

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.03.02**

(30) Prioridade(s): **2005.05.27 EP 05011536**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.02.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.04.13**
121/2011

(73) Titular(es):
UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG
HUGSTETTER STRASSE 49 79106 FREIBURG
DE

(72) Inventor(es):
URSULA ELSÄSSER-BEILE **DE**
PHILIPP WOLF **DE**
DOROTHEE GIER SCHNER **DE**
PATRICK BÜHLER **DE**
ULRICH WETTERAUER **DE**

(74) Mandatário:
MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIIS E FRAGMENTOS DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA CONTRA ANTIGÉNIO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DA PRÓSTATA DE SUPERFÍCIE CELULAR**

(57) Resumo:

ANTICORPOS MONOCLONAIIS ISOLADOS OU UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO DOS MESMOS QUE SE LIGAM A ANTIGÉNIO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DA PRÓSTATA NA SUA FORMA NATIVA QUE OCORRE NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS TUMORAIS CARACTERIZADOS POR SEREM LIGADOS A UM MARCADOR OU UM AGENTE CITOTÓXICO OU CONSTRUÍDOS COMO UMA PARTE DE UM ANTICORPO BIESPECÍFICO OU UM DIACORPO RECOMBINANTE.

RESUMO**"ANTICORPOS MONOCLONAIS E FRAGMENTOS DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA CONTRA ANTIGÊNIO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DA PRÓSTATA DE SUPERFÍCIE CELULAR"**

Anticorpos monoclonais isolados ou uma porção de ligação a antigénio dos mesmos que se ligam a antigénio de membrana específico da próstata na sua forma nativa que ocorre na superfície de células tumorais caracterizados por serem ligados a um marcador ou um agente citotóxico ou construídos como uma parte de um anticorpo biespecífico ou um diacorpo recombinante.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS E FRAGMENTOS DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA CONTRA ANTIGÉNIO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DA PRÓSTATA DE SUPERFÍCIE CELULAR"

O cancro da próstata é o cancro mais comumente diagnosticado nos homens e a segunda causa mais comum de morte na civilização Ocidental. Nenhum tratamento curativo existe actualmente para este tumor após a progressão além das fronteiras da possibilidade de ser operado. Por causa da mortalidade e da morbilidade significativa associadas à progressão da doença, existe uma necessidade urgente de novos tratamentos alvo. Em contraste com o cancro em outros sistemas de órgãos, o cancro de próstata representa um excelente alvo para a terapêutica de anticorpo por uma quantidade de razões, que incluem i) a próstata expressa antigénios específicos dos tecidos, ii) a próstata é um órgão não essencial e sua destruição não prejudicará o hospedeiro, iii) os locais de metástase são nódulos linfáticos e osso que recebem altos níveis de anticorpos circulantes, e iv) os níveis séricos de PSA proporcionam um meio para monitorizar a resposta terapêutica.

Entre os diversos marcadores candidatos que foram identificados para cancro de próstata, o antigénio de membrana específico da próstata (PSMA) parece ser o mais promissor. Esta glicoproteína transmembranar do tipo II de aproximadamente 100 KD consiste num segmento intracelular curto (1 - 18 aminoácidos), um domínio transmembranar (19 - 43 aminoácidos), e um domínio extracelular extenso (44 - 750 aminoácidos). O PSMA pode servir como um alvo útil para imunoterapia porque cumpre com os seguintes critérios: i) a expressão é primariamente restrita à próstata, ii) o PSMA é expresso abundantemente como proteína em todos os estágios de doença, iii) apresenta-se na superfície celular, mas não

derramado na circulação, iv) a expressão é associada a actividade enzimática ou de sinalização. O PSMA é também expresso na neovasculatura da maioria dos outros tumores sólidos, e portanto pode ser um alvo para a administração específica de fármacos anti-angiogénicos.

Por causa das suas especificidades orientadas ao alvo, coloca-se muita ênfase no desenvolvimento de anticorpos monoclonais (mAbs) para aplicações de diagnóstico e terapêuticas em medicina do cancro. No entanto, a utilização *in vivo* de mAbs é associada a sérios problemas, por causa do seu tamanho e imunogenicidade. Portanto, a investigação focou-se no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos menores com poucos efeitos secundários, melhor acessibilidade tumoral e taxas de depuração mais rápidas. A engenharia genética tornou possível construir fragmentos de anticorpo de cadeia única (scFv) que são ferramentas potencialmente poderosas para terapêutica de cancro. Estes anticorpos pequenos são compostos dos domínios variáveis da cadeia leve (V_L) e a cadeia pesada (V_H) ligadas por um péptido *linker*. Mostram pouca imunogenicidade, quase nenhum efeito tóxico, uma taxa de depuração aumentada, uma absorção melhorada pelo tumor e uma penetração melhor nas células tumorais. scFv murino recombinante pode ser estabelecido de acordo com métodos padrão utilizando bibliotecas de expressão de hibridomas ou células do baço de ratinhos especificamente imunizados [Chowdhury *et al.*, *Mol. Immunol.* 4 (1997), p. 9-20].

O primeiro mAb publicado (7E11-C5) contra alvos de PSMA no domínio intracelular da proteína e mostrou-se altamente específicos da próstata [Horoszewicz *et al.*, *Anticancer Res.* 7 (1987), p. 927-935]. Também, os anticorpos monoclonais contra o domínio extracelular de PSMA foram originados após a imunização com o antigénio. No entanto, existe ainda uma discrepância entre a ligação ao

antigénio em células fixadas e secções histológicas por um lado e ligação a células tumorais viáveis por outro lado.

O antigénio de membrana específico da próstata (PSMA) é um marcador de próstata que é altamente expresso em próstata normal bem como em cancro de próstata. Sua expressão é aumentada em cancro de próstata e encontra-se primariamente na próstata.

O antigénio de membrana específico da próstata (PSMA) é uma membrana única ligada a proteína celular que é sobre-expressa muitas vezes no cancro de próstata bem como na neovasculatura de muitos outros tumores sólidos, mas não na vasculatura dos tecidos normais. Esta expressão única de PSMA torna-o num marcador importante bem como um alvo extracelular grande de agentes de de imagiologia. O PSMA pode servir como alvo para a distribuição de agentes terapêuticos tais como citotoxinas ou radionuclídeos. O PSMA tem duas funções enzimáticas únicas, folato hidrolase e NAALADase e é reciclado como outros receptores ligados à membrana através de depressões revestidas com clatrina.

Uma forma de radio-imuno-conjugado do anticorpo monoclonal anti-PSMA (mAb) 7E11, está comercialmente disponível como "ProstaScint®" que se utiliza actualmente para diagnosticar a metástase e recorrência do cancro de próstata. O epítipo de PSMA reconhecido pelo anticorpo monoclonal 7E11-C5.3 está localizado no domínio citoplasmático do antigénio de membrana específico da próstata.

Existem, no entanto, também relatórios que descrevem a expressão de PSMA em tecidos não prostáticos que incluem rim, fígado e cérebro. Uma explicação possível é, assim, proporcionada por O'Keefe et al. (Prostate, 2004, 1 de Fevereiro; 58 (2) 200-10), isto é, que existe um gene semelhante a PSMA que possui 98% de identidade ao gene de PSMA ao nível dos nucleótidos, que é expresso em rim e

fígado sob o controlo de um promotor diferente ao do gene de PSMA.

O documento WO 01/009192 descreve o desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos para antígeno de membrana específico da próstata. Os anticorpos monoclonais anti-PSMA humanos foram gerados por meio da imunização de ratinhos com PSMA purificado ou preparações enriquecidas de antígeno PSMA. Tal antígeno purificado é um PSMA desnaturado uma vez que se purificou por imunoadsorção após lise celular com detergentes iónicos.

O documento WO 97/35616 descreve anticorpos monoclonais específicos para o domínio extracelular de antígeno de membrana específico de próstata. As imunizações foram realizadas com um péptido C-terminal ou uma preparação de membrana de tumor que expressa PSMA. Os mAbs não se ligam especificamente a células que expressam PSMA e, portanto, não podem ser utilizados para fins de diagnóstico ou terapêuticos.

Bander *et al.*, *Seminars in Oncology*, 2003, pp 667-677 e o documento US 2004/0213791 respectivamente divulgam anticorpos monoclonais dirigidos contra antígeno de membrana específico de próstata. Uma vez que a imunização foi realizada com antígeno purificado, os anticorpos monoclonais não têm uma alta ligação à célula e não se conseguiu obter scFv de nenhum destes mAb.

O documento WO 98/03873 descreve os mesmos anticorpos como no documento US 2004/0213791 ou porções de ligação dos mesmos que reconhecem um domínio extracelular de antígeno de membrana específico de próstata. Não pôde ser mostrado que as porções de ligação dos anticorpos de facto ligam-se ao antígeno. Fracasso *et al.*, *The Prostate*, 2002, pp 9-23 descrevem anticorpos monoclonais anti-PSMA que são quimicamente acoplados à cadeia A de ricina. As construções descritas neste artigo não se ligam de forma

suficientemente específica ao alvo e têm as desvantagens geralmente descritas de geração em imunotoxinas.

É um objecto da presente invenção proporcionar meios superiores e construções que ajudam a diferenciar com maior fiabilidade entre células tumorais e células saudáveis que expressam PSMA ou uma proteína similar e células PSMA-negativas. Tais construções podem ser utilizadas para alvejar mais especificamente cancro de próstata.

É outro objecto proporcionar construções que destroem células de cancro de próstata específicas que expressam PSMA.

O antigénio de membrana específico de próstata (PSMA) é um alvo atractivo para imunoterapia de cancro de próstata. No entanto, em células de próstata o PSMA é expresso com uma estrutura terciária e quaternária específica e anticorpos produzidos contra PSMA desnaturado isolado não reconhecem eficientemente células tumorais que expressam PSMA. A ligação de anticorpos e scFv a PSMA desnaturado pode ser obtida após a imunização com o antigénio purificado isolado. A presente invenção, no entanto, permite a geração de anticorpos e scFv de alta afinidade contra PSMA celular nativo por meio de um método de imunização diferente que dá somente um pobre rendimento de clones positivos. Somente os últimos anticorpos produzidos contra PSMA nativo podem reagir com PSMA de superfície celular e podem ser utilizados como ferramentas de diagnóstico e terapêutica.

Os anticorpos monoclonais (mAbs), fragmentos de anticorpo de cadeia única (scFv) e diacorpos da presente invenção foram preparados de acordo com métodos convencionais a partir de células do baço de ratinhos. No entanto, os ratinhos foram imunizados com células LNCaP e lisado de células LNCaP contendo PSMA nativo de comprimento completo. Numa forma de realização preferida da presente invenção o antigénio, em particular o PSMA nativo de

comprimento completo foi obtido após o tratamento das células, preferentemente células LNCaP com um tampão de lise especial chamado M-PER, reagente de extracção de proteína de mamífero que está comercialmente disponível de Pierce, Roquefort, Illinois. O tampão M-PER utiliza um detergente patenteado em 25 mM de tampão bicina (pH 7,6). Hibridomas e scFv foram rastreados e seleccionados por meio de citometria de fluxo em células LNCaP positivas para PSMA após absorção com células de próstata DU 145 negativas para PSMA. Adicionalmente, foram testados para reactividade com PSMA purificado. Os anticorpos monoclonais e scFv resultantes foram caracterizados por citometria de fluxo em LNCaP e DU 145 transfectadas com PSMA e por western blot com PSMA glicosilado e desglicosilado purificado. Além disso, imunocitologia com células LNCaP e imunohistoquímica em secções de parafina de amostras de cancro de próstata foi preparada.

No curso da presente invenção três mAbs (3/F11, 3/A12 e 3/E7) puderam ser obtidos, que foram reactivos com células LNCaP viáveis e DU 145 transfectadas com PSMA células, mas não com outras linhas celulares que não expressam PSMA. A ligação a células LNCaP foi muito forte. Nas concentrações de saturação (100 nM) a intensidade de fluorescência média de PE (MFI) foi entre 1000 e 1600. A reactividade com PSMA purificado foi mais forte com a forma nativa (ELISA) que com a proteína desnaturada e desglicosilada (western blot), a imunohistoquímica em secções de parafina foi especificamente positiva para células epiteliais com mAb E7.

A partir de mAb 3/A12 dois scFv, chamados E8 e A5, foram obtidos por meio de selecção de fagos recombinantes em células LNCaP e PSMA purificadas. A sequência de scFv E8 foi idêntica a um scFv A4, que foi obtida da Biblioteca de células B do mesmo ratinho. ScFv E8 foi fortemente reactivo com células LNCaP mostrando um MFI de aproximadamente 100

nas concentrações de saturação, enquanto a MFI de scFv A5 foi somente aproximadamente 40 sob as mesmas condições. Nenhuma ou ligação mínima foi vista com outras linhas celulares que não possuíam expressão de PSMA. Ligação de ambos scFv a PSMA desglicosilado e glicosilado desnaturado purificado foi fraca. Além disso, do mAb 3/F11 o scFv chamado D7 e para mAb 3/E7 o scFv chamado H12 foi obtido.

No presente pedido de patente descrevem-se três mAb, que são diferentes daqueles publicados por outros autores com relação a alta afinidade de ligação e alta coração de Células de cancro de próstata que expressam PSMA. Os anticorpos 3/F11, 3/A12 e 3/E7 não somente mostram uma forte actividade de ligação, mas também internalização em células LNCaP como são mostradas por meio de citologia de imunofluorescência e detecção com microscopia de varrimento laser confocal. Estes mAbs foram obtidos após imunização com PSMA nativo de comprimento completo, que está em contraste a métodos de imunização diferentes publicados.

Após a imunização com PSMA desnaturado purificado, mAbs foram obtidos que foram altamente específicos para o antígeno, mas tinham somente uma ligação limitada a células LNCaP que expressam PSMA e também não foram internalizados nas células. Estes dados de controlo não são mostrados no presente pedido de patente. Existem alguns mAbs anti-PSMA descritos em literatura. No entanto, os valores de intensidade de fluorescência médios foram muito inferiores que com os anticorpos da presente invenção.

De maneira similar aos mAbs, scFv anti-PSMA foram gerados após imunização com PSMA desnaturado e nativo. Com o PSMA desnaturado foi obtido scFv altamente específico ao antígeno, mas não ligação a células LNCaP (dados não mostrados no presente pedido de patente). Em contraste, com PSMA nativo foi obtido scFv com uma alta actividade de ligação a célula, mas uma pobre ligação ao antígeno desnaturado isolado.

No entanto, os problemas identificados nestes e outros ensaios com imunotoxinas quimicamente ligadas são o desenvolvimento de anticorpos contra as imunotoxinas, toxicidade hepática e síndrome de vazamento vascular e também dificuldades em produzir grandes quantidades de material definido. Estes problemas são, pelo menos em parte, superados pela utilização tecnologia de ADN recombinante que torna a construção de menos imunogénica e menores imunotoxinas factíveis, e mais facilmente permita a produção de imunotoxinas em grandes quantidades. Acredita-se também que a penetração em tumores deve ser melhor para pequenas proteínas que grandes conjugados. Portanto, imunotoxinas recombinantes foram engenheiradas fusionando a sequência codificante do scFv E8, H 12, D7 e A5 e a toxina PE40. A descoberta central foi que todas as imunotoxinas recombinantes efectivamente mataram células de cancro de próstata cultivadas numa maneira dependente da dose. Morte potente foi encontrada não somente com a alta ligação de E8- com CI50 de aproximadamente 0,05 nM, mas também com a menor ligação de proteína de fusão A5- com CI50 de aproximadamente 0,09 nM. A morte de células de cancro de próstata que não expressam PSMA foi mais que 2000 vezes menos. Isto pode ser seguido de volta a proteínas bacterianas residuais ou outros agentes tóxicos nas preparações de imunotoxina, porque o mesmo antecedente pôde ser observado em concentrações igualmente altas com o scFv sozinho. O termo CI50 é definido como a concentração em nM da toxina que reduz a proliferação de células a 50% da proliferação de células sem adicionar uma toxina.

Os anticorpos e scFv descritos neste relatório descritivo especificamente ligam-se a PSMA de superfície celular nativo e, portanto, terão valor em aplicações de diagnóstico e terapêuticas focalizando em PSMA como um alvo antigénio para cancro de próstata.

Uma vez que PSMA é expresso nas células de cancro de próstata com uma estrutura terciária e quaternária específica, somente anticorpos contra esta conformação celular podem reconhecer e fortemente ligar-se a células de cancro de próstata viáveis e tecido que expressa PSMA. Portanto, o objectivo do presente estudo foi gerar tais mAbs e scFv que podem ser utilizados para terapêutica e diagnóstico alvejando de cancro de próstata.

A presente invenção proporciona portanto um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo que liga-se a antígeno de membrana específico da próstata na sua forma nativa que ocorre na superfície de células tumorais que é ligado a um marcador ou um agente citotóxico.

O termo "anticorpo monoclonal isolado" refere-se a uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesada (H) e duas cadeias leve (L) interligadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, em particular CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve contém uma região variável de cadeia leve (V_L) e uma região constante de cadeia leve (CL). As regiões de V_H e V_L podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, que são também chamadas regiões de determinação de complementaridade (CDR) entremeada com regiões que são mais conservadas. Aquelas regiões são também chamadas regiões de framework (FR). Cada região de V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs dispostas desde a terminação amino até a terminação carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno.

