

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 362 795**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2006 E 06707388 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **09.09.2015 EP 1883698**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo de cadena única frente a antígeno
prostático específico de membrana de superficie celular**

30 Prioridad:

27.05.2005 EP 05011536

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

06.11.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (100.0%)
HUGSTETTER STRASSE 49
79106 FREIBURG, DE**

72 Inventor/es:

**ELSÄSSER-BEILE, URSULA;
WOLF, PHILIPP;
GIERSCHNER, DOROTHEE;
BÜHLER, PATRICK y
WETTERAUER, ULRICH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo de cadena única frente a antígeno prostático específico de membrana de superficie celular

El cáncer de la próstata es el cáncer más comúnmente diagnosticado en hombres y la segunda causa de muerte más común en la civilización occidental. No existe actualmente un tratamiento curativo para este tumor después de la progresión más allá de los límites resecables. Debido a la mortalidad y morbilidad significativa asociada con la progresión de la enfermedad, existe una necesidad urgente de tratamientos dirigidos nuevos. A diferencia del cáncer en otros sistemas orgánicos, el cáncer de próstata representa una diana excelente para terapia de anticuerpo por muchas razones, que incluyen i) la próstata expresa antígenos específicos de tejido, ii) la próstata es un órgano no esencial y su destrucción no dañará al huésped, iii) los sitios de metástasis son ganglios linfáticos y hueso que reciben niveles elevados de anticuerpos circulantes, iv) los niveles en suero de PSA proporcionan un medio para controlar la respuesta terapéutica.

Entre varios marcadores candidatos que se han identificado para el cáncer de próstata, el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) parece ser el más importante. Esta glicoproteína de transmembrana de tipo 2 de aproximadamente 100 KD consiste en un segmento intracelular corto (aminoácidos 1-18), un dominio transmembrana (aminoácidos 19-43) y un dominio extracelular extenso (aminoácidos 44-750). PSMA puede servir como una diana útil para inmunoterapia debido a que cumple con los siguientes criterios: i) la expresión está limitada principalmente a la próstata, ii) PSMA se expresa de forma abundante como proteína en todas las fases de la enfermedad, iii) se presenta en la superficie celular pero no se vierte a la circulación, iv) la expresión está asociada con la actividad enzimática o de señalización. PSMA también se expresa en la neovascularización de la mayoría de otros tumores sólidos y, por lo tanto, puede ser una diana para administración de fármaco anti-angiogénico específico.

Debido a sus especificidades orientadas a diana, se ha puesto un gran énfasis en el desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAb) para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas en la medicina del cáncer. Sin embargo, el uso *in vivo* de mAb está asociado con problemas graves, debido a su tamaño e inmunogenicidad. Por lo tanto, la investigación se ha enfocado en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos más pequeños con menos efectos secundarios, mejor accesibilidad al tumor y velocidades de eliminación más rápidas. La ingeniería genética ha hecho posible construir fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) que son potencialmente herramientas potentes para la terapia del cáncer. Estos anticuerpos pequeños están compuestos de los dominios variables de la cadena ligera (V_L) y la cadena pesada (V_H) conectados por un péptido de engarce. Los mismos muestran inmunogenicidad pequeña, casi ningún efecto tóxico, una velocidad de eliminación aumentada, una captación mejorada por el tumor y una mejor penetración en las células del tumor. Los scFv murinos recombinantes se pueden establecer de acuerdo con procedimientos convencionales usando bibliotecas de expresión a partir de hibridomas o células del bazo de ratones inmunizados específicamente [Chowdhury y col., Mol. Immunol. 4 (1997), págs. 9-20].

El primer mAb publicado (7E11-C5) frente a PSMA se dirige al dominio intracelular de la proteína y demostró ser altamente específico de la próstata [Horszewicz y col., Anticancer Res. 7 (1987), págs. 927-935]. También, los anticuerpos monoclonales frente al dominio extracelular de PSMA se han generado después de la inmunización con el antígeno. Sin embargo, aún existe una discrepancia entre la unión del antígeno en células fijas y cortes histológicos por una parte y la unión a células tumorales viables por la otra parte.

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) es un marcador prostático que se expresa altamente en la próstata normal así como en el cáncer prostático. Su expresión está aumentada en el cáncer prostático y se encuentra principalmente y en la próstata.

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) es una proteína celular unida a membrana única que está sobre expresada de forma múltiple en cáncer prostático así como la neovascularización de muchos tumores sólidos diferentes, pero no en la vasculatura de tejidos normales. Esta expresión única de PSMA lo hace un marcador importante así como una diana extracelular grande de agentes de formación de imágenes. PSMA puede servir como una diana para la administración de agentes terapéuticos tales como citotoxinas o radionúclidos. PSMA tiene dos funciones enzimáticas únicas, folato hidrolasa y NAALADasa y se ha observado que se recicla al igual que otros receptores unidos a membrana a través de depresiones revestidas por clatrina.

Una forma radio-inmuno-conjugada del anticuerpo monoclonal anti-PSMA (mAb) 7E11, está disponible en el mercado como "ProstaScint[®]" que se usa actualmente para diagnosticar la metástasis de cáncer prostático y la reaparición. El epítipo de PSMA reconocido por el anticuerpo monoclonal 7E11-C5.3 se localiza en el dominio citoplasmático del antígeno prostático específico de membrana.

Sin embargo, también hay informes que describen la expresión de PSMA en tejidos no prostáticos incluyendo riñón, hígado y cerebro. Por lo tanto una explicación posible la proporcionan O'Keefe y col. (Prostate, 2004, February 1; 58 (2) 200-10), concretamente que existe un gen similar a PSMA que posee una identidad del 98% al gen de PSMA en el nivel nucleotídico, que se expresa en riñón e hígado bajo el control de un promotor diferente al gen de PSMA.

El documento WO 01/009192 describe el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos para antígeno prostático específico de membrana. Los anticuerpos monoclonales anti-PSMA humanos se generaron inmunizando ratones con PSMA purificado o preparaciones enriquecidas de antígeno de PSMA. Tal antígeno purificado es un PSMA desnaturalizado ya que el mismo se ha purificado mediante inmunoadsorción después de la lisis celular con detergentes iónicos.

El documento WO 97/35616 describe anticuerpos monoclonales específicos para el dominio extracelular de antígeno prostático específico de membrana. Las inmunizaciones se realizaron con un péptido C-terminal o una preparación de membrana de tumor que expresa PSMA. Los mAb no se unen específicamente a células que expresan PSMA y por lo tanto no se pueden usar con fines de diagnóstico o terapéuticos.

Bander y col., *Seminars in Oncology*, 2003, págs. 667-677 y el documento US 2004/0213791 describen respectivamente anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígeno prostático específico de membrana. Debido a que la inmunización se realizó con antígeno purificado, los anticuerpos monoclonales no tienen una unión celular elevada y no se pudo obtener scFv de ninguno de estos mAb.

El documento WO 98/03873 describe los mismos anticuerpos que el documento US 2004/0213791 o partes de unión de los mismos que reconocen un dominio extracelular de antígeno prostático específico de membrana. No se pudo demostrar que las partes de unión de los anticuerpos, de hecho, se unen al antígeno. Fracasso y col., *The Prostate*, 2002, págs. 9-23 describen anticuerpos monoclonales anti-PSMA que están acoplados químicamente a la cadena A de ricina. Las construcciones descritas en este artículo no se unen de forma suficientemente específica a la diana y tienen las desventajas descritas en general de generación de inmunotoxinas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar medios y construcciones superiores que ayuden a diferenciar con una mayor fiabilidad entre células tumorales y células sanas que expresan PSMA o una proteína similar y células negativas a PSMA. Tales construcciones se pueden usar para dirigirse más específicamente a cáncer de próstata.

