

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 975**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012** **E 18207370 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024** **EP 3505536**

54 Título: **Anticuerpos contra el antígeno de células madre específico de la próstata y su uso**

30 Prioridad:

**30.06.2011 DE 102011118022**

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

**28.11.2024**

73 Titular/es:

**AVENCELL EUROPE GMBH (100.0%)**

**Tatzberg 47**

**01307 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**BACHMANN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 989 975 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el antígeno de células madre específico de la próstata y su uso

5 La invención se refiere a anticuerpos recombinantes de unión al antígeno de células madre específico de la próstata (PSCA) y a su uso en el diagnóstico y la terapia. Los anticuerpos son adecuados para su uso en el campo de la medicina, la farmacia y la investigación biomédica.

10 El cáncer de próstata es una de las causas de muerte relacionadas con el cáncer más comunes en Alemania. La terapia estándar para el cáncer de próstata primario limitado a órganos es actualmente la prostatectomía radical, es decir, eliminación completa de próstata, vesículas seminales y ganglios linfáticos. Una alternativa a esto es la radioterapia, que se logra al fijar la próstata con material radioactivo (braquiterapia). La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata local y primario pueden tratarse con éxito mediante prostatectomía radical y radioterapia. Se produce una recurrencia en alrededor del 20 al 40 % de los afectados [Roehl 2004].

15 En la actualidad, se están desarrollando distintos procedimientos de terapia basados en anticuerpos. A este respecto, es crucial identificar estructuras diana en las células cancerosas, que pueden servir como sitios de ataque para los agentes terapéuticos basados en anticuerpos. Una estructura diana adecuada como sitio de ataque adecuado para el tratamiento del cáncer de próstata son las proteínas de superficie que están predominantemente presentes en el tejido de la próstata y que muestran una sobreexpresión en células malignas en comparación con las sanas.

20 El antígeno de células madre específico de la próstata (PSCA) es una molécula de superficie de este tipo que es específica de las células de la próstata y se expresa cada vez más en las células de cáncer de próstata en comparación con el tejido sano (antígeno asociado a tumor). El PSCA humano comprende 123 aminoácidos y presenta una secuencia de señal N-terminal, una secuencia de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal y varios sitios de N-glicosilación. Se considera que PSCA es parte de la familia Thy-1/Ly-6 de moléculas de superficie celular ancladas a GPI, ya que presenta, entre otros, los residuos de cisteína conservados característicos de esta familia [Reiter 1998]. Debido al aumento de la expresión en los tumores de próstata, el PSCA es una molécula diana adecuada para la terapia del cáncer de próstata y hasta el momento se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas dirigidas al PSCA como diana. Se ha notificado evidencia de la eficacia del PSCA como diana terapéutica en la terapia del cáncer en seres humanos, entre otros, por vacunación con células dendríticas previamente cargadas con un péptido de PSCA. Los ensayos clínicos (Fase 1 y 2) con 12 pacientes con cáncer de próstata refractarios a terapia hormonal y quimioterapia mostraron que la vacunación con células dendríticas cargadas con péptido PSCA en cinco de los pacientes causó una respuesta de células T a PSCA que se correlacionó en promedio con un tiempo de supervivencia prolongado. En un paciente, incluso pudo observarse una reducción en la masa tumoral [Thomas-Kaskel 2006].

40 El documento WO 2009/032949 A2 da a conocer anticuerpos monoclonales anti-PSCA (1G8), que se utilizan para seleccionar como diana tumores y detectarlos. Las regiones CDR de los anticuerpos tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

	región variable de la cadena ligera (1G8)		región variable de la cadena pesada (1G8)	
45	CDR1	SASSSVRFHW	SEQ ID n.º 69	DYYIHW
				SEQ ID n.º 72
	CDR2	DTSKLAS	SEQ ID n.º 70	WIDPENGDTFVVPKFQG
				SEQ ID n.º 73
	CDR3	QQWSSSPFT	SEQ ID n.º 71	TGGF
				SEQ ID n.º 74

50 Debido a las propiedades citotóxicas del anticuerpo 1G8, no es adecuado para estrategias de selección como diana, que se basan en el reclutamiento de células efectoras (Gu 2005).

Los anticuerpos descritos en el documento WO 2009/032949 A2 se usan de manera diagnóstica, preferiblemente, en forma de anticuerpos monoclonales murinos y humanizados funcionales, así como minicuerpos y diacuerpos específicos de PSCA marcados con radionúclidos.

55 1G8 y otros anticuerpos anti-PSCA se divulgan en los documentos WO 01/40309 A2, WO 01/05427 A1, Lepin y col. 2010 y Morgenroth 2005.

60 [Feldmann 2011] desarrolló anticuerpos recombinantes biespecíficos con un paratopo de unión a PSCA y un paratopo de unión a CD3. El paratopo de unión a PSCA de los anticuerpos biespecíficos se deriva del anticuerpo PSCA 7F5 [Morgenroth 2007] y comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos:

	región variable de la cadena ligera (7F5)		región variable de la cadena pesada (7F5)	
65	CDR1	RTSQDISNYLN	SEQ ID n.º 27	SYTMS
				SEQ ID n.º 30
	CDR2	YTLKLNS	SEQ ID n.º 28	YIHNGGGHTYYPDTIKG
				SEQ ID n.º 31

	región variable de la cadena ligera (7F5)		región variable de la cadena pesada (7F5)	
CDR3	QQSKTLPWT	SEQ ID n.º 29	RMYYGNShWYFDV	SEQ ID n.º 32

Los anticuerpos biespecíficos divulgados en [Feldmann 2011] llevaron con éxito a la lisis específica mediada por células T de células tumorales positivas para PSCA *in vitro*. Para una lisis específica de aproximadamente el 40 % de las células tumorales positivas para PSCA utilizadas, en una proporción de células efectoras a células tumorales positivas para PSCA de 20:1, se deben usar al menos 5 ng de los anticuerpos biespecíficos descritos en [Feldmann 2011]. *In vitro*, con el anticuerpo divulgado en [Feldmann 2011], se pudo conseguir una lisis específica de como máximo aproximadamente el 60 % de las células tumorales positivas para PSCA utilizadas (en presencia de 50 - 100 ng del anticuerpo). No se pudo probar un aumento adicional en la efectividad. Incluso en presencia de 1000 ng del anticuerpo biespecífico, no se pudo lisar una proporción mayor de células tumorales positivas para PSCA.

Los datos conocidos *in vitro* e *in vivo* muestran que el PSCA tiene un gran potencial como antígeno diana para la inmunoterapia de los carcinomas de próstata y es adecuado como diana de diagnóstico.

El objetivo de la invención es proporcionar anticuerpos mejorados frente a PSCA, que sean terapéuticamente eficaces, en particular, en forma de anticuerpos recombinantes biespecíficos en baja concentración y puedan lisar eficazmente células tumorales positivas para PSCA.

El objetivo se consigue según la invención mediante un anticuerpo (también denominado en el presente documento anticuerpo anti-PSCA) que comprende al menos dos unidades de unión diferentes,

i. al menos una de las unidades de unión se une al antígeno de células madre específico de la próstata (PSCA), en donde

- una región variable de la cadena ligera las secuencias de aminoácidos: SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 2, SEQ ID n.º 3 y

- una región variable de la cadena pesada las secuencias de aminoácidos: SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5 y SEQ ID n.º 6;

ii. al menos otra de las unidades de unión está dirigida frente a CD3.

El anticuerpo según la invención, que se caracteriza por las secuencias antes mencionadas, también se denomina en el presente documento de manera simplificada MB1. Los inventores descubrieron sorprendentemente en extensas investigaciones, que el anticuerpo según la invención en forma de anticuerpos biespecíficos producidos de manera recombinante puede mediar la lisis específica de células tumorales positivas para PSCA incluso en cantidades muy pequeñas. Además, se descubrió sorprendentemente, que la lisis específica de células tumorales positivas para PSCA mediada por los nuevos anticuerpos es más efectiva. Por lo tanto, en investigaciones *in vitro* con anticuerpos biespecíficos que contienen un anticuerpo anti-PSCA según la invención, más del 90 % de las células tumorales positivas para PSCA utilizadas pudieron ser lisadas. Por lo tanto, con el nuevo anticuerpo anti-PSCA se puede reducir significativamente la cantidad de anticuerpo utilizada. Al mismo tiempo, aumenta la eficacia terapéutica, ya que las células tumorales positivas para PSCA pueden lisarse más eficazmente con el anticuerpo según la invención. Debido a la baja concentración en la que se puede lograr una eficacia con el anticuerpo según la invención, también es posible una mejor destrucción de las células metastásicas positivas para PSCA con el anticuerpo según la invención. Los estudios comparativos con anti-PSCA 7F5 conocido de la técnica anterior en un constructo biespecífico comparable confirman claramente la superioridad del anticuerpo de la invención tanto en estudios *in vitro* (Fig. 3) como *in vivo* (Fig. 4).

Los anticuerpos anti-PSCA según la invención preferidos contienen las secuencias como se definió anteriormente, en donde la unidad de unión dirigida frente a PSCA presenta una secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada de al menos un 80 %, preferiblemente, al menos un 90 %, de manera especialmente preferida, al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la siguiente secuencia de aminoácidos:

- región variable de la cadena ligera SEQ ID n.º 24, región variable de la cadena pesada SEQ ID n.º 26 o

- región variable de la cadena ligera SEQ ID n.º 20, región variable de la cadena pesada SEQ ID n.º 22.

