTATTGCGCACGGAGCTGGATTATGCAATACTGG
GGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCTAAGGATCC

ES 2 800 602 T3

SEQ ID NO: 8 (3E8.scFv.Cys)

CATATGAAATATCTGTTACCTACTGCTGCTGCGGGCCTGCTATTATTA
GCGGCACAACCAGCAATGGCGGGCGCATCATCATCATCATGGGTCCTCG
GGCGGTGGCGAAAATCTGTATTTTCAGGGTAGCAGCGGCGATATTGTGATG
ACCCAGAGCCCCGGATAGTTTGGCCGTTAGCCTGGGCGAACGTGCGACGATT
AATTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTTTACAGCAGCAACAATAAGAATTAC
CTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCCGGCCAGCCGCCGAACTTTTGATTTATT
GGGCGAGCACCCGTGAAAGCGGCGTGCCGGATCGTTTCTCGGGCTCAGGCA
GCGGGACCGATTTTACGCTGACCATCAGCAGCCTTCAGGCGGAGGATGTCG
CGGTGTACTACTGCCAGCAGTATTACAGCTATCCGTTGACCTTTGGGGGAGG
CACCAAAGTGGAGATCAAACCTGAGCGCGGATGATGCTAAGAAAGATGCGG
CGAAGAAGGACGATGCGAAAAAAGACGACGCAAAAAAGGATCTGCAGGTG
CAGCTGGTGCAGTCGGGTGCGGAAGTGAAGAAACCTGGGGCGTCGGTGAAA
GTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATACCTTTACCGATCATGCGATTCATTGGG
TGCGTCAAGCGCCAGGCCAGCGTCTGGAATGGATGGGCTATTTTTCCCCAGG
CAACGATGATTTCAAGTATTCCCAGAAGTTCCAAGGGCGCGTGACCATTACC
GCCGATAAAAGCGCAAGCACCGCGTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTAGC
GAAGATACAGCGGTTTACTATTGCGCACGGAGCTGGATTATGCAATACTGG
GGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCTGTTAAGGATCC

SEQ ID NO: 9

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAAHHHHHHGSSGGGENLYFQGSSGD

5

IV

SEQ ID NO: 10 (Dominio VH)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAHWVRQAPGQRLE
WMGYFSPGNDDFKYSQKFQGRVTITADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
SWIMQYWGGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 11 (Dominio VL)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPG
QPPKLLIWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYSY
PLTFGGGTKVEIK

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación de Innovación del Estado de Ohio

5 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES RELACIONADOS CON EL ANTICUERPO MONOCATENARIO

<130> 10336-043WO1

<140> PCT/US2014/047854

10 <141> 2014-07-23

<150> US 61/857.511

<151> 2013-07-23

15 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 298

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintetizado

<400> 1

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala His His His His His His Gly Ser Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val
35 40 45

Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala
50 55 60

Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn
65 70 75 80

Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
85 90 95

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
100 105 110

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
115 120 125

Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
130 135 140

30

ES 2 800 602 T3

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Leu Ser
145 150 155 160

Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys
165 170 175

Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
180 185 190

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
195 200 205

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
210 215 220

Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp
225 230 235 240

Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
245 250 255

Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
260 265 270

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Trp Ile Met Gln Tyr Trp
275 280 285

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
290 295

<210> 2

<211> 299

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

10

<400> 2

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala His His His His His Gly Ser Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val
35 40 45

ES 2 800 602 T3

Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala
50 55 60

Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn
65 70 75 80

Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
85 90 95

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
100 105 110

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
115 120 125

Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
130 135 140

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Leu Ser
145 150 155 160

Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys
165 170 175

Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
180 185 190

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
195 200 205

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
210 215 220

Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp
225 230 235 240

Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
245 250 255

Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
260 265 270

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Trp Ile Met Gln Tyr Trp
275 280 285

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys
290 295

<210> 3

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala
5 20

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

15 <400> 4

Ala His His His His His His Gly Ser Ser Gly Gly Gly Glu Asn Leu
1 5 10 15

Tyr Phe Gln

<210> 5

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintetizado

<400> 5

Gly Ser Ser Gly 1
30

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Sintetizado

<400> 6

40

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
1 5 10 15

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu
20 25

45 <210> 7

<211> 906

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Sintetizado

ES 2 800 602 T3

<400> 7

catatgaaat atctgttacc tactgctgct gcgggcctgc tattattagc ggcacaacca	60
gcaatggcgg cgcacatca tcatcatcat gggtcctcgg gcggtggcga aaatctgtat	120
tttcagggtg gcagcggcga tattgtgatg acccagagcc cggatagttt ggccgttagc	180
ctgggcgaac gtgcgacgat taattgcaag agcagccaga gcgtgcttta cagcagcaac	240
aataagaatt acctggcgtg gtatcagcaa aaaccgcggc agccgccgaa acttttgatt	300
tattgggcga gacccgtga aagcggcgtg ccggtatcgtt tctcgggctc aggcagcggg	360
accgatttta cgtgacat cagcagcctt caggcggagg atgtcgcgt gtactactgc	420
cagcagtatt acagctatcc gttgacctt gggggaggca ccaaagtga gatcaaaactg	480
agcgcggatg atgctaagaa agatgcggcg aagaaggacg atgcgaaaaa agacgacgca	540
aaaaaggatc tgcagggtga gctggtgcag tcgggtgcgg aagtgaagaa acctggggcg	600
tcggtgaaag tgagctgcaa agcagcggc tataccttta ccgacatgc gattcattgg	660
gtgcgtcaag cgcaggcca gcgtctgga tggatgggct atttttcccc aggcaacgat	720
gatttcaagt attcccagaa gttccaaggc cgcgtgacca ttaccgccga taaaagcgca	780
agcaccgcgt atatggagct gtccagcctg cgtagcgaag atacagcgt ttactattgc	840
gcacggagct ggattatgca atactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagctaa	900
ggatcc	906

5 <210> 8

<211> 909

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Sintetizado

<400> 8

catatgaaat atctgttacc tactgctgct gcgggcctgc tattattagc ggcacaacca	60
gcaatggcgg cgcacatca tcatcatcat gggtcctcgg gcggtggcga aaatctgtat	120
15 tttcagggtg gcagcggcga tattgtgatg acccagagcc cggatagttt ggccgttagc	180

ES 2 800 602 T3

```

ctgggcgaac gtgcgacgat taattgcaag agcagccaga gcgtgcttta cagcagcaac      240
aataagaatt acctggcgtg gtatcagcaa aaaccgggcc agccgccgaa acttttgatt      300
tattgggcga gcaccgctga aagcggcgtg ccgcatcggt tctcgggctc aggcagcggg      360
accgatttta cgctgaccat cagcagcctt caggcggagg atgtcgcggt gtactactgc      420
cagcagtatt acagctatcc gttgaccttt gggggaggca ccaaagtgga gatcaaactg      480
agcgcgggatg atgctaagaa agatgcggcg aagaaggacg atgcgaaaaa agacgacgca      540
aaaaaggatc tgcagggtgca gctggtgcag tcgggtgcgg aagtgaagaa acctggggcg      600
tcggtgaaag tgagctgcaa agcagcggc tataccttta ccgatcatgc gattcattgg      660
gtgcgtcaag cgccaggcca gcgtctggaa tggatgggct atttttcccc aggcaacgat      720
gatttcaagt attcccagaa gttccaaggg cgcgtgacca ttaccgccga taaaagcgcga      780
agcaccgcgt atatggagct gtccagcctg cgtagcgaag atacagcgggt ttactattgc      840
gcacggagct ggattatgca atactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagctgt      900
taaggatcc                                     909

```

<210> 9

<211> 48

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

10

<400> 9

```

Met  Lys  Tyr  Leu  Leu  Pro  Thr  Ala  Ala  Ala  Gly  Leu  Leu  Leu  Leu  Ala
1              5              10              15

```

```

Ala  Gln  Pro  Ala  Met  Ala  Ala  His  His  His  His  His  His  Gly  Ser  Ser
                20              25              30

```

```

Gly  Gly  Gly  Glu  Asn  Leu  Tyr  Phe  Gln  Gly  Ser  Ser  Gly  Asp  Ile  Val
          35              40              45

```

15 <210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Sintetizado

<400> 10

```

Gln  Val  Gln  Leu  Val  Gln  Ser  Gly  Ala  Glu  Val  Lys  Lys  Pro  Gly  Ala
25  1              5              10              15

```

ES 2 800 602 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Ile Met Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

10

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de anticuerpo scFv que se une específicamente a la glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), donde el fragmento de anticuerpo comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2.
2. Un fragmento de anticuerpo scFv que se une específicamente a la glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72) y que es más estable que CC49.scFv, donde dicho fragmento de anticuerpo comprende el 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
3. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1.
4. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 3.
5. El vector según la reivindicación 4, donde dicho vector es un segmento de ácidos nucleicos desnudo, un segmento de ácidos nucleicos asociado al vehículo, una nucleoproteína, un plásmido, un virus, un viroide o un elemento transponible.
6. Una célula aislada que produce el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1.
7. Una composición que comprende el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer.
9. La composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 8, donde dicho fragmento de anticuerpo está, directa o indirectamente, asociado o unido a una fracción efectora que tiene actividad terapéutica, y la composición es adecuada para el tratamiento del cáncer.
10. La composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 9, donde dicha fracción efectora es un radionúclido, enzima terapéutica, fármaco anticancerígeno, citocina, citotoxina o agente antiproliferativo.
11. Una composición que comprende una cantidad diagnósticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1 para su uso in vivo para la detección del cáncer.
12. Un procedimiento in vitro que comprende el uso de una cantidad diagnósticamente efectiva de un fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1 para la detección de cáncer.
13. La composición para su uso según la reivindicación 11 o el procedimiento según la reivindicación 12, donde dicho fragmento de anticuerpo está, directa o indirectamente, asociado o unido a un marcador detectable, y la composición es adecuada para la detección de cáncer.
14. La composición para su uso o el procedimiento según la reivindicación 13, donde el marcador detectable es un radionúclido o una enzima.
15. La composición para su uso o el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8, 11 o 12, donde el cáncer es cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, un adenocarcinoma, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y cáncer de mama.
16. La composición para su uso o el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 14, donde el radionúclido es ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , $^{81}\text{Rb}/^{81}\text{MKr}$, $^{87}\text{M}\text{Sr}$, $^{99}\text{M}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{113}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{124}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb , ^{64}Cu o ^{206}Bi .
17. La composición para su uso según la reivindicación 8, donde la fracción efectora es un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste en un fármaco antitumoral, una citocina, un antimetabolito, un agente de alquilación, una hormona, metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, citosina arabinósido, etopósido, 5-fluorouracilo, melfalán, clorambucilo, una mostaza nitrogenada, ciclofosfamida, cis-platino, vindesina, alcaloides de vinca, mitomicina, bleomicina, purotitionina, macromomicina, derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón, esteroides, aminopterina, antraciclinas, demecolcina, etopósido, mitramicina, doxorubicina, daunomicina, vinblastina, neocarzinostatina, macromicina, a-amanitina y combinaciones de los mismos.