Es otro objeto proporcionar construcciones que destruyan las células de cáncer prostático específicas que expresan PSMA.

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) es una diana atractiva para inmunoterapia de cáncer de próstata. Sin embargo, en células prostáticas el PSMA se expresa con una estructura terciaria y cuaternaria específica y los anticuerpos generados con PSMA desnaturalizado aislado no reconocen eficazmente células tumorales que expresan PSMA. La unión de anticuerpos y scFv a PSMA desnaturalizado se puede obtener después de la inmunización con el antígeno purificado aislado. Sin embargo, la presente invención permite la generación de anticuerpos y scFv de afinidad elevada frente a PSMA celular nativo mediante un procedimiento de inmunización diferente que proporciona únicamente una poca producción de clones positivos. Únicamente los últimos anticuerpos generados con PSMA nativo pueden reaccionar con PSMA de superficie celular y se pueden usar como herramientas de diagnóstico y terapéuticas.

Los anticuerpos monoclonales (mAb), fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) y diacuerpos de la presente invención se prepararon de acuerdo con procedimientos convencionales a partir de células de bazo de ratones. Sin embargo, los ratones se habían inmunizado con células LNCaP y lisado de células LNCaP que contenía PSMA nativo de longitud completa. En una realización preferida de la presente invención el antígeno, concretamente el PSMA nativo de longitud completa se ha obtenido después del tratamiento de las células, preferentemente células LNCaP con un tampón de lisis especial denominado M-PER, reactivo de extracción de proteína de mamífero que está disponible en el mercado en Pierce, Roquefort, Illinois. El tampón M-PER usa un detergente de propiedad en tampón de glicina 25 mM (pH 7,6). Se exploraron y seleccionaron hibridomas y scFv mediante citometría de flujo en células LNCaP positivas a PSMA después de la absorción con células prostáticas DU 145 negativas a PSMA. Adicionalmente, las mismas se ensayaron para determinar reactividad con PSMA purificado. Los anticuerpos y scFv monoclonales resultantes se caracterizaron mediante citometría de flujo en LNCaP y DU 145 transfectadas con PSMA y mediante transferencia de Western con PSMA glicosilado y desglicosilado purificado. Adicionalmente, se preparó inmunocitología con células LNCaP e inmunohistoquímica en cortes de parafina de muestras de cáncer de próstata.

En el transcurso de la presente invención se pudieron obtener tres mAb (3/F11, 3/A12 y 3/E7), que fueron reactivos con células LNCaP viables y células DU 145 transfectadas con PSMA pero no como otras líneas celulares que no expresan PSMA. La unión a células LNCaP fue muy marcada. A concentraciones de saturación (100 nM) la intensidad de fluorescencia de PE media (IFM) estuvo entre 1.000 y 1.600. La reactividad con PSMA purificado fue más marcada con la forma nativa (ELISA) que con la proteína desnaturalizada y desglicosilada (transferencia de Western). La inmunohistoquímica en cortes de parafina fue específicamente positiva para células epiteliales con mAb E7.

A partir del mAb 3/A12 se obtuvieron dos scFv, denominados E8 y A5, mediante selección de fagos recombinantes en células LNCaP y PSMA purificado. La secuencia de scFv E8 fue idéntica a scFv A4, que se obtuvo a partir de la biblioteca de células B del mismo ratón. ScFv E8 fue reactivo de forma marcada con células LNCaP que muestran una IFM de aproximadamente 100 a concentraciones de saturación, mientras que la IFM de scFv A5 fue únicamente

aproximadamente 40 en las mismas condiciones. No se observó unión o se observó unión mínima con otras líneas celulares que carecen de expresión de PSMA. La unión de ambos scFv a PSMA glicosilado y desglicosilado desnaturalizado purificado fue débil. Adicionalmente, se obtuvo el scFv denominado D7 a partir de mAb 3/F11 y el scFv denominado H12 a partir de mAb 3/E7. ScFv E8 es una realización no cubierta por las reivindicaciones.

- 5 En la presente solicitud se describen tres mAb, que son diferentes de los publicados por otros autores con respecto a la afinidad de unión elevada y tinción elevada de células de cáncer de próstata que expresan PSMA. Los anticuerpos 3/F11, 3/A12 y 3/E7 no sólo muestran una actividad de unión marcada sino también internalización en células LNCaP como se demuestra mediante citología de inmunofluorescencia y detección con microscopía láser confocal de barrido. Estos mAb se obtuvieron después de la inmunización con PSMA nativo de longitud completa, lo
- 10 cual difiere de procedimientos diferentes de inmunización publicados.

Después de la inmunización con PSMA desnaturalizado purificado se obtuvieron mAb que eran altamente específicos para el antígeno, pero únicamente tenían una unión limitada a células LNCaP que expresan PSMA y además no se internalizaron en las células. Estos datos de control no se muestran en la presente solicitud. Existen unos pocos mAb anti-PSMA descritos en la bibliografía. Sin embargo, los valores de intensidad de fluorescencia

15 medios fueron mucho más bajos que con los anticuerpos de la presente invención.

De forma similar a los mAb, se generaron scFv anti-PSMA después de la inmunización con PSMA desnaturalizado y nativo. Con el PSMA desnaturalizado se obtuvieron scFv altamente específicos al antígeno, pero que no se unían a células LNCaP (datos no mostrados en la presente solicitud). Por el contrario, con PSMA nativos se obtuvieron scFv con una actividad de unión celular elevada, pero una unión pobre al antígeno desnaturalizado aislado.

- 20 Sin embargo, los problemas identificados en estos y otros ensayos con inmunotoxinas enlazadas químicamente son el desarrollo de anticuerpos frente a las inmunotoxinas, toxicidad hepática y síndrome de extravasación vascular y también dificultades para producir cantidades grandes de material definido. Estos problemas, al menos en parte, se superan usando tecnología de ADN recombinante que hace posible la construcción de inmunotoxinas menos inmunogénicas y más pequeñas y permite más fácilmente la producción de inmunotoxinas en grandes cantidades.
- 25 También se cree que la penetración en tumores sería mejor para proteínas pequeñas que para conjugados grandes. Por lo tanto, se modificaron por ingeniería genética inmunotoxinas recombinantes fusionando la secuencia codificante de los scFv E8, H12, D7 y A5 y la toxina PE40. El hallazgo central fue que todas las inmunotoxinas recombinantes eliminaban eficazmente las células de cáncer prostático cultivadas de una manera dependiente de la dosis. Se observó eliminación marcada con la proteína de fusión A5 de unión más baja con CI50 de
- 30 aproximadamente 0,09 nM. La eliminación de células de cáncer de próstata que no expresan PSMA fue más de 2.000 veces menor. Esto puede remontarse a proteínas bacterianas residuales u otros agentes tóxicos en las preparaciones de inmunotoxina, debido a que se pudo observar el mismo fondo en concentraciones igualmente elevadas con el scFv en solitario. El término CI50 se define como la concentración en nM de la toxina que reduce la proliferación celular hasta el 50% de la proliferación celular sin añadir una toxina.

- 35 Los anticuerpos y scFv descritos en la presente solicitud se unen específicamente a PSMA de superficie celular nativo y por lo tanto tendrán un valor en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas que se enfocan en PSMA como un antígeno diana para el cáncer de próstata.