De estos, se prefieren anticuerpos anti-PSCA con las secuencias definidas anteriormente, cuyas regiones variables presentan una estructura humanizada. Son particularmente preferidos anticuerpos anti-PSCA, cuya región variable de la cadena ligera contiene la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID n.º 24 y su región variable de la cadena pesada contiene la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID n.º 26.

El término “anticuerpo” en el sentido según la invención abarca todos los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo capaces de unirse específicamente a un antígeno. Los anticuerpos recombinantes consisten en anticuerpos que se

producen con ayuda de organismos genéticamente modificados. El término anticuerpo abarca tanto los anticuerpos monoclonales completos como sus fragmentos de unión a epítipo. En este sentido, los fragmentos de unión a epítipo (también denominados en este caso fragmentos de anticuerpo) abarcan aquellas partes del anticuerpo que son capaces de unirse al antígeno. Los fragmentos de anticuerpo en el sentido de la invención incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, fragmentos variables monocatenarios (cadena simple) (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos variables unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que contienen o bien una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) o una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>). Los fragmentos de anticuerpo contienen las regiones variables o bien solas o bien en combinación con regiones adicionales, que se seleccionan de la región bisagra y la primera, segunda y tercera zona de la región constante (C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3).

Además, el término anticuerpo comprende anticuerpos producidos de forma recombinante, tales como diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Igualmente, el término anticuerpo abarca anticuerpos quiméricos, en los que diferentes partes del anticuerpo proceden de especies distintas, tales como, por ejemplo, anticuerpos con una región variable murina, que está combinada con una región constante humana. Los anticuerpos humanizados también están incluidos en el presente documento por el término anticuerpo. El fin de humanizar anticuerpos es reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, como los anticuerpos murinos, para su uso en el sistema humano, mientras se mantiene la afinidad de unión completa y la especificidad antigénica. Los anticuerpos humanizados se pueden preparar por varias vías conocidas, como la renovación de superficies y el injerto de CDR. En la renovación, una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis altera todas las regiones no CDR en la superficie del anticuerpo, para parecerse a la superficie de los anticuerpos del organismo diana. En el injerto de CDR, las regiones de CDR del anticuerpo por humanizar se introducen en regiones variables humanas.

Los fragmentos de anticuerpo están opcionalmente ligados entre sí a través de un enlazador. El enlazador comprende una secuencia peptídica corta (preferiblemente, de 10 a 50 residuos de aminoácidos de largo) seleccionada de modo que el fragmento de anticuerpo tenga un plegamiento tridimensional de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, que tenga la especificidad antigénica del anticuerpo completo. Se prefieren los enlazadores de glicina-serina o péptidos enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos según SEQ ID n.º 75 o SEQ ID n.º 76.

La expresión “región variable” como se usa en el presente documento significa las partes de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos, que difieren en su secuencia entre los anticuerpos y determinan la especificidad del anticuerpo y la unión a su antígeno. En este sentido, la variabilidad no está distribuida uniformemente en la región variable, sino que generalmente se concentra dentro de tres segmentos definidos de la región variable, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, también denominadas regiones hipervariables), que están contenidas en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas. El sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, el denominado paratopo, se caracteriza por las regiones hipervariables (CDR) de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo.

Para describir anticuerpos, el término simplificado anticuerpo anti-“antígeno” también se usa en el presente documento para indicar que es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno indicado en el término. Así, por ejemplo, un “anticuerpo anti-PSCA” en el sentido de la invención significa un anticuerpo que se une específicamente al antígeno PSCA. Por unión específica de un anticuerpo a un antígeno particular se entiende en el presente documento, que un anticuerpo con una alta afinidad se une al antígeno particular y se une con una afinidad significativamente menor y, con preferencia, no se une a otros antígenos.

Los anticuerpos preferidos se encuentran en forma de un fragmento scFv o de un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Otros anticuerpos preferidos son anticuerpos biespecíficos que se producen de forma recombinante.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-PSCA según la invención (anticuerpos naífs o recombinantes) están conjugados con un grupo efector. La conjugación significa en este sentido el acoplamiento de una sustancia, es decir, el grupo efector, al anticuerpo. La conexión del anticuerpo al grupo efector se produce preferiblemente por expresión recombinante en forma de una proteína de fusión o por métodos *in vitro*, en donde el grupo efector se une preferiblemente al anticuerpo a través de grupos enlazadores químicos (por ejemplo, a través de enlaces tioéter o enlaces disulfuro). También pueden estar unidos al anticuerpo por una molécula portadora intermedia, por ejemplo, albúmina de suero. Opcionalmente, un anticuerpo según la invención contiene varios grupos efectores. Los grupos efectores se seleccionan preferiblemente de principios activos, péptidos (con una longitud de 10 a 100 aminoácidos), proteínas (con una longitud de más de 100 aminoácidos), moléculas coestimuladoras, colorantes o agentes de contraste.

Los anticuerpos anti-PSCA según la invención preferidos están conjugados con principios activos, es decir, con sustancias farmacéuticamente activas. Los principios activos preferidos incluyen toxinas, preferiblemente, citostáticos, preferiblemente seleccionados entre maytansinoides y análogos de maytansinoides, taxoides, análogos de CC-1065 y CC-1065, dolastatina y análogos de dolastatina, metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo y caliqueamicina.

Otros anticuerpos anti-PSCA según la invención preferidos están conjugados con agentes de contraste. Los agentes de contraste preferidos son radionúclidos, de los cuales se prefieren los isótopos radiactivos de tecnecio, renio, itrio, cobre, galio, indio, bismuto y platino, en particular,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  y  $^{111}\text{In}$ .

- 5 Otros anticuerpos anti-PSCA según la invención preferidos están conjugados con una proteína, preferiblemente, una enzima, preferiblemente, una enzima adecuada para el sistema ADEPT, una molécula coestimuladora, preferiblemente, un ligando de receptor tipo Toll, preferiblemente, CpG o conjugado con un ácido nucleico.

- 10 Otros anticuerpos anti-PSCA según la invención preferidos están conjugados con un colorante, preferiblemente, un colorante fluorescente.

- 15 Otros anticuerpos según la invención preferidos están conjugados con un péptido, que contiene una región de unión a la que se une específicamente un anticuerpo específico para el péptido. Preferiblemente, el péptido comprende una secuencia peptídica de 10 a 50 aminoácidos de longitud de una región alfa-helicoidal de la proteína La humana (la secuencia de aminoácidos de la proteína La humana corresponde a la SEQ ID n.º 77). Son particularmente preferidos péptidos con una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, preferiblemente, al menos un 95 %, de manera especialmente preferida, al menos un 99 % con una de las secuencias de aminoácidos según la SEQ ID n.º 75 o SEQ ID n.º 76.

- 20 De manera especialmente preferida, los anticuerpos anti-PSCA según la invención se producen de manera recombinante.

- 25 Una “unidad de unión” en el sentido de la invención se refiere a cualquier estructura molecular que se una específicamente a sustancias o estructuras definidas. Dependiendo de la sustancia o estructura a la que esté unida, la unidad de unión tiene diferentes estructuras. Por lo tanto, la expresión “unidad de unión” en el sentido de la invención incluye tanto anticuerpos (en este caso, la unidad de unión contiene al menos el paratopo funcional del anticuerpo) como otras moléculas, preferiblemente, proteínas, que experimentan una unión específica con un antígeno. Dichas moléculas son preferiblemente ligandos, que se unen específicamente a una estructura de superficie (por ejemplo, un receptor de superficie) en una célula, en particular, una célula efectora.

- 30 Según la invención, la unidad de unión adicional, que está contenida en los anticuerpos según la invención se une específicamente a una célula efectora. La definición de células efectoras en el sentido de la invención abarca todas las células del sistema inmune innato y adaptativo que median o participan activamente en las reacciones inmunes. La célula efectora se selecciona preferiblemente de linfocitos T, células NK, monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos.

- 35 Según la invención, si el anticuerpo recombinante contiene al menos dos anticuerpos diferentes (al menos un anticuerpo anti-PSCA según la invención y al menos un anticuerpo adicional que está dirigido frente a CD3), entonces está preferiblemente en forma de diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo. De estos se prefieren los anticuerpos biespecíficos de anticuerpos monocatenarios (diacuerpo biespecífico de cadena simple, scBsDb) o anticuerpos tándem biespecíficos de anticuerpos monocatenarios (anticuerpo tándem biespecífico de cadena simple, scBsTaFv). Se prefiere muy en particular, un anticuerpo recombinante según la invención en forma de un scBsTaFv.

- 40 Según la invención, el anticuerpo está dirigido contra la siguiente estructura de superficie sobre células efectoras: CD3. Se prefieren los anticuerpos que están dirigidos frente a CD3 (anticuerpos anti-CD3), en donde el anticuerpo anti-CD3 contiene las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 45 - una región variable de la cadena pesada: SEQ ID n.º 66, SEQ ID n.º 67, SEQ ID n.º 68 y  
50 - una región variable de la cadena ligera: SEQ ID n.º 58, SEQ ID n.º 59, SEQ ID n.º 60.