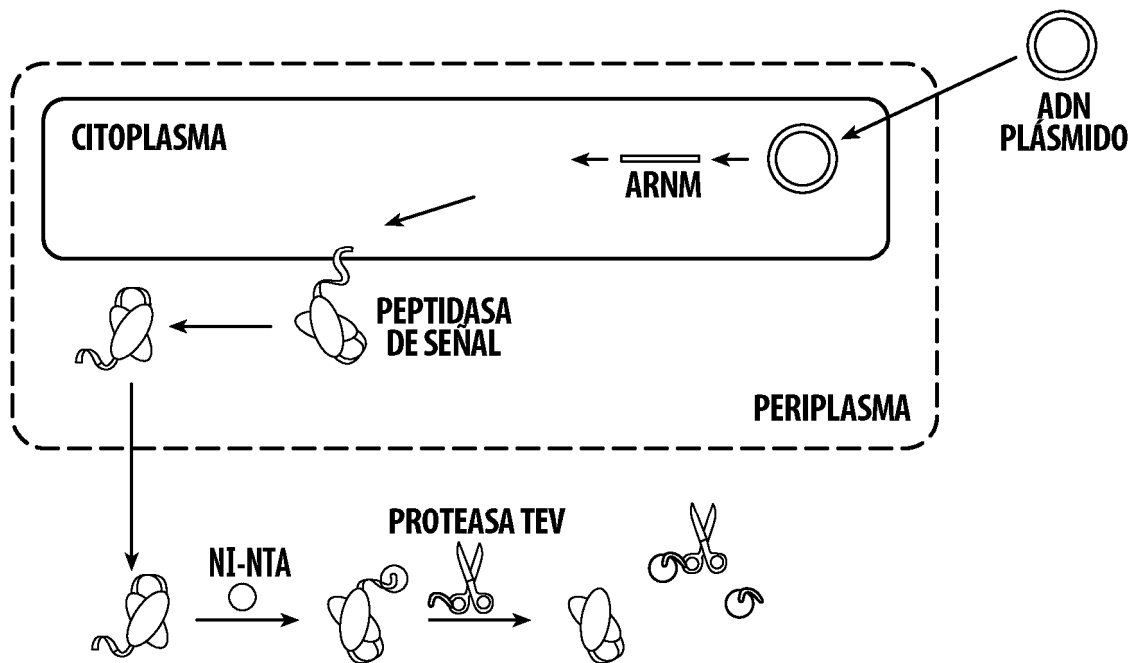


FIG. 1

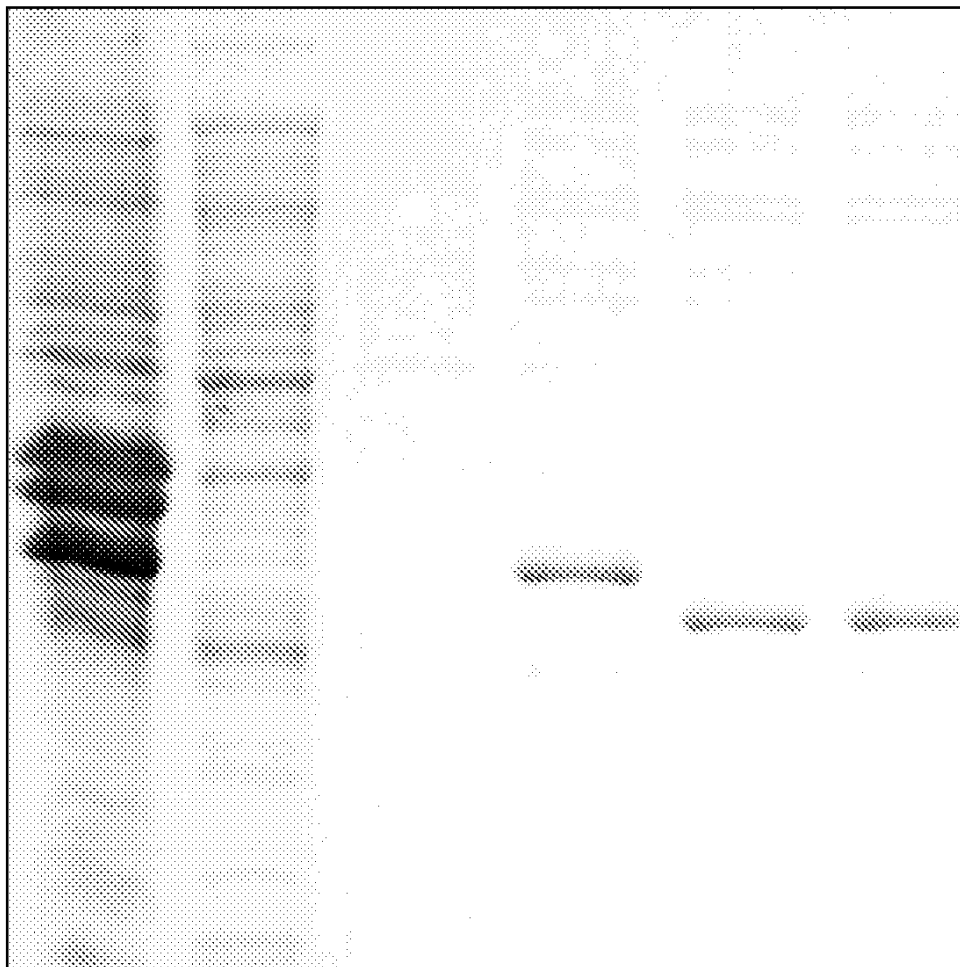


FIG. 2

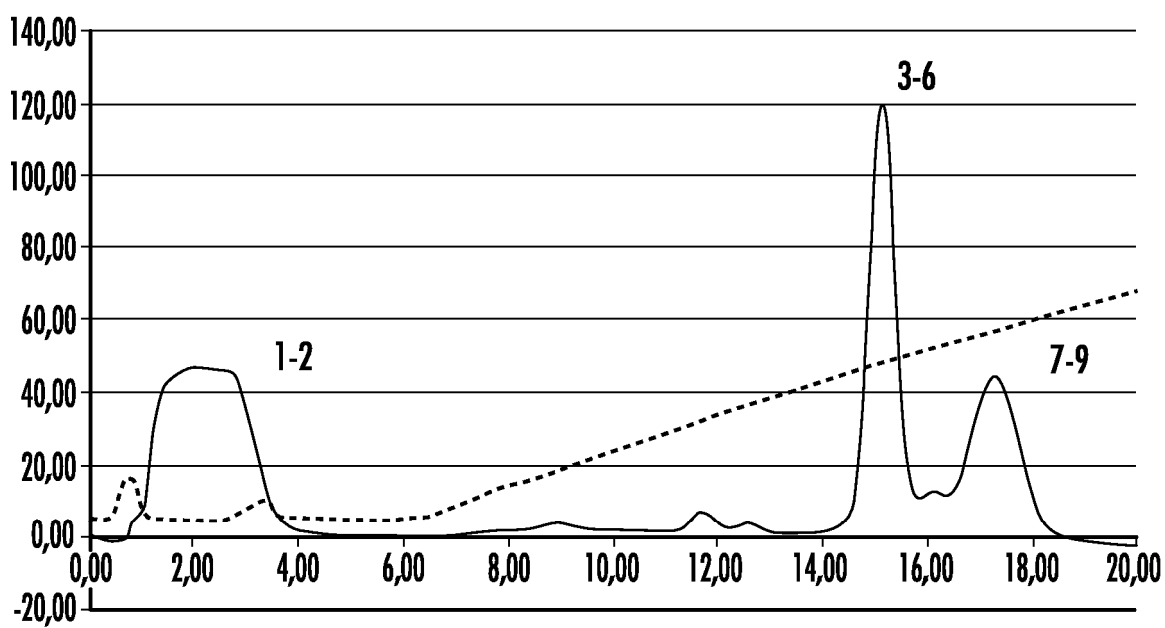


FIG. 3A

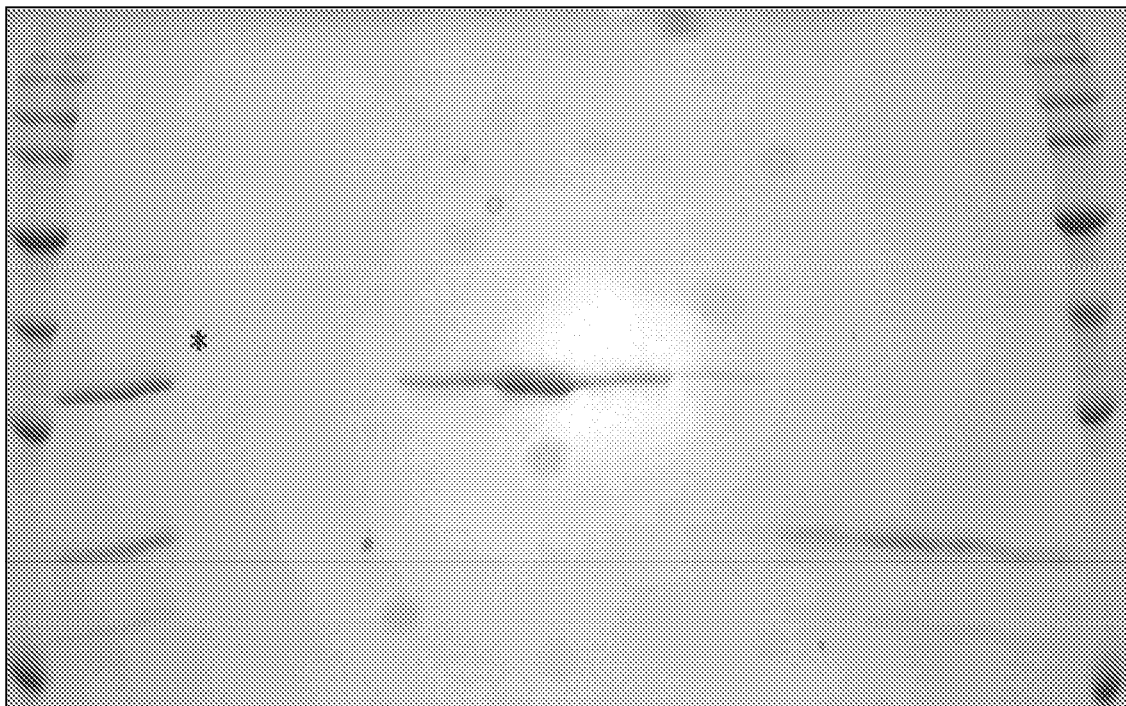


FIG. 3B