Debido a que PSMA se expresa en células de cáncer de próstata con una estructura terciaria y cuaternaria específica, únicamente los anticuerpos frente a esta conformación celular pueden reconocer y unirse de forma

40 marcada a células de cáncer de próstata viables y tejido que expresa PSMA. Por lo tanto, el objeto del presente estudio era generar tales mAb y scFv que se puedan usar para la dirección terapéutica y de diagnóstico de cáncer de próstata.

La presente invención proporciona, por lo tanto, un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo que se une a antígeno prostático específico de membrana en su forma nativa que está presente en la

45 superficie de células tumorales que está enlazado a un marcador o un agente citotóxico.

La expresión "anticuerpo monoclonal aislado" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante puentes de disulfuro. Cada cadena pesada consiste en una región variable de cadena pesada (abreviado V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada consiste en tres dominios, concretamente CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera

50 contiene una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, que también se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR) intercaladas con regiones que están más conservadas. Esas regiones también se denominan regiones flanqueantes (FR). Cada región V_H y V_L consiste en tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,

55 CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno.

En las Figuras 14, 20 y 21 las CDR están marcadas por cuadros grises. Esas áreas son importantes para la unión del anticuerpo monoclonal o la parte de unión a antígeno del mismo. Las otras áreas de las regiones flanqueantes

que se pueden reemplazar por otras secuencias, proporcionaron la estructura tridimensional que es necesaria para que la unión no se altere. En el caso de que la estructura de la construcción se cambie, no habrá suficiente unión al antígeno. Los anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de ratón pueden provocar efectos secundarios inmunológicos indeseados debido al hecho de que los mismos contienen una proteína de otra especie que puede provocar anticuerpos. Para superar este problema los anticuerpos monoclonales o las partes de unión a antígeno de los mismos se pueden humanizar. El procedimiento de humanización de anticuerpos monoclonales se conoce por los expertos en la materia. Las regiones flanqueantes de un mAb de ratón se reemplazan por las correspondientes regiones flanqueantes humanas. Con el fin de mantener las propiedades de unión preferidas las secuencias de las CDR se deberían mantener en la medida de lo posible. Sin embargo, puede ser necesario realizar algunos cambios de aminoácidos con el fin de optimizar las propiedades de unión. Esto se puede realizar por un experto en la materia mediante procedimientos convencionales. Adicionalmente mediante la introducción de una región flanqueante humana puede ser necesario realizar cambios y/o supresiones de aminoácidos con el fin de mejorar las propiedades de la construcción.

La expresión "parte de unión a antígeno" del anticuerpo monoclonal se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo tal que conservaron la capacidad de unirse específicamente al antígeno prostático específico de membrana en su forma nativa. Los ejemplos de partes de unión a antígeno del anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} , un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente de disulfuro en la región de bisagra, un fragmento Fd que consiste en el dominio V_H y C_{H1} , un fragmento F_V que consiste en los dominios V_L y V_H de un brazo único de un anticuerpo, un fragmento dAb que consiste en un dominio V_H y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

El anticuerpo monoclonal aislado o parte de un antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención se puede internalizar por una célula tumoral si el mismo se usa con fines terapéuticos. Con fines de diagnóstico puede no ser necesaria una internalización.

El anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención se une de forma marcada a células LNCAP pero no a células que carecen de la expresión de antígeno prostático específico de membrana.

La unión del anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo se mide mediante la intensidad de fluorescencia de PE (IFM) que es preferentemente igual o mayor que 40 para un scFv y preferentemente mayor que 1.000 para un mAb a concentraciones de saturación.

Las propiedades de unión de los anticuerpos monoclonales aislados o parte de unión a antígeno de los mismos al PSMA nativo se compararon tratando células LNCAP con concentraciones crecientes del Ab anti-PSMA de primera etapa seguido por incubación con el anticuerpo marcado con PE de segunda etapa. A partir de las curvas de saturación resultantes se puede leer la concentración de anticuerpo que alcanza el 50% de saturación de sitios de PSMA. Los tres mAb 3/F11, 3/A12 y 3/E7 mostraron una actividad de unión elevada alcanzando una saturación del 50% de sitios PSMA a aproximadamente 16 nM (3/F11), 2 nM (3/A12) y 30 nM (3/E7). Se observó una saturación del 50% de sitios de PSMA a 60 nM (A5) con el scFv.

Con el fin de determinar la fuerza de unión se midió la intensidad de fluorescencia (IFM) de PE (ficoeritrina). Los valores de IFM se representaron frente a la concentración de anticuerpo (o fragmentos de unión de los mismos) por lo que el valor meseta de IFM corresponde al 100% de saturación con antígeno. Después de haber determinado el valor superior (correspondiendo la meseta al 100% de saturación de antígeno) se puede determinar fácilmente el valor correspondiente al 50% de saturación. Mediante el uso del gráfico se puede observar la concentración correspondiente de los anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos en nM.

El anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo comprende un marcador que puede ser una partícula que emite radiación radioactiva. Esta partícula puede ser un elemento en una forma que se puede enlazar a la construcción, preferiblemente en forma de un complejo. Por ejemplo se puede usar un mAb marcado con ^{111}In como un agente de radioinmunoescintigrafía en la detección de tumores metastásicos distantes en pacientes con cáncer de próstata. Por su puesto, se pueden usar otros elementos radioactivos adecuados como ^{35}S o ^{131}I .

Como alternativa el anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo puede comprender una agente citotóxico que es una sustancia tóxica a células seleccionada entre el grupo que consiste en toxinas, por ejemplo taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaina, propranolol y/o puromicina.

El anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo se define por las reivindicaciones. Un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo de este tipo comprende una secuencia de aminoácidos parcial de al menos 10 aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 10 (scFv A5), SEC ID N°: 20 (scFv

H12) y/o SEC ID N°: 22 (scFv D7). El anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo comprende al menos 25 o, más preferido, al menos 35 y más preferido al menos 50 aminoácidos consecutivos de SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 20 y/o SEC ID N°: 22, respectivamente. ScFv E8 es una realización que no está cubierta por las reivindicaciones.

- 5 El anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo comprende las CDR que tienen SEC ID N°: 11 a 16. De una manera similar las CDR se pueden deducir a partir de la Figura 20 y 21 en las que se designan las secuencias de CDR.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de secuencias de ADN para la preparación de anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión de los mismos. SEC ID N°: 17 y 18 se refieren a scFv A5. SEC ID N°: 19 y 23 se refieren a scFv H12 y SEC ID N°: 21 y 24 se refieren a scFv D7. Las secuencias registran la cadena codificante y la cadena complementaria a la misma. La SEC ID N°: 18 se muestra en la orientación 5'→3'. Los polinucleótidos de la presente invención comprenden una secuencia contigua de al menos 20, preferentemente 50 y más preferentemente 75 y lo más preferido es que sean al menos 100 nucleótidos del grupo que consiste en SEC ID N°: 17, 18, 19, 21, 23 y 24. La secuencia que codifica la CDR se prefiere particularmente.

15 Es un aspecto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente solicitud. La composición farmacéutica de la presente invención comprende el anticuerpo monoclonal o una parte de unión a antígeno del mismo junto con aditivos farmacéuticamente aceptables. Preferentemente una composición de este tipo se prepara para inyección intramuscular o intravenosa. Como alternativa el anticuerpo se puede proporcionar en una
20 formulación de liberación prolongada que permite la liberación sostenida del agente biológicamente activo a lo largo de un periodo determinado de tiempo que puede variar preferentemente de uno a seis meses. Una formulación de liberación sostenida de este tipo puede comprender un polímero biodegradable como un poliláctido o copolímero poliláctido/poliglicólico que se degrada a lo largo de un periodo de tiempo prolongado en el cuerpo humano por lo cual el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo que preferentemente tiene una toxina se libera de una
25 manera controlada a lo largo de un periodo de tiempo determinado.

El anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo se puede usar para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en particular cáncer de próstata.

Como alternativa la invención proporciona un kit de diagnóstico para la detección de células tumorales que comprende un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo. En tales realizaciones el
30 marcador permite la detección de la construcción con dispositivos de detección adecuados.

La invención también proporciona un procedimiento para la identificación *in vitro* de células tumorales mediante el cual las células tumorales que se tienen que identificar se ponen en contacto con un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo que porta un marcador que se puede detectar mediante dispositivos analíticos adecuados. El marcador permite la identificación de diagnóstico de células tumorales, por ejemplo en
35 cortes de tejidos humanos obtenidos después de cirugía o biopsia.

Breve Descripción de las Figuras

ScFv E8 es una realización que no está cubierta por las reivindicaciones.

- Figura 1: Análisis de FACS de la unión de mAb 3/F11, 3/A12 y 3/E7 a la superficie de células LNCaP que expresan PSMA a concentraciones de saturación.
- 40 Figura 1 a-c: Curvas de saturación de antígeno de mAb 3/F11 (a), 3/A12 (b) y 3/E7 (c).
- Figura 2: Citología de inmunofluorescencia: Unión de a) mAb 3/F11 b) mAb 3/A12 c) 3/E7 a células LNCaP. Las fotografías de la izquierda muestran una tinción de control con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI).
- 45 Figura 3: Citología de inmunofluorescencia: Internalización de a) mAb 3/F11 b) mAb 3/A12 c) 3/E7 en células LNCaP. Las fotografías de la izquierda muestran una tinción de control con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI).
- Figura 4: Transferencia de Western con PSMA purificado y los mAb 3/E7, 3/A12 y 3/F11.
- Figura 5: Transferencia de Western con PSMA glicosilado y desglucosilado y mAb 3/A12.
- Figura 6: Inmunohistoquímica de mAb 3/E7 en corte de parafina de cáncer de próstata.
- 50 Figura 7a/b: Análisis de FACS de los scFv E8 (a) y A5 (b) en células LNCaP que expresan PSMA a concentraciones de saturación.
- Figura 7c/d: Curvas de saturación de antígeno de scFv E8 (c) y A5 (d).

- Figura 8: Transferencia de Western con PSMA purificado y los scFv A5 y E8.
- Figura 9: inmunocitología de scFv E8 en células LNCaP.
- Figura 10: construcción de la inmunotoxina E8-P40.
- Figura 11: Efecto citotóxico de inmunotoxina recombinante E8-P40 en células LNCaP.
- 5 Figura 12: Efecto citotóxico de proteína de fusión recombinante A5-P40 en células LNCaP.
- Figura 13: Secuencia de scFv E8. La secuencia de ADN se proporciona también como secuencia de aminoácidos por lo que la región de las CDW se identifica mediante un área marcada.
- Figura 14: Secuencia de scFv A5. La secuencia de ADN se proporciona también como secuencia de aminoácidos por lo que la región de la CDW se identifica mediante un área marcada.
- 10 Figura 15: Esta Figura muestra la unión del scFv A5, H12 y D7 a células DU 145 negativas a PSMA (a) y células LNCaP positivas a PSMA (A5 = B, H12 = C, D7 = D). Las células se tiñeron con los mAb y un mAb anti-IgG de ratón conjugado con PE. Los histogramas representan logaritmos de fluorescencia de PE en citómetro de flujo. El control negativo se realizó únicamente con anticuerpo secundario.
- 15 Figura 16: La unión de los scFv A5, H12 y D7 a células BOSC negativas a PSMA (a) y células BOSC transfectadas con PSMA (A5 = B, H12 = C, D7 = D). Las células se tiñeron con el mAb anti-c-myc de scFv y anti-Ig de ratón conjugado con PE. Los histogramas representan logaritmos de fluorescencia de PE en citómetro de flujo. El control negativo se realizó únicamente con anticuerpo secundario.
- 20 Figura 17: demuestra el efecto citotóxico de inmunotoxina recombinante HE12-PE40 sobre células LNCaP (negro) y DU (blanco).
- Figura 18: muestra esquemáticamente el esquema de construcción del diacuerpo A5-CD3.
- Figura 19: muestra el efecto citotóxico de un diacuerpo construido a partir de scFv A5 (A5-CD3) a concentraciones diferentes y linfocitos de sangre periférica (proporción de efecto o diana 10:1) sobre células LNCaP después de incubación de 48 h.
- 25 Figura 20: muestra la secuencia de scFv H12. La secuencia de aminoácidos se proporciona en el código de una letra en la primera línea (correspondiente a SEC ID N°: 20). La cadena codificante se muestra en la segunda línea (SEC ID N°: 19) y la cadena complementaria se muestra en la tercera línea. Esta secuencia corresponde a SEC ID N°: 23. Las CDR se designan específicamente como CDR H1, H2, H3, L1, L2 y L3. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones de CDR se muestran en un fondo gris.
- 30 Figura 21: muestra la secuencia de scFv D7. La secuencia de aminoácidos se muestra en la primera línea en el código de una letra. Esta secuencia corresponde a SEC ID N°: 22. La cadena de ácido nucleico codificante se muestra en la primera línea. Esta secuencia corresponde a SEC ID N°: 21 y la cadena complementaria se muestra en la tercera línea. Esta secuencia corresponde a SEC ID N°: 24. Las regiones de CDR H1, H2, H3, L1 y L2 se muestran en la secuencia. Las secuencias de ácido nucleico que codifican esas regiones se muestran en un fondo gris.
- 35

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. ScFv E8 es una realización que no está cubierta por las reivindicaciones.

40 **Ejemplo 1**

a) Preparación de PSMA

Las líneas de células de carcinoma de próstata humano LNCaP, DU 145, PC-3 y HeLa así como el hibridoma 7E11-C5.3 (IgG1-k, PSMA) se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD, EE.UU. LNCaP, DU 145 y HeLa se cultivaron en medio RPMI 1640, PC-3 en medio F12 Nutrimix, ambos complementados con penicilina (100.000 U/l), estreptomycin (100 mg/l) y FCS al 10 % a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Para la generación de células LNCaP que expresan PSMA no glicosilado en su superficie se añadieron 2 µg/ml de tunicamicina (ICN Biomedicals) al medio durante 48 h.

45

Células LNCaP fijas se obtuvieron mediante tratamiento con paraformaldehído al 4% durante 10 min a TA y después se lavaron vigorosamente con PBS.

Para preparar PSMA purificado, 10^8 células LNCaP se lavaron con PBS y después se lisaron en PBS que contenía IGEPAL al 1% durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 10.000 g el sobrenadante se proporcionó sobre una columna de cromatografía de afinidad 7E11-C5 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y el PSMA se eluyó con tampón de glicina 100 mM pH 2,5 que contenía Tritón X-100 al 1%. Después de la neutralización la proteína se dializó exhaustivamente con PBS.

Para la preparación de PSMA desglucosilado, se añadió 1/10 vol. de tampón desnaturizante de glicoproteína (BioLabs) a la solución con PSMA purificado y se calentó durante 10 min a 100°C. Después se añadieron 1/10 vol. de NP-40 al 10% (10%) y 50 U de PNGasapor por μg de PSMA y se incubó a 37°C durante 1 h.