- 55 Más preferidos son los anticuerpos anti-PSCA recombinantes, que contienen al menos dos unidades de unión diferentes, en donde al menos otra de las unidades de unión es un ligando (preferiblemente, una proteína o un glicano), que se une específicamente a una estructura de superficie en una célula efectora. Los ligandos preferidos influyen en la actividad de las células efectoras por su unión a la superficie celular (efectora). El ligando se selecciona de modo que se una específicamente a estructuras de superficie de células efectoras y desencadene mediante la unión cascadas de señalización para la activación de las células efectoras. Se prefiere como ligando una estructura de proteína o un glicano que se une específicamente a un receptor, que se expresa específicamente en la superficie de células efectoras, en donde el ligando provoca una activación de la célula efectora por su unión al receptor. Particularmente preferidas son las estructuras de proteína seleccionadas de ULB-Ps (por ejemplo, ULB-P2), MICA, MICB y citoquinas (tales como, por ejemplo, IL2 e IL15).

- 60 Los anticuerpos según la invención, en particular, los anticuerpos recombinantes según la invención son adecuados para la unión específica a células positivas para PSCA *in vivo* e *in vitro*. Por lo tanto, la invención también abarca el uso de los anticuerpos anti-PSCA según la invención como medicamento, en particular, para el tratamiento de enfermedades tumorales, preferiblemente, cáncer de próstata o como agente de diagnóstico.

Además, la invención abarca los anticuerpos según la invención para su uso en la terapia de enfermedades tumorales, en particular, cáncer de próstata. Igualmente, la invención abarca el uso de los anticuerpos según la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales, en particular, cáncer de próstata.

Una aplicación terapéutica preferida de los anticuerpos (preferiblemente recombinantes) según la invención es el tratamiento de enfermedades tumorales, preferiblemente, cáncer de próstata. En la aplicación terapéutica, los anticuerpos según la invención se usan preferiblemente para dirigir sustancias terapéuticamente activas o células efectoras al tejido tumoral. Para dirigir sustancias terapéuticamente activas al tejido tumoral, se utilizan preferiblemente anticuerpos recombinantes según la invención, que se conjugan con un principio activo. Para dirigir células efectoras al tejido tumoral se utilizan anticuerpos recombinantes según la invención, que contienen al menos dos unidades de unión diferentes, en donde al menos una de las unidades de unión es un anticuerpo anti-PSCA según la invención y otra de las unidades de unión que se une específicamente a CD3 en células T. Preferiblemente, los anticuerpos mencionados anteriormente se usan para este propósito.

La invención también abarca una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición farmacéutica según la invención se encuentra en una forma adecuada para administración intravenosa.

Preferiblemente, los anticuerpos están presentes en la composición farmacéutica según la invención en forma recombinante como anticuerpos quiméricos o, de manera especialmente preferida, humanizados, que presentan una inmunogenicidad reducida.

Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden diversas formas de dosificación y son preferiblemente adecuadas para la administración parenteral, de manera especialmente preferida, para la administración intravenosa. Preferiblemente, la composición farmacéutica parenteral se encuentra en una forma de dosificación que es adecuada para inyección. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas particularmente preferidas son soluciones, emulsiones o suspensiones del anticuerpo en un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

Los portadores farmacéuticamente aceptables son preferiblemente líquidos estériles, en particular, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 % y similares. Las composiciones farmacéuticas se esterilizan mediante técnicas convencionales bien conocidas. Las composiciones contienen preferiblemente excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como los necesarios para proporcionar aproximadamente condiciones fisiológicas y/o aumentar la estabilidad de los anticuerpos contenidos en la composición, tales como agentes reguladores del pH y agentes tamponantes, agentes reguladores de la toxicidad y similares, preferiblemente, seleccionados de entre acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y lactato de sodio.

Preferiblemente, la composición farmacéutica es una solución tamponada inyectable, que contiene entre 0,1 y 500 mg/ml de anticuerpo, de manera especialmente preferida, entre 0,1 y 250 mg/ml de anticuerpo, en particular, junto con 1 a 500 mmol/l de tampón. La solución inyectable se encuentra preferiblemente en una forma de dosificación líquida o liofilizada. El tampón se selecciona preferiblemente de histidina, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio y fosfato de potasio.

Una aplicación de diagnóstico preferida es el diagnóstico *in vivo*, en donde se usa un anticuerpo anti-PSCA según la invención conjugado con agente de contraste para el transporte dirigido de agentes de contraste al tejido tumoral. Otra aplicación de diagnóstico preferida de los anticuerpos anti-PSCA según la invención es el diagnóstico *in vitro*, donde se prefiere el uso de un anticuerpo anti-PSCA según la invención conjugado con colorante para detectar células positivas para PSCA en una muestra, en particular, en una muestra de tejido.

La invención también abarca una composición de diagnóstico que contiene un anticuerpo anti-PSCA según la invención. El anticuerpo anti-PSCA está presente preferiblemente en una solución tamponante, preferiblemente, en solución salina tamponada.

La invención también abarca un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos codifica para un anticuerpo anti-PSCA según la invención. Preferiblemente, las secciones que codifican para las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen las siguientes secuencias de nucleótidos:

- región variable de la cadena ligera: SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 11 y región variable de la cadena pesada: SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 17 o

- región variable de la cadena ligera: SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 12 y región variable de la cadena pesada: SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 16, SEQ ID n.º 18.

La expresión “ácidos nucleicos” en el sentido de la invención, además de los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y los ácidos ribonucleicos (ARN), también incluye todos los demás polímeros lineales, en los cuales las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) o uracilo (U) están dispuestas en una secuencia correspondiente (secuencia de

ácido nucleico). La invención también abarca las secuencias de ARN correspondientes (en las que la timina se reemplaza por uracilo), secuencias complementarias y secuencias con esqueleto de ácido nucleico modificado o el término extremo 3' o 5' terminal. La expresión "secuencias de ácido nucleico con esqueleto alterado" abarca todos los otros polímeros lineales en los que las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) o uracilo (U) están dispuestas en una secuencia correspondiente, tales como, por ejemplo, secuencias con un fosforotioato, fosforamidato o esqueleto derivatizado de O-metilo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o esqueletos mixtos. La expresión "extremo 3' o 5' terminal modificado" abarca tanto modificaciones que sirven para la estabilización como también la unión de marcadores. Ejemplos de marcadores son enzimas, colorantes o colorantes fluorescentes, radionucleótidos y haptenos, tales como, por ejemplo, digoxigenina o biotina.

La invención abarca también un vector (también: "vector de expresión") que contiene un ácido nucleico según la invención. En el sentido de la invención, un vector de expresión significa un plásmido, virus u otro portador que contiene una secuencia de ácido nucleico según la invención de forma recombinante por inserción o incorporación. El vector de expresión contiene normalmente un origen de replicación, un promotor, así como secuencias génicas específicas que permiten la selección fenotípica de las células huésped que contienen vectores de expresión.

Además, la invención comprende una célula huésped o un organismo huésped no humano que contiene una secuencia de nucleótidos según la invención o un vector según la invención. La secuencia de nucleótidos o el vector están contenidos a este respecto de manera recombinante en la célula huésped o en el organismo huésped no humano.

Una célula huésped en el sentido de la invención es una célula natural o una línea celular transformada o modificada genéticamente, que contiene al menos un vector según la invención. La invención abarca transfectantes transitorios (por ejemplo, mediante inyección de ARNm) o células huésped, en las que al menos un vector de expresión según la invención está contenido como plásmido o cromosoma artificial, así como células huésped, en las que un vector de expresión según la invención está integrado de manera estable en el genoma del huésped.

La célula huésped se selecciona preferiblemente de células de procariotas y eucariotas. Las células madre embrionarias humanas obtenidas destruyendo embriones no son células huésped en el sentido de la invención. Las células procariotas preferidas se seleccionan de células de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Las células eucariotas preferidas se seleccionan de células de levadura (preferiblemente, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*), células de insecto, células de anfibio y células de mamífero (preferiblemente CHO, HeLa, HEK293).

Los organismos huésped no humanos contienen un vector según la invención, que está integrado de manera estable en el genoma del organismo huésped o células individuales del organismo huésped. Los organismos huésped preferidos son plantas, invertebrados o vertebrados, en particular, *Bovidae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, medaka, pez cebra o *Mus musculus*, o células o embriones de los organismos mencionados.

La invención proporciona anticuerpos anti-PSCA y sistemas de expresión asociados, con los cuales el PSCA humano puede unirse de manera más efectiva. De este modo, el anticuerpo anti-PSCA según la invención es particularmente adecuado para su utilización en sistemas terapéuticos en los que la destrucción de células tumorales puede estar mediada por el reclutamiento de células efectoras. Debido a la mayor afinidad del anticuerpo según la invención por PSCA, solo se requiere una cantidad significativamente menor de anticuerpo para una unión (por ejemplo, en la aplicación terapéutica). Pudo mostrarse que el anticuerpo anti-PSCA según la invención puede mediar la lisis específica de células tumorales positivas para PSCA en concentraciones significativamente más bajas y con una eficiencia significativamente mayor. Por un lado, esto tiene ventajas de costo, ya que el consumo de anticuerpos puede reducirse. Por otro lado, en la aplicación terapéutica, se espera una mejor selección como diana sobre todo de las células metastatizantes, así como menos efectos secundarios debido a la menor cantidad utilizada.