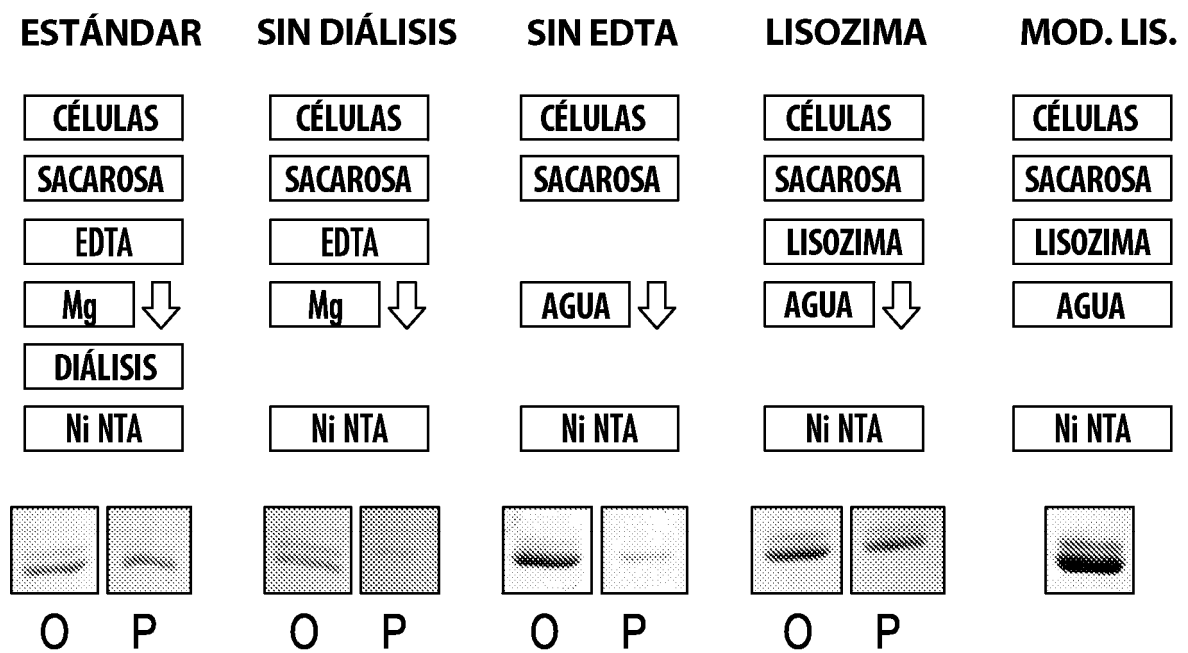


FIG. 4

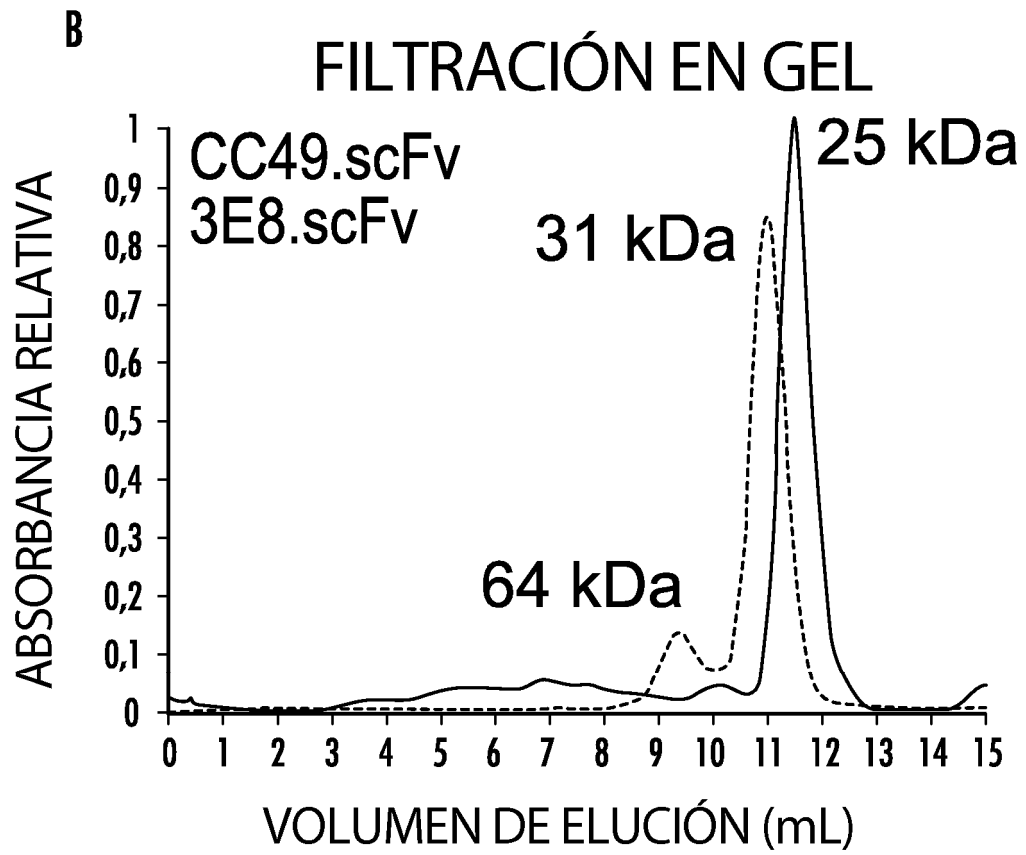


FIG. 5

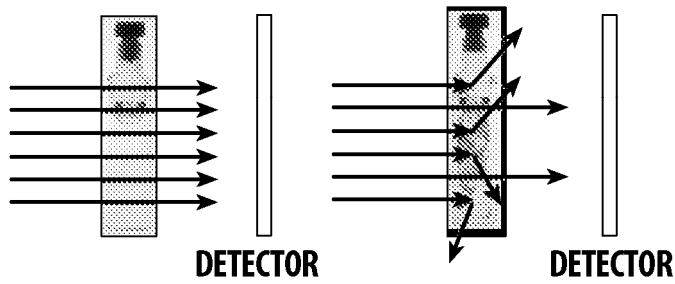
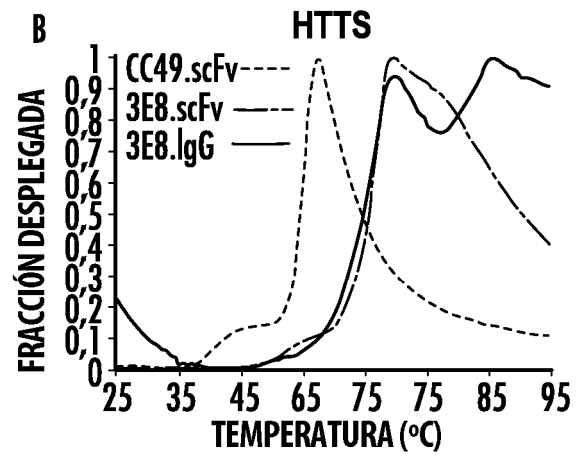
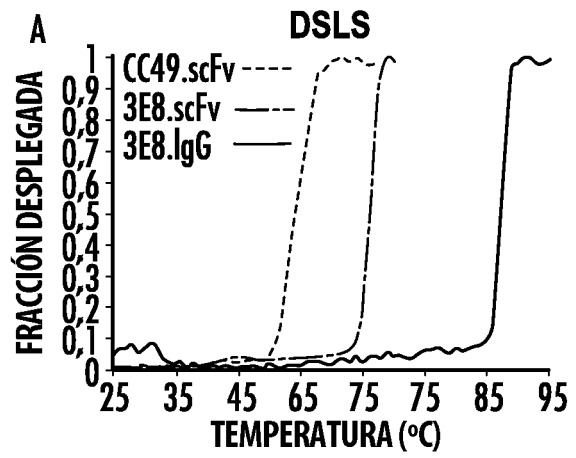