Nas Figuras 13, 14 e 20, 21 as CDRs são marcadas por caixas cinzas. Aquelas áreas são importantes para a ligação

do anticorpo monoclonal ou a porção de ligação a antígeno do mesmo. As outras áreas são regiões de framework que podem ser substituídas por outras sequências, contanto que a estrutura tridimensional que é requerida para a ligação não seja desarranjada. Em caso da estrutura da construção ser mudada, não haverá suficiente ligação ao antígeno. Anticorpos monoclonais derivados de ratinho podem causar efeitos secundários imunológicos indesejados devido ao facto de que contêm uma proteína de outra espécie que pode provocar anticorpos. A fim de superar este problema os anticorpos monoclonais ou as porções de ligação ao antígeno do mesmo pode ser humanizadas. O processo de humanização de anticorpos monoclonais é conhecido ao perito na especialidade. As regiões de framework de um mAb de ratinho são substituídas pelas correspondentes regiões de framework humanas. A fim de manter as propriedades de ligação preferidas as sequências das CDRs deveriam ser mantidas tão longe quanto possível. Pode ser requerido, no entanto, realizar algumas trocas de aminoácido a fim de otimizar as propriedades de ligação. Isto pode ser realizado pelo perito na especialidade por meio de procedimentos padrão. Além disso introduzindo um framework humano pode ser necessário realizar trocas e/ou deleções a de aminoácido fim de melhorar as propriedades da construção.

O termo "porção de ligação a antígeno" do anticorpo monoclonal refere-se a um ou mais fragmentos de tal anticorpo que reteve a capacidade de especificamente ligar-se ao antígeno de membrana específico da próstata na sua forma nativa. Exemplos de porções de ligação ao antígeno do anticorpo incluem um fragmento de Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e Cm, um fragmento de $F(ab')_2$, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos de Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça, um fragmento Fd que consiste no

domínio V_H e C_{Hi} , um fragmento F_v que consiste nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo, um fragmento dAb que consiste num domínio V_H e um região de determinação de complementaridade isolada (CDR).

O anticorpo monoclonal isolado ou a porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com a presente invenção pode preferentemente ser internalizado por uma célula tumoral se é utilizado para propósitos terapêuticos. Para propósitos de diagnóstico uma internalização pode não ser requerida.

O anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com a presente invenção se liga fortemente a células LNCAP, mas não a células que não possuem expressão de antígeno de membrana específico da próstata.

A ligação do anticorpo monoclonal isolado ou a porção de ligação a antígeno do mesmo é medida por intensidade de fluorescência de PE (MFI) que é preferentemente igual ou superior a 40 para um $scFv$ e preferentemente superior a 1000 para um mAb em concentrações de saturação.

As propriedades de ligação dos anticorpos monoclonais isolados ou uma porção de ligação a antígeno dos mesmos ao PSMA nativo foram comparadas por tratamento das células LNCAP com concentrações crescentes do Ab anti-PSMA da primeira etapa seguido por incubação com o Anticorpo marcado para PE da segunda etapa. A partir das resultantes curvas de saturação a concentração de anticorpo alcançando 50% de saturação de locais de PSMA pode ser lida. Os três mAb 3/F11, 3/A12 e 3/E7 mostraram uma alta actividade de ligação alcançando 50% de saturação de locais de PSMA a aproximadamente 16 nM (3/F11), 2 nM (3/A12) e 30 nM (3/E7). Com o $scFv$ um 50% de saturação de locais de PSMA foi encontrado a 10 nM (E8) e 60 nM (A5).

A fim de determinar a força de ligação a fluorescência intensidade de PE (ficoeritina) (MFI) foi medida. Os valores de MFI foram representados em gráfico contra a

concentração de anticorpo (ou fragmentos de ligação do mesmo) pelo qual o valor de platô de MFI corresponde a 100% de saturação com antígeno. Após ter determinado o valor de topo (platô correspondente a 100% de saturação de antígeno) o valor correspondente a 50% de saturação pode ser facilmente determinado. Utilizando o gráfico a concentração correspondente dos anticorpos ou fragmentos de ligação do mesmo em nM pode ser vista.

O anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo compreende um marcador que pode ser uma partícula que emite radiação radioactiva. Esta partícula pode ser um elemento radioactivo numa forma que pode ser ligado à construção, preferentemente na forma de um complexo. Por exemplo um mAb marcado com 111 pode ser utilizados como um agente de radioimunocontigrafia na detecção de tumores metastásicos distantes em pacientes de cancro de próstata. Obviamente outros elementos radioactivos adequados como ^{35}S ou ^{131}I podem ser utilizados.

Alternativamente o anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação a antígeno do mesmo pode compreender um agente citotóxico que é uma substância celular tóxica seleccionada do grupo que consiste em toxinas, por exemplo, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, teniposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestoteronona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e/ou puromicina.

Numa forma de realização preferida da presente invenção um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo compreende uma sequência de aminoácidos parcial de pelo menos 10 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:1 (scFv E8), SEQ ID NO: 10 (scFv

A5), SEQ ID NO:20 (scFv H12) e/ou SEQ ID NO:22 (scFv D7). Numa forma de realização preferida o anticorpo monoclonal ou proteína de ligação a antígeno do mesmo compreende pelo menos 25 ou, mais preferido, pelo menos 35 e o mais preferido pelo menos 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:20 e/ou SEQ ID NO:22, respectivamente.

Numa forma de realização preferida o anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação a antígeno do mesmo compreende pelo menos uma das CDRs que têm SEQ ID NO:2 - SEQ ID NO:7 e/ou SEQ ID NO:11 a 16. Mais preferentemente tal construção compreende pelo menos 3 e mais preferentemente pelo menos 5 daquelas sequências de CDR. Numa maneira similar as CDRs pode ser deduzidas da Fig. 20 e 21 em que as sequências de CDR são designadas.

É ainda um aspecto da invenção proporcionar sequências de ADN que podem ser utilizadas para a preparação de anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação do mesmo. As SEQ ID NO:8 e 9 referem-se a scFv E8 e as SEQ ID NO:17 e 18 referem-se a scFv A5. As SEQ ID NO:19 e 23 referem-se a scFv H12 e as SEQ ID NO:21 e 24 referem-se a scFv D7. As sequências reportam a cadeia codificante e a cadeia complementar aos mesmos. As SEQ ID NOS:9 e 18 são mostradas na orientação 5'→3'. Os polinucleótidos da presente invenção compreendem uma sequência contígua de pelo menos 20, preferentemente 50 e mais preferentemente 75 e o mais preferido pelo menos 100 nucleótidos do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 8, 9, 17, 18, 19, 21, 23 e 24. A sequência que codifica a CDR é em particular preferida.

É um aspecto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo como descritas no presente pedido de patente. A composição farmacêutica da presente invenção compreende o anticorpo monoclonal ou uma porção de ligação a antígeno

do mesmo junto com aditivos farmacêuticamente aceitáveis. Preferentemente tal composição é preparada para for injeção intramuscular ou intravenosa. Alternativamente o anticorpo pode ser proporcionado numa formulação depot que permite a libertação sustentada do agente biologicamente activo ao longo de um certo período de tempo que pode variar preferentemente desde um até seis meses. Tal formulação libertação sustentada pode compreender um polímero biodegradável como um polilactido ou copolímero polilactido/poliglicolido que é degradado ao longo de um período de tempo prolongado no corpo humano pelo qual o anticorpo ou a porção de ligação a antígeno do mesmo preferentemente que têm uma toxina é libertada numa maneira controlada ao longo de um certo período de tempo.

O anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo pode ser utilizado para a preparação de um medicamento para o tratamento do cancro, em particular cancro de próstata.

Alternativamente a invenção proporciona um kit diagnóstico para a detecção de células tumorais que compreende um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo. Em tais formas de realização o marcador permite a detecção da construção com dispositivos de detecção adequados.

A invenção proporciona também um método para a identificação *in vitro* de células tumorais pelo qual as células tumorais a serem identificadas são colocadas em contacto com um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo que porta um marcador que pode ser detectado por dispositivos analíticos adequados. O marcador permite a identificação diagnóstica de células tumorais, por exemplo, em secção de tecidos humanos obtidos após cirurgia ou biopsia.

Breve Descrição das Figuras

Fig. 1: análise de FACS da ligação de mAb 3/F11, 3/A12 e 3/E7 à superfície de células LNCaP que expressam PSMA em concentrações de saturação

Fig. 1a-c: Curvas de saturação de antigénio de mAb 3/F11 (a), 3/A12 (b), 3/E7 (c)

Fig. 2: citologia de imunofluorescência: Ligação de a) mAb 3/F11 b) mAb 3A/12 c) 3E7 a células LNCaP. As fotografias da esquerda mostram uma coloração de controlo com 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Fig. 3: citologia de imunofluorescência: Internalização de a) mAb 3/F11 b) mAb 3A/12 c) 3E7 em células LNCaP. As fotografias da esquerda mostram coloração de controlo com 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Fig. 4: Western blot com PSMA purificado e os mAbs 3/E7, e 3/A12 e 3/F11

Fig. 5: Western blot com PSMA glicosilado e desglicosilado e mAb 3/A12

Fig. 6: imunohistoquímica de mAb 3/E7 em uma secção de parafina de cancro de próstata

Fig. 7a/b: análise de FACS do scFv E8 (a), e A5 (b) em células LNCaP que expressam PSMA nas concentrações de saturação

Fig. 7c/d: Curvas de saturação de antigénio de scFv E8 (c) e A5 (d)

Fig. 8: Western blot com PSMA purificado e o scFv A5 e E8

Fig. 9: imunocitologia de scFv E8 em células LNCaP

Fig. 10: construção da imunotoxina E8-P40

Fig. 11: Efeito citotóxico de imunotoxina recombinante E8-P40 sobre células LNCaP

Fig. 12: Efeito citotóxico de proteína de fusão recombinante A5-P40 sobre células LNCaP

Fig. 13: Sequência de scFv E8. A sequência de ADN é apresentada bem como a sequência de aminoácidos pelo qual a região das CDWs é identificada por uma área marcada.

Fig. 14: Sequência de scFv A5. A sequência de ADN é apresentada bem como a sequência de aminoácidos em que a região das CDWs é identificada por uma área marcada.

Fig. 15: Esta Figura mostra a ligação do scFv A5, H12 e D7 a Células DU145 negativas para PSMA (a) e células LNCaP positivas para PSMA (A5 = B, H12 = C, D7 = D). Células foram coradas com os mAbs e um mAb de IgG anti-ratinho conjugado com PE. Histogramas representam logaritmos de fluorescência de PE em citómetro de fluxo. O controlo negativo foi feito com anticorpo secundário somente.

Fig. 16: A ligação do scFv A5, H12 e D7 a células BOSC negativas para PSMA (a) e células BOSC transfectadas com PSMA (A5 = B, H12 = C, D7 = D). Células foram coradas com o mAb anti-c-myc scFv e Ig anti-ratinho conjugada com PE. Histogramas representam logaritmos de fluorescência de PE em citómetro de fluxo. Controlo negativo foi feito com anticorpo secundário somente.

Fig. 17: demonstra o efeito citotóxico de imunotoxina recombinante HE12-PE40 sobre LNCaP (negro) e células DU (branco).

Fig. 18: mostra esquematicamente o esquema de construção do diacorpo A5-CD3.

Fig. 19: mostra o efeito citotóxico de um diacorpo construído de scFv A5 (A5/CD3) a diferentes concentrações e linfócitos de sangue periférico (razão de efeito ou alvo ratio 10:1) em células LNCaP após 48 h de incubação.

Fig. 20: mostra a sequência de scFv H 12. A sequência de aminoácidos é apresentada no código de uma letra na primeira linha (correspondente a SEQ ID NO:20). A cadeia codificante é mostrada na segunda linha (SEQ ID NO: 19) e a cadeia complementar é mostrada na terceira linha. Esta sequência corresponde a SEQ ID NO:23. As CDRs são especificamente designadas como CDR H1, H2, H3, L1, L2 e

L3. As sequências de ácido nucleico que codificam as regiões de CDR são mostradas num fundo cinza.

Fig. 21: mostra a sequência de scFv D7. A sequência de aminoácidos é apresentada na primeira linha no código de uma letra. Esta sequência corresponde a SEQ ID NO:22. A cadeia codificante de ácido nucleico é apresentada na primeira linha. Esta sequência corresponde a SEQ ID NO:21 e a cadeia complementar é apresentada na terceira linha. Esta sequência corresponde a SEQ ID NO:24. As regiões de CDR M₁ H2, H3, L1 e L2 são mostradas na sequência. T As sequências de ácido nucleico que codificam aquelas regiões são mostradas num fundo cinza.

A presente invenção é ilustrada adicionalmente pelos seguintes exemplos.

Exemplo 1

a) Preparação de PSMA

As linhas de células de carcinoma de próstata humana LNCaP, DU 145, PC-3 e HeLa bem como o hibridoma 7E11-C5.3 (IgG1-k, PSMA) foram comprados da Coleção Americana de Culturas Celulares (ATCC), Rockville, MD, EUA. LNCaP, DU 145 e HeLa foram cultivadas em meio RPMI 1640, PC-3 em meio F12 Nutrimix, ambos suplementados com penicilina (100 000 U/l), estreptomicina (100 mg/l) e 10% de FCS a 37 C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂. Para a geração de células LNCaP que expressam PSMA não glicosilado na sua superfície 2 µg/ml de tunicamicina (ICN Biomedicals) foram adicionados ao meio durante 48 h.

As células fixadas LNCaP foram obtidas por tratamento com 4% de paraformaldeído durante 10 min a RT, e a seguir lavagem de maneira meticulosa com PBS.

Para preparar PSMA purificado, 10⁸ células LNCaP foram lavadas com PBS e então lisadas em PBS que contém 1% de IGEPAL durante 20 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação a 10.000 g o sobrenadante foi dado numa coluna de cromatografia de afinidade 7E11-C5 (Amersham

Biosciences, Uppsala, Suécia) e PSMA foi eluído com 100 mM de tampão de glicina pH 2,5 que contém 1% de Triton X-100. Após a neutralização, a proteína foi dializada extensivamente com PBS.

Para a preparação de PSMA desglicosilado, 1/10 vol tampão desnaturante de glicoproteína (BioLabs), foi adicionado à solução com PSMA purificado e aquecido durante 10 min a 100°C. Então 1/10 vol 10% de NP-40 (10%) e 50 U PNGase por µg de PSMA foi adicionado e incubado a 37°C durante 1 h.

Para a preparação de um lisado de células LNCaP que contém o PSMA nativo de comprimento completo, as células foram lisadas com reagente M-PER (Pierce) durante 10 min e então centrifugadas a 15.000 rpm durante 30 min a 4°C. O sobrenadante que contém PSMA nativo de comprimento completo foi colhido (M-PER-lisado). A fracção molecular alta (100 a 600 KD) deste lisado foi separada por HPLC numa coluna de exclusão por tamanho Biosil 250.

b) Transfecção de PSMA de comprimento completo em células DU 145 e PC3

O PSMA de comprimento completo foi clonado em dois fragmentos (fragmento 1 de 262 pb ao local de restrição EcoRI único em 1573 pb e fragmento 2 da posição 1574 a 2512) no vector pCR3.1 (Invitrogen). A transfecção transiente foi obtida por meio da adição de uma mistura de 4 µg de DNA e 10 µl de Lipofectamina (Invitrogen) em 500 µl de meio RPMI a 10⁶ células de acordo com o protocolo do fabricante. Após 48 h de incubação as células transfectadas transientes foram utilizadas para a realização de testes.

Exemplo 2

Imunização de ratinhos

Os ratinhos fêmea Balb/c de quatro meses de idade foram imunizados intraperitonealmente com 300 µg de lisado de M-PER de células LNCaP ou com a fracção molecular alta de HPLC do lisado, ou com 10⁶ células LNCaP, fixadas com 2%

de paraformaldeído. Estas preparações foram misturadas 1 :1 com complete adjuvante de Freund. Cada ratinho recebeu 4 ou 5 imunizações a intervalos de 2 semanas. Quatro dias após a última imunização, as células do baço foram colhidas e utilizadas para a preparação de hibridomas ou uma biblioteca de células B.

Exemplo 3

Preparação de uma biblioteca de células B

O baço de ratinho foi lavado em salina tamponada com fosfato (PBS), picado a pedaços pequenos, lavado de novo em PBS e então gentilmente homogeneizado num homogeneizador manual "de ajuste frouxo". A suspensão de célula única resultante foi colocada em camadas sobre Ficoll (Pharmacia, Freiburg, Alemanha) e centrifugadas a 400 g durante 20 min a temperatura ambiente. As células B de interfase foram isoladas com micropérolas de CD19 de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemanha). 10^6 células B foram lisadas em 350 μ l de uma solução que consiste em 4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sódio, 0,5% de N-laurosilsarcosinato de sódio e 100 mM de 2-mercaptoetanol.

Exemplo 4

a) Preparação de Hibridomas

O baço foi assepticamente removido e uma suspensão de célula única foi preparada em Meio RPMI-1640 sem soro. Os esplénócitos foram adicionados a células de mieloma SP2/0 numa razão de 10:1 e a fusão e selecção foram realizadas para os procedimentos estabelecidos [Galfre et al., Nature (1979), p. 131-133].