Con referencia a las siguientes figuras y ejemplos de realización, la invención se explicará con más detalle, sin limitar la invención a las mismas.

Fig. 1 Representación esquemática de diferentes anticuerpos recombinantes. A) Anticuerpo biespecífico según la invención en forma de un scBsTaFv que contiene una unidad de unión frente a PSCA y una unidad de unión frente a CD3. B) Anticuerpo recombinante frente a PSCA que contiene una etiqueta peptídica (5B9), para su uso con el anticuerpo biespecífico también representado en forma de scBsTaFv que contiene una unidad de unión frente a CD3 y una unidad de unión contra la región 5B9 de la proteína La humana (ejemplo comparativo). C) Anticuerpo recombinante frente a PSCA que contiene una etiqueta peptídica (7B6), para su uso con el anticuerpo biespecífico también representado en forma de scBsTaFv que contiene una unidad de unión frente a CD3 y una unidad de unión contra la región 7B6 de la proteína La humana (ejemplo comparativo). Las respectivas subunidades V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> están unidas a través de los péptidos enlazadores a las secuencias de aminoácidos que se indican en las figuras.

Fig. 2 Anticuerpo recombinante según SDS-PAGE. Carril 1: anticuerpo humanizado biespecífico CD3-7B6 (scBsTaFv CD3-7B6); carril 2: anticuerpo humanizado biespecífico CD3-5B9 (scBsTaFv CD3(G4S)-5B9); carril 3: anticuerpo murino biespecífico CD3-PSCA (7F5) (scBsTaFv CD3-PSCA (7F5)); carril 4: anticuerpo humanizado mono-específico scFv PSCA (MB1)-7B6; carril 5: anticuerpo humanizado biespecífico según la invención CD3-PSCA(MB1) (scBsTaFv

CD3-PSCA(MB1)); carril 6: anticuerpo humanizado monoespecífico scFv PSCA (MB1)-5B9. M... marcadores con tamaños de fragmento (de arriba a abajo): 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa.

Fig. 3 lisis específica de células tumorales PC3-PSCA cargadas con  $^{51}\text{Cr}$  en el ensayo según el ejemplo de realización 4. Las barras corresponden a los siguientes ensayos: 1 (negro) ... scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) biespecífico humanizado del ejemplo de realización 1; 2 (blanco) ... scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) biespecífico murino del ejemplo de realización 1; 3 (rayado) ... scBsTaFv CD3-PSCA(7F5) biespecífico humanizado (ejemplo comparativo); 4 (punteado) ... scBsTaFv CD3-PSCA(7F5) biespecífico murino (ejemplo comparativo).

Fig. 4 superficie tumoral formada después de la transferencia de células tumorales positivas para PSCA, células T y anticuerpos tal como se describe en el ejemplo de realización 5. A) Relación efector-diana 1:1; B) Relación efector-diana 10:1. Las líneas numeradas corresponden a los siguientes ensayos: 1 ... anticuerpo control biespecífico anti-CD3xanti-5B9 (control); 2 ... scFv anti-PSCA(MB1) humanizado monoespecífico del ejemplo de realización 1 (control); 3 ... ensayo de control sin anticuerpos (control negativo); 4 ... scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) biespecífico humanizado del ejemplo de realización 1 (según la invención); 5 ... scBsTaFv CD3-PSCA(7F5) biespecífico humanizado tal como se describe en el ejemplo 3 (ejemplo comparativo); 6 ... scBsDb CD3xPSCA(7F5) biespecífico humanizado, que contiene las regiones variables de unión a PSCA del anticuerpo 7F5 (ejemplo comparativo).

Ejemplo de realización 1: Preparación de anticuerpos recombinantes biespecíficos (scBsTaFv) que se unen específicamente a PSCA (direccionamiento directo)

Para la utilización para el direccionamiento de células PSCA<sup>+</sup>, se preparó un anticuerpo biespecífico (diacuerpo biespecífico de cadena simple, scBsTaFv) que se une al PSCA con una unidad de unión y a CD3 con la otra unidad de unión. El anticuerpo biespecífico también se denomina en el presente documento de manera simplificada como CD3-PSCA(MB1) y se muestra esquemáticamente en la Fig. 1A.

El dominio de unión a PSCA contiene la región variable del anticuerpo anti-PSCA MB1 según la invención (anticuerpo murino anti-PSCA: cadena pesada SEQ ID n.º 22, cadena ligera SEQ ID n.º 20; anticuerpo anti-PSCA humanizado: cadena pesada SEQ ID n.º 26, cadena ligera SEQ ID n.º 24). Sirve para unirse a las células tumorales positivas para PSCA. El otro dominio se une a CD3, un componente del complejo receptor de células T y sirve para la activación de células T. Esto permite el reclutamiento de células T en las células positivas para PSCA, así media la lisis específica de las células positivas para PSCA por parte de las células T.

Para la generación de anticuerpos monoclonales anti-PSCA MB1, se inmunizaron ratones H-2d C3Hx Balb/cF1 positivos con células P815 que expresaban PSCA recombinantemente en la superficie. Por fusión de células de bazo y células de mieloma se produjeron células de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales anti-PSCA. Después de la clonación de células individuales de estas células de hibridoma, se pudo seleccionar el clon MB1. Para la generación de anticuerpos MB1 anti-PSCA recombinantes, se identificaron las secuencias de ácido nucleico del dominio variable de la cadena de anticuerpos pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ). Primero, se aisló el ARNm de las células de hibridoma secretoras de MB1 anti-PSCA y se transcribió en ADNc. A continuación, el dominio variable de la cadena pesada del isotipo IgG1 se amplificó con cebadores degenerados (par de cebadores SEQ ID n.º 90 y 91) y el dominio variable de la cadena ligera K usando cebadores degenerados (par de cebadores SEQ ID n.º 92 y 93). Los productos de la PCR se subclonaron en cada caso en el vector pGEM T-easy y se secuenciaron.

Para la clonación del fragmento murino monocaenario (scFv) del anticuerpo anti-PSCA MB1 (denominado en el presente documento "scFv MB1") en el que la región variable de la cadena pesada está unida a través de tres enlazadores de glicina-serina (G<sub>4</sub>S, SEQ ID n.º 131) a la región variable de la cadena ligera, la secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo MB1 anti-PSCA se amplificó con ayuda del par de cebadores según la SEQ ID n.º 94 y 95. La secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo MB1 anti-PSCA se amplificó con ayuda del par de cebadores según la SEQ ID n.º 96 y 97. Los ácidos nucleicos amplificados se fusionaron mediante PCR superpuesta al scFv PSCA MB1 y se clonaron a través de SfiI y NotI en el vector de expresión eucariótico pSecTag2B (el vector de expresión también se conoce en el presente documento como "pSecTag2B\_scFv MB1 murino").

Para la clonación del anticuerpo en tándem biespecífico (scBsTaFv), que está dirigido contra PSCA y CD3 y que contiene las regiones CDR del anticuerpo MB1 murino, se amplificó la secuencia de ácido nucleico de un scFv anti-CD3 murino con un par de cebadores según la SEQ ID n.º 98 y 99 y se clonó a través del lado 3' Apal del scFv MB1 murino en el vector de expresión previamente producido "pSecTag2B\_scFv MB1 murino", de modo que se creó el vector "pSecTag2B\_scBsTaFv PSCA (MB1)-CD3 murino".

Para la clonación del anticuerpo tándem biespecífico (scBsTaFv), que se dirige contra PSCA y CD3 y que contiene las regiones CDR del anticuerpo MB1 humanizado, se humanizaron las regiones marco (FWR) de los anticuerpos PSCA MB1 y CD3. Para hacer esto, los FWR de los dominios de anticuerpos murinos variables se reemplazaron con las secuencias FWR humanas de una IgG1 humana altamente homóloga. Además, las secuencias de anticuerpos humanizados se optimizaron para su expresión y secreción por líneas celulares humanas. Para la humanización de scFv CD3 murino o scFv MB1, primero las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  humanizadas se amplificaron individualmente como se



describió con anterioridad y luego se unieron por PCR. La humanización de la secuencia de V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> se llevó a cabo mediante el ensamblaje de oligonucleótidos superpuestos y la posterior amplificación de la secuencia de ácido nucleico de V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> humanizada. Para poder determinar las secuencias de los oligonucleótidos superpuestos, la secuencia V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> murina se alineó primero contra una base de datos de IgG humana (NCBI IgBlast), que identifica la IgG humana con la mayor homología y, en última instancia, crea la secuencia V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> humanizada teóricamente y sintetiza los oligonucleótidos superpuestos. Se construyeron varios anticuerpos biespecíficos utilizando péptidos enlazadores de diferentes longitudes.

#### Humanización del anticuerpo anti-CD3

Para la humanización de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3, se reunieron los oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 100 a 105. Posteriormente, la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 (con un péptido enlazador G<sub>4</sub>S, SEQ ID n.º 132) se amplificó con ayuda del par de cebadores según la SEQ ID n.º 105 y 106. Para la humanización de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3, se reunieron los oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 107 a 112. La secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 se amplificó con el par de cebadores según la SEQ ID n.º 112 y 113.