FIG. 6A

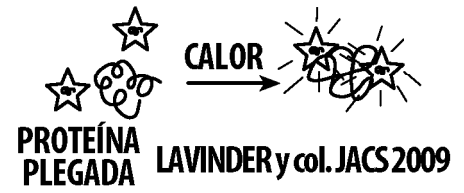


FIG. 6B

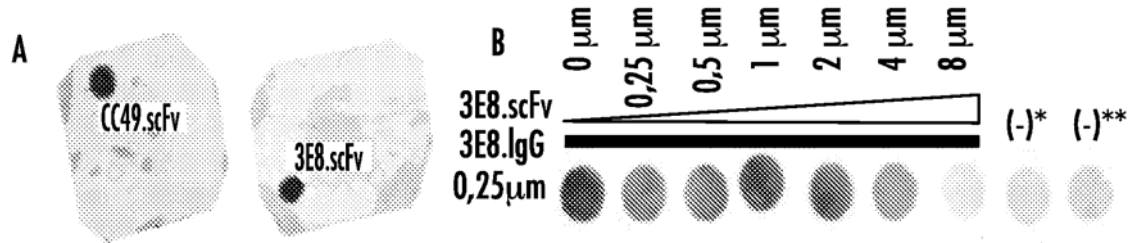


FIG. 7A

FIG. 7B

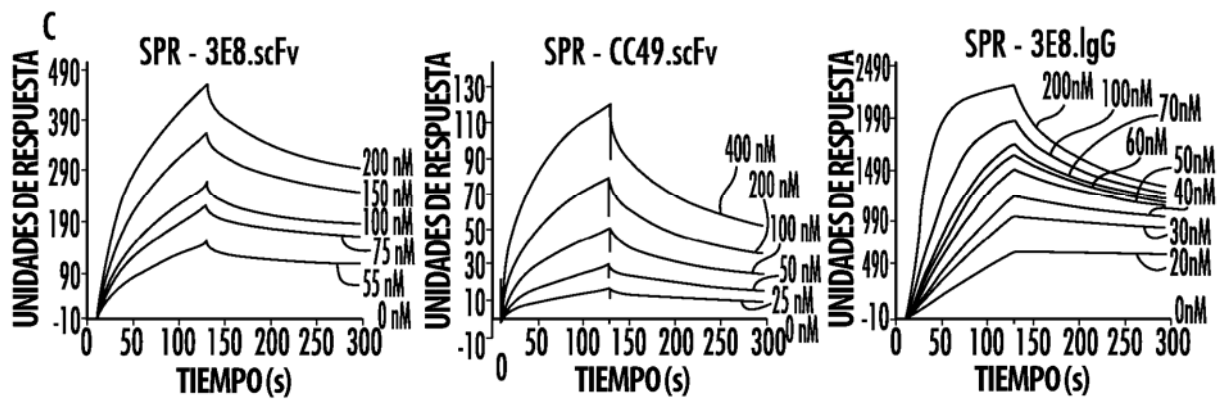


FIG. 7C

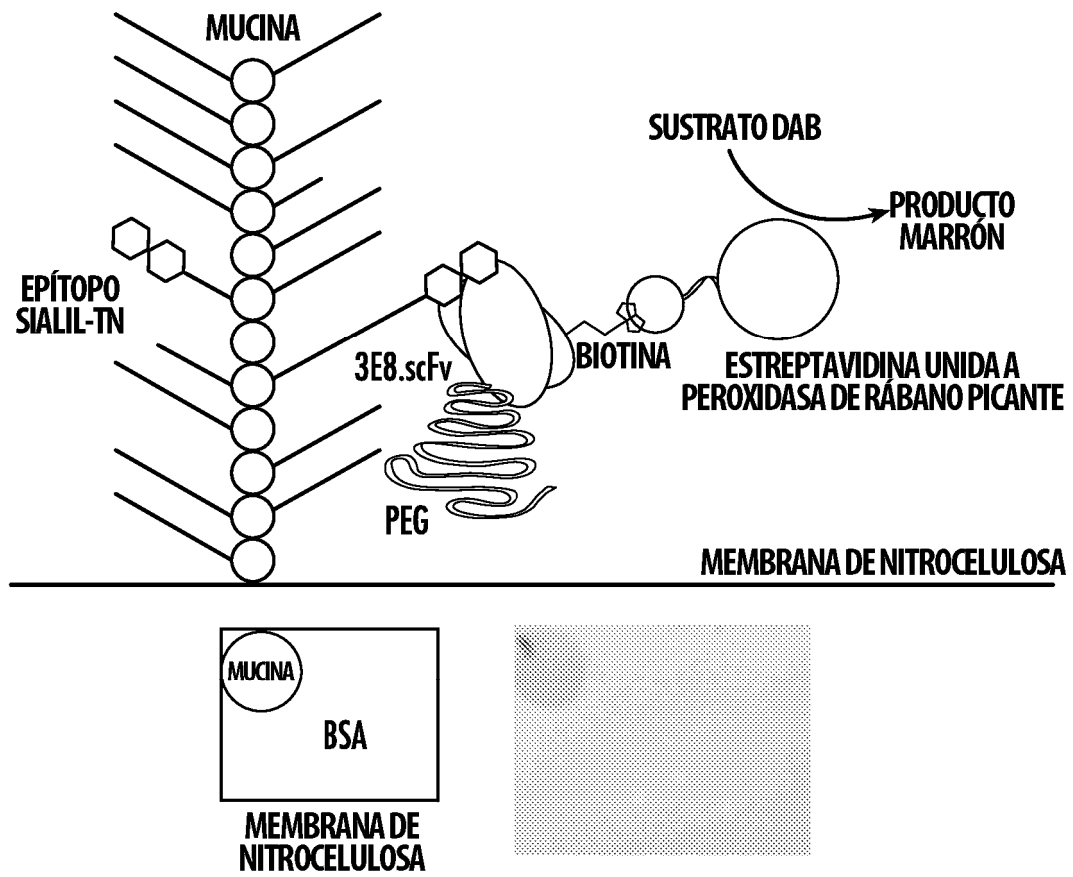


FIG. 8



FIG. 9

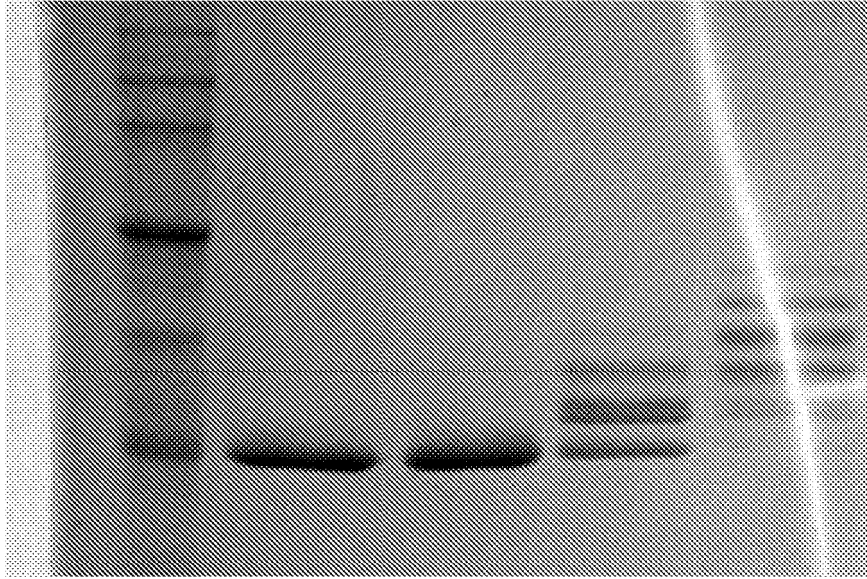


FIG. 10

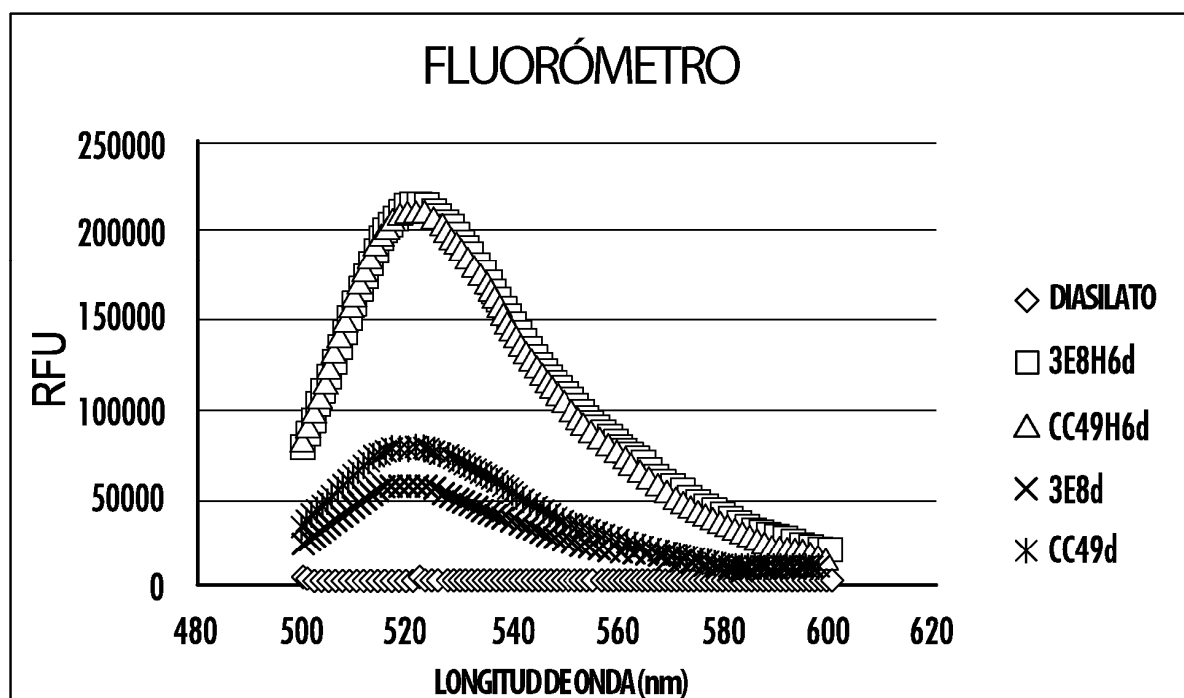


FIG. 11

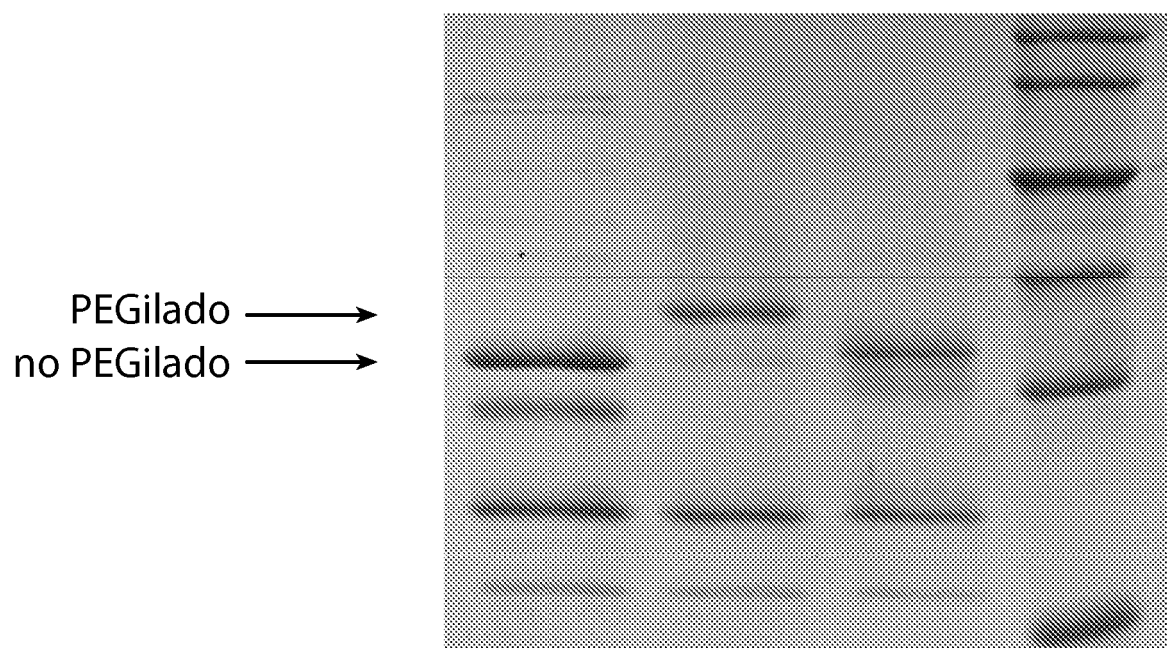


FIG. 12

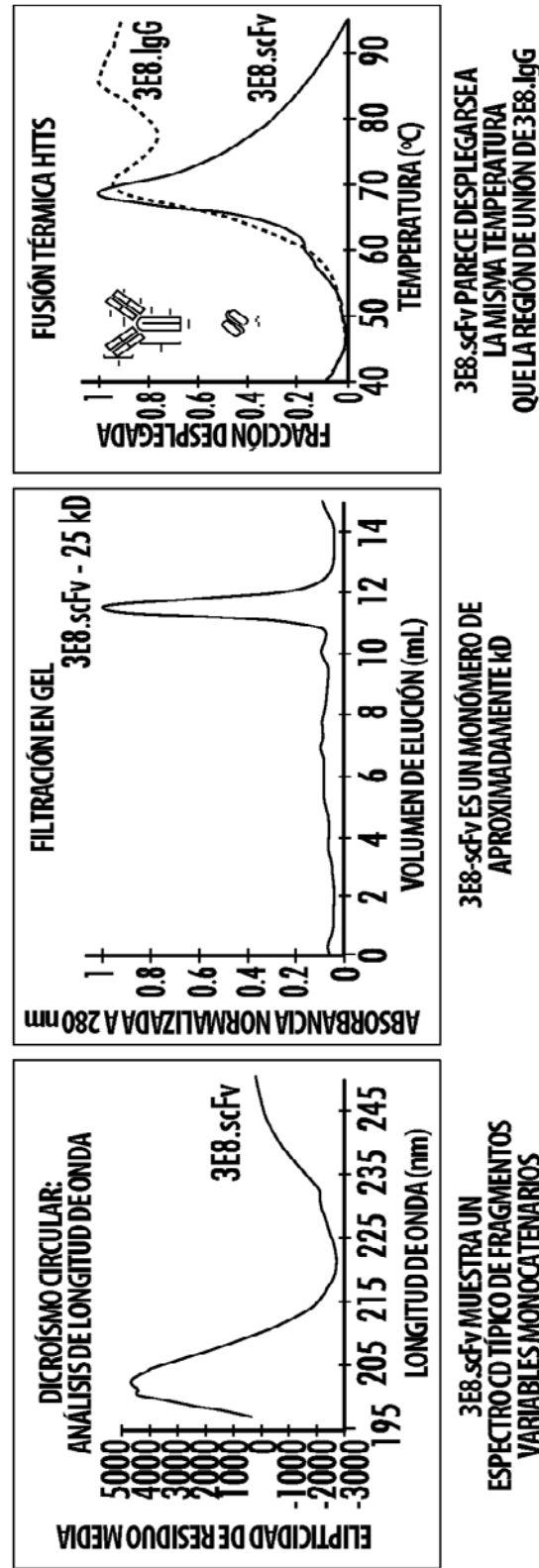