Para la preparación de un lisado de células de LNCaP que contenga PSMA nativo de longitud completa, las células se lisaron con reactivo M-PER (Pierce) durante 10 min y después se centrifugaron a 15.000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante que contenía el PSMA de longitud completa nativo se recogió (lisado de M-PER). La fracción molecular elevada (100 a 600 KD) de este lisado se separó mediante HPLC en una columna de exclusión por tamaño Biosil 250.

b) Transfección de PSMA de longitud completa en células DU 145 y PC3

PSMA de longitud completo se clonó en dos fragmentos (fragmento 1 desde pb 262 hasta el sitio de restricción EcoRI único en pb 1573 y el fragmento 2 desde la posición 1574 hasta 2512) en el vector pCR3.1 (Invitrogen). La transfección transitoria se obtuvo añadiendo una mezcla de 4 μg de ADN y 10 μl de Lipofectamina (Invitrogen) en 500 μl de medio RPMI a 10^6 células de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de incubación de 48 h las células transfectadas de forma transitoria se usaron para ensayo.

Ejemplo 2

Inmunización de ratones

Ratones Balb/c hembra de cuatro meses de edad se inmunizaron por vía intraperitoneal con 300 μg de lisado M-PER a partir de células LNCaP o con la fracción de HPLC molecular elevada del lisado o con 10^6 células LNCaP, fijadas con paraformaldehído al 2%. Estas preparaciones se mezclaron 1:1 con adyuvante de Freund completo. Cada ratón recibió 4 o 5 inmunizaciones con intervalos de 2 semanas. Cuatro días después de la última inmunización se recogieron células del bazo y se usaron para la preparación de hibridomas o una biblioteca de células B.

Ejemplo 3

Preparación de una biblioteca de células B

El bazo de ratón se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se cortó en trozos pequeños, se lavó nuevamente en PBS y después se homogeneizó con cuidado en un homogeneizador de mano "ajustable". La suspensión de células única resultante se revistió en Ficoll (Pharmacia, Freiburg, Alemania) y se centrifugó a 400 g durante 20 min a temperatura ambiente. Las células B de interfase se aislaron con microperlas CD 19 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). 10^6 células B se lisaron en 350 μl de una solución que consiste en tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, N-laurosilsarcosinato de sodio al 0,5% y 2-mercaptoetanol 100 mM.

Ejemplo 4

a) Preparación de Hibridomas

El bazo se retiró de forma aséptica y se preparó una suspensión de células única en medio RPMI-1640 sin suero. Los esplenocitos se añadieron a células de mieloma SP2/0 en una proporción de 10:1 y la fusión y selección se realizó para establecer los procedimientos [Galfre y col., Nature (1979), págs. 131-133].

Los sobrenadantes de hibridomas se ensayaron mediante FACS en células LNCaP y DU 145 y mediante un ELISA con PSMA purificado como fase sólida. Los anticuerpos monoclonales se purificaron usando una columna de proteína G (Pharmacia).

b) Determinación de isotipo de los mAb

Los isotipos de Ig de los mAb anti-PSMA se determinaron mediante ELISA usando anticuerpos específicos anti-isotipo no marcados (fase sólida) o marcados con peroxidasa (indicador) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL).

c) Aislamiento y caracterización de anticuerpos monoclonales conformacionales anti-PSMA

A partir de ratones Balb/c que se inmunizaron 5 veces con el lisado M-PER de células LNCaP, células de bazo se fusionaron con células SP2/0 de acuerdo con procedimientos establecidos. Los hibridomas positivos se

seleccionaron mediante citometría de flujo con células LNCaP y ELISA en PSMA purificado. De esta manera se obtuvieron tres clones positivos. Los mAb correspondientes con sus isotipos fueron 3/F11 (IgG2a), 3/A12 (IgG1) y 3/E7 (IgG2b).

d) Caracterización de mAb

Mediante citometría de flujo se pudo observar que los tres mAb y células LNCaP teñidas se unen muy bien con un porcentaje de células positivas que varía del 95% al 98%. La forma de las curvas de fluorescencia frente al número de acontecimientos sugirió que PSMA se distribuye de forma homogénea dentro de la población de células LNCaP (Figura 1). Para evaluar la especificidad de unión de los mAb anti-PSMA, células DU 145, PC3 negativas a PSMA, células HeLa y Jurkat también se tiñeron y se analizaron mediante citometría de flujo. Los tres mAb no tiñeron las células negativas a PSMA (porcentaje de células positivas que varía del 0,04% al 2%).

Las propiedades de unión de los tres anticuerpos se compararon tratando células LNCaP con concentraciones crecientes del mAb anti-PSMA de primera etapa seguido por incubación con una cantidad de saturación de un anticuerpo de cabra marcado con PE (ficoeritrina) de segunda etapa seguido por análisis de citofluorometría. A concentraciones de saturación de antígeno [100 nM] la intensidad de fluorescencia media de PE (ficoeritrina) corregida fue aproximadamente 1.000 para mAb 3A12 y aproximadamente 1.400 para mAb 3F11 y aproximadamente 1.600 para mAb 3E7. Como se muestra para mAb 3A12 la IFM fue cinco veces más baja en células LNCaP que expresan PSMA no glicosilado (cultivadas con tunicamicina).

Mediante citología de inmunofluorescencia y detección con un microscopio láser confocal de barrido se pudo demostrar una unión marcada de los tres mAb a células LNCaP (Figura 2) y también una internalización en estas células (Figura 3). Todos los mAb fueron positivos en un ELISA con PSMA purificado como fase sólida. Con PSMA desnaturizado los mAb mostraron una señal a aproximadamente 100 KD en transferencia de Western (Figura 4) mientras que la transferencia con PSMA desglicosilado fue débil dando una señal a aproximadamente 84 KD, que corresponde a los datos de la bibliografía (Figura 5).

La inmunohistoquímica en cortes de parafina de cáncer de próstata fue positiva con mAb 3/E7 pero no con mAb 3/F11 y 3/A12 (Figura 6). Los datos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Caracterización de 3 anticuerpos monoclonales frente a PSMA de superficie celular

Hibridoma	Isotipo	FACS de LNCaP [IFM]*	FACS de DU* transf. con PSMA [IFM]	ELISA de PSMA	Transferencia de PSMA	Transferencia de PSMA desglicosilado	Inmunohistoquímica
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
IFM = intensidad de fluorescencia media a concentración de scFv que alcanza saturación de antígeno (se resta la tinción de fondo con anticuerpo secundario en solitario) (pos) = ligeramente positivo							

A partir de estos datos se concluye que los 3 mAb muestran una unión muy marcada y altamente específica a PSMA nativo y desnaturizado. Aunque la unión a PSMA desglicosilado es más débil, se puede excluir una especificidad de azúcar a partir del hecho de que no se observa unión a células que no expresan PSMA.