Para la generación del scFv humanizado del anticuerpo anti-CD3, en el que la región variable de la cadena pesada a través de un enlace glicina-serina (G<sub>4</sub>S) está vinculada a la región variable de la cadena ligera, primero se clonó la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 a través de SfiI y BamHI en el vector de expresión pSecTag2B y luego se colocó a través de BamHI y NotI la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 aguas abajo en el mismo vector de expresión.

Para la generación del scFv humanizado del anticuerpo anti-CD3, en la cual la región variable de la cadena pesada está unida a través del enlazador de glicina-serina (G<sub>4</sub>S) a la región variable de la cadena ligera, se preparó primero la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 con tres enlazadores de glicina-serina (G<sub>4</sub>S). Para este propósito, se amplificó la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 (con tres péptidos enlazadores G<sub>4</sub>S) con ayuda del par de cebadores según la SEQ ID n.º 105 y 114 y se clonó a través de SfiI y BamHI en el vector de expresión pSecTag2B y luego se colocó a través de BamHI y NotI la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 aguas abajo en el mismo vector de expresión.

#### Humanización del anticuerpo anti-PSCA MB1

Para la humanización de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PSCA MB1, se reunieron los oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 115 a 118. La secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PSCA MB1 se amplificó con el par de cebadores según la SEQ ID n.º 119 y 120.

Para la humanización de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PSCA MB1, se reunieron los oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 121 a 125. La secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PSCA MB1 se amplificó con el par de cebadores según la SEQ ID n.º 126 y 127.

#### Preparación del anticuerpo humanizado biespecífico scBsTaFv CD3-PSCA(MB1)

Finalmente, las secuencias de ácido nucleico humanizado de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo MB1 se reunieron mediante PCR de superposición usando los cebadores según la SEQ ID n.º 128 y 129, y se amplificaron. La secuencia de ácido nucleico así generada que codifica el scFv MB1 humanizado (en la organización V<sub>L</sub>-G<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SGASAAG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>S-V<sub>H</sub>, péptido enlazador según la SEQ ID n.º 130) se clonó mediante XhoI y ApaI aguas abajo del scFv humanizado descrito anteriormente del anticuerpo anti-CD3 (con tres péptidos enlazadores de G<sub>4</sub>S), en donde se generó el vector de expresión “pSecTag2B\_ scBsTaFv PSCA(MB1)-CD3 humano”.

Para la expresión del anticuerpo humanizado biespecífico según la Fig. 1 A, las células Hek293T se transfectaron con el vector de expresión y los anticuerpos secretados se purificaron de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía por afinidad de níquel, opcionalmente, en combinación con una precipitación de sulfato de amonio fraccionado. La Fig. 2, carril 5 muestra un registro de electroforesis en gel SDS del anticuerpo biespecífico purificado.

Ejemplo comparativo: Preparación de anticuerpos recombinantes biespecíficos que se unen específicamente a PSCA (direccionamiento modular)

Para proporcionar una composición farmacéutica según la invención (“sistema de direccionamiento modular 1”, representado esquemáticamente en la Fig. 1 B), se prepararon los siguientes anticuerpos recombinantes:

- anticuerpo anti-PSCA recombinante que contiene un péptido según la SEQ ID n.º 75 (en el presente documento también "E5B9"). Este anticuerpo se denomina en lo sucesivo scFv PSCA(MB1)-E5B9.

- anticuerpo biespecífico (scBsTaFv) que está dirigido frente a CD3 y el péptido según la SEQ ID n.º 75. El paratopo dirigido frente a CD3 comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de las regiones variables: cadena pesada SEQ ID n.º 65, cadena ligera SEQ ID n.º 57. El paratopo dirigido frente al péptido según la SEQ ID n.º 75 comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de las regiones variables: cadena ligera CDR1 SEQ ID n.º 78, CDR2 SEQ ID n.º 79, CDR3 SEQ ID n.º 80, cadena pesada CDR1 SEQ ID n.º 81, CDR2 SEQ ID n.º 82, CDR3 SEQ ID n.º 83. Este anticuerpo se denomina en lo sucesivo scBsTaFv CD3-5B9. Se prepararon dos scBsTaFv CD3-5B9 diferentes, que únicamente se diferencian entre sí en el péptido enlazador entre VH y VL del anticuerpo anti-CD3 (véase la Fig. 1B).

Clonación del scFv PSCA(MB1)-ESB9 humanizado:

Para la generación del scFv PSCA(MB1) humanizado con epítipo E5B9 en el extremo C terminal (MB1 [VL-G4SG4SGASAAG4SG4S-MB1 VH]-[G4S-E5B9], representado en la Fig. 1B a continuación), se amplificó el scFv PSCA(MB1) humanizado descrito en el ejemplo de realización 1 (MB1 VL-G4SG4SGASAAG4SG4S-MB1 VH-G4S, péptidos enlazadores según la SEQ ID n.º 130 y 132) por medio de los cebadores según la SEQ ID n.º 134 y 135 y, a continuación, se clonaron en pSecTag2B a través de SfiI y NotI. Después del ensamblaje de los oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 136 y 137, se clonó la secuencia de ácido nucleico para E5B9 a través de NotI y XhoI del lado 3' del scFv PSCA(MB1) humanizado, donde se produce el constructo "pSecTag2B\_scFv PSCA(MB1)-E5B9 humanizado".

Clonación de dos módulos efectores "scBsTaFv CD3(G4S)-5B9" y "scBsTaFv CD3(3×G4S)-5B9" de unión a las células T y al péptido E5B9

Como se representa esquemáticamente en la Fig. 1B, se prepararon dos de los denominados módulos efectores (anticuerpos biespecíficos scBsTaFv CD3-5B9) para construir el sistema I de direccionamiento modular, que comprende el scFv PSCA(MB1)-5B9, que difieren en el número de elementos de glicina-serina (G4S) del péptido enlazador entre la cadena VH y VL del dominio anti-CD3 y por lo tanto se designaron "scBsTaFv CD3(G4S)-5B9" o "scBsTaFv CD3(3×G4S)-5B9".

- Clonación del "scBsTaFv CD3(G4S)-5B9" humanizado (para el esquema, véase la Fig. 1B anterior):

Para la humanización de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 5B9 (específicamente dirigido contra el péptido E5B9), se reunieron oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 138 a 142. Posteriormente, la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 5B9 (con un péptido enlazador G4S, SEQ ID n.º 132) se amplificó con ayuda del par de cebadores según la SEQ ID n.º 143 y 144. Para la humanización de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5B9, se reunieron los oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 145 a 149. La secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5B9 se amplificó con el par de cebadores según la SEQ ID n.º 150 y 151.

Finalmente, las secuencias de ácido nucleico humanizadas para 5B9 VH y 5B9 VL se reunieron por medio de PCR de solapamiento con el uso de los cebadores según la SEQ ID n.º 152 y 153, y se amplificaron. La secuencia de ácidos nucleicos así generada para el scFv 5B9 humanizado (VH-3×G4S-VL) se clonó a través de XhoI y ApaI aguas abajo del scFv CD3 VH-G4S-VL humanizado en el "pSecTag2B\_scFv CD3 VH-G4S-VL" humanizado, donde se produce el vector "pSecTag2B\_scBsTaFv CD3(G4S)-5B9 humanizado".

- Clonación del "scBsTaFv CD3(3×G4S)-5B9" humanizado (para el esquema, véase la Fig. 1B centro):

La secuencia humanizada para scFv 5B9 (VH-3×G4S-VL) se clonó a través de XhoI y ApaI aguas abajo del scFv CD3 humanizado (VH-3×G4S-VL) en el "pSecTag2B\_scFv CD3 VH-3×G4S-VL" humanizado, donde se produce el vector "pSecTag2B\_scBsTaFv CD3(3×G4S)-5B9 humanizado".

Para proporcionar una composición farmacéutica ("sistema de direccionamiento modular 2", representado esquemáticamente en la Fig. 1 C), se prepararon los siguientes anticuerpos recombinantes:

- anticuerpo anti-PSCA recombinante que contiene un péptido según la SEQ ID n.º 76 (también denominado en el presente documento "E7B6"). Este anticuerpo se denomina en lo sucesivo scFv PSCA(MB1)-E7B6.

- anticuerpo biespecífico (scBsTaFv) que está dirigido frente a CD3 y el péptido según la SEQ ID n.º 76. El paratopo dirigido frente a CD3 comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de las regiones variables: cadena pesada SEQ ID n.º 65, cadena ligera SEQ ID n.º 57. El paratopo dirigido frente al péptido según la SEQ ID n.º 76 comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de las regiones variables: cadena ligera CDR1 SEQ ID n.º 84, CDR2 SEQ ID n.º 85, CDR3 SEQ ID n.º 86, cadena pesada CDR1 SEQ ID n.º 87, CDR2 SEQ ID n.º 88, CDR3 SEQ ID n.º 89. Este anticuerpo se denomina en lo sucesivo scBsTaFv CD3-7B6.