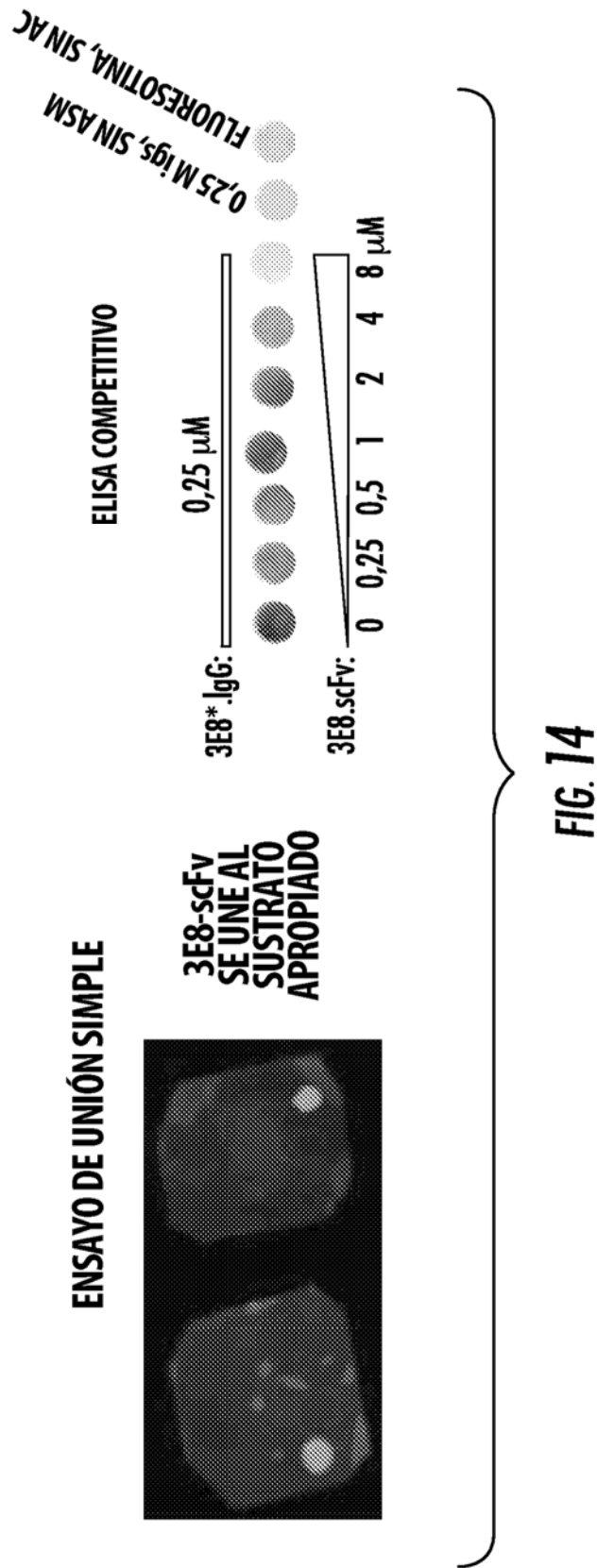
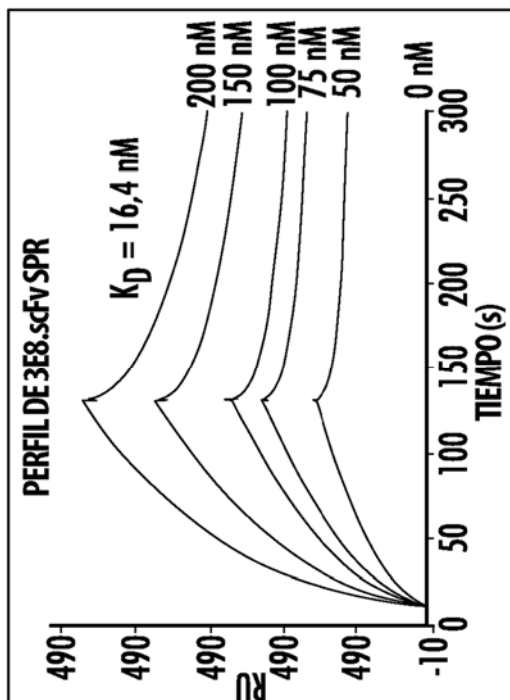
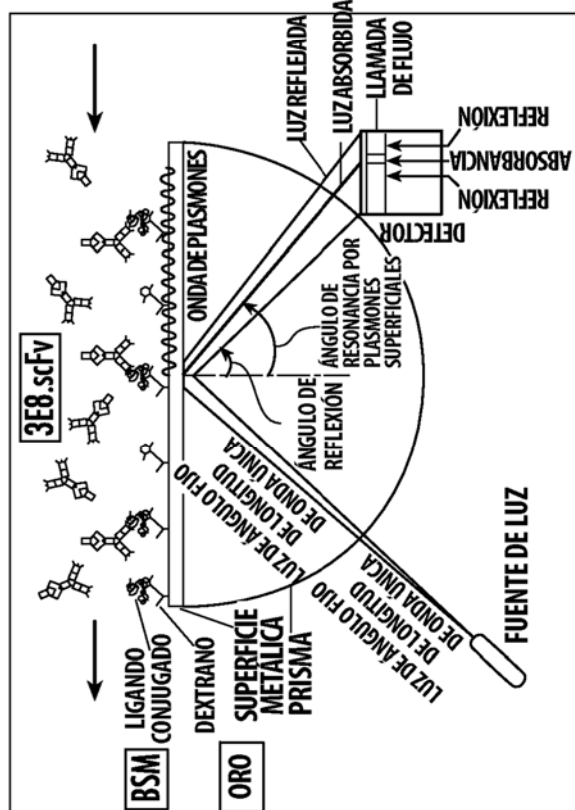


FIG. 13



RESONANCIA POR PLASMONES SUPERFICIALES (RPS)



**3E8.scFv TIENE UN VALOR K_D MEDIDO DE 16,4 nM,
QUE INDICA UNA UNIÓN MUY ESTRECHA
(AL SUSTRATO APROPIADO)**

FIG. 15

LA RESONANCIA POR PLASMONES SUPERFICIALES MIDE EL ÁNGULO DE REFLEXIÓN DE LA LUZ, QUE CAMBIA A MEDIDA QUE NUESTRO FRAGMENTO DE ANTICUERPO SE UNE AL LIGANDO CONJUGADO