Os sobrenadantes de hibridoma foram testados por FACS em células LNCaP e DU 145 e por um ELISA com PSMA purificado como fase sólida. Os anticorpos monoclonais foram purificados utilizando uma coluna de proteína G (Pharmacia).

b) Determinação do isotipo dos mAbs

Os Ig-isotipos dos mAbs anti-PSMA foram determinados por ELISA utilizando anticorpos anti-isotipo específicos não marcados (fase sólida) ou marcados com peroxidase (traçador) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL).

c) Isolamento e caracterização de anticorpos monoclonais conformacionais anti-PSMA

Dos ratinhos Balb/c que foram imunizados 5 vezes com o lisado de M-PER de células LNCaP, as células do baço foram fusionados com Células SP2/0 de acordo com os métodos estabelecidos. Os hibridomas positivos foram selecionados por meio de citometria de fluxo com células LNCaP e ELISA em PSMA purificado. Por esta forma, três clones positivos foram obtidos. Os mAbs correspondentes com seus isotipos foram 3/F11 (IgG2a), 3/A12 (IgG1) e 3/E7 (IgG2b).

d) Caracterização de mAbs

Por meio de citometria de fluxo poderia observar-se que os três mAbs e células LNCaP coradas se ligam muito bem com uma percentagem de células positivas variando desde 95% até 98%. A forma das curvas de fluorescência versus número de eventos sugeriu que o PSMA é homogeneamente distribuído dentro da população de células LNCaP (Fig. 1). Para avaliar a especificidade de ligação dos mAbs anti-PSMA, DU145 PSMA-negativo, células PC3, células HeLa e Jurkat foram também coradas e analisadas por meio de citometria de fluxo. Todos os três mAbs não coraram as células PSMA-negativo (percentagem de células positivas variando desde 0,04% até 2%).

As propriedades de ligação dos três anticorpos foram comparadas por meio do tratamento de células LNCaP com concentrações crescentes da primeira etapa mAb anti-PSMA seguido por incubação com uma quantidade saturante de uma segunda etapa anticorpo de cabra marcado com PE-(ficoeritina) seguido por análise citofluorimétrica. Na saturação de concentrações de antígeno [100 nM] a

intensidade de fluorescência média corrigida PE (ficoeritina) foi aproximadamente 1000 para mAb 3A12, e aproximadamente 1400 para mAb 3F11 e aproximadamente 1600 para mAb 3E7. Como são mostradas para mAb 3A12 a MFI foi 5 vezes menor em células LNCaP que expressam PSMA não glicosilado (crescidas com tunicamicina).

Por meio de citologia por imunofluorescência e detecção com um microscópio confocal de varrimento a laser uma ligação forte dos três mAbs a células LNCaP (Fig 2) e também uma internalização nestas células poderiam ser mostradas (Fig. 3). Todos os mAbs foram positivos num ELISA com PSMA purificado como fase sólida. Com PSMA desnaturado os mAbs mostraram um sinal a aproximadamente 100 KD em western blot (Fig 4) enquanto a mancha com PSMA desglicosilado foi fraca dando um sinal a aproximadamente 84 KD₁ que corresponde aos dados da literatura (Fig. 5).

A imunohistoquímica de secções de parafina de cancro de próstata foi positiva com mAb 3/E7, mas não com mAbs 3/F11 e 3/A12 (Fig. 6). Os dados são sumarizados no Quadro 1.

Quadro 1: Caracterização de 3 anticorpos monoclonais contra superfície celular PSMA

Híbrido ma	Isóti po	FACS LNCaP [MFI] *	FACS DU PSMA- transf .* [MFI]	ELIS A PSMA	Manch a de PSMA	Mancha de PSMA desgl.	Imunohistoquím ica
3/F11	IgG2a	1400	105	pos	pos	(pos)	neg
3/A12	IgG1	1000	110	pos	pos	(pos)	neg
3/E7	IgG2b	1600	90	pos	pos	(pos)	pos
MFI = intensidade de fluorescência média na concentração de scFv alcançando saturação de antígeno (coloração de fundo com anticorpo secundário somente é subtraído) (pos) = ligeiramente positivo							

A partir destes dados conclui-se que os 3 mAbs mostram uma ligação muito forte e altamente específica a PSMA

nativo e desnaturado. Embora a ligação a PSMA desglicosilado seja mais fraca, uma especificidade para açúcar pode ser excluída pelo facto de que não se observa nenhuma ligação a células que não expressam PSMA.

Exemplo 5

Preparação de uma biblioteca de expressão de scFv no fagomídeo pSEX

A partir da biblioteca de células B ou de células de hibridoma ARN total e ARNm foram isolados com membranas a base de sílica gel (Rneasy, Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. A síntese de ADNc foi realizada a 42°C durante 60 min num volume final de 50 µl que continha 25 µl de ARN desnaturado, 10 µl 5x tampão (Promega, Heidelberg, Alemanha), 5 µl de 10 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Promega), 1,5 µl ARNsin (40 U/µl, Promega) 2,5 µl de 150 pM de iniciadores de hexámero aleatórios, e 2,5 µl de transcriptase reversa AMV (10 U/µl, Promega). Então as regiões codificantes das cadeias pesadas e das cadeias gama e kappa foram amplificadas por PCR como foi descrito anteriormente por Orum *et al.* [Nucleic Acids Res. (1993), 4491-4498]. Para cada cadeia 25 reacções separadas foram levadas a cabo por meio da combinação de 25 iniciadores directos da região constante diferentes com um iniciador inverso correspondente. Os produtos amplificados para as cadeias leves e as cadeias pesadas foram purificados por meio de electroforese em gel de agarose.

Os produtos de PCR para as cadeias leves foram digeridos com MluI e NotI, e ligados no fagomídeo pSEX81 [Dübel *et al.*, Gene (1993), 97-101] utilizando uma razão molar de 1:3 (2 µg de vector, 400 ng de inserção). Os produtos de uma ligação foram utilizados para a electroporação de 50 µl de células electrocompetentes *E. coli* XL1 blue (Stratagene) de acordo com o protocolo do fornecedor. As bactérias foram colocadas em nove placas de agarose de 80 mm de diâmetro que contêm 100 µg/ml de

ampicilina e 0,1 M de glicose (SOB-AG) e incubadas durante a noite a 30°C. As bactérias foram isoladas por meio da adição de 3 ml de meio 2xYT em cada placa, retirando as mesmas por raspagem com um espalhador de vidro estéril e precipitadas a 3.000 g durante 15 min. A partir destas bactérias ADN de plasmídeo foi isolado que revelou a sub-biblioteca VI. Então os produtos de PCR para a cadeia pesada e a sub-biblioteca VI foram digeridos com NcoI e HindIII. A ligação foi preparada numa razão de 3:1 (2 µg de sub-biblioteca e 400 ng de inserção). A transformação por electroporação, plaqueamento e colheita de bactérias transformadas foi feita como descrita para a sub-biblioteca VI. Das nove placas SOB-AG de 80 mm de diâmetro um total de 18 ml da biblioteca de V_HV_L foi obtido.

Exemplo 6

Produção e selecção de fago que apresenta anticorpo

a) Produção

Na biblioteca de V_HV_L em fagomídeo pSEX os genes de anticorpo são fusionados na estrutura com gene III, que codifica a proteína de superfície menor gIIIp do fago filamentososo. Portanto, a produção de partículas de fagomídeo recombinante que mostram o anticorpo na superfície requer a infecção da célula bacteriana que porta o fagomídeo com o fago de replicação defectiva M13K07 [14]. M13K07 foi adicionado a uma cultura de biblioteca de 10 ml numa multiplicidade de 10. Após a incubação a 37°C durante 90 min as células foram precipitadas e ressuspensas em 15 ml de meio 2xYT que contém 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de tetraciclina e 50 µg/ml de kanamicina. A cultura foi incubada durante a noite a 37°C a 250 rpm, então arrefecida em gelo e centrifugada para remover as células. O sobrenadante que contém os fagos foi misturado com 1/5 volume de uma solução aquosa que contém 20% de PEG 8.000 e 14% NaCl e incubada 1 h a 4°C. Então uma etapa de centrifugação de 30 min a 4°C e 6.200 g foi adicionada. O

precipitado que contém os fagos foi ressuspenso em 2 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM de NaCl, 2 mM de EDTA pH 7,5 e utilizados para a *panning*.

b) *Panning para seleccionar clones de ligação a antígeno e célula*

O *panning* em PSMA purificado foi feito em placas de microtitulação de 96 poços Maxi-Sorb (Nunc) que foram revestidas com uma solução de PSMA purificado (100 µl/poço, 12 µg/ml de PSMA em PBS) e bloqueadas com 4% de leite magro/PBS. Um ml de fagos recombinantes purificados (cerca de 10^{11}) foi incubado em 1 ml 4% de leite magro/PBS suplementado com 15 µl 10% de Triton X100 durante 15 min e então deixado para que se liguem a 8 poços revestidos com PSMA durante 2 h a 37°C. Após 20 séries de lavagem com PBS/Tween (0,1%) os fagos ligados foram eluídos com 0,1 M Glicina-Puffer pH 2,2. Para o *panning* em células viáveis fagos LNCaP foram absorvidos previamente em células DU 145. Para este procedimento 1 ml (cerca de 10^{11}) fagos recombinantes foi incubado em 2% de leite magro/PBS durante 15 min e então com 10^7 DU 145 células durante 1 h a temperatura ambiente num agitador. Então as células foram centrifugadas e o sobrenadante com fagos não absorvidos foi incubado com 10^6 células LNCaP durante 1 h a temperatura ambiente num agitador. Após 10 séries de lavagem com 2% de leite magro/PBS e 5 séries com PBS os fagos ligados foram eluídos com 50 mM de HCl com neutralização subsequente com 1 M de Tris-HCl (pH 7,5).

As células TG 1 de *E. coli* foram infectadas com os fagos eluídos, colocadas em placas SOB-AG e incubadas durante a noite a 30°C. Uma alíquota do eluato foi utilizada para a titulação. O procedimento de selecção foi repetido de três a seis vezes.

c) *Resgate de fago de pequena escala*

A partir da placa de titulação 96 colónias individuais foram isoladas e cada uma transferida em um poço de uma

placa de microtitulação de 96 poços profundos preenchidas com 500 µl de meio 2xYT que contém 100 µg/ml de ampicilina e 0,1 M de glicose (YT-AG) e incubada durante a noite a 37°C (placa principal). Então 40 µl de cultura saturada de cada poço da placa principal foram transferidos ao poço correspondente de uma nova placa que contém 400 µl de meio 2x YT-AG.

A cada poço aproximadamente 1×10^{10} fagos ajudantes M13K07 foram adicionados e incubados num agitador durante 2 horas a 37°C. Então a placa foi centrifugada e o precipitado suspenso em meio 2xYT suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de tetraciclina, e 50 µg/ml de kanamicina e incubado a 29°C e 240 rpm durante a noite. Após a centrifugação o sobrenadante que contém os fagomídeos resgatados foi removido e utilizado para ELISA fago e citometria de fluxo.

d) *ELISA-Fago*

As placas de microtitulação foram revestidas com PSMA purificado (1,5 µg de PSMA/ml de PBS) durante a noite e então bloqueadas com 2% de leite magro/PBS. A cada poço 200 µl de fagomídeos resgatados, pré-incubados 1:1 com 2% leite magro/PBS, foram adicionados e incubados durante 2 h a temperatura ambiente. Após cinco etapas de lavagem com PBS-Tween, os fagos ligados foram detectados com 200 µl /poço anticorpo anti-M13 conjugado a peroxidase de rábano picante (Pharmacia) durante 2 h a temperatura ambiente. O desenvolvimento foi levado a cabo com S.S'.δ'.δ'-tetrametilbenzidina como substrato.

e) *Isolamento e caracterização de scFv conformacional anti-PSMA*

Para a geração de scFv conformacional anti-PSMA uma biblioteca de VHVL no fagomídeo pSEX foi construída a partir da biblioteca de células B de um ratinho imunizado com lisado de M-PER de células LNCaP. Esta biblioteca tinha uma complexidade de 10^7 . De uma maneira similar, uma

biblioteca de VHVL foi preparada a partir do anticorpo monoclonal 3/A12, que foi obtido a partir do mesmo ratinho imunizado com LNCaP lisado. Esta biblioteca de VHVL tinha uma complexidade de 10^5 . Para isolar fagos que apresentam scFv de ligação a PSMA celular na sua superfície, seis séries de *panning* foram realizadas alternativamente em células LNCaP após a absorção com DLM 45 células em tubos de poliestireno e em placas de microtitulação revestidas com 20 µg/ml de PSMA purificado. Após três, quatro e seis séries de *panning* colônias de fagomídeo isoladas foram crescidas e partículas de fago foram resgatadas por infecção com M13KO7. A análise de 800 clones de fago a partir da biblioteca de células B por meio de citometria de fluxo com células LNCaP e ELISA em PSMA purificado mostraram um clone positivo denominado E8. Das bibliotecas de VHVL de mAb 3/A12 dois clones positivos foram obtidos após a quarta série de *panning* denominada A4 e A5. Por meio de sequenciamento encontrou-se que A4 foi idêntico a E8.

A região codificante do scFv E8 e A5 foi transferida do fagomídeo pSEX no vector de expressão pHOG, que contém C-terminal c-myc e caudas de His. As sequências com as CDRs correspondentes são dadas na Fig. 13 e Fig. 14. As regiões que codificam CDRs das porções de ligação a antigénio são marcadas na Fig. 13 e 14. Essas sequências não deveriam ser mudadas enquanto as outras partes da sequência que não são marcadas podem ser mudadas. A estrutura tridimensional apropriada precisa, no entanto, ser mantida.

O scFv E8 reagiu fortemente com células LNCaP viáveis como foi medido por meio de citometria de fluxo com valores de MFI de aproximadamente 100 nas concentrações de saturação, enquanto a ligação de A5 foi muito mais fraca com valores MFI de aproximadamente 40 nas concentrações de saturação (Fig 7). Em contraste, a ligação a PSMA purificado como fase sólida num ensaio ELISA foi fraca para E8 e algo mais forte para A5. Um padrão similar foi visto

em western blots com PSMA glicosilado desnaturado e desglicosilado (Fig.8). Por meio de citologia por imunofluorescência com células LNCaP e detecção por microscopia confocal a laser uma ligação muito boa do scFv E8 e internalização poderiam ser mostradas (Fig 9). Os dados do scFv são sumarizados no Quadro 2.

Quadro 2: Caracterização de 2 scFv contra superfície celular PSMA

ScFv	Origem	FACS LNCaP [MFI]	FACS PSMA-transf.D U [MFI]	ELISA PSMA	Mancha de PSMA	Mancha de PSMA desgl.
E8 = A4	biblioteca de células B e mAb A12	100	70	Pos	(pos)	(pos)
A5	MAb A12	40		Pos	pos	(pos)
MFI = intensidade de fluorescência média na concentração de scFv alcançando saturação de antígeno (coloração de fundo com anticorpo secundário somente é subtraído) (pos) = ligeiramente positivo						

Exemplo 7

Expressão e purificação de ScFv

Os fragmentos ScFv foram expressos em *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) utilizando o vector de secreção pHOG 21 que contém as sequências para a His-6 e c-myc-tag numa posição C-terminal do scFv [Kipriganov et al., J. Immunol. Methods (1997), p. 69-77]. As bactérias *E. coli* transformadas com plasmídeos pHOG foram crescidas durante a noite em meio 2 x YT-AG, então diluídas 1 :20 e crescidas como 600 ml de culturas a 37°C. Quando as culturas alcançaram DO 0,8, as bactérias foram precipitadas para centrifugação a 1.500 g durante 10 min e ressuspensas no mesmo volume de meio YT fresco que contém 50 :g/ml de ampicilina, 0,4 M de sacarose

e 1 mM de IPTG. Então o crescimento foi continuado a temperatura ambiente durante 18 a 20 h. As células foram colhidas por centrifugação a 5.000 g durante 10 min e 4°C. Para isolar proteínas periplasmáticas solúveis, as bactérias precipitadas foram ressuspensas em 5% do volume inicial de gelo frio 50 mM Tris-HCl, 20% de sacarose, 1 mM de EDTA pH 8,0. Após uma incubação de 1 h em gelo, os esferoblastos foram centrifugados a 20.000 g a 4°C durante 30 min rendendo extracto periplasmático solúvel no sobrenadante. O extracto periplasmático foi concentrado utilizando membranas Amicon YM 10 com um corte de 10 kDa (Amicon, Witten, Alemanha) seguido por diálise meticulosa contra 50 mM de Tris-HCl, 1 M de NaCl, pH 7,0.

A purificação foi alcançada por cromatografia de afinidade de metal imobilizado. Esta foi realizada utilizando um 1 ml de coluna de Sepharose quelante (Pharmacia) carregada com Cu^{2+} e equilibrada com um tampão que contém 50 mM de Tris-HCl e 1 M NaCl, pH 7,0. O extracto periplasmático foi carregado, lavado com vinte volumes de coluna de tampão equilíbrio que contém 30 mM de imidazole e então eluído com o mesmo tampão que contém 250 mM imidazole. O material Eluído foi dializado contra PBS.

A determinação do conteúdo de proteína foi realizada com o Kit de Reagente de Proteína Micro BCA (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante.

A indução da proteína foi obtida com IPTG e o rendimento de scFv a partir de uma cultura de XL1 de *E. coli* de 600 ml foi aproximadamente 20 µg.