Clonación del scFv PSCA(MB1)-E7B6 humanizado:

Para la generación del scFv PSCA(MB1) humanizado con el epítipo E7B6 en el extremo C terminal MB 1 [V<sub>L</sub>-G<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SGASAAAG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>S-MB1 V<sub>H</sub>]-[G<sub>4</sub>S-E7B6], representado en la Fig. 1C abajo), primero se llevó a cabo el ensamblaje de los oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 154 y 155 y, a continuación, la clonación de la secuencia de ácido nucleico E7B6 a través de NotI y XhoI del lado 3' en "pSecTag2B-scFv PSCA(MB1) humanizado" (V<sub>L</sub>-G<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SGASAAAG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>S-V<sub>H</sub>-G<sub>4</sub>S, análogamente al constructo descrito anteriormente con el péptido E5B9), donde se produce el vector "pSecTag2B-scFv PSCA(MB1)-E7B6 humanizado".

Clonación de un módulo efector que se une a células T y al péptido E7B6 "scBsTaFv CD3(3×G<sub>4</sub>S)-7B6" humanizado:

Para la humanización de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 7B6 (específicamente dirigido contra el péptido E7B6), se reunieron oligonucleótidos solapantes según la SEQ ID n.º 156 a 160. Posteriormente, la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 7B6 (con un péptido enlazador G<sub>4</sub>S, SEQ ID n.º 132) se amplificó con ayuda del par de cebadores según la SEQ ID n.º 161 y 162. Para la humanización de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 7B6, se reunieron los oligonucleótidos según la SEQ ID n.º 163 a 167. La secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 7B6 se amplificó con el par de cebadores según la SEQ ID n.º 168 y 169.

Finalmente, las secuencias de ácido nucleico humanizado para 7B6 V<sub>H</sub> y 7B6 V<sub>L</sub> se reunieron por medio de PCR de solapamiento con el uso de los cebadores según la SEQ ID n.º 170 y 171, y se amplificaron. La secuencia de ácidos nucleicos así generada para el scFv 7B6 humanizado (V<sub>H</sub>-3×G<sub>4</sub>S-V<sub>L</sub>) se clonó a través de XhoI y ApaI aguas abajo del scFv CD3 V<sub>H</sub>-G<sub>4</sub>S-V<sub>L</sub> humanizado en el "pSecTag2B-scFv CD3 V<sub>H</sub>-G<sub>4</sub>S-V<sub>L</sub>" humanizado, donde se produce el vector "pSecTag2B-scBsTaFv CD3(G<sub>4</sub>S)-7B6 humanizado".

Para la expresión de las distintas proteínas de fusión de los sistemas 1 y 2 de direccionamiento modular, se transfectaron células Hek293T con los vectores de expresión y scFv (scFv PSCA-E5B9 o scFv PSCA-E7B6) recombinantes secretados y los anticuerpos biespecíficos (scBsTaFv CD3(G<sub>4</sub>S)-5B9 o scBsTaFv CD3(3×G<sub>4</sub>S)-5B9 y scBsTaFv CD3-7B6) se purificaron del sobrenadante del cultivo celular con ayuda de cromatografía por afinidad sobre Ni-NTA Agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania) (opcionalmente en combinación por medio de una precipitación de sulfato de amonio fraccionado). La pureza y estabilidad de los derivados de anticuerpo recombinantes se detectaron mediante SDS-Page e inmunotransferencia (Fig. 2)

Determinación de la constante de disociación de la unión a PSCA

La determinación de la constante de afinidad para el dominio anti-PSCA respectivo de los anticuerpos biespecíficos recombinantes con el anticuerpo anti-PSCA MB1 (según la invención) y el anticuerpo anti-PSCA 7F5 (ejemplo comparativo, anticuerpo de [Feldmann 2011]) se basó en un análisis de citometría de flujo de la unión con células PC3 positivas para PSCA.

Para la generación de las curvas de unión de los dominios de anticuerpos anti-PSCA recombinantes se incubaron en cada caso 2×10<sup>5</sup> células positivas para PSCA con 100 µl de los anticuerpos biespecíficos (MB1 y 7F5) durante 1 h a 4 °C. Los anticuerpos se usaron en cada caso en las siguientes concentraciones:

Cantidad de anticuerpo por preparación en ng	Concentración de anticuerpo en pmol/l
1000	90000
100	9000
50	4500
10	900
5	450
1	90
0,5	45
0,1	9
0,05	4,5
0,01	0,9
0,001	0,09

Para detectar la unión específica de los anticuerpos CD3-PSCA recombinantes, se usó un anticuerpo de detección de ratón anti-c-myc de IgG-FITC (AbD Serotec, Düsseldorf, Alemania), que después de completar la primera etapa de tinción durante 30 min a 4 °C se incubó con células positivas para PSCA marcadas con anticuerpos anti-PSCA. Como

control negativo, se llevó una muestra en la que las células positivas para PSCA se tiñeron solo con el anticuerpo de detección de ratón anti-c-myc IgG-FITC. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Calibur BD FACS (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Alemania) y los datos se evaluaron utilizando el *software* WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, La Jolla, CA, EE. UU.).

Para la evaluación, los valores de MFI determinados (valores medios de intensidad de fluorescencia) se representaron en función de las concentraciones de anticuerpo analizadas y, en cada caso, se calculó una línea de tendencia del tipo de regresión polinómica de segundo orden. Para determinar la constante de afinidad, se calculó e insertó una línea de tendencia de tipo regresión polinómica de segundo orden. La curva de unión resultante sirvió como base para calcular la constante de afinidad  $K_D$ , que se define como la concentración que se alcanza al 50 % del valor máximo de MFI y, por tanto, a la mitad de la saturación máxima de la unión. Para calcular esta constante, se formó la primera derivada de la curva de unión, que sigue una función cuadrática. Para determinar el máximo de la función basándose en esta ecuación, la primera derivada se estableció en “cero” y se resolvió para  $x$ . Al insertar el valor de  $x$  obtenido en la ecuación inicial, se calculó el máximo de la función  $y_{\max}$  y, por lo tanto,  $y_{\max}/2$ , que corresponde al valor de MFI a la mitad de la máxima saturación de los sitios de unión. Como el valor de  $K_D$  corresponde al valor de  $x$  en  $y_{\max}/2$ , este se puede calcular finalmente insertando el valor de  $y_{\max}/2$  en la función cuadrática de la curva de enlace y cambiando la ecuación a  $x$ .

Los siguientes valores de  $K_D$  se determinaron de esta manera para la unión a PSCA:

	$K_D$
scBsTaFv CD3×PSCA(MB1)	$6,3 \times 10^{-7}$
scBsTaFv CD3×PSCA(7F5)	$2,3 \times 10^{-6}$

Con ello, se pudo mostrar que la afinidad del anticuerpo anti-PSCA según la invención por el antígeno PSCA es un orden de magnitud mayor que la del anticuerpo 7F5 conocido del estado de la técnica.

Lisis específica de células PSCA+ con anticuerpos biespecíficos anti-PSCA

En el ensayo de liberación de cromo, las PBMC preactivadas  $5 \times 10^4$  se cocultivaron con  $5 \times 10^3$  células tumorales PC3-PSCA cargadas con  $^{51}\text{Cr}$  (relación efector-diana = 10:1) en presencia y ausencia de los anticuerpos recombinantes en medio RPMI en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$ . Para este propósito, se usaron los anticuerpos según la invención del Ejemplo 1 (tanto en forma murina como humanizada). Como ejemplo comparativo, el anticuerpo anti-PSCA (7F5) murino conocido de la técnica anterior se usó en un anticuerpo biespecífico construido de manera similar. Las regiones variables del anticuerpo 7F5 corresponden a: la cadena pesada SEQ ID n.º 48, cadena ligera SEQ ID n.º 50. Se llevaron a cabo ensayos con los siguientes constructos de anticuerpos concretos:

1. scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) biespecífico humanizado del ejemplo de realización 1
2. scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) biespecífico murino del ejemplo de realización 1
3. scBsTaFv CD3-PSCA(7F5) biespecífico humanizado (ejemplo comparativo)
4. scBsTaFv CD3-PSCA(7F5) biespecífico murino (ejemplo comparativo)

Después de 20 horas de incubación a 37 °C en la incubadora, se midió el cromo liberado en el medio. La lisis específica se calculó de la siguiente manera:

Lisis específica en %  $[\text{}^{51}\text{Cr liberado} - \text{}^{51}\text{Cr liberado espontáneamente (mínimo)}]/[\text{}^{51}\text{Cr liberado máximo (máximo)} - \text{mínimo}] \times 100 \%$

Los resultados del ensayo *in vitro* se representan gráficamente en la Fig. 3. Se muestra el porcentaje de células PC3 lisadas en el total de células PC3 utilizadas (eje y). Mientras que los anticuerpos según la invención de los grupos de ensayo 1 y 2 ya muestran una fuerte lisis de las células positivas para PSCA en cantidades menores a 1 ng, en el anticuerpo 7F5 conocido en un constructo comparable (grupos de ensayo 3 y 4) se ha de determinar una lisis detectable solo cuando se usan varios ng del anticuerpo. A lo sumo, se determinó una lisis de aproximadamente un 60 % de las células PC3 utilizadas. Con los anticuerpos según la invención, ya se pudo detectar una lisis de aproximadamente un 80 % de las células PC3 utilizadas con la utilización de una cantidad significativamente menor de anticuerpo. A lo sumo, más del 90 % de las células PC3 utilizadas pudieron lisarse con un anticuerpo según la invención (grupo de ensayo 1).