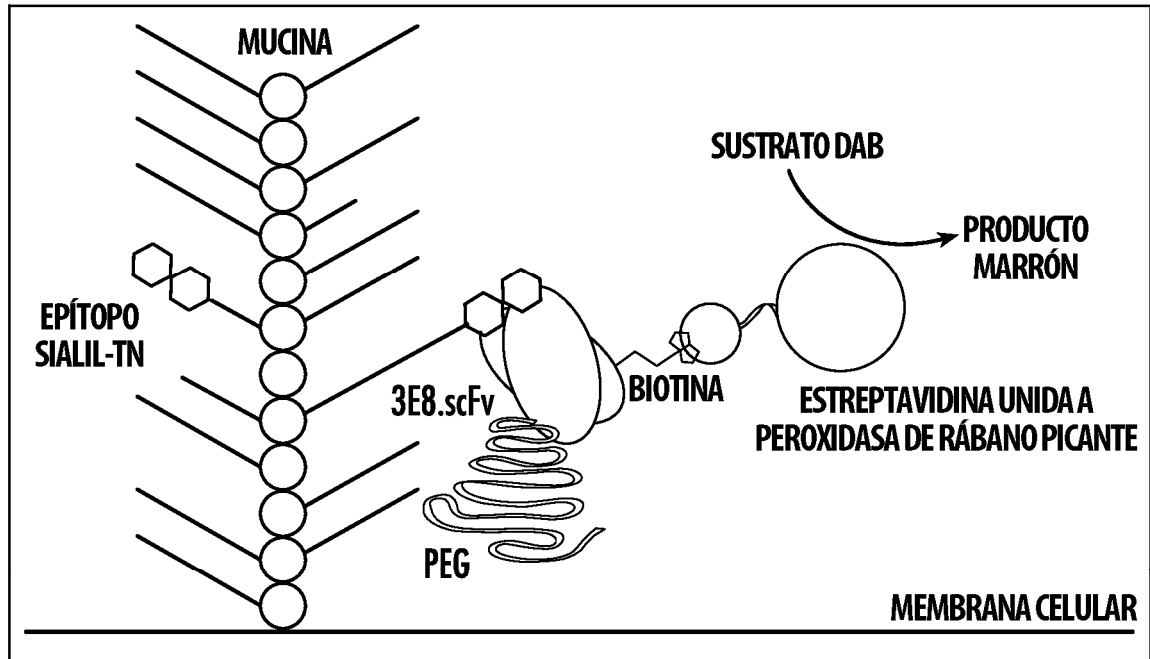


FIG. 16

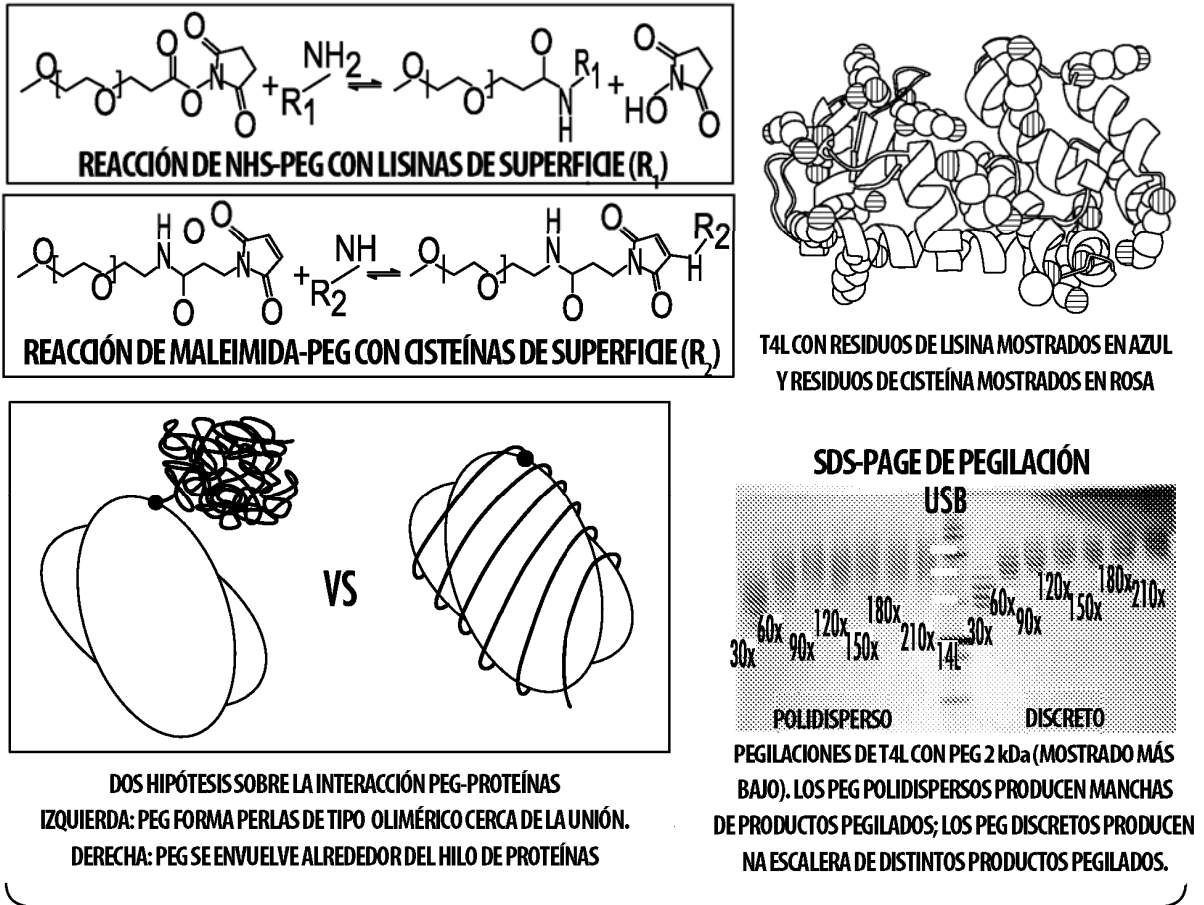


FIG. 17

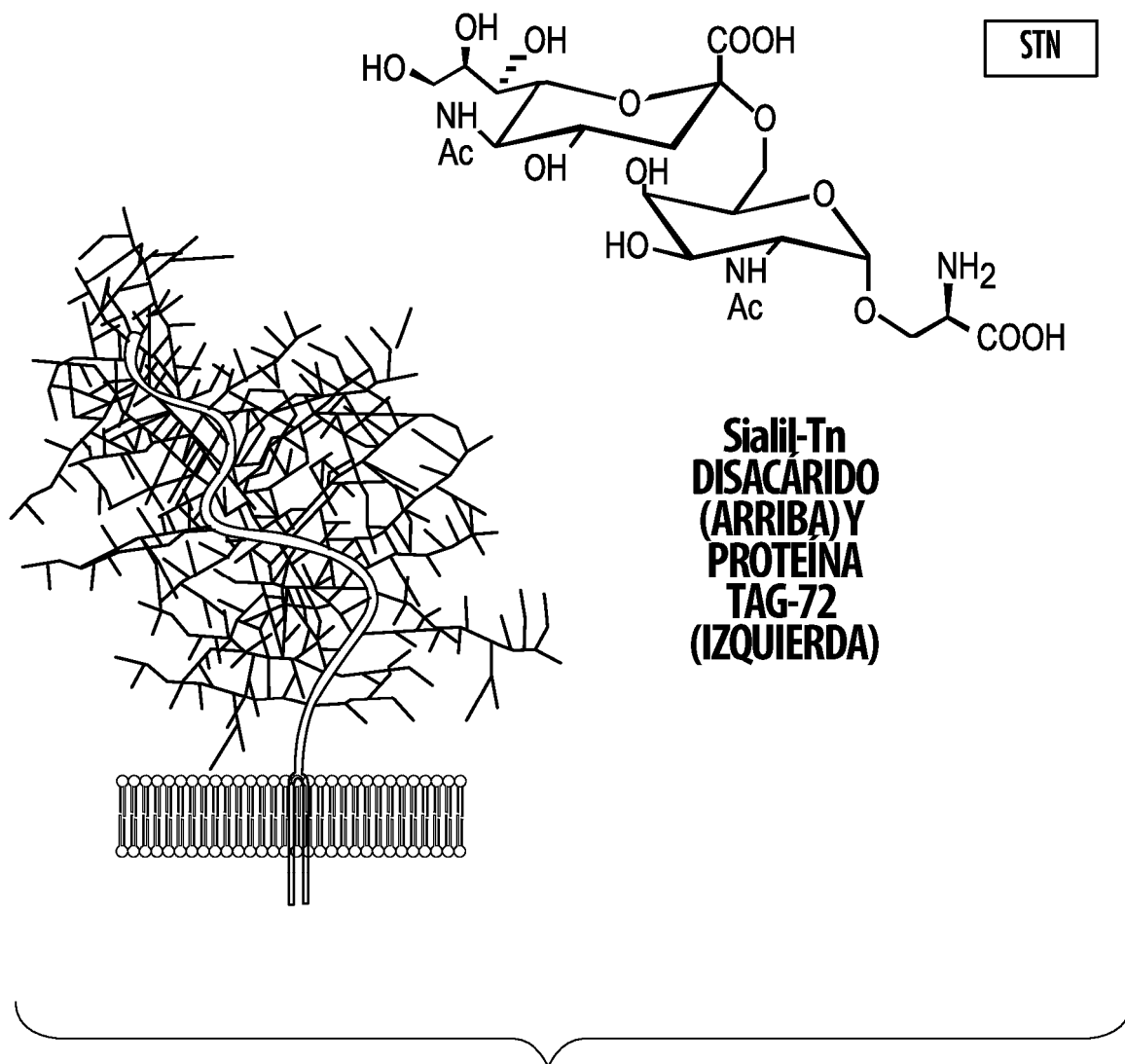


FIG. 18

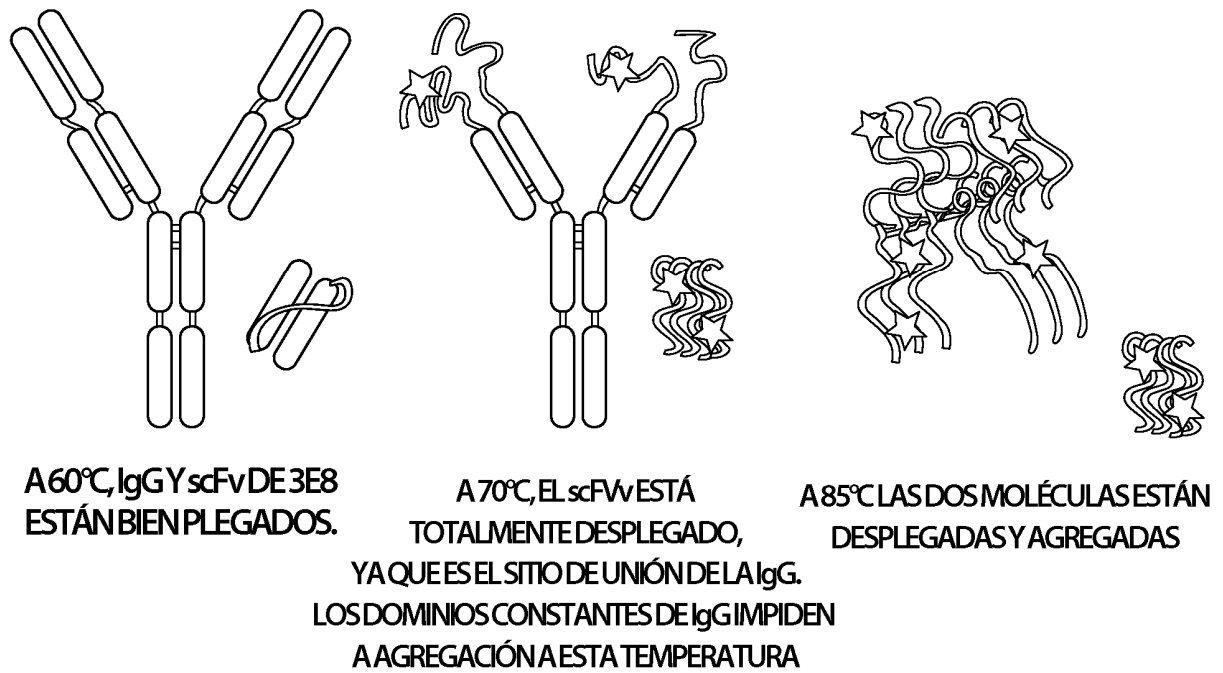