Exemplo 8

Citometria de fluxo

As células LNCaP₁ DU 145, e PC3 foram colhidas frescamente de balões de cultura de tecido e uma suspensão de célula única foi preparada em PBS com 3% de FCS e 0,1% NaN_3 . Aproximadamente 10^5 células foram incubadas com 50 µl de fagomídeos resgatados, pré-incubadas 1:1 com 2% de leite

magro/ PBS, 1 h em gelo. Após 3 séries de lavagem com PBS 25 µl/poço anti-c-myc anticorpo monoclonal 9E10 (10 µg/ml; Becton Dickinson) ou quando os fagos foram testados 25 µl/poço anticorpo anti-M13 (10 µg/ml; Pharmacia) foram adicionados e incubados 40 min em gelo. Após lavar 3 vezes com PBS, as células foram incubadas com 100 µl de IgG anti-ratinho de cabra marcada com PE (Becton Dickinson) durante 40 min em gelo. As células foram então lavadas de novo e ressuspensas em 100 µl de uma solução que contém 1 µg/ml iodeto de propídio (Sigma, Deisenhofen) em PBS com 3% de FCS e 0,1% NaNe a fim de excluir células mortas. A fluorescência relativa de células coradas foi medida utilizando um citômetro de fluxo FACScan e o software CellQuest (Becton Dickinson Mountain Vista, CA).

Exemplo 9

Citologia de imunofluorescência

As células LNCaP foram crescidas em lamínulas de vidro durante 24 horas. Para a fixação, as células foram tratadas com 2% de paraformaldeído em PBS durante 30 min a RT, que não permeabilizam a membrana celular, lavadas com 1% BSA-PBS, extintas durante 10 min em 50 mM de NH₄Cl em PBS, e enxaguadas com 1% BSA-PBS. O anticorpo monoclonal primário a 4 µg/ml em 1% BSA-PBS foi adicionado e incubado durante 60 min a 4°C. O anticorpo secundário anti-ratinho de cabra marcado com FITC (2 µg/ml; Southern Biotechnology Associates Inc. Birmingham, EUA) foi incubado durante 30 min e lavado extensivamente com 1% de BSA-PBS. As lâminas foram montadas em Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA).

Para as experiências de internalização o anticorpo primário foi incubado durante 30 min a 37°C antes da fixação das células com 2% de paraformaldeído e permeabilização com 0,5% de Triton X100 em PBS.

Exemplo 10

a) imunohistoquímica

As secções de tecido de parafina foram primeiro desparafinizadas e então tratadas com 0,3% de Triton X100 em PBS para recuperação de antigénio. As secções de Kryostat foram fixadas em acetona fria. As secções foram tratadas 30 min com 3% de H₂O₂ e 10% de metanol para extinguir de peroxidase endógena. Após o bloqueio com 1% BSA-PBS o anticorpo primário foi adicionado a uma concentração de 2 µg/ml e incubado durante 1 h a RT. Para o scFv um anticorpo secundário anti-ratinho de c-myc foi adicionado durante 1 h a RT. Então um anticorpo anti-ratinho de cabra biotinilado foi incubado durante 30 min a RT e finalmente desenvolvido com reagente ABC (Vectastain).

b) *Análise de Western blot*

A análise de Western blot foi realizada seguindo electroforese em gel de dodecil sulfato-poliacrilamida de sódio (SDS) de PSMA purificado e lisado celular de células LNCaP e transferido a membranas difluoreto de. As manchas foram bloqueadas durante a noite em PBS que contém 5% de leite magro e incubado com os mAbs purificados ou scFv em concentrações de 10 µg/ml durante 1 h. Então as manchas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween (0,5%) e incubadas com peroxidase de rábano picante conjugada com IgG anti-ratinho de cabra durante 1 hora a RT. Após 5 lavagens com PBS-Tween (0,5%) as manchas foram desenvolvidas utilizando S.S'.δ'.δ'-tetrametilbenzidina como substrato.

Exemplo 11

Construção, expressão e purificação de proteínas scFv-PE40

A toxina utilizada no presente enfoque foi a versão truncada da exotoxina de *Pseudomonas* (PE40), que não possui o domínio Ia e que contém somente domínios Ib, II, e III [Pastan *et al.*, J.Biol.Chem. (1989), p. 15157-15160]. O ADN com a região codificante no vector pSW200 foi obtido do Prof. W. Wels, Frankfurt [Wels *et al.*, Biotechnology (1992), p. 1128-1132]. O fragmento de ADN da posição 253 pb

a 613 que codifica PE40 foi amplificado por PCR de plasmídeo pSW200. O ADN amplificado foi então ligado no vector pHOG-His-scFv numa posição C-terminal ao scFv utilizando o local de restrição XbaI. Todas as etapas de clonagem foram realizadas de acordo com métodos padrão em *E. coli* XL1 blue e os produtos foram confirmados por meio de sequenciamento.

A indução da proteína da imunotoxina e purificação por meio de IMAC foi a mesma como para scFv. Os produtos foram testados e caracterizados por SDS-page, western blot e citometria de fluxo.

Exemplo 12

Citotoxicidade de Imunotoxinas de scFv-PE40

O metabolismo do sal de tetrazólio vermelho WST a um corante formazan solúvel em água foi determinado de acordo com as instruções do fabricante (Boehringer). As células alvo (LNCaP e DU 145 como controlo) foram semeadas a $2,5 \times 10^4$ /poço de uma placa de 96 poços e crescidas durante 24 horas até que uma camada de células confluentes tenha sido formada. Várias diluições das imunotoxinas recombinantes em alíquotas de 50 µl/poço foram adicionadas e as placas foram incubadas durante 48 horas a 37°C, 5% de CO₂. Após este tempo as culturas foram pulsadas com 15 µl/poço de reagente WST e incubadas durante 90 min a 37°C, 5% de CO₂. Então as absorvâncias espectrofotométricas das amostras foram medidas a 450 nm (referência 690 nm). A concentração de imunotoxina requerida para alcançar uma redução de 50% na viabilidade celular relativa a essa das culturas de controlo não tratadas (50% de concentração inibitória = IC50) foi calculada.

Os ensaios de citotoxicidade (WST) com as imunotoxinas E8-P40 e A5-P40 foram preparados com PSMA que expressam células LNCaP e células de controlo DU 145. Como são mostradas na Fig. 11 um efeito citotóxico alto poderia ser mostrado com a imunotoxina E8-PE40 em células LNCaP com um

valor de CI50 de 0,05 nM. Na Fig. 12 o efeito citotóxico da imunotoxina A5-PE40 é mostrado com um CI50 de aproximadamente 0,09 nM. O fundo citotóxico em células DU 145 que não expressam PSMA foi 5% para a construção E8 e somente 0,01% para a construção A5 evidenciando uma janela terapêutica muito boa.

Exemplo 13

Geração do scFv H12 e D7 a partir de mAb 3/F11 e 3/E7

A partir de cada mAb uma biblioteca de expressão de scFv no fagomídeo pSEX foi gerada como descrito no Exemplo 5.

A produção e selecção de fago que apresenta anticorpo foram feitas de acordo com o Exemplo 6.

Após seis séries de *panning* alternativamente em PSMA e células LNCaP um clone positivo específico foi obtido, de mAB 3/E7, que foi chamado H12 e um clone positivo foi obtida de mAB 3/F11, que foi chamado D7. A região codificante de cada scFv foi transferida no vector de expressão pHOG-21.

A expressão e purificação de ScFv foram feitas como descrito no Exemplo 7.

Exemplo 14

Caracterização do scFv H12 e D7

a) Citometria de fluxo em linhas de células positivas e negativas para PSMA

Os scFvs H12 e D7 reagiram com células LNCaP viáveis como medidas por meio de citometria de fluxo.

A partir das curvas de saturação a concentração de anticorpo alcançando 50% de saturação de locais de PSMA foi determinada por ser de aproximadamente 120 nM (H12) e 20 nM (D7) respectivamente. A valores de concentrações de saturação de MFI de 70 (H12) e 40 (D7) foram alcançados (Fig. 15).

Para avaliar a especificidade de ligação a PSMA do scFv H12 e D7, células cancro de próstata de DU145 e PC3

negativas para PSMA e outras linhas de células negativas para PSMA (HeLa, MCF7, HCT15 e Jurkat) foram adicionalmente coradas e analisadas por meio de citometria de fluxo. Todos os três scFv não coraram as células negativas para PSMA.

b) Citometria de fluxo em transfectantes de PSMA

Para verificar uma ligação específica a PSMA, os scFv H12 e D7 foram também testado em células BOSC-23 transfectadas com PSMA. Ambos os scFv mostraram uma ligação dependente da concentração a BOSC células transfectadas com PSMA de comprimento completo, mas não a células não transfectadas (Fig. 16). As condições de saturação foram alcançadas a 100 nM (D7) e 200 nM (H 12). Similar aos mAbs, os valores de MFI sobre os transfectantes foram inferiores que em células LNCaP e mostraram um ampla distribuição, que pode corresponder a moléculas PSMA variantes na superfície celular do anterior.

c) Citologia de imunofluorescência

A citologia de imunofluorescência foi preparada como descrito no Exemplo 4. Após a detecção com um microscópio confocal de varrimento a laser uma ligação forte do scFv a células LNCaP e também uma internalização nestas células foi observada.

d) ELISA e Western blotting

A ligação do scFv H12 e D7 a PSMA purificado num ELISA de fase sólida e por Western blotting foi fraca.

As sequências (aminoácido e ácido nucleico) de H12 e D7 são dadas nas Fig. 20 e Fig. 21.

Quadro 3: Características do scFv anti-PSMA H12 e D7

scFv	mAb	FACS	FACS em	Blot	SEQ ID	SEQ ID NO	SEQ ID NO
	Origina	S em	BOSC transfectadas	em PSMA	NO de sequência de ácido nucleico	de sequência de aminoácido	de ácido nucleico sequência (cadeira complement
H12	3/E7	70	25	100	19	20	23
D7	3/F1	40	24	100	21	22	24

* MFI = Valores de intensidade de fluorescência média em condições de saturação após subtração da coloração de fundo com um anticorpo de controlo combinado com isotipo

Exemplo 15

Construção e citotoxicidade de uma imunotoxina H12-PE40 e imunotoxina D7-PE40

A construção da imunotoxina H12-PE40 e a D7-PE40 foi similar a A imunotoxinas 5 e E8 descritas no exemplo 11. PE-40 representa o fragmento exotóxico de *Pseudomonas*.

A citotoxicidade foi testada como descritas em exemplo 12.

A imunotoxina promoveu a morte de células LNCaP de uma maneira dependente do tempo; os maiores efeitos citotóxicos puderam ser observados após 48 h de incubação.

Neste tempo valores de CI50 de aproximadamente 200 pM foram encontrados para H12-PE40 e D7-PE40 (Fig. 17).

Adicionalmente, citotoxicidade de H12-PE40 e D7-PE40 foi testada nas linhas de células negativas para PSMA DU 145, PC-3, MCF7 e HCT 15. Nenhuma citotoxicidade foi encontrada nestas linhas de células em concentrações de até 25 000 pM..

Exemplo 16

Construção de um diacorpo anti-PSMA/CD3

Um diacorpo biespecífico específico para PSMA e a cadeia CD3 do Complexo receptor de célula T foi gerado. O diacorpo biespecífico foi expresso em *E. coli* utilizando um vector que contém o operão discistrônico para co-secreção de scFv VhCD3-VIA5 e VhA5-VICD3 (Fig. 18). Para a construção de diacorpo anti-A5/CD3 os plasmídeos pKID19x3 e pKID 3x19 foram utilizados [Kipriyanov, Int.J. Cancer 1998, pp 763]. A expressão periplasmática bacteriana e a purificação foram similares ao scFv.

Exemplo 17

Indução de citotoxicidade específica por diacorpo A5-CD3

A capacidade do diacorpo biespecífico induzir lise em célula tumoral redireccionando citotoxicidade mediada por célula T foi investigada utilizando PBMC de dadores saudáveis como células efectoras. Após a incubação com ou sem IL-2 durante 4 dias, as células foram adicionadas a células LNCaP alvo, que foram semeadas a $1,5 \times 10^4$ células/poço de um placa de 96 poços. A razão efector-alvo foi de 10:1. Diacorpo foi adicionado a diferentes concentrações. Após a incubação de 48 horas as culturas foram pulsadas com 15 µl/poço reagente WST e incubadas durante 90 min a 37°C e 5% de CO₂. Então as absorvâncias espectrofotométricas das amostras foram medidas a 450 nm (referência 690 nm).

Neste teste *in vitro* o diacorpo pareceu ser bastante potente em realvejar PBMC activada e inactivada para lisar as células LNCaP alvo numa maneira dependente da concentração (Fig. 19).

Exemplo 18

Diacorpo A5-A5

Este diacorpo monoespecífico bivalente foi gerado similar ao diacorpo A5-CD3 (exemplo 16). A expressão periplasmática bacteriana e a purificação foram similares ao scFv.

Por meio de citometria de fluxo uma forte e específica ligação de diacorpo A5-A5 a células LNCaP poderiam ser mostradas.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Universitaetsklinikum Freiburg
<120> Anticorpos Monoclonais E Fragmentos De Anticorpo De
Cadeia Única Contra Antigénio De Membrana Específico Da
Próstata De Superfície Celular
<130> ZEE20050222c
<150> EP 05011536.9
<151> 27-05-2005
<160> 24
<170> PatentIn versão 3.2
<210> 1
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> scFv E8
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (103)..(103)
<223> Xaa significa Tyr ou Ser
<400> 1

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

Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Glu Arg His Gly Lys Ser Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln
50 55 60

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Xaa Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100... 105 110

Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu
115 120 125

Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Gln Met Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr
145 150 155 160

Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Thr Ala Thr Asn Leu
180 185 190

Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln
195 200 205

Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Ser Gly Thr Tyr
210 215 220

Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala
245 250

<210> 2

<211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp
1 5 10

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 3

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly val Thr Ile
1 5 10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4) .. (4)
 <223> xaa significa Tyr ou Ser

<400> 4
Arg Gly Asp Xaa Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 5

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 6

Thr Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR

<400> 7
 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 8
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> scFv E8
 <400> 8

atggccgagg tgcagctgca gcagtcagga cccgacctgg tgaagcctgg ggcctcaatg	60
aagatttcct gcaaggcttc tggatacaca ttcactgact acaacatgga ctgggtgaag	120
gagagacatg gaaagagcct tgagtggatt ggagatatta atcctaaaaa tggcgttact	180
atttacaacc agaagttcaa gggcaaggcc acattgactg tagacaagtc ctccaccaca	240
gcctacatgg agctccgcag cctgacatct gaagacactg cagtctatta ttgtgcaaga	300
ggggactmct atggtaacta ctttgactac tggggccaag gcaccagtct cacagtctcc	360

```

tcagccaaaa cgacmcccaa gcttgaagaa ggtgaatttt cagaagcacg cgtagacatt 420
cagatgacac agtctccagc ctccctatct gtatctgtgg gagaaactgt caccatcaca 480
tgtcgaacaa gtgagaatat ttacagtaat ttagcatggg atcagcagaa acagggaaaa 540
tctcctcagc tcctgggtcta tactgcaaca aacttagcag atgggtgtgcc ctcaagggtc 600
agtggcagtg gatcaggcac acagtattcc ctcaagatca acagcctgca gtctgatgat 660
tctgggactt attactgtca acatttttgg ggtactccgt acacgttcgg aggggggacc 720
aagctggaaa taaaacgggc tgatgctgcg gcc 753

```

<210> 9

<211> 753

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> reverso e complemento de SEQ ID NO:8

<400> 9

```

ggccgcagca tcagcccggt ttatttccag ctgtgtcccc cctccgaacg tgtacggagt 60
acccccaaaa tggtgacagt aataagtccc agaatcatca gactgcaggc tggtgatctt 120
gaggggaatac tgtgtgcctg atccactgcc actgaacctt gagggcacac catctgctaa 180
gtttgttgca gtatagacca ggagctgagg agattttccc tgtttctgct gataccatgc 240
taaattactg taaatattct cacttggtcg acatgtgatg gtgacagttt ctcccacaga 300
tacagatagg gaggtgggag actgtgtcat ctgaatgtct acgcgtgctt ctgaaaattc 360
accttcttca agcttgggkg tcgttttggc tgaggagact gtgagactgg tgccttggcc 420
ccagtagtca aagtagttac catagkagtc ccctcttgca caataataga ctgcagtgtc 480
ttcagatgtc aggtgcgga gctccatgta ggctgtgggt gaggacttgt ctacagtcaa 540
tgtggccttg cccttgaact tctggttgta aatagtaacg ccatttttag gattaatatc 600
tccaatccac tcaaggctct ttccatgtct ctcttcacc cagtccatgt ttagtgcagt 660
gaatgtgtat ccagaagcct tgcaggaaat cttcattgag gcccagggtc tcaccagggtc 720
gggtcctgac tgctgcagct gcacctcggc cat 753

```

<210> 10

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> scFv A5

<400> 10

Met Ala Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala Ile Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp
50 55 60

Ile Ile Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Leu Arg His Gly Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Leu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Lys Thr Thr Pro
115 120 125

Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Gln Met
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser
145 150 155 160

Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala Trp Tyr
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser
180 185 190

Tyr Arg Tyr Ser Asp Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Glu Ser Gly
195 200 205

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala
210 215 220

Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala
245 250

<210> 11

<211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met
1 5

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 12

Ile Ile Ser Asp Gly Gly Tyr
1 5

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 13

Gly Phe Pro Leu Leu Arg His Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 14

Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 15

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 15

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência de CDR
 <400> 16

1 5

Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr Thr

<210> 17
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> SCFV A5

```

atggccgacg tgaagttggt ggagtcctgg ggaggcttag tgaagcctgg agagtcctg      60
aaactctcct gtatagcctc tggattcact ttcagtgact attatatgta ttgggttcgc      120
cagactccgg aaaagagggt ggagtggttc gcaatcatta gtgatggtgg ttattatacc      180
tactattcag acattatcaa ggggcgattc accatctcca gagacaatgc caagaacaac      240
ctgtacctcc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatgtatta ctgtacaaga      300
ggttttcttc tactacggca cggggctatg gactactggg gtcttggaac ctgagtcacc      360
gtctcctcaa ccaaaacgac acccaagctt gaagaagggt aattttcaga agcacgcgta      420
gacattcaga tgacccagtc tccaaaattc atgtccacat cggtaggaga cagggtcagc      480
gtcacctgca aggccagtca gaatgtggat actaatgtag cctgggtatca acagaaacca      540
ggacaatctc ctaaagcact gatttactcg gcctcctacc ggtacagtga cgtccctgat      600
cgcttcacag gcagtgaatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct      660
gaagacttgg cagagtatct ctgtcagcaa tatgacagct atccatacac gttcggaggg      720
gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat gctgcggcc      759

```

<400> 17

<210> 18

<211> 759

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> reverso e complemento de SEQ ID NO:17

<400> 18

```

ggccgcagca tcagcccgtt ttatttccag cttggtcccc cctccgaacg tgtatggata      60
gctgtcatat tgctgacaga aatactctgc caagtcttca gactgcacat tgctgatgg      120
gagagtgaat tctgtcccag attcactgcc tgtgaagcga tcagggacgt cactgtaccg      180
gtaggatgcc gagtaaatca gtgcttttag agattgtcct ggtttctgtt gataccaggc      240
tacattagta tccacattct gactggcctt gcaggtgacg ctgaccctgt ctctaccga      300
tgtggacatg aattttggag actgggtcat ctgaatgtct acgcgtgctt ctgaaaattc      360
accttcttca agcttgggtg tcgttttggg tgaggagacg gtgactgagg ttccaagacc      420
ccagtagtcc atagccccgt gccgtagtag aggaaaacct cttgtacagt aatacatggc      480
tgtgtcctca gacttcagac tgctcatttg gaggtacagg ttgttcttgg cattgtctct      540
ggagatgggt aatcgcccct tgataatgtc tgaatagtag gtataataac caccatcact      600
aatgattgag acccactcca gcctcttttc cggagtctgg cgaaccaat acatataata      660

```

gtcactgaaa gtgaatccag aggctataca ggagagtttc agggactctc caggcttcac 720
 taagcctccc ccagactcca ccaacttcac gtcggccat 759

<210> 19
 <211> 777
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> scFv H12
 <220>
 <221> misc_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> n é a, c, g, ou t
 <400> 19

atggcgaggt tcagctccag cagtctggat ctgaactggg atagcctggg gcttcagntg 60
 aaattgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcacatact ttgacataaa ctggttgaga 120
 cagaggcctg aacagggact tgagtggatt ggagtgattt ctcttgagaga tggcaatata 180
 aactacaatg agaacttcaa gggcaaggcc aactgacta tagataaatc ctccaccaca 240
 gcctacattc agcttagcag gctgacatct gaggactctg ctgtctatct ctgtgcaaga 300
 gatggcaact tcccttacta tgctatggac tcatggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360
 tcctcagcca aaacgacacc caagcttgaa gaaggatgaat tttcagaagc acgcgtagac 420
 attgtgatga cccagattcc actctccctg cctgtcattc ttggagatca agcctccatc 480
 tcttgcatat ctagtcagag ccttggtatac agtaatggaa acacctatct acattgggtc 540
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca atgtttccaa cctattttct 600
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtggg tcagggactg atttcacact caagatcagc 660
 agagtggagg ctgaggatct gggaatttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccacg 720
 ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa cgggctgatg ctgcggccgc tggatcc 777

<210> 20
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> SCFV H12
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)

<223> O 'xaa' na localização 20 representa Met, val, ou Leu.

<400> 20

20					25					30					
Tyr	Phe	Asp 35	Ile	Asn	Trp	Leu	Arg 40	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln 45	Gly	Leu	Glu
Trp	Ile 50	Gly	Val	Ile	Ser	Pro 55	Gly	Asp	Gly	Asn	Thr 60	Asn	Tyr	Asn	Glu
Asn 65	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala 70	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp 75	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr 80
Ala	Tyr	Ile	Gln	Leu 85	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser 90	Glu	Asp	Ser	Ala	Val 95	Tyr
Phe	Cys	Ala	Arg 100	Asp	Gly	Asn	Phe	Pro 105	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp 110	Ser	Trp
Gly	Gln	Gly 115	Thr	Ser	Val	Thr	Val 120	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr 125	Thr	Pro	Lys
Leu	Glu 130	Glu	Gly	Glu	Phe	Ser 135	Glu	Ala	Arg	Val	Asp 140	Ile	Val	Met	Thr
Gln 145	Ile	Pro	Leu	Ser	Leu 150	Pro	Val	Ile	Leu	Gly 155	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile 160
Ser	Cys	Arg	Ser	Ser 165	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr 170	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr 175	Tyr
Leu	His	Trp	Phe 180	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly 185	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu 190	Leu	Ile
Tyr	Asn	Val 195	Ser	Asn	Leu	Phe	Ser 200	Gly	Val	Pro	Asp	Arg 205	Phe	Ser	Gly
Ser	Gly 210	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe 215	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser 220	Arg	Val	Glu	Ala
Glu 225	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr 230	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser 235	Thr	His	Val	Pro	Thr 240
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr 245	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys 250	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala 255	Ala
Ala	Gly	Ser													

<210> 21
 <211> 777
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> scFv D7
 <400> 21

```

atggcccagg tgcagctgca gcagtctggg gctgaactgg tagagcctgg ggcttcagtg      60
aaactgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcacatact ttgacataaa ctgggttgaga      120
cagaggcctg aacaggggact tgagtggatt ggagggattt ctcctggaga tggtaatata      180
aactacaatg agaacttcaa gggcaaggcc aacttgacta tagacaaatc ctccaccaca      240
gcctacattc agctcagcag gctgacatct gaggactctg ctgtctatct ctgtgcaaga      300
gatggcaact tcccttacta tgctatggac tcatgggggc aaggaaacct agtcaccgtc      360
tcctcagcca aaacgacacc caagcttgaa gaagggtgaat tttcagaagc acgcgtagac      420
attgagctca cccaatctcc actctccctg cctgtcattc ttggagatca agcctccatc      480
tcttgcagat ctagtcagag ccttgtagac agtaatggaa acacctatct acattgggtt      540
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca cagtttccaa ccgattttct      600
gggggtcccag acaggttcag tggcagtggg tcagggacag atttcacact caagatcagc      660
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtaccca tgttcccacg      720
ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa cgggctgatg ctgcggccgc tggatcc       777

```

<210> 22
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> SCFV D7
 <400> 22

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Tyr Phe Asp Ile Asn Trp Leu Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Gly Ile Ser Pro Gly Asp Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu
 50 55 60
 Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Thr Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 85 90 95
 Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asn Phe Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Ser Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys

115	120	125
Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Glu Leu Thr		
130	135	140
Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ile Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile		
145	150	155
Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr		
165	170	175
Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
180	185	190
Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
195	200	205
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala		
210	215	220
Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Thr		
225	230	235
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala		
245	250	255

Ala Gly Ser

<210> 23
 <211> 777
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> scFv H12-reverso e complemento de SEQ ID NO:19
 <220>
 <221> misc_FEATURE
 <222> (720)..(720)
 <223> n é a, c, g, ou t
 <400> 23

```

ggatccagcg gccgcagcat cagcccgttt tatttccagc ttgggtcccc ctccgaacgt      60
gggaacatgt gtactttgag agcagaaata aattcccaga tcctcagcct ccactctgct      120
gatcttgagt gtgaaatcag tccctgatcc actgccactg aacctgtctg ggaccccaga      180
aaatagggtt gaaacattgt agatcaggag ctttggagac tggcctggct tctgcaggaa      240
ccaatgtaaa taggtgtttc cattactgta tacaaggctc tgactagatc tgcaagagat      300
ggaggcttga tctccaagaa tgacaggcag ggagagtgga atctgggtca tcacaatgtc      360
tacgcgtgct tctgaaaatt caccttcttc aagcttgggt gtcgttttgg ctgaggagac      420
ggtgactgag gttccttgac cccatgagtc catagcatag taagggaagt tgccatctct      480

tgcacagaaa tagacagcag agtcctcaga tgtcagcctg ctaagctgaa tgtaggctgt      540
ggtggaggat ttatctatag tcagtgtggc cttgcccttg aagttctcat tgtagtttgt      600
attgccatct ccaggagaaa tcaactcaat ccactcaagt ccctgttcag gcctctgtct      660
caaccagttt atgtcaaagt atgtgaagggt gtagccagaa gccttgagg acaatttcan      720
ctgaagcccc aggtataacc agttcagatc cagactgctg gagctgaacc tcgccat      777

```

<210> 24

<211> 777

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> scFv D7 reverso e complemento de SEQ ID NO:21

<400> 24

```

ggatccagcg gccgcagcat cagcccgttt tatttccagc ttgggtcccc ctccgaacgt      60
gggaacatgg gtactttgag agcagaaata aactcccaga tcctcagcct ccactctgct      120
gatcttgagt gtgaaatctg tccctgatcc actgccactg aacctgtctg ggaccccaga      180
aaatcggttg gaaactgtgt agatcaggag ctttggagac tggcctggct tctgcagaaa      240
ccaatgtaaa taggtgtttc cattactgtg tacaaggctc tgactagatc tgcaagagat      300
ggaggcttga tctccaagaa tgacaggcag ggagagtgga gattgggtga gctcaatgtc      360
tacgcgtgct tctgaaaatt caccttcttc aagcttgggt gtcgttttgg ctgaggagac      420
ggtgactgag gttccttgac cccatgagtc catagcatag taagggaagt tgccatctct      480
tgcacagaaa tagacagcag agtcctcaga tgtcagcctg ctgagctgaa tgtaggctgt      540
ggtggaggat ttgtctatag tcagtgtggc cttgcccttg aagttctcat tgtagtttgt      600
attaccatct ccaggagaaa tccctccaat ccactcaagt ccctgttcag gcctctgtct      660
caaccagttt atgtcaaagt atgtgaagggt gtagccagaa gccttgagg acagtttcac      720
tgaagcccca ggctctacca gttcagcccc agactgctgc agctgcacct gggccat      777

```

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 01009192 A [0009]
- WO 9735616 A [0010]
- US 20040213791 A [0011] [0012]
- WO 9803873 A [0012]
- EP 05011536 A [0107]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- Chowdhury et al. Mol. Immunol., 1997, vol. 4, 9-20 [0003]
- Horoszewicz et al. Anticancer Res., 1987, vol. 7, 927-935 [0004]
- O'Keefe et al. Prostate, 01 de Fevereiro de 2004, vol. 58 (2), 200-10 [0008]
- Bander et al. Seminars in Oncology, 2003, 667-677 [0011]
- Fracasso et al. The Prostate, 2002, 9-23 [0012]
- Galfre et al. Nature, 1979, 131-133 [0053]
- Orum et al. Nucleic Acids Res., 1993, 4491-4498 [0062]
- Dübel et al. Gene, 1993, 97-101 [0063]
- Kipriyanov et al. J. Immunol. Methods, 1997, 69-77 [0073]
- Pastan et al. J. Biol. Chem., 1989, 15157-15160 [0082]
- Wels et al. Biotechnology, 1992, 1128-1132 [0082]
- Kipriyanov. Int. J. Cancer, 1998, 763 [0102]

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo que

a) se liga a antígeno de membrana específico da próstata na sua forma nativa que ocorre na superfície de células tumorais

b) pode ser internalizado por uma célula tumoral,

c) se liga fortemente a células LNCAP, mas não se liga ou liga-se apenas minimamente a células que não expressam antígeno de membrana específico da próstata e

d) é ligado a um marcador ou um agente citotóxico, **caracterizado por**

e) compreender as CDRs que possuem as SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO:7, ou as CDRs que possuem as SEQ ID NO:11 a SEQ ID NO:16 ou as CDRs designadas como CDR H1, H2, H3, L1, L2 e L3 como são apresentadas na Fig. 20 ou as regiões CDR correspondentes como são apresentadas na Fig. 21.

2. Anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** a intensidade de fluorescência de PE (MFI) do mAb é superior a 1000 e do scFv superior a 40 com saturação de antígeno.

3. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com as reivindicações 1 e 2 que mostram uma actividade elevada de ligação a células LNCAP atingindo 50% de saturação de locais de PSMA em concentrações entre 1 nM e 120 nM.

4. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com qualquer das

reivindicações 1-3 **caracterizado por** o marcador ser uma partícula que emite radiação radioactiva ou de fluorescência.

5. Anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com as reivindicações 1-4 **caracterizado por** o agente citotóxico ser uma substância tóxica para as células seleccionada do grupo que consiste em toxinas.

6. Anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** a toxina ser seleccionada do grupo de taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, teniposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e/ou puromicina.

7. Composição farmacêutica que compreende um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores.

8. Um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com qualquer das reivindicações 1-6 para utilização no tratamento do cancro.

9. Kit diagnóstico para a detecção de células tumorais que compreende um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com qualquer das reivindicações 1-6.

10. Um método para a identificação *in vitro* de células tumorais **caracterizado por** as células tumorais a ser identificadas serem colocadas em contacto com um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo de acordo com qualquer das reivindicações 1-6.

11. Um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6 para utilização na identificação diagnóstica de células tumorais.

12. Utilização de um polinucleótido isolado que compreende uma sequência contígua de pelo menos 20 nucleótidos de qualquer sequência do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 8, 9, 17, 18, 19, 21, 23 e 24 na preparação de um anticorpo monoclonal ou um fragmento de ligação do mesmo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6.