Ejemplo 5

Preparación de una biblioteca de expresión de scFv en el fagémido pSEX

A partir de la biblioteca de células B o a partir de células de hibridoma se aisló ARN total y ARNm con membranas basadas en gel de sílice (Rneasy, Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La síntesis de ADNc se realizó a 42°C durante 60 min en un volumen final de 50 µl que contenía 25 µl de ARN desnaturizado, 10 µl de tampón 5x (Promega, Heidelberg, Alemania), 5 µl de dNTP 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Promega), 1,5 µl de RNasin (40 U/µl, Promega), 2,5 µl de cebadores de hexámero aleatorios 150 pM y 2,5 µl de transcriptasa inversa AMV (10 U/µl, Promega). Después las regiones codificantes de las cadenas pesadas y las cadenas gamma y kappa se amplificaron mediante PCR como se ha descrito previamente por Orum y col. [Nucleic Acids Res. (1993), 4491-4498]. Para cada cadena se realizaron 25 reacciones separadas combinando 25 cebadores directos de región constante diferentes con un cebador inverso correspondiente. Los productos amplificados para las cadenas ligeras y las cadenas pesadas se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de PCR para las cadenas ligeras se digirieron con MluI y NotI, y se ligaron en el fagémido pSEX81 [Dübel y col., Gene (1993), 97-101] usando una proporción molar de 1:3 (2 µg del vector, 400 ng de inserto). Los productos de un ligamiento se usaron para la electroporación de 50 µl de células XL1-Blue de *E. coli* electrocompetentes (Stratagene) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Las bacterias se sembraron en nueve placas de agarosa de 80 mm de diámetro que contenían 100 µg/ml de ampicilina y glucosa (SOB-AG) 0,1 M y se incubaron durante una noche a 30 °C. Las bacterias se aislaron añadiendo 3 ml de medio 2xYT en cada placa, raspándolas con un distribuidor de vidrio estéril y sedimentándolas a 3.000 g durante 15 min. A partir de estas bacterias se aisló ADN de plásmido que reveló la sub-biblioteca VI. Después los productos de PCR para la cadena pesada y la sub-biblioteca VI se digirieron con NcoI y HindIII. El ligamiento se preparó a una proporción de 3:1 (2 µg de sub-biblioteca y 400 ng de inserto). La transformación mediante electroporación, el sembrado y la recolección de bacterias transformadas se realizó como se ha descrito para la sub-biblioteca VI. A partir de nueve placas de SOB-AG de 80 mm de diámetro se obtuvieron un total de 18 ml de biblioteca V_HV_L.

Ejemplo 6

Producción y selección de fago que presenta anticuerpo

a) Producción

En la biblioteca de V_HV_L en el fagémido pSEX los genes de anticuerpo se fusionan en fase con el gen III, que codifica la proteína de superficie menor gIIIp del fago filamentoso. Por lo tanto, la producción de partículas de fagémido recombinante que presentan al anticuerpo en la superficie requiere infección de la célula bacteriana que porta el fagémido con el fago sin capacidad de replicación M13KO7 [14]. M13KO se añadió a un cultivo de biblioteca de 10 ml a una multiplicidad de 10. Después de la incubación a 37 °C durante 90 min las células se sedimentaron y resuspendieron en 15 ml de medio 2xYT que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de kanamicina. El cultivo se incubó durante una noche a 37 °C a 250 rpm, después se enfrió en hielo y se centrifugó para retirar las células. El sobrenadante que contenía los fagos se mezcló con 1/5 volumen de una solución acuosa que contenía PEG 8.000 al 20% y NaCl al 14% y se incubó 1 h a 4 °C. Después se añadió una etapa de centrifugación de 30 min a 4 °C a 6.200 g. El sedimento que contiene los fagos se resuspendió en 2 ml de Tris/HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5 y se usó para selección.

b) Selección para seleccionar clones de unión a antígeno y a células.

La selección en PSMA purificado se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos Maxi-Sorb (Nunc) que se revistieron con una solución de PSMA purificado (100 µl/pocillo, 12 µg/ml de PSMA en PBS) y se bloquearon con leche desnatada/PBS al 4%. Un ml de fagos recombinantes purificados (circa 10¹¹) se incubaron en 1 ml de leche desnatada/PBS al 4% complementado con 15 µl de Tritón X100 al 10% durante 15 min y después se permitió que se unieran a 8 pocillos revestidos con PSMA durante 2 h a 37 °C. Después de 20 ciclos de lavado con PBS/Tween (0,1%) los fagos unidos se eluyeron con tampón de Glicina 0,1 M pH 2,2. Para selección en células LNCaP viables los fagos se absorbieron previamente en células DU 145. Para este procedimiento 1 ml de fagos recombinantes (circa 10¹¹) se incubaron en leche desnatada/PBS al 2% durante 15 min y después con 10⁷ células DU 145 durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador. Después las células se centrifugaron y el sobrenadante con fagos no absorbidos se incubó con 10⁵ células LNCaP durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador. Después de 10 ciclos de lavado con leche desnatada/PBS al 2% y 5 ciclos con PBS los fagos unidos se eluyeron con HCl 50 mM con neutralización posterior con Tris-HCl 1 M (pH 7,5).

Células TG1 de *E. coli* se infectaron con los fagos eluidos, se sembraron en placas de SOB-AG y se incubaron durante una noche a 30 °C. Una alícuota del eluido se usó para titulación. El procedimiento de selección se repitió tres a seis veces.

c) Recuperación de fago a pequeña escala.

A partir de la placa de titulación se aislaron 96 colonias individuales y cada una se transfirió a un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos profundos llenos con 500 µl de medio 2xYT que contenía 100 µg/ml de ampicilina y glucosa 0,1 M (YT-AG) y se incubaron durante una noche a 37 °C (placa maestra). Después 40 µl de cultivo saturado a partir de cada pocillo de la placa maestra se transfirieron al pocillo correspondiente de una placa nueva que contenía 400 µl de medio 2x YT-AG.

A cada pocillo se añadieron aproximadamente 1 x 10¹⁰ fagos auxiliares M13KO7 y se incubaron en un agitador durante 2 horas a 37 °C. Después la placa se centrifugó y el sedimento se suspendió en medio 2xYT complementado con 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de kanamicina y se incubó a 29 °C y 240 rpm durante una noche. Después de la centrifugación el sobrenadante que contenía los fagémidos recuperados se retiró y se usó para ELISA de fago y citometría de flujo.

d) *ELISA de fago*

Placas de microtitulación se revistieron con PSMA purificado (1,5 µg de PSMA/ml de PBS) durante una noche y después se bloquearon con leche desnatada/PBS al 2%. A cada pocillo se añadieron 200 µl de fagémidos recuperados, se preincubaron 1:1 con leche desnatada/PBS al 2% y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después de cinco etapas de lavado con PBS-Tween, los fagos unidos se detectaron con 200 µl/pocillo de anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pharmacia) durante 2 h a temperatura ambiente. El desarrollo se realizó con 3,3',5',5'-tetrametilbencidina como sustrato.

e) *Aislamiento y caracterización de scFv conformacional anti-PSMA*

Para la generación de scFv conformacional anti-PSMA se construyó una biblioteca V_HV_L en el fagémido pSEX a partir de la biblioteca de células B de un ratón inmunizado con lisado M-PER de células LNCaP. Esta biblioteca tenía una complejidad de 10⁷. De una manera similar se preparó una biblioteca V_HV_L a partir del anticuerpo monoclonal 3/A12, que se obtuvo a partir del mismo ratón inmunizado con lisado de LNCaP. Esta biblioteca V_HV_L tenía una complejidad de 10⁵. Para aislar los fagos que presentan scFv de unión a PSMA celular en su superficie, se realizaron seis ciclos de selección alternativamente en células LNCaP después de la absorción con células DU-145 en tubos de poliestireno y en placas de microtitulación revestidas con 20 µg/ml de PSMA purificado. Después de tres, cuatro y seis ciclos de selección las colonias de fagémido aisladas se cultivaron y las partículas de fago se recuperaron mediante infección con M13KO7. El análisis de 800 clones de fago a partir de la biblioteca de células B mediante citometría de flujo con células LNCaP y ELISA en PSMA purificado mostró un clon positivo denominado E8. A partir de la biblioteca V_HV_L de mAb 3/A12 se obtuvieron dos clones positivos después del cuarto ciclo de selección denominados A4 y A5. Mediante la secuenciación de los mismos se observó que A4 era idéntico a E8.