FIG. 19

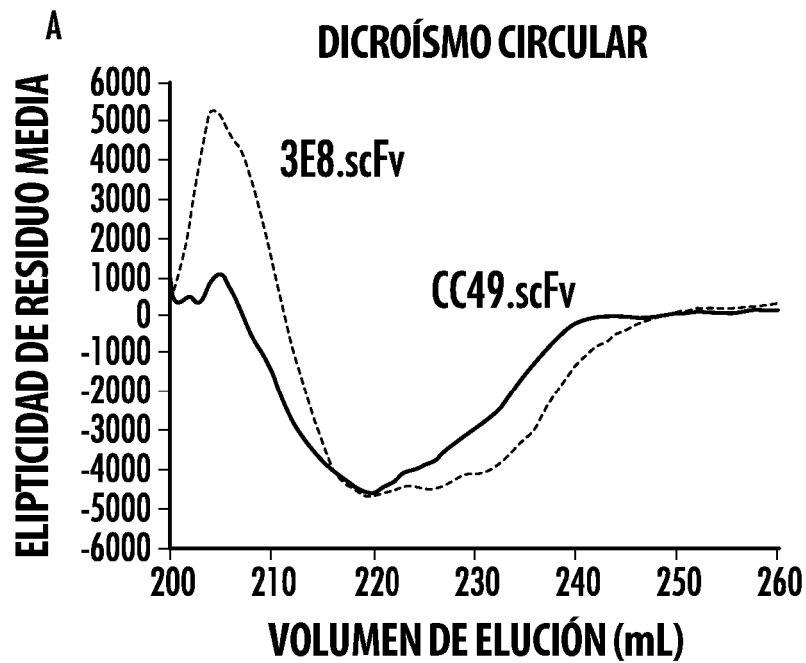


FIG. 20A

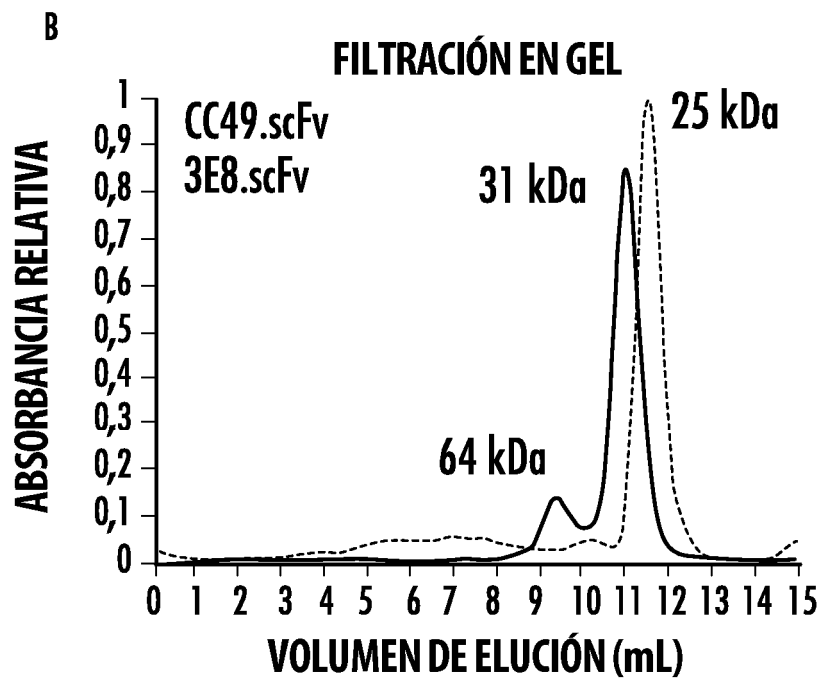


FIG. 20B

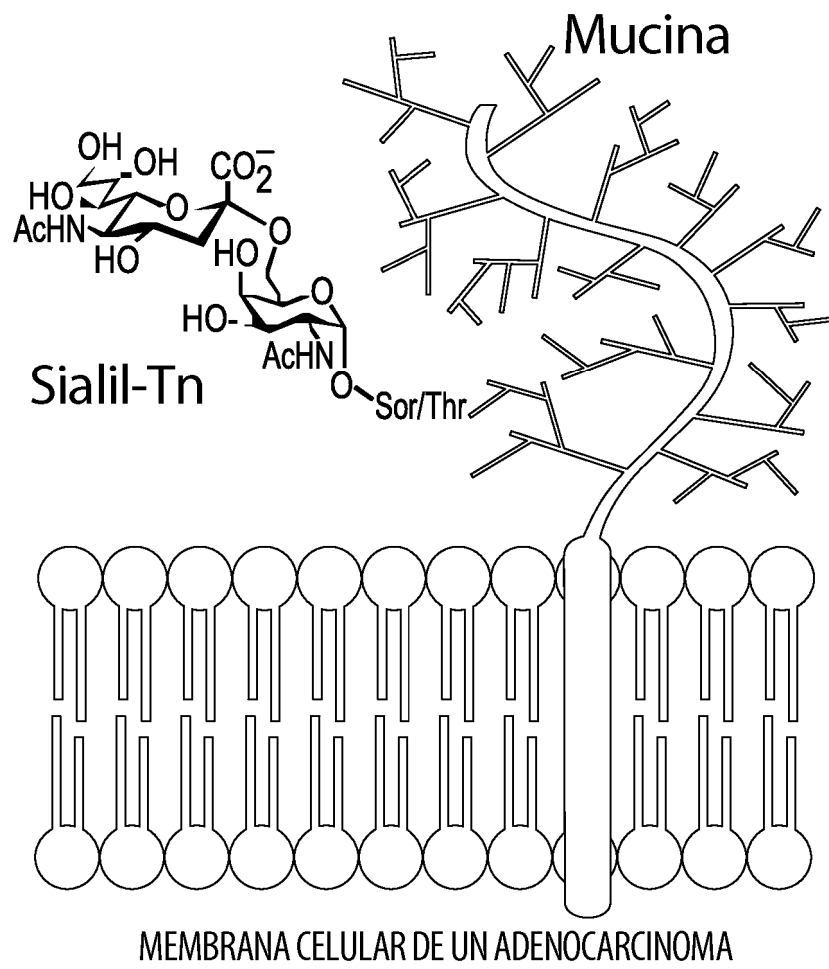
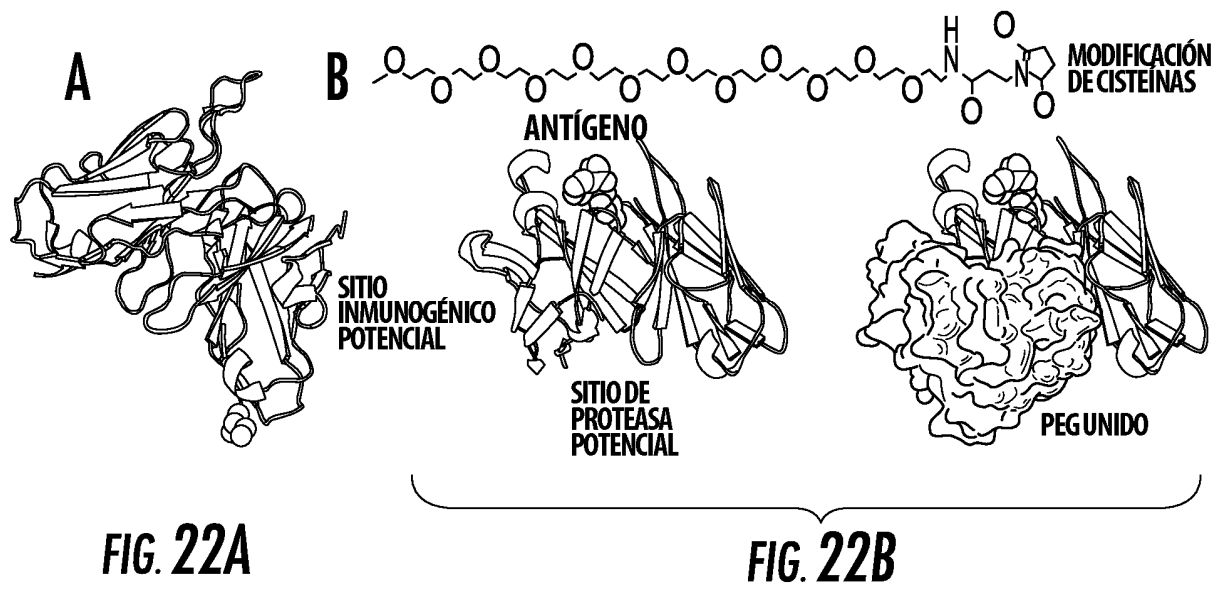