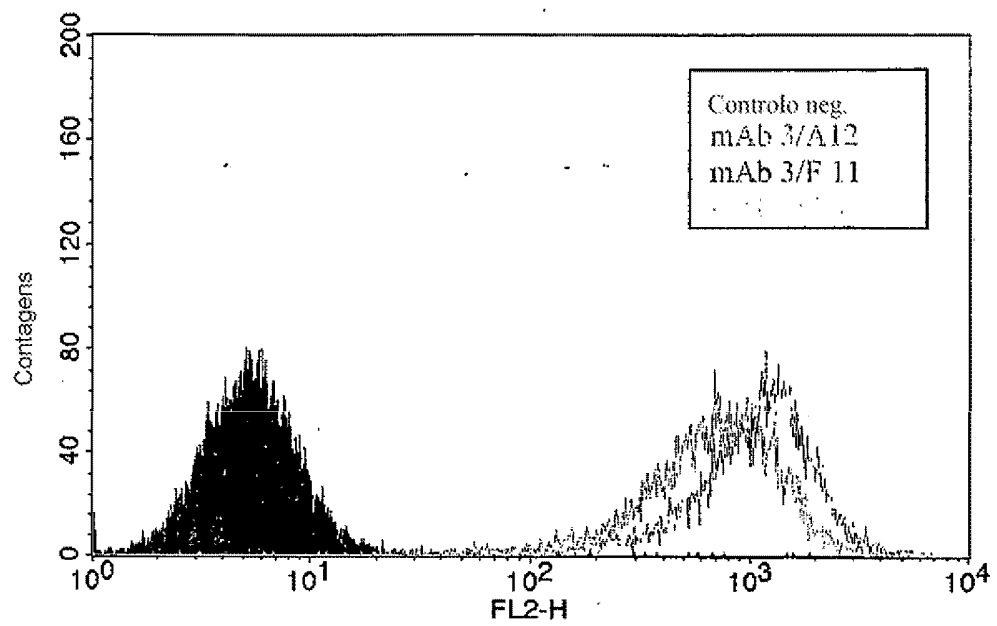


Fig 1

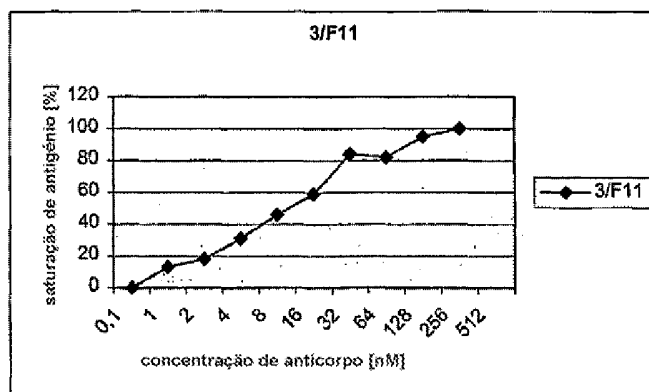


Fig 1a

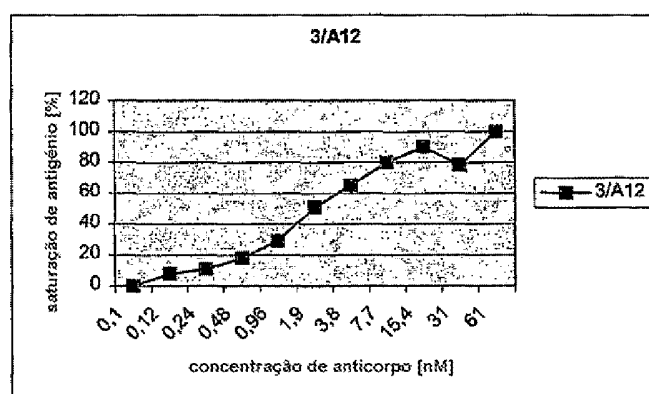


Fig 1b

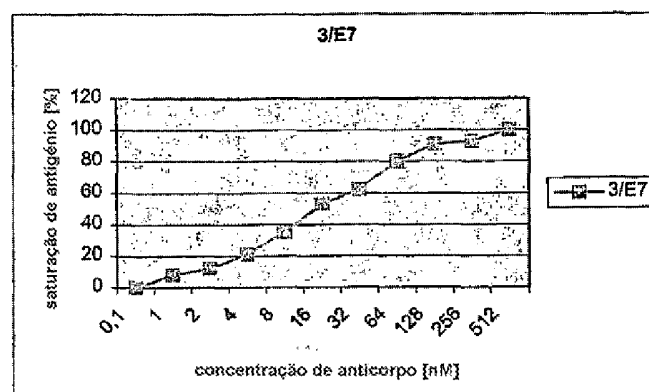


Fig 1c

Fig 1a-c

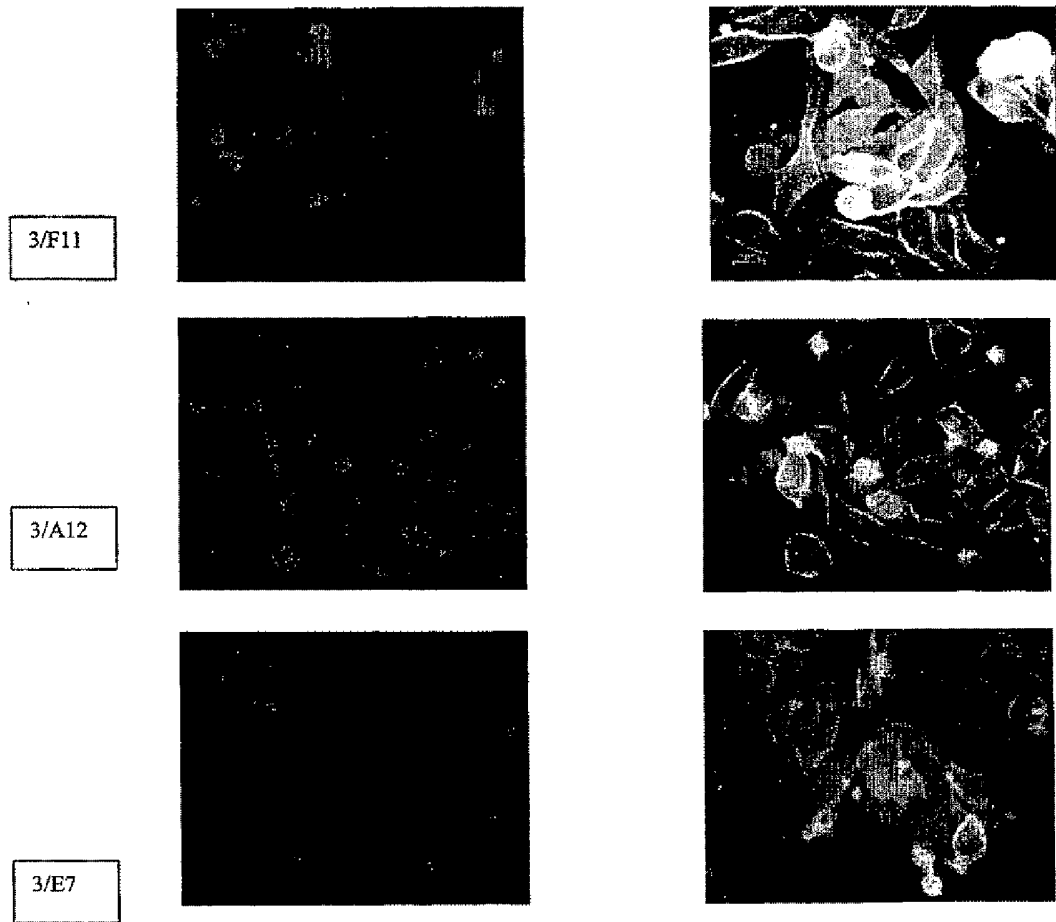


Fig 2

3/F11



3/A12



3/E7

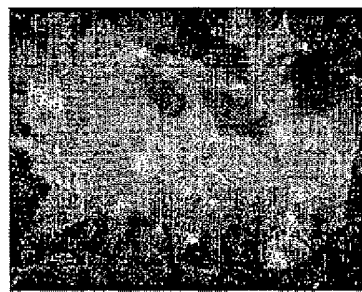


Fig 3

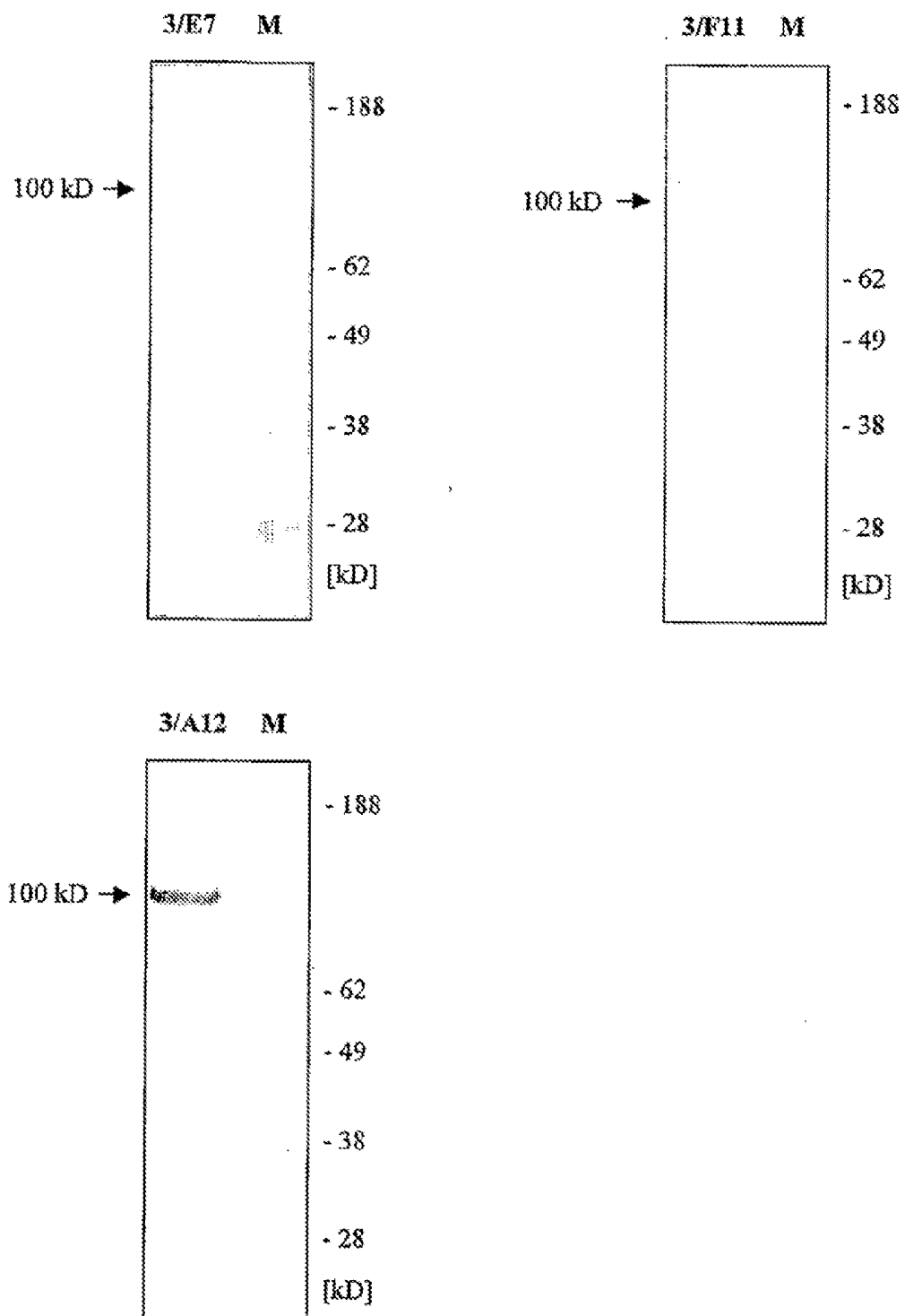


Fig 4

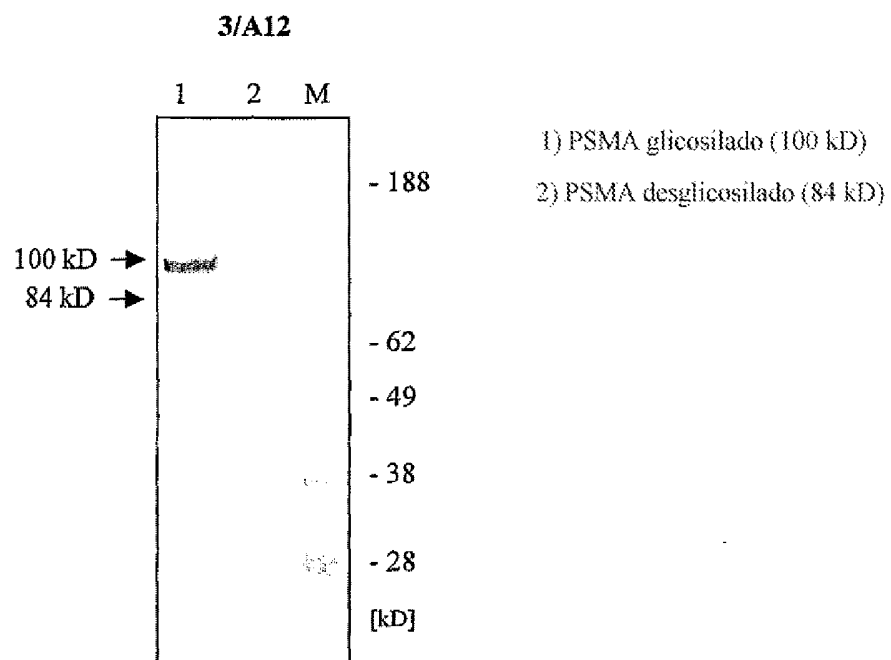


Fig 5



Fig 6

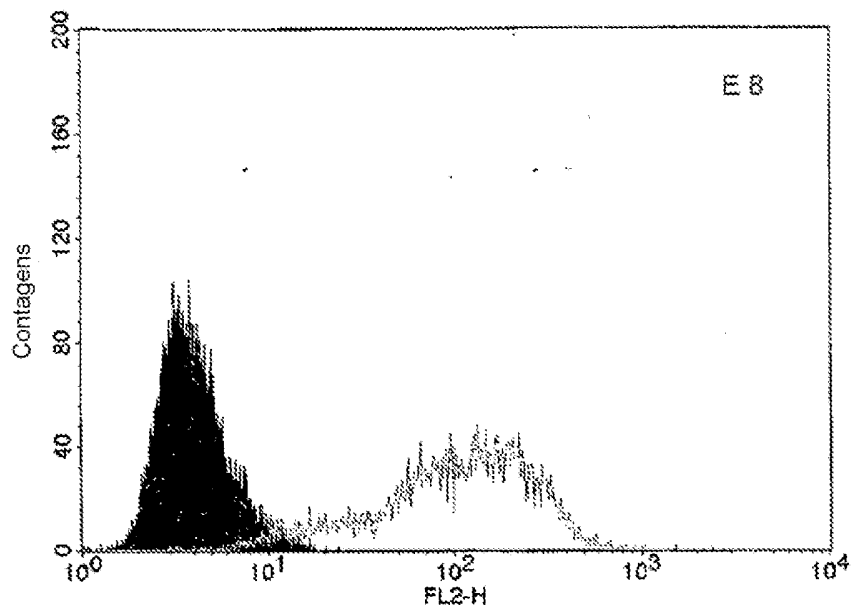


Fig 7 a

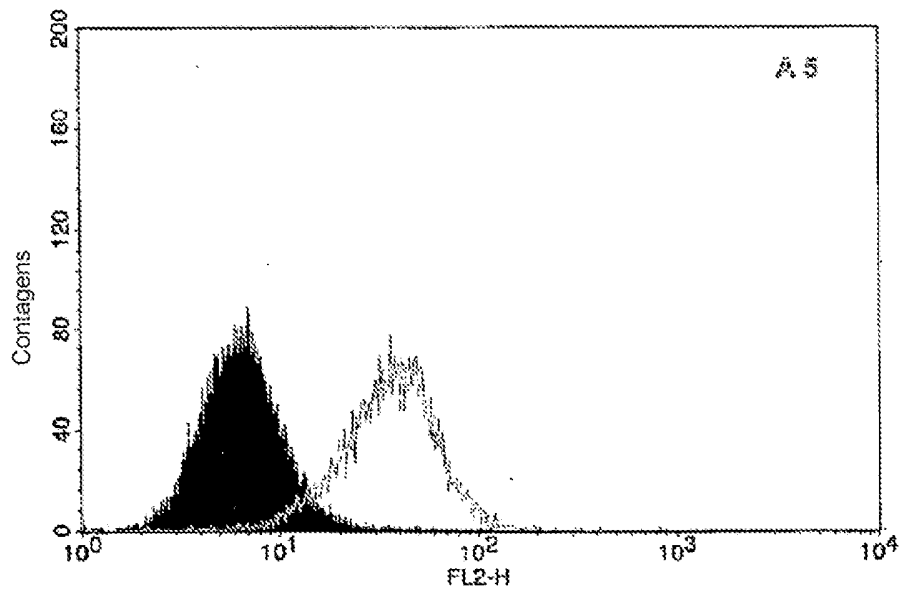


Fig 7 b

Fig 7 a,b

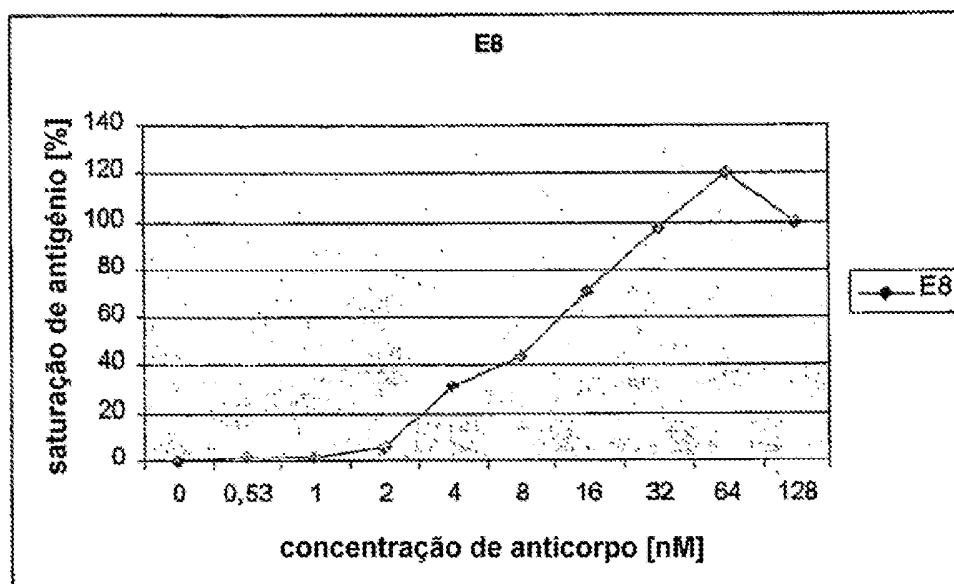


Fig 7c

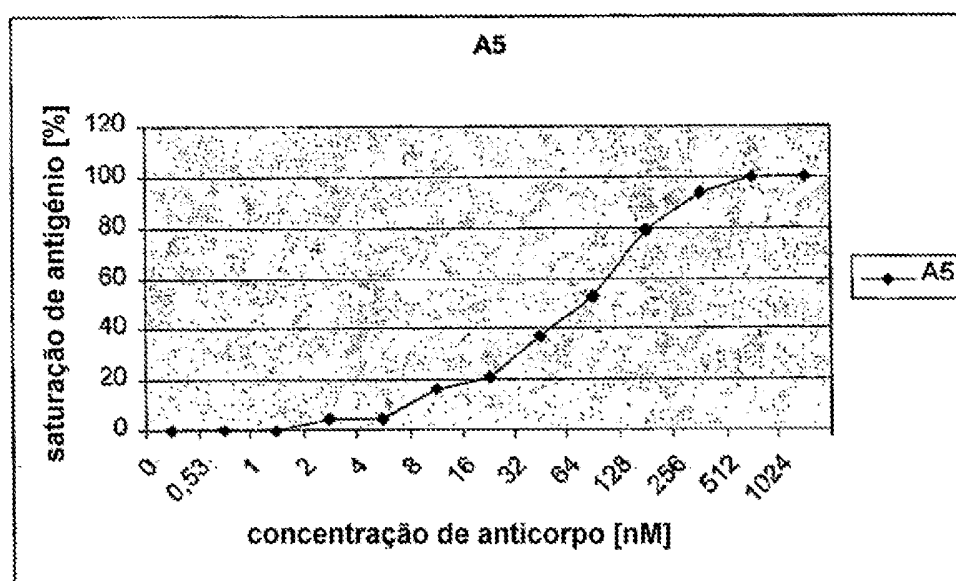


Fig 7d

Fig 7c,d

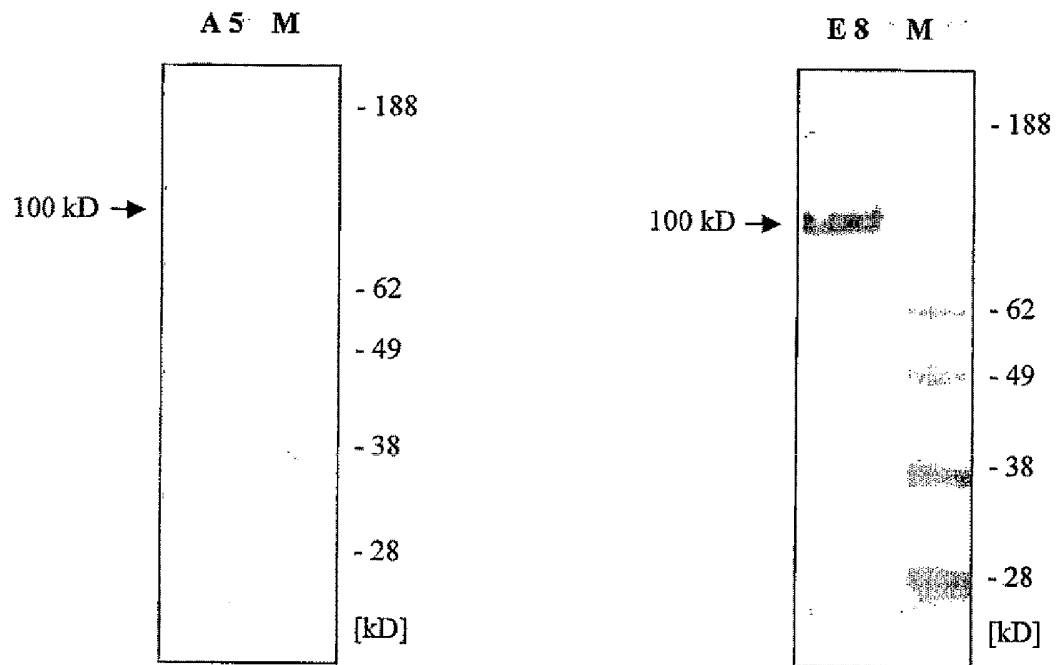


Fig 8

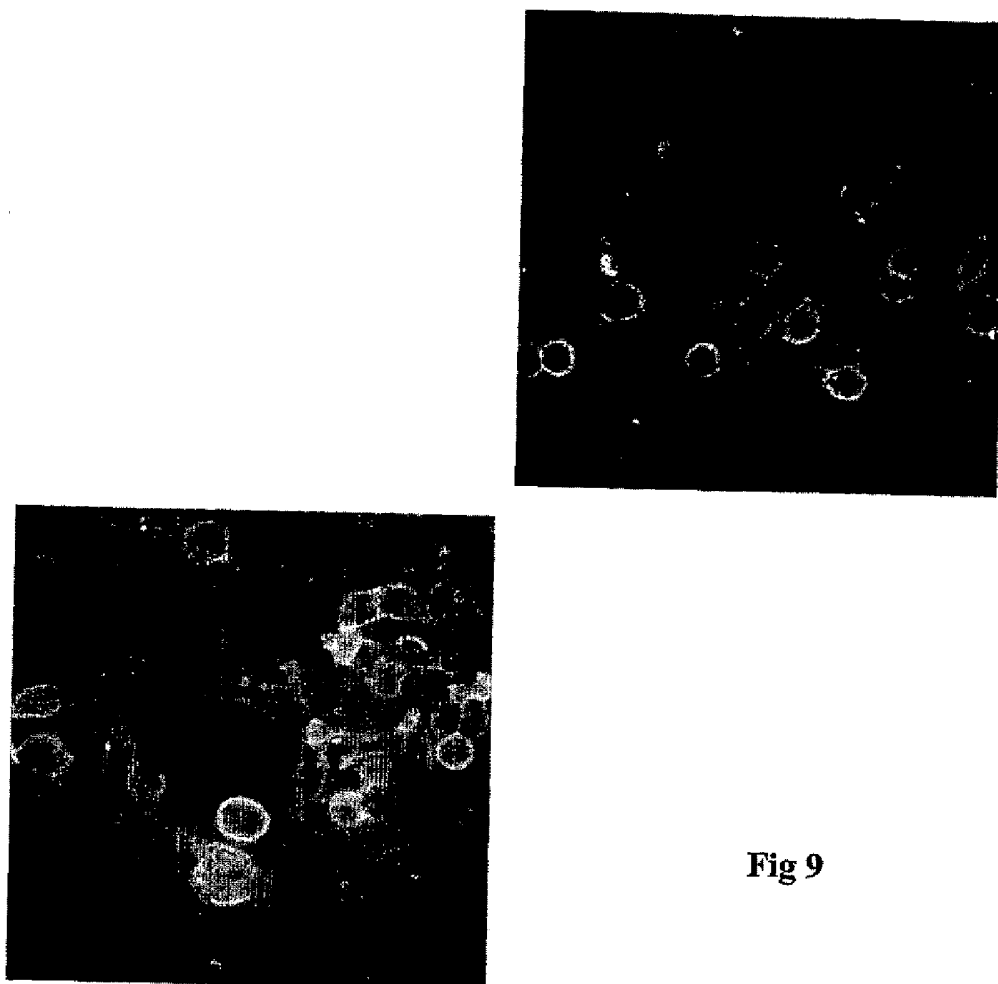


Fig 9

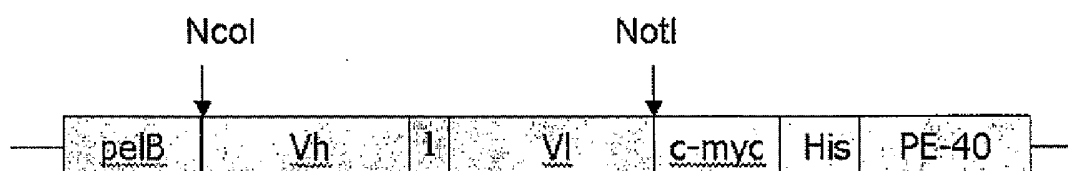
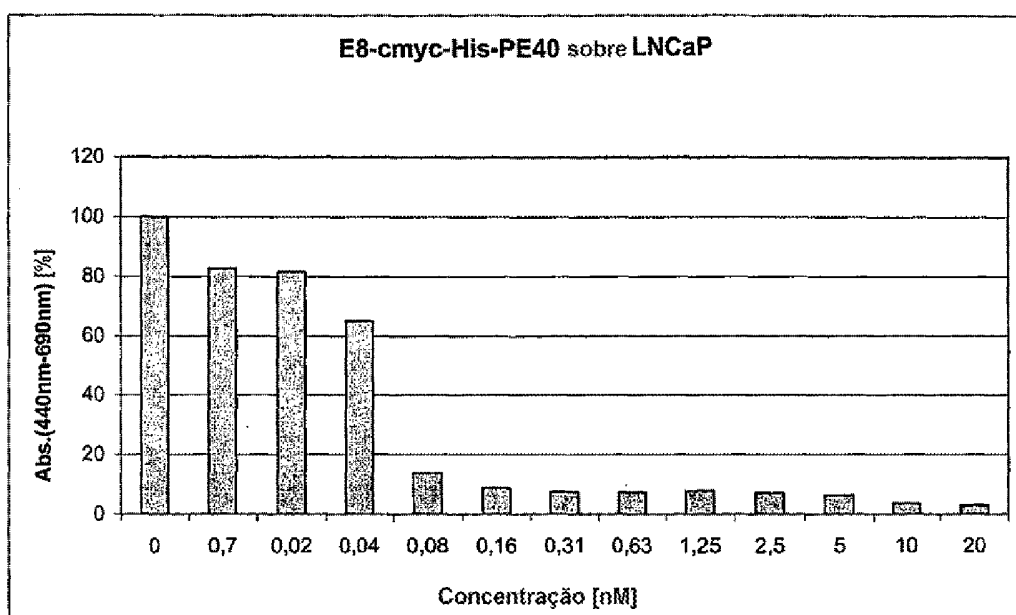
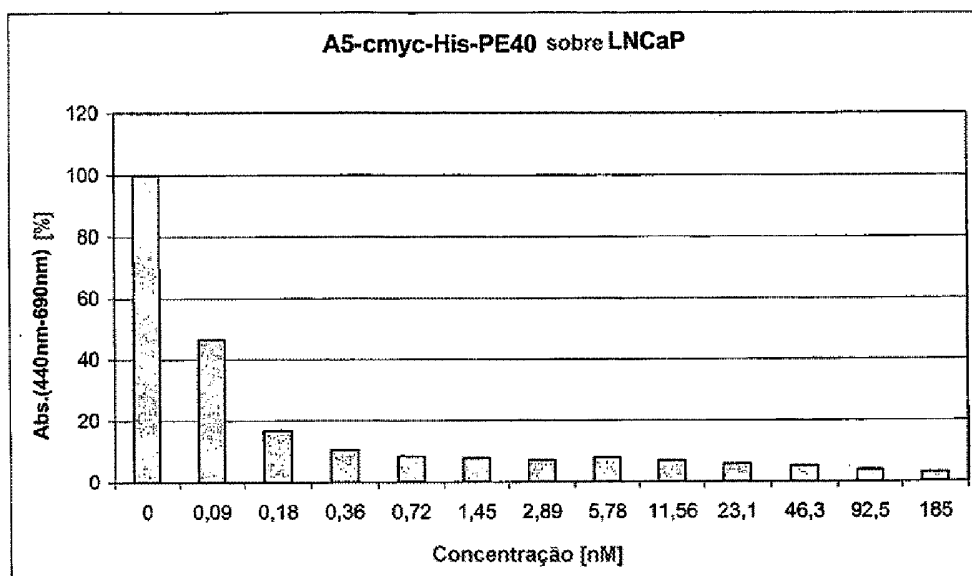


Fig 10

**Fig 11**

**Fig. 12**


```

      M  A  E  V  Q  L  Q  Q  S  G  P  D  L  V  K  P  G  A
1    ATG GCC GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCA GGA CCC GAC CTG GTG AAG CCT GGG GCC
    TAC CGG CTC CAC GTC GAC GTC GTC AGT CCT GGG CTG GAC CAC TTC GGA CCC CGG
      S  M  K  I  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  D  Y  N  M
55   TCA ATG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAC TAC AAC ATG
    AGT TAC TTC TAA AGG ACG TTC CGA AGA CCT ATG TGT AAG TGA CTG ATG TTG TAC
      D  W  V  K  E  R  H  G  K  S  L  E  W  I  G  D  I  N
109  GAG TGG GTG AAG GAG AGA CAT GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATT GGA GAT ATT AAT
    CTG ACC CAC TTC CTC TCT GTA CCT TTC TCG GAA CTC ACC TAA CCT CTA TAA TTA
      P  K  N  G  V  T  I  Y  N  Q  K  F  K  G  K  A  T  L
163  CCT AAA AAT GGC GTT ACT ATT TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG
    GGA TTT TTA CCG CAA TGA TAA ATG TTG GTC TTC AAG TTC CCG TTC CGG TGT AAC
      T  V  D  K  S  S  T  T  A  Y  M  E  L  R  S  L  T  S
217  ACT GTA GAC AAG TCC TCC ACC ACA GCC TAC ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT
    TGA CAT CTG TTC AGG AGG TGG TGT CGG ATG TAC CTC GAG GCG TCG GAC TGT AGA
      E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G  D  X  Y  G  N  Y  F
271  GAA GAC ACT GCA GTC TAT TAT TGT GCA AGA GGC GAC TMC TAT GGT AAC TAC TTT
    CTT CTG TGA CGT CAG ATA ACA CGT TCT CCG CTG AAG ATA CCA TTG ATG AAT
      D  Y  W  G  Q  G  T  S  L  T  V  S  S  A  K  T  T  P
325  GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC AGT CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACG ACM CCC
    CTG ATG ACC CCG GTT CCG TGG TCA GAG TGT CAG AGG AGT CGG TTT TGC TGC GGG

      Epitopo YOL 100.0%
      ~~~~~
      K  L  E  E  G  E  F  S  E  A  R  V  D  I  Q  M  T  Q
379  AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC GTA GAC ATT CAG ATG ACA CAG
    TTC GAA CTT CTT CCA CTT AAA AGT CTT CGT GCG CAT CTG TAA GTC TAC TGT GTC
      S  P  A  S  L  S  V  S  V  G  E  T  V  T  I  T  C  R
433  TCT CCA GCC TCC CTA TCT GTA TCT GTG GGA GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT GGA
    AGA GGT CGG AGG GAT AGA CAT AGA CAC CCT CTT TGA CAG TGG TAG TGT ACA GGT
      T  S  E  N  I  Y  S  N  L  A  W  Y  Q  Q  K  Q  G  K
487  ACA AGT GAG AAT ATT TAC AGT AAT TTA GGT TGG TAT CAG CAG AAA CAG GGA AAA
    TGT TCA CTC TTA TAA ATG TCA TTA AAT CGT ACC ATA GTC GTC TTT GTC CCT TTT
      S  P  Q  L  L  V  Y  T  A  T  N  L  A  D  G  V  P  S
541  TCT CCT CAG CTC CTG GTC TAT ACT GCA ACA AAC TTA GCA GAT GGT GTG CCC TCA
    AGA GGA GTC GAG GAC CAG ATA TCA CGT TGT TTG AAT GGT CTA CCA CAC GGG AGT
      R  F  S  G  S  G  S  G  T  Q  Y  S  L  K  I  N  S  L
595  AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA CAG TAT TCC CTC AAG ATC AAC AGC CTG
    TCC AAG TCA CCG TCA CCT AGT CCG TGT GTC ATA AGG GAG TTC TAG TTG TCG GAC
      Q  S  D  D  S  G  T  Y  Y  C  Q  H  F  W  G  T  P  Y
649  CAG TCT GAT GAT TCT GGG ACT TAT TAC TGT CAA CAT TTT TGG GGT ACT GCG TAG