Inhibición del crecimiento tumoral mediante scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) humanizado *in vivo*

Para demostrar la eficacia del anticuerpo MB1 anti-PSCA según la invención, se probó el efecto de un anticuerpo biespecífico scBsTaFv CD3-PSCA (MB1) derivado de un ejemplo de realización 1 (representado esquemáticamente en la Fig. 1 A, arriba) en el modelo de tumor murino. Se utilizaron ratones atímicos como organismos modelo, que forman tumores después de la transferencia de células tumorales PC3 positivas para PSCA. En el ensayo, se transfirieron células tumorales positivas para PSCA en combinación con células T y un anticuerpo.

Para ello, se utilizaron los siguientes anticuerpos, inyectándose 10 µg de anticuerpos en cada ratón:

- (1) anticuerpo de control biespecífico anti-CD3xanti-5B9 (control)
- (2) scFv anti-PSCA(MB1) humanizado mono-específico del ejemplo de realización 1 (control)
- (3) ensayo de control sin anticuerpo (control negativo)
- (4) scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) biespecífico humanizado del ejemplo de realización 1
- (5) scBsTaFv CD3-PSCA(7F5) biespecífico humanizado (ejemplo comparativo)
- (6) scBsDb CD3xPSCA(7F5) biespecífico humanizado, que contiene las regiones variables de unión a PSCA del anticuerpo 7F5 (ejemplo comparativo)

El efecto de los anticuerpos biespecíficos se basa en el reclutamiento de células T positivas para CD3 en las células tumorales positivas para PSCA y la consiguiente lisis mediada de las células tumorales.

En un primer ensayo, se transfirieron  $5 \times 10^3$  células tumorales positivas para PSCA en 8 ratones atímicos en cada caso por grupo de ensayo y  $5 \times 10^3$  células T (relación efector-diana 1:1). En los grupos de control (1) y (3), se observó un rápido crecimiento tumoral en ausencia de un anticuerpo anti-PSCA. El ensayo de control (2), en el que se inyectó el scFv anti-PSCA(MB1) mono-específico también mostró un rápido crecimiento tumoral. Esto significa que se puede descartar un efecto citotóxico del anticuerpo mono-específico y la eficacia se puede atribuir únicamente al constructo biespecífico. La superficie tumoral de los tumores formados se determinó 25 días después de la transferencia celular. Los tres grupos de control no mostraron diferencias significativas en la superficie tumoral (Fig. 4A).

Cuando se transfirieron los anticuerpos de comparación biespecíficos que contenían las regiones variables del anticuerpo anti-PSCA 7F5 (grupos de comparación (5) en forma de anticuerpo en tándem y (6) en forma de diacuerpo), también se determinó un rápido crecimiento tumoral (datos no representados). También en un segundo ensayo, en el que las células tumorales estaban en una relación efector-diana de 10:1 (es decir, con 10 veces la cantidad de células T; transferencia de  $5 \times 10^3$  células tumorales positivas para PSCA y  $5 \times 10^4$  células T), se detectó un rápido crecimiento tumoral, que no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo de control (1) (Fig. 4B). El crecimiento tumoral no se inhibió con los anticuerpos anti-PSCA 7F5, sino solo se retrasó ligeramente. Incluso con un exceso de células T, no se puede determinar una inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral mediante el anticuerpo anti-PSCA 7F5.

La transferencia del anticuerpo biespecífico scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) según la invención a partir del ejemplo de realización 1 en una relación efector-diana de 1:1 pudo reducir significativamente el crecimiento tumoral. Mientras que aparecieron tumores con una superficie significativamente pequeña (diámetro de aproximadamente 2 mm) en 2 de los 8 animales de ensayo 25 días después de la transferencia celular, 6 de los 8 animales de ensayo permanecieron libres de tumores (Fig. 4A). Por lo tanto, el anticuerpo anti-PSCA MB1 según la invención (grupo de ensayo (4)) es claramente superior al anticuerpo anti-PSCA 7F5 construido de manera comparable (grupo de ensayo (5)) en términos de eficacia *in vivo* en condiciones de ensayo idénticas.

Bibliografía citada que no es de patente

Feldmann A, Stamova S, Bippes CC, Bartsch H, Wehner R, Schmitz M, Temme A, Cartellieri M, Bachmann M. *Retargeting of T cells to prostate stem cell antigen expressing tumor cells: comparison of different antibody formats*. Prostate. 15 de junio de 2011; 71(9):998-1011. doi: 10.1002/pros.21315. Epub 28 de diciembre de 2010.

Gu Z, Yamashiro J, Kono E, Reiter RE. *Anti-prostate stem cell antigen monoclonal antibody 1G8 induces cell death in vitro and inhibits tumor growth in vivo via a Fc-independent mechanism*. Cancer Res. 15 de octubre de 2005; 65(20):9495-500.

Lepin EJ y col. *An Affinity matured minibody for PET imaging of prostate stem cell antigen (PSCA)-expressing tumors*, Europ J Nucl Med and Mol Imaging. 1 de abril de 2010; 37 (8): 1529-1538.

Morgenroth A, Cartellieri M, Schmitz M, Günes S, Weigle B, Bachmann M, Abken H, Rieber EP, Temme A. *Targeting of tumor cells expressing the prostate stem cell antigen (PSCA) using genetically engineered T-cells*. Prostate. 1 de julio de 2007; 67(10):1121-31.

Reiter, R.E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M.M., Loda, M. y Witte, O.N. *Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer*. Proc Natl Acad Sci USA. 95(4): 1735-40 (1998)

Roehl, K.A., M. Han, C. G. Ramos, J. A. V. Antenor, y W. J. Catalona. *Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results*. J Urol, 172(3):910-4, septiembre de 2004.

Thomas-Kaskel, A.-K., R. Zeiser, R. Jochim, C. Robbel, W. Schultze-Seemann, C. F. Waller, y H. Veelken. *Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival*. Int J Cancer, 119(10):2428-34, noviembre de 2006.

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpos que comprenden al menos dos unidades de unión diferentes, en donde
  - i.al menos una de las unidades de unión se une al antígeno de células madre específico de la próstata (PSCA), en donde
    - una región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO. 1, SEQ ID n.º 2 y SEQ ID n.º 3 y
    - una región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5 y SEQ ID n.º 6;
  - ii.al menos otra de las unidades de unión está dirigida frente a CD3.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en donde la unidad de unión dirigida frente a CD3 contiene:
  - una región variable de la cadena pesada que contiene las secuencias de aminoácidos SEQ ID n.º 66, SEQ ID n.º 67 y SEQ ID n.º 68 y
  - una región variable de la cadena ligera que contiene las secuencias de aminoácidos SEQ ID n.º 58, SEQ ID n.º 59 y SEQ ID n.º 60.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, cuyas regiones variables están humanizadas.
4. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la unidad de unión dirigida frente a PSCA
  - (i)comprende una región variable de la cadena pesada según la SEQ ID n.º 26 o una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID n.º 26 y
  - (ii)una región variable de la cadena ligera según la SEQ ID n.º 24 o una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID n.º 24.
5. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la unidad de unión dirigida frente a CD3 comprende una región variable de la cadena ligera según la SEQ ID n.º 57 y una región variable de la cadena pesada según la SEQ ID n.º 65.
6. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 5 en forma de un diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo.
7. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la unidad de unión dirigida frente a PSCA es un fragmento scFv con la siguiente estructura  $V_L\text{-}G_4SG_4SGASAAG_4SG_4S\text{-}V_H$ , en donde  $V_L$  es la región variable de la cadena ligera y  $V_H$  es la región variable de la cadena pesada y en donde  $G_4SG_4SGASAAG_4SG_4S$  es un péptido enlazador según la SEQ ID n.º 130.
8. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la unidad de unión dirigida frente a CD3 presenta la siguiente estructura  $V_L\text{-}(G_4S)_3\text{-}V_H$ , en donde  $V_L$  es la región variable de la cadena ligera y  $V_H$  es la región variable de la cadena pesada y en donde  $(G_4S)_3$  es un péptido enlazador según la SEQ ID n.º 131.
9. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso como medicamento, en particular, para el tratamiento de enfermedades tumorales, preferiblemente, cáncer de próstata o como agente de diagnóstico.
10. Ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos codifica para un anticuerpo recombinante según una de las reivindicaciones 1 a 8.
11. Vector que contiene una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 10.
12. Célula huésped u organismo huésped no humano, que contiene una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 10 o un vector según la reivindicación 11.
13. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo recombinante según una de las reivindicaciones 1 a 8 y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente, en una forma adecuada para la administración intravenosa.