La región codificante de los scFv E8 y A5 se transfirió desde el fagémido pSEX al vector de expresión pHOG, que contiene etiquetas c-myc y His C terminales. Las secuencias con las CDR correspondientes se proporcionan en la Figura 13 y Figura 14. Las regiones codificantes de las CDR de las partes de unión a antígeno están marcadas en las Figuras 13 y 14. Esas secuencias no se deben cambiar mientras que las otras partes de la secuencia que no están marcadas se pueden cambiar. Sin embargo, la estructura tridimensional apropiada tiene que mantenerse.

El scFv E8 reaccionó de forma marcada con células LNCaP viables según se midió mediante citometría de flujo con valores de IFM de aproximadamente 100 a concentraciones de saturación, mientras que la unión de A5 fue mucho más débil con valores de IFM de aproximadamente 40 a concentraciones de saturación (Figura 7). Por el contrario, la unión a PSMA purificado como fase sólida en un ELISA fue débil para E8 y algo más fuerte para A5. Se observó un patrón similar en transferencias de western con PSMA glicosilado y desglicosilado desnaturalizado (Figura 8). Mediante citología de inmunofluorescencia con células LNCaP y detección mediante microscopía láser confocal se pudo demostrar una muy buena unión del scFv E8 e internalización (Figura 9). Los datos del scFv se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Caracterización de 2 scFv frente a PSMA de superficie celular

ScFv	Origen	FACS de LNCaP [IFM]	FACS de DU transf. con PSMA [IFM]	ELISA de PSMA	Transferencia de PSMA	Transferencia de PSMA desgl.
E8 = A4	Biblioteca de células B y mAb A12	100	70	pos	(pos)	(pos)
A5	MAb A12	40		pos	pos	(pos)
IFM = intensidad de fluorescencia media a concentración de scFv que alcanza la saturación de antígeno (se resta la tinción de fondo con anticuerpo secundario en solitario) (pos) = ligeramente positivo						

Ejemplo 7

Expresión y purificación de scFv

Fragmentos de ScFv se expresaron en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) usando el vector de secreción pHOG 21 que contiene las secuencias de la etiqueta His-6 y c-myc en una posición C terminal del scFv [Kipriganov y col., J. Immunol. Methods (1997), págs. 69-77]. Bacterias *E. coli* transformadas con plásmidos pHOG se cultivaron durante una noche en medio 2 x YT-AG, después se diluyeron 1:20 y se cultivaron como cultivos de 600 ml a 37 °C. Cuando los cultivos alcanzaron DO 0,8, las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación a 1.500 g durante 10 min y se resuspendieron en el mismo volumen de medio YT nuevo que contenía 50 µg/ml de ampicilina, sacarosa 0,4 M e IPTG 1 mM. Después el cultivo se continuó a temperatura ambiente durante 18 a 20 h. Las células se recogieron mediante centrifugación a 5.000 g durante 10 min y 4 °C. Para aislar las proteínas periplasmáticas solubles, las

bacterias sedimentadas se resuspendieron en el 5% del volumen inicial de Tris-HCl 50 mM enfriado con hielo, sacarosa al 20%, EDTA 1 mM pH 8,0. Después de una incubación de 1 h en hielo, los esferoblastos se centrifugaron a 20.000 g a 4 °C durante 30 min produciendo extracto periplasmático soluble en el sobrenadante. El extracto periplasmático se concentró usando membranas YM10 Amicon con un punto de corte de 10 kDa (Amicon, Witten, Alemania) seguido por diálisis vigorosa frente a Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,0.

La purificación se consiguió mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Esto se realizó usando una columna de 1 ml de Sefarosa quelante (Pharmacia) cargada con Cu^{2+} y equilibrada con un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM y NaCl 1 M, pH 7,0. El extracto periplasmático se cargó, se lavó con veinte volúmenes de columna de tampón de equilibrio que contenía imidazol 30 mM y después se eluyó con el mismo tampón que contenía imidazol 250 mM. El material eluido se dializó frente a PBS.

La determinación del contenido de proteína se realizó con el Kit Micro BCA Protein Reagent (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La inducción de proteína se obtuvo con IPTG y la producción de scFv a partir de 600 ml de un cultivo de *E. coli* XL1 fue aproximadamente 20 µg.

Ejemplo 8

Citometría de flujo

Células LNCaP, DU 145 y PC3 se recogieron de forma reciente a partir de matraces de cultivo de tejido y se preparó una suspensión de células únicas en PBS con FCS al 3% y NaN_3 al 0,1%. Se incubaron aproximadamente 10^5 células con 50 µl de fagémidos recuperados, se preincubaron 1:1 con leche desnatada/PBS al 2%, 1 h en hielo. Después de 3 ciclos de lavado con PBS, 25 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10 (10 µg/ml; Becton Dickinson) o cuando los fagos se ensayaron, 25 µl/pocillo de anticuerpo anti-M14 (10 µg/ml; Pharmacia) se añadieron e incubaron 40 min en hielo. Después de lavar 3 veces con PBS las células se incubaron con 100 µl de anti-IgG de ratón de cabra marcado con PE (Becton Dickinson) durante 40 min en hielo. Después las células se lavaron nuevamente y se resuspendieron en 100 µl de una solución que contenía 1 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma, Deisenhofen) en PBS con FCS al 3% y NaN_3 al 0,1% para excluir las células muertas. La fluorescencia relativa de células teñidas se midió usando un citómetro de flujo FACScan y el software CellQuest (Becton Dickinson Mountain View, CA).

Ejemplo 9

Citología de inmunofluorescencia

Células LNCaP se cultivaron en cubreobjetos de vidrio durante 24 horas. Para la fijación, las células se trataron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 min a TA, lo cual no permeabiliza la membrana celular, se lavaron con BSA-PBS al 1%, se inactivaron durante 10 min en NH_4Cl 50 mM en PBS y se enjuagaron con BSA-PBS al 1%. Se añadió anticuerpo monoclonal primario a 4 µg/ml en BSA-PBS al 1% y se incubó durante 60 min a 4 °C. Anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con FITC (2 µg/ml; Southern Biotechnology Associates Inc. Birmingham, EE.UU.) se incubó durante 30 min y se lavó exhaustivamente con BSA-PBS al 1%. Los portaobjetos se montaron en Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA).

Para experimentos de internalización el anticuerpo primario se incubó durante 30 min a 37 °C antes de la fijación de las células con paraformaldehído al 2% y permeabilización con Tritón X100 al 0,5% en PBS.