    GTC AGA CTA CTA AGA CCC TGA ATA ATG ACA GTT GTA AAA ACC CCA TGA GGC ATG
      T  F  G  G  G  T  K  L  E  I  K  R  A  D  A  A  A
703  AGG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCG GCC
    TGG AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCC CGA CTA CGA CGC CGG

```

Sequência de scFv E8

Fig 13

```

      M   A   D   V   K   L   V   E   S   G   G   G   L   V   K   P   G   E
1    ATG GCC GAC GTG AAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GAG
    TAC CGG CTG CAC TTC AAC CAC CTC AGA CCC CCT CCG AAT CAC TTC GGA CCT CTC
      S   L   K   L   S   C   I   A   S   G   F   T   F   S   D   Y   Y   M
55   TCC CTG AAA CTC TCC TGT ATA GCC TCT SGA TTC ACT TTC AGT GAC TAT TAT ATG
    AGG GAC TTT GAG AGG ACA TAT CGG AGA CCT AAG TGA AAG TCA CTG ATA ATA TAC
      Y   W   V   R   Q   T   P   E   K   R   L   E   W   V   A   I   I   S
109  TAT TGG GTT CGC CAG ACT CCG GAA AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ATC ATT AGT
    ATA ACC CAA GCG GTC TGA GGC CTT TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT TAG TAA TCA
      D   G   G   Y   Y   T   Y   Y   S   D   I   I   K   G   R   F   T   I
163  GAT GGT GGT TAT TAT ACC TAC TAT TCA GAC ATT ATC AAG GGG CGA TTC ACC ATC
    CTA CCA GCA ATA ATA TGG ATG ATA AGT CTG TAA TAG TTC CCC GCT AAG TGG TAG
      S   R   D   N   A   K   N   N   L   Y   L   Q   M   S   S   L   K   S
217  TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC AAC CTG TAC CTC CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT
    AGG TCT CTG TTA CGG TTC TTG TTG GAC ATG GAG GTT TAC TCG TCA GAC TTC AGA
      E   D   T   A   M   Y   Y   C   T   R   G   F   P   L   L   R   H   G
271  GAG GAG ACA GCC ATG TAT TAC TGT ACA AGA GGT TTT CCT CTA CTA CGG CAC GGG
    CTC CTG TGT CGG TAC ATA ATG ACA TGT TCT CCA AAA GGA GAT GAT GCC CTG CCG
      A   M   D   Y   W   G   L   G   T   S   V   T   V   S   S   T   K   T
325  GCT ATG GAC TAG TGG GGT CTT GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA ACC AAA ACG
    CSA TAC CTG ATC ACC CCA GAA CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGG AGT TGG TTT TGC

      ~~~~~ Epitopo YOL 100.0% ~~~~~

      T   P   K   L   E   E   G   E   F   S   E   A   R   V   D   I   Q   M
379  ACA CCC AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC GTA GAC ATT CAG ATG
    TGT GGG TTC GAA CTT CTT CCA CTT AAA AGT CTT CGT GCG CAT CTG TAA GTC TAC
      T   Q   S   P   K   F   M   S   T   S   V   G   D   R   V   S   V   T
433  ACC CAG TCT CCA AAA TTC ATG TCC ACA TCG GTA GGA GAC AGG GTC AGC GTC ACC
    TGG GTC AGA GGT TTT AAG TAC AGG TGT AGC CAT CCT CTG TCC CAG TCG CAG TGG
      C   K   A   S   Q   N   V   D   T   N   V   A   W   Y   Q   Q   K   P
487  TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTC GAT ACT AAT GTA GCG TGG TAT CAA CAG AAA CCA
    ACG ATC CGG TCA GTC TTA CAC CTA TGA TTA CAT CCG ACC ATA GTT GTC TTT GGT
      G   Q   S   P   K   R   L   I   Y   S   A   S   Y   R   Y   S   D   V
541  GGA CAA TCT CCT AAA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TAC CGG TAC AGT GAC GTC
    CCT GTT AGA GGA TTT CGT GAC TAA ATG AGC CGT AGG ATG GCC ATG TCA CTG CAG
      P   D   R   F   T   G   S   E   S   G   T   D   F   T   L   T   I   S
595  CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GAA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC
    GGA CTA GCG AAG TGT CCG TCA CTT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG
      N   V   Q   S   E   D   L   A   E   Y   F   C   Q   Q   Y   D   S   Y
649  AAT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT CAG CAA TAT GAC AGC TAT
    TTA CAC GTC AGA CTT CTG AAC CGT CTC ATA AAG ACA GTC GTT ATA CTG TCG ATA
      P   Y   T   F   G   G   G   T   K   L   E   I   K   R   A   D   A   A
703  GCA TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCG
    GGT ATC TGC AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCC CGA CTA CGA CGC
      A
757  GCC
    CGG