**A**

scBsTaFv CD3-PSCA (MB1) (humanizado)	<p>Igk líder</p> <p><math>(G_4S)_3</math></p> <p>myc his</p>
scBsTaFv PSCA(MB1)- CD3 (murino)	<p>Igk líder</p> <p><math>(G_4S)_3</math></p> <p>myc his</p>

**B**

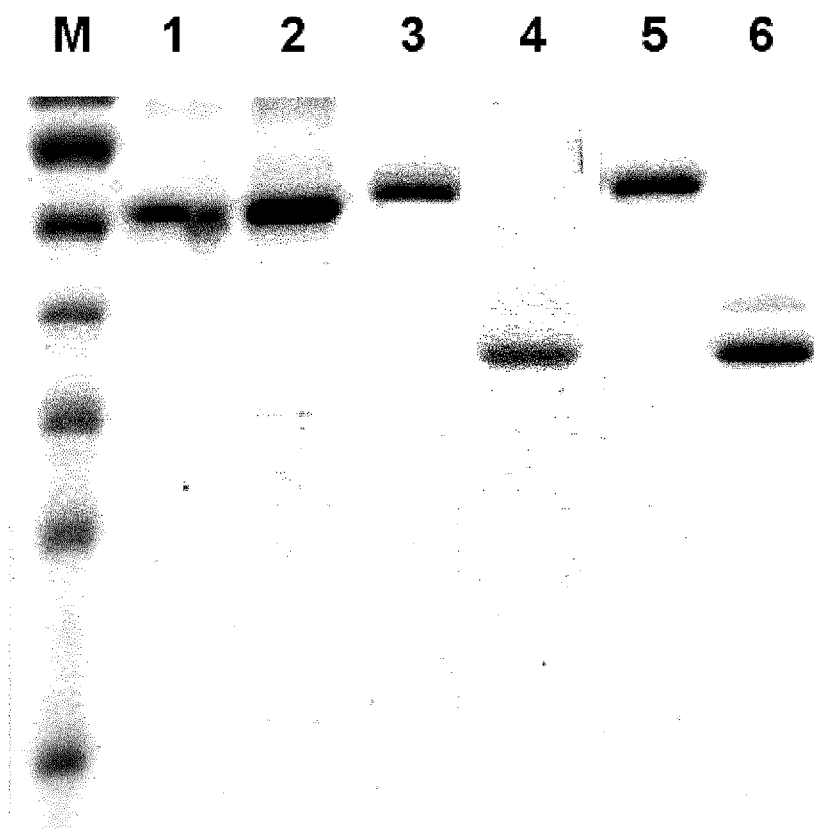
scBsTaFv CD3(G4S)- 5B9 (humanizado)	<p>Igk líder</p> <p><math>G_4S</math></p> <p><math>(G_4S)_3</math></p> <p>myc his</p>
scBsTaFv CD3(3xG4S)- 5B9 (humanizado)	<p>Igk líder</p> <p><math>(G_4S)_3</math></p> <p><math>(G_4S)_3</math></p> <p>myc his</p>
scFv PSCA(MB1)- E5B9 (humanizado)	<p>Igk líder</p> <p><math>G_4S</math></p> <p>myc his</p>

**C**

scBsTaFv CD3(3xG4S)- 7B6 (humanizado)	<p>Igk líder</p> <p><math>(G_4S)_3</math></p> <p><math>(G_4S)_5</math></p> <p>myc his</p>
scFv PSCA(MB1)- E7B6 (humanizado)	<p>Igk líder</p> <p><math>G_4S</math></p> <p>myc his</p>

**Figura 1**





**Figura 2**

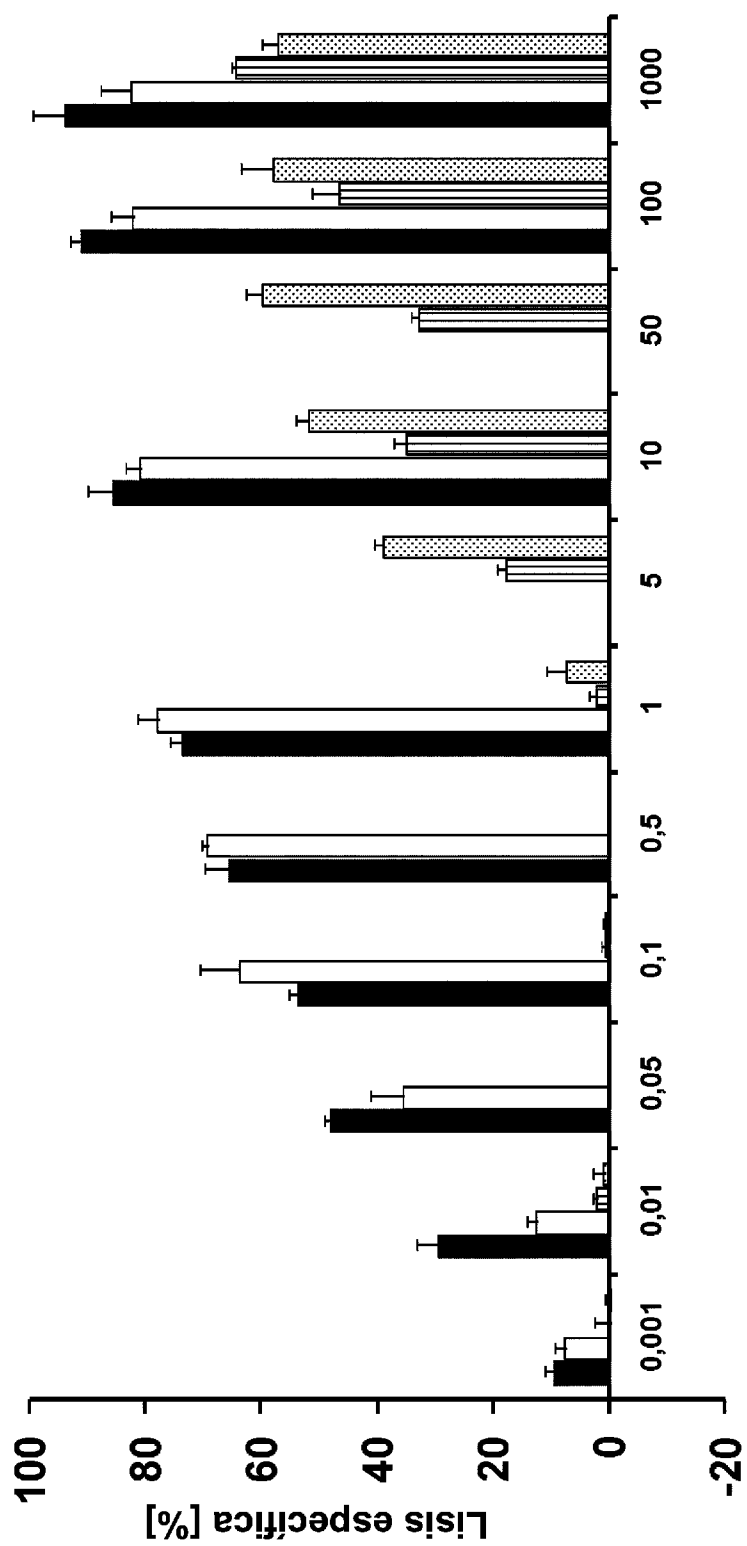
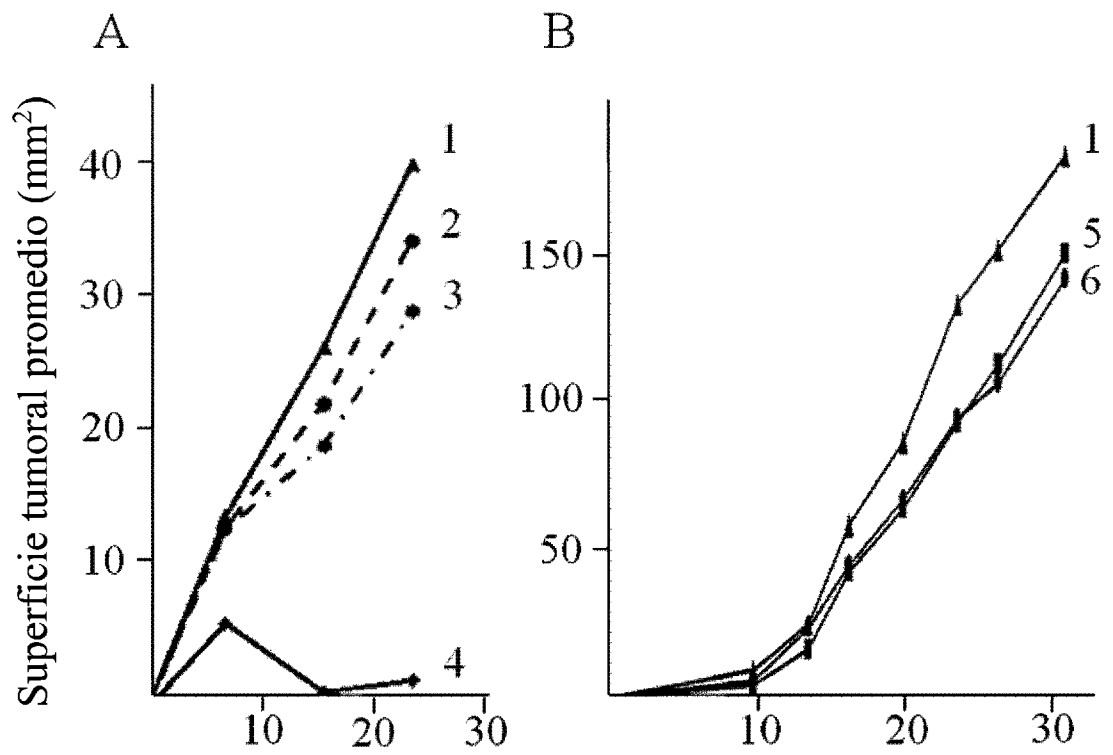


Figura 3



**Figura 4**