FIG. 21



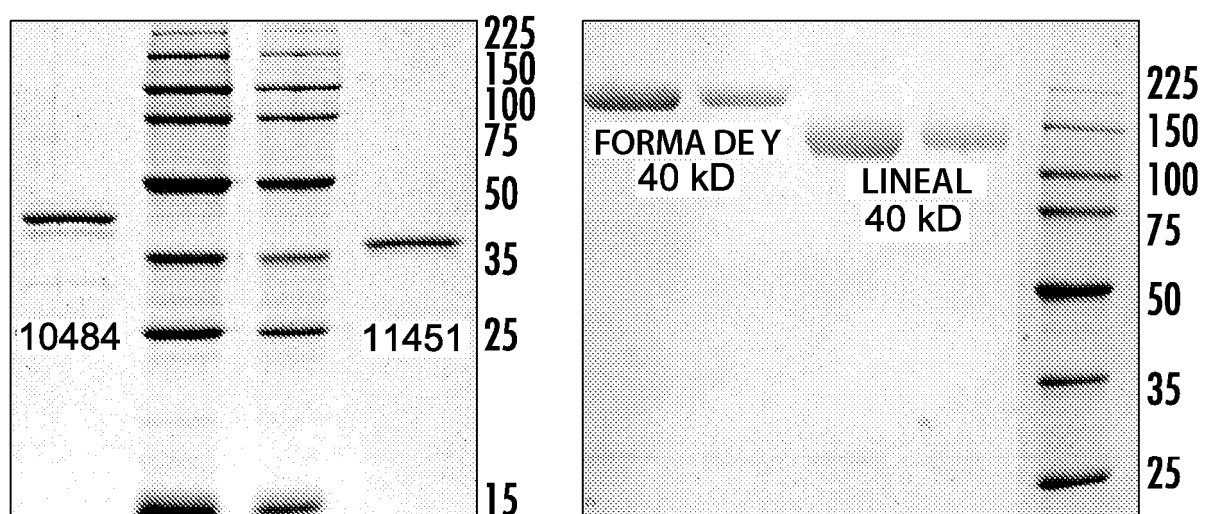


FIG. 23

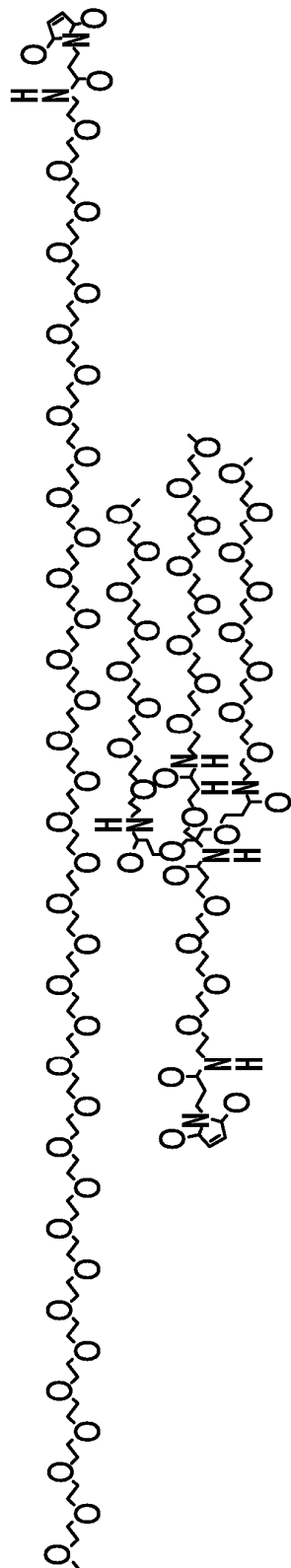


FIG. 24

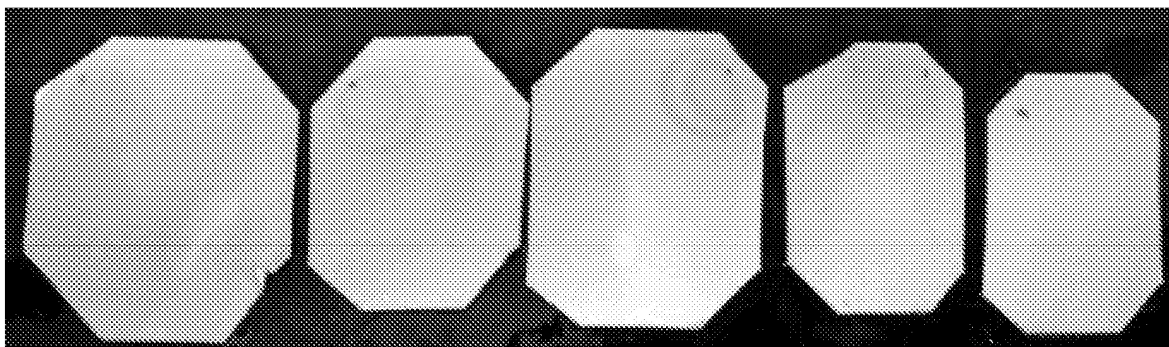


FIG. 25

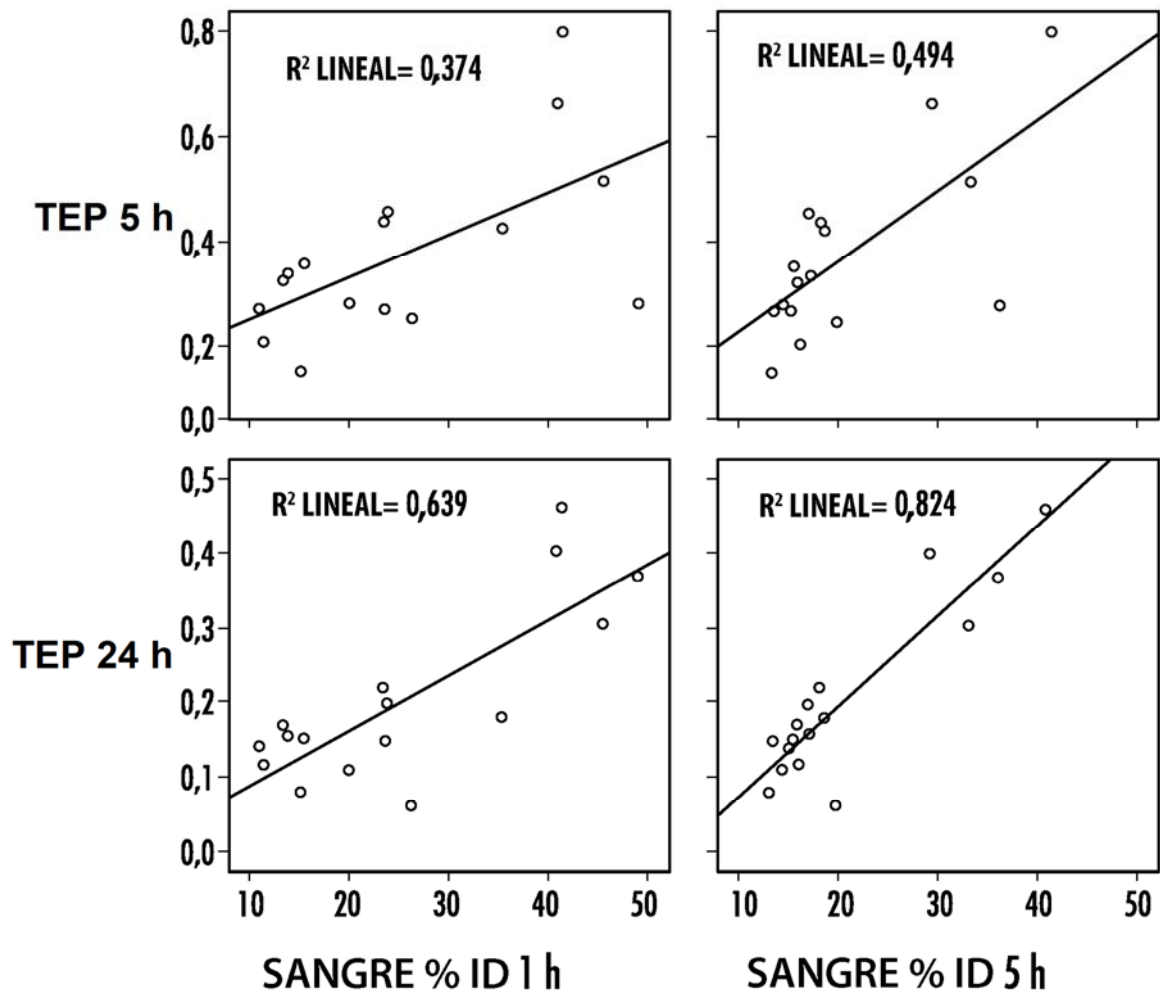


FIG. 26

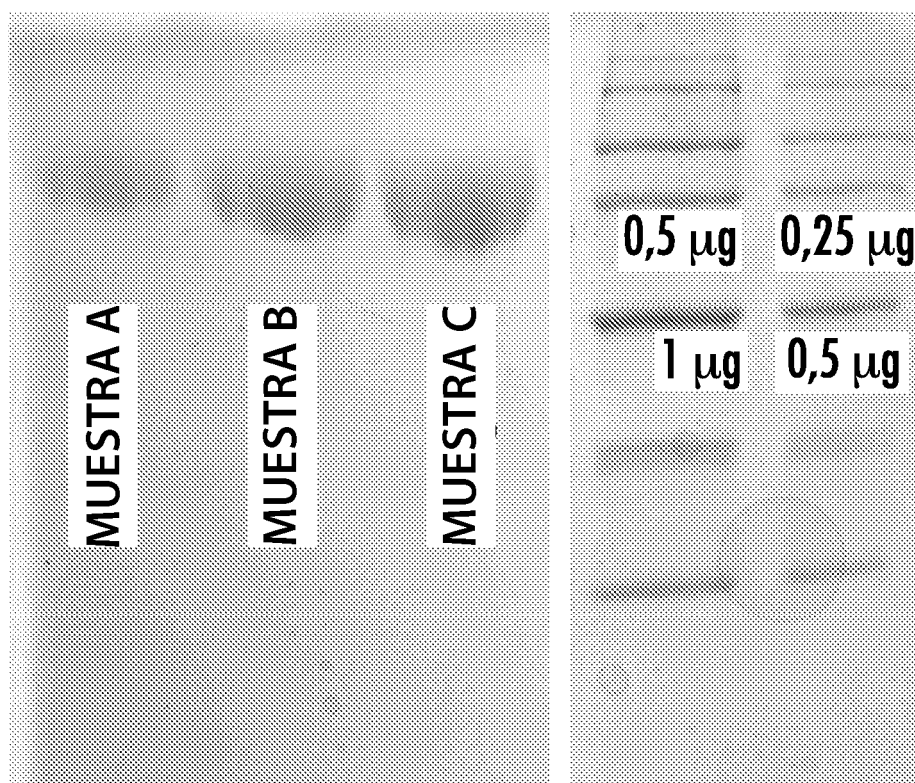


FIG. 27

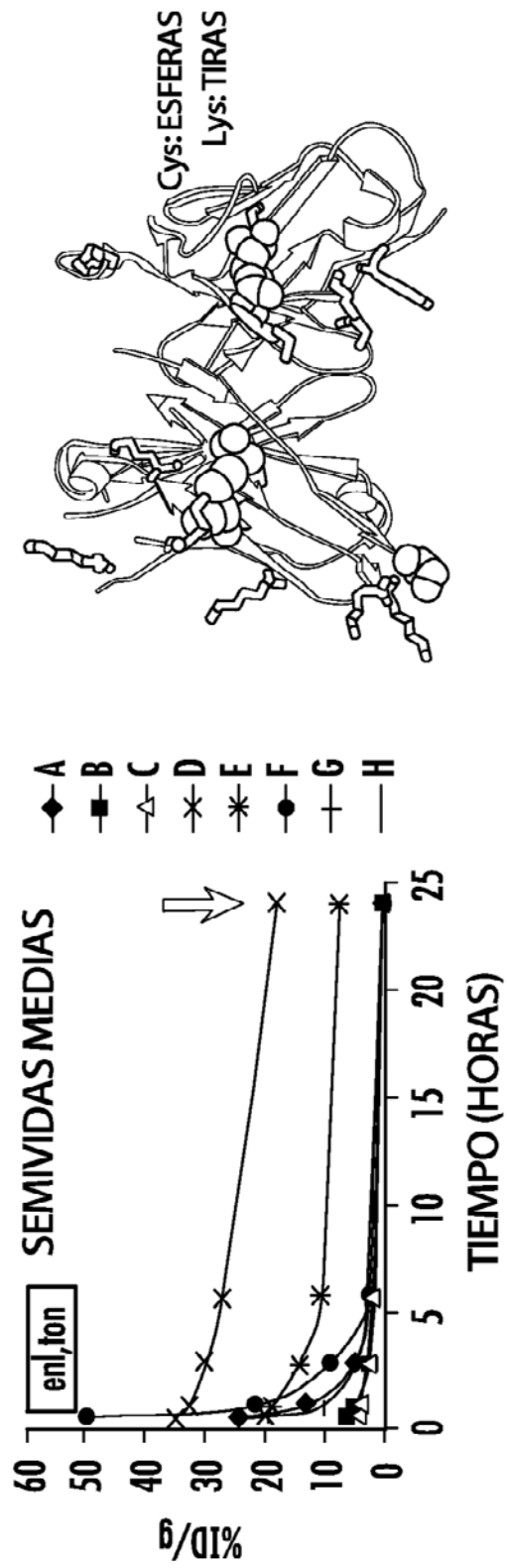


FIG. 28

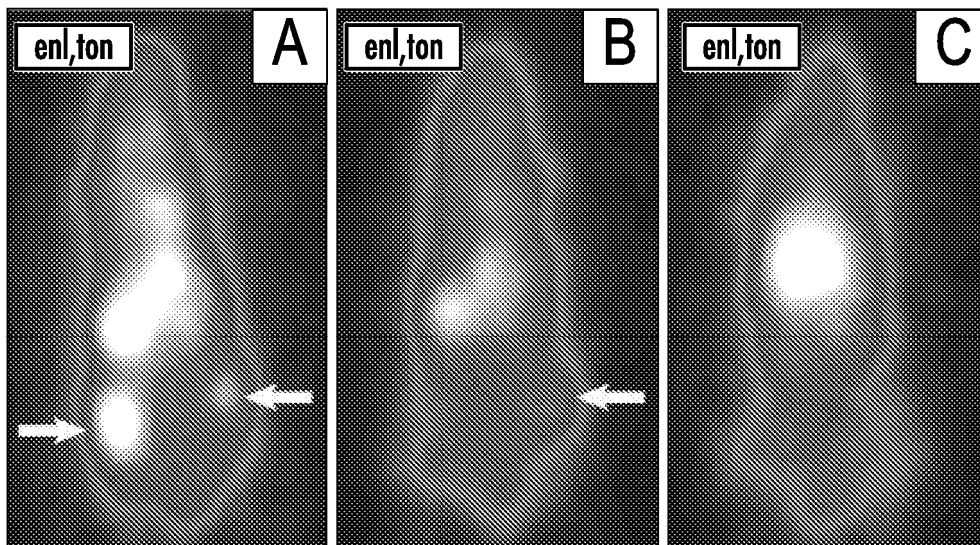


FIG. 29