```

Sequência de scFv A5

Fig. 14

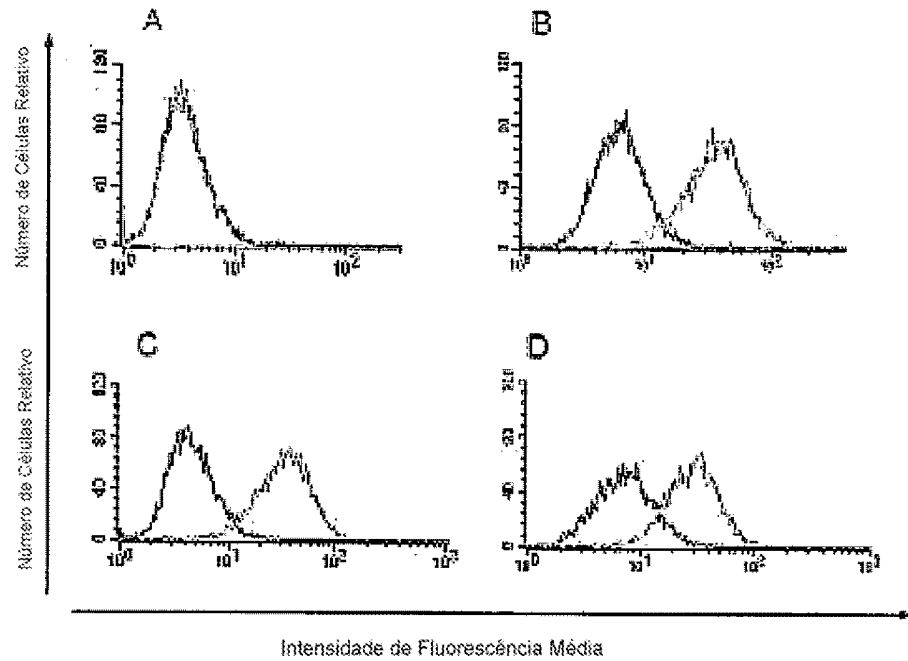


Fig. 15

Ligação do scFv A5, H12 e D7 a células DU145 negativas para PSMA (a) e células LNCaP positivas para PSMA (A5 = B, H12 = C, D7 = D). As células foram coradas com os mAbs e um mAb de IgG anti-ratinho conjugado com PE. Os histogramas representam logaritmos de fluorescência de PE em citômetro de fluxo. O controle negativo foi feito com anticorpo secundário somente.

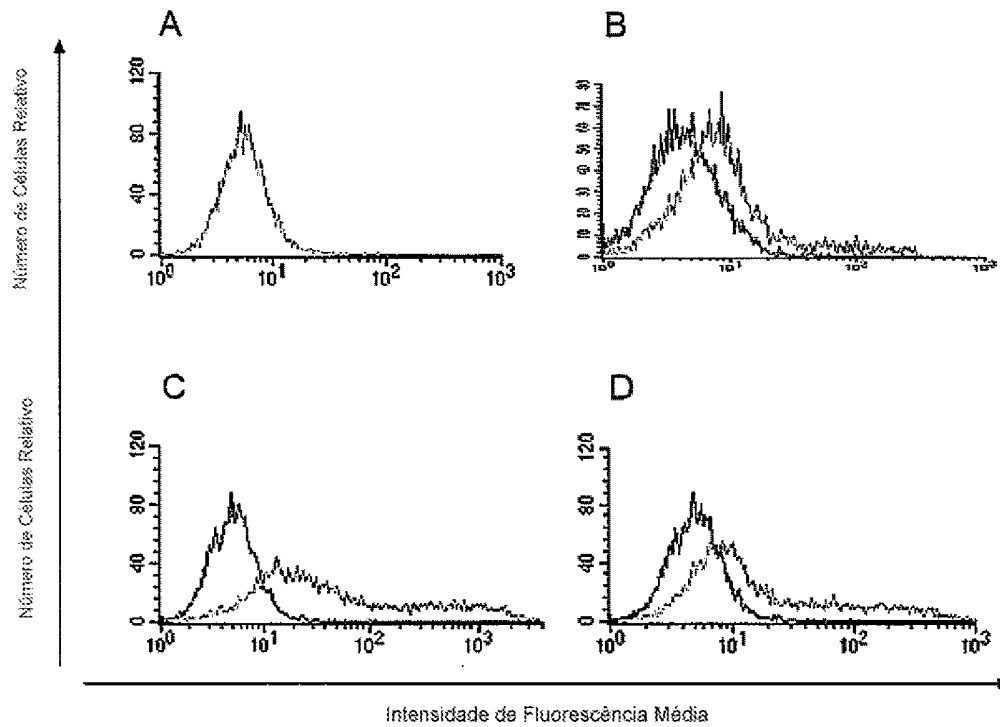
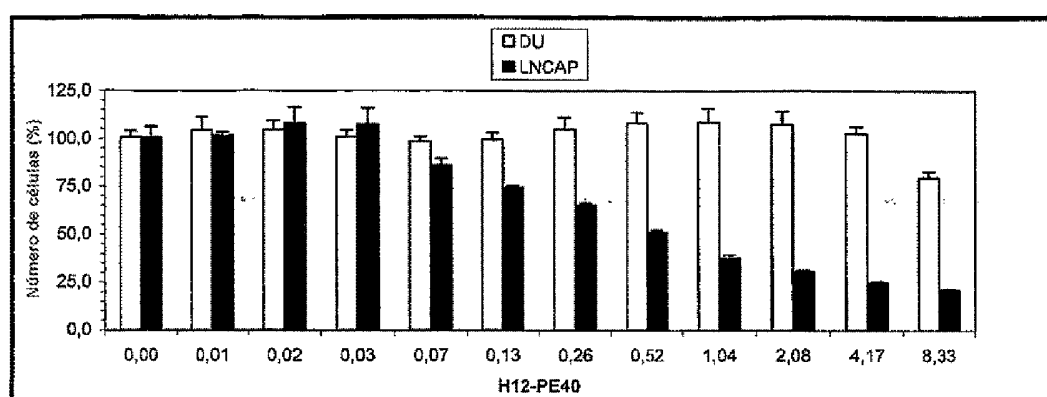


Fig 16

Ligação do scFv A5, H12 e D7 a células BOSC negativas para PSMA (a) e células BOSC transfectadas com PSMA (A5 = B, H12 = C, D7 = D). As células foram coradas com o mAb anti-c-myc scFv e Ig anti-ratinho conjugada com PE. Os histogramas representam logaritmos de fluorescência de PE em citómetro de fluxo. Controlo negativo foi feito com anticorpo secundário somente.

**Fig. 17**

Efeito citotóxico de imunotoxina recombinante HE12-PE40 sobre células LNCaP (negro) e DU (branco)

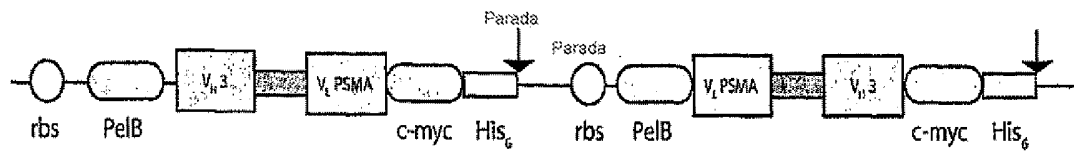
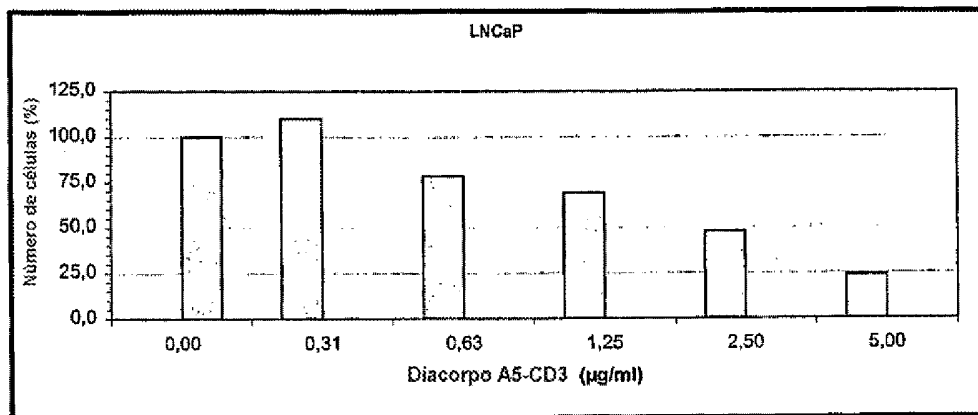


Fig. 18

Esquema de construção do diacore A5-CD3

**Fig. 19**

Efeito citotóxico de um diacopo construído de scFv A5 (A5/CD3) a diferentes concentrações e linfócitos de sangue periférico (razão de efeito ou alvo ratio 10:1) sobre células LNCaP após 48 h de incubação

```

+1 M A R F S S S S L D L N W Y S L G L Q X
1  ATG GCG AGG TTC AGC TCC AGC AGT CTG GAT CTG AAC TCG TAT AGC CTG GGC CTT CAG NTG
   TAC CGC TCC AAG TCG AGG TCG TCA GAC CTA GAC TTG ACC ATA TCG GAC CCC GAA GTC AAC

                                CDR-H1
+1 K L S C K A S G Y T F T Y F D I N W L R
61  AAA TTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACA TAC TTT GAC ATA AAC TGG TTG AGA
   TTT AAC AGG AGC TTC CGA AGA CCG ATG TGG AAG TGT ATG AAA CTG TAT TTG ACC AAC TCT

                                CDR-H2
+1 Q R P E Q G L E W I G V I S F G D G N T
121 CAG AGG OCT GAA CAG GGA CTT GAG TGG ATT GGA GTG ATT TCT CCT GGA GAT GGC AAT ACA
   GTC TCC GGA CTT GTC CCT GAA CTC ACC TAA CCT CAC TAA ACA GGA CCT CTA CCG TTA TCT

+1 N Y N E N F R G K A T L T I D K S S T T
181 AAC TAC AAT CAG AAC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT ATA GAT AAA TCC TCC ACC ACA
   TTG ATG TTA CTC TTG AAG TTC CCG TTC CGG TGT GAC TGA TAT CTA TTT AGG AGG TGG TGT

+1 A Y I Q L S R L T S E D S A V Y F C A R
241 GCC TAC ATT CAG CTT AGC AGG CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCT GTC TAT TTC TGT GCA AGA
   CCG ATG TAA GTC GAA TCG TCC GAC TGT AGA CTC CTG AGA CGA CAG ATA AAG ACA CGT TCT

                                CDR-H3
+1 D G N P P Y Y A M D S N G Q G T S V T V
301 GAT GCG AAC TTC CCT TAC TAT GCT ATG GAC TCA TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC
   CTA CCG TTT AAG GGA ATG ATA CGA TAC CTG AGT ACC CCA GTT CCT TGG ACT CAG TGG CAG

                                Epitope YOL
+1 S S A K T T P K L E E G E F S E A R V D
361 TCC TCA GCC AAA ACG ACA CCC AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CCG CTA GAC
   AGG AGT CCG TTT TGC TGT GGG TTC GAA CTT CTT CCA CTT AAA AGT CTT CBT GCG CAT CTG

+1 I V M T Q I P L S L P V I L G D Q A S I
421 ATT GTG ATG ACC CAG ATT CCA CTC TCC CTG CCT GTC ATT CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC
   TAA CAC TAC TGG GTC TAA GGT GAG AGG GAC GGA CAG TAA GAA COT CTA GTT CCG AGG TAG

                                CDR-L1
+1 S C R S S Q S L V Y S N G N T Y L H W F
481 TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTT GTA TAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TTC
   AGA ACG TCT AGA TCA GTC TCG GAA CAT ATG TCA TTA CCT TTG TGG ATA AAT GTG ACC AAG

                                CDR-L2
+1 L Q K F G Q S P K L L I Y N V S N L F S
541 CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAT GTT TCC AAC CTA TTT TCT
   GAC GTC TTC GGT CCG GTC AGA GGT TTC GAG GAC TAG ATG TTA CAA AGG TTG GAT AAA AAG

```

Fig. 20 a


```

+1 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
601 GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACT GAT TTC ACA CTC AAG ATC AGC
    CCC CAG GGT CTG TCC AAG TCA CCG TCA CCT AGT CCC TGA CTA AAG TGT GAG TTC TAG TCG

```

CDR-L3

```

+1 R V E A E D L G I Y F C S Q S T H V P T
661 ACA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA ATT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCC ACG
    TCT CAC CTC CGA CTC CTA GAC CCT TAA ATA AAG ACG AGA GTT TCA TGT GTA CAA GGG TGC

```

```

+1 F G G G T K L E I K R A D A A A A G S
721 TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCG GCC GCT GGA TCC
    AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCC CGA CTA CGA CGC CGG CGA CCT AGG

```

Sequência de scFv H12

Fig. 20 b

M A Q V Q L Q Q S G A E L V E P G A S V
 1 ATG GCC CAG CTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GTA GAG CCT GGG GCT TCA GTG
 TAC CGG GTC CAC GTC GAC GTC GTC AGA CCC CGA CTT GAC CAT CTC GGA CCC CGA AGT CAC

CDR-H1

+1 K L S C K A S G Y T F T Y F D I N W L R
 61 AAA CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACA TAC TTT GAC ATA AAC TGG TTG AGA
 TTT GAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TGG AAG TGT ATG AAA CTG TAT TTG ACC AAC TCT

CDR-H2

+1 Q R P E Q G L E W I G G I S P G D G N T
 121 CAG AGG CCT GAA CAG GGA CTT GAG TGG ATT GGA GGG ATT TCT CCT GGA GAT GGT AAT ACA
 GTC TCC GGA CTT GTC CCT GAA CTC ACC TAA CCT CCC TAA AGA GGA CCT CTA CCA TTA TGT

+1 N Y N E N F K G K A T L T I D K S S T T
 181 AAC TAC AAT GAG AAC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT ATA GAC AAA TCC TCC ACC ACA
 TTG ATG TTA CTC TTG AAG TTC CCG TTC CGG TGT GAC TGA TAT CTG TTT AGG AGG TGG TGT

+1 A Y I Q L S R L T S E D S A V Y F C A R
 241 GCC TAC ATT CAG CTC AGC AGG CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCT GTC TAT TTC TGT GCA AGA
 CCG ATG TAA GTC GAG TCG TCC GAC TGT AGA CTC CTG AGA CGA CAG ATA AAG ACA CGT TCT

CDR-H3

+1 D G N F P Y Y A M D S W G Q G T S V T V
 301 GAT GGC AAC TTC CCT TAC TAT GCT ATG GAC TCA TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC
 CTA CCG TTG AAG GGA ATG ATA CGA TAC CTG AGT ACC CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG

Epitope YOL

+1 S S A K T T P K L E E G E F S E A R V D
 361 TCC TCA GCC AAA ACG ACA CCC AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC GTA GAC
 AGG AGT CGG TTT TGC TGT GGG TTC GAA CTT CTT CCA CTT AAA AGT CTT CGT GCG CAT CTG

+1 I E L T Q S P L S L P V I L G D Q A S I
 421 ATT GAG CTC ACC CAA TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC ATT CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC
 TAA CTC GAG TGG GTT AGA GGT GAG AGG GAC GGA CAG TAA GAA CCT CTA GTT CGG AGG TAG

CDR-L1

+1 S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W F
 481 TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TTT
 AGA ACG TCT AGA TCA GTC TCG GAA CAT GTC TCA TTA CCT TTG TGG ATA AAT GTA ACC AAA

CDR-L2

+1 L Q K P G Q S P K L L I Y T V S N R F S
 541 CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC ACA GTT TCC AAC CGA TTT TCT
 GAC GTC TTC GGT CCG GTC AGA GGT TTC GAG GAC TAG ATG TGT CAA AGG TTG GCT AAA AGA

Fig. 21 a

```

+1 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
601 GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC AAG ATC AGC
    CCC CAG GGT CTG TCC AAG TCA CCG TCA CCT AGT CCC TGT CTA AAG TGT GAG TTC TAG TCG

```

CDR-L3

```

+1 R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P T
661 AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACC CAT GTT CCC ACG
    TCT CAC CTC CGA CTC CTA GAC CCT CAA ATA AAG ACG AGA GTT TCA TGG GTA CAA GGG TCG

```

```

+1 F G G G T K L E I K R A D A A A A G S
721 TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCG GCC GCT GGA TCC
    AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCC CGA CTA CGA CGC CGG CGA CCT AGG

```

Sequência de scFv D7

Fig. 21 b