Ejemplo 10

a) Inmunohistoquímica

Cortes de tejido con parafina se desparafinaron en primer lugar y después se trataron con Tritón X100 al 0,3% en PBS para recuperación de antígeno. Los cortes de Kryostat se fijaron en acetona fría. Después los cortes se trataron 30 min con H_2O_2 al 3% y metanol al 10% para inactivación de peroxidasa endógena. Después de bloqueo con BSA-PBS al 1% el anticuerpo primario se añadió a una concentración de 2 µg/ml y se incubó durante 1 h a TA. Para el scFv se añadió un anticuerpo anti-c-myc de ratón secundario durante 1 h a TA. Después se incubó un anticuerpo anti-ratón de cabra biotinilado durante 30 min a TA y finalmente se desarrolló con reactivo ABC (Vectastain).

b) Análisis de transferencia de western

El análisis de transferencia de western se realizó a continuación de electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS) de PSMA purificado y el lisado de células a partir de células LNCaP y se transfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno. Las transferencias se bloquearon durante una noche en PBS que contenía leche desnatada al 5% y se incubaron con los mA b purificados o scFv a concentraciones de 10 µg/ml durante 1 h. Después las transferencias se lavaron 5 veces con PBS-Tween (0,5%) y se incubaron con anti-IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante durante 1 hora a TA. Después de 5 lavados con PBS-

Tween (0,5%) las transferencias se desarrollaron usando 3,3',5',5'-tetrametilbencidina como sustrato.

Ejemplo 11

Construcción, expresión y purificación de proteínas de scFv-PE40

La toxina usada en el presente enfoque fue la versión truncada de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE40), que carece de dominio Ia y que contiene únicamente los dominios Ib, II y III [Pastan y col., J. Biol. Chem. (1989), págs. 15157-15160]. El ADN con la región codificante en el vector pSW200 se obtuvo del Prof. W. Wels, Frankfurt [Wels y col., Biotechnology (1992), págs. 1128-1132]. El fragmento de ADN desde la posición de pb 253 hasta 613 que codifica PE40 se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pSW200. El ADN amplificado después se ligó en el vector pOG-His-scFv en una posición C terminal al scFv usando el sitio de restricción XbaI. Todas las etapas de clonación se realizaron de acuerdo con los procedimientos convencionales en *E. coli* XL1 blue y los productos se confirmaron mediante secuenciación.

La inducción de proteína de la inmunotoxina y la purificación mediante IMAC fue la misma que el scFv. Los productos se ensayaron y caracterizaron mediante SDS-page, transferencia de western y citometría de flujo.

Ejemplo 12

Citotoxicidad de Inmunotoxinas de scFv-PE40

El metabolismo de la sal de tetrazolio WST roja a un colorante de formazán soluble en agua se determinó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer). Las células diana (LNCaP y DU 145 como control) se sembraron a $2,5 \times 10^4$ /pocillo de una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas hasta que se formó una capa de células confluyente. Se añadieron diversas diluciones de las inmunotoxinas recombinantes en alícuotas de 50 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C, CO₂ al 5%. Después de este tiempo los cultivos se pulsaron con 15 µl/pocillo de reactivo WST y se incubaron durante 90 min a 37 °C, CO₂ al 5%. Después las absorbancias espectrofotométricas de las muestras se midieron a 450 nm (referencia 690 nm). Se calculó la concentración de inmunotoxina necesaria para conseguir una reducción del 50% en una viabilidad celular con relación a la de los cultivos de control no tratados (concentración inhibidora del 50% = CI50).

Los ensayos de citotoxicidad (WST) con las inmunotoxinas E8-P40 y A5-P40 se prepararon con células LNCaP que expresan PSMA y células de control DU 145. Como se muestra en la Figura 11 se pudo demostrar un efecto citotóxico elevado con la inmunotoxina E8-PE40 sobre células LNCaP con un valor de CI50 de 0,05 nM. En la Figura 12 el efecto citotóxico de la inmunotoxina A5-PE40 se muestra con una CI50 de aproximadamente 0,09 nM. El fondo citotóxico sobre células DU 145 que no expresan PSMA fue el 5% para la construcción E8 y únicamente el 0,01% para la construcción A5 evidenciando una ventana terapéutica muy buena.

Ejemplo 13

Generación de los scFv H12 y D7 partir de mAb 3/F11 y 3/E7

A partir de cada mAb se generó una biblioteca de expresión de scFv en el fagémido pSEX como se ha descrito en el Ejemplo 5.

La producción y selección de fago que presenta anticuerpo se realizó de acuerdo con el Ejemplo 6.

Después de seis ciclos de selección alternativamente en PSMA y células LNCaP se obtuvo un clon positivo específico, a partir de mAb 3/E7, que se denominó H12 y se obtuvo un clon positivo a partir de mAb 3/F11, que se denominó D7. La región codificante de cada scFv se transfirió al vector de expresión pHOG-21.

La expresión y purificación de scFv se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 7.

Ejemplo 14

Caracterización de los scFv H12 y D7

a) Citometría de flujo en líneas celulares positivas y negativas para PSMA.

Los scFv H12 y D7 reaccionaron con células LNCaP viables según se midió mediante citometría de flujo.

A partir de las curvas de saturación la concentración de anticuerpo que alcanza el 50% de la saturación de los sitios de PSMA se determinó que era aproximadamente 120 nM (H12) y 20 nM (D7), respectivamente. En las concentraciones de saturación se alcanzaron los valores de IFM de 70 (H12) y 40 (D7) (Figura 15).

Para evaluar la especificidad de unión a PSMA de los scFv H12 y D7, células de cáncer de próstata negativas a PSMA DU145 y PC3 y otras líneas celulares negativas a PSMA (HeLa, MCF7, HCT15 y Jurkat) se tiñeron adicionalmente y se analizaron mediante citometría de flujo. Los tres scFv no tiñeron las células negativas para

PSMA.

b) Citometría de flujo en transfectantes de PSMA

5 Para verificar una unión específica a PSMA, los scFv H12 y D7 también se ensayaron en células BOSC-23 transfectadas con PSMA. Ambos scFv mostraron una unión dependiente de concentración a células BOSC transfectadas con PSMA de longitud completa pero no a células no transfectadas (Figura 16). Las condiciones de saturación se alcanzaron a 100 nM (D7) y 200 nM (H12). Similar a los mAb, los valores de IFM de los transfectantes fueron menores que en las células LNCaP y mostraron una distribución amplia, lo cual puede corresponder a moléculas de PSMA variables en la superficie celular de las primeras.

c) Citología de inmunofluorescencia

10 Se preparó citología de inmunofluorescencia como se ha descrito en el Ejemplo 4. Después de la detección con un microscopio láser confocal de barrido se observó una unión marcada de los scFv a células LNCaP y también una internalización en estas células.

d) ELISA y transferencia de Western

15 La unión de los scFv H12 y D7 a PSMA purificado en un ELISA de fase sólida y mediante transferencia de Western fue débil.

Las secuencias (de aminoácidos y ácido nucleico) de H12 y D7 se proporcionan en la Figura 20 y la Figura 21.

Tabla 3: Características de los scFv H12 y D7 anti-PSMA

scFv	mAb original	FACS en LNCaP IFM*	FACS en BOSC transfectadas con PSMA (IFM*)	Transferencia en PSMA	SEC ID N° de secuencia de ácido nucleico (cadena codificante)	SEC ID N° de secuencia de aminoácidos	SEC ID N° de secuencia de ácido nucleico (cadena complementaria)
H12	3/E7	70	25	100 kD	19	20	23
D7	3/F11	40	24	100 kD	21	22	24

* IFM = Valores de intensidad de fluorescencia media en condiciones de saturación después de la sustracción de la tinción de fondo con un anticuerpo de control con isotipo igual irrelevante o inmunoglobulina anti-ratón en solitario.

Ejemplo 15

20 *Construcción y citotoxicidad de una inmunotoxina H12-PE40 e inmunotoxina D7-PE40.*

La construcción de la inmunotoxina H12-PE40 y D7-PE40 fue similar a las inmunotoxinas A5 y E8 descritas en el Ejemplo 11. PE-40 representa el fragmento exotóxico de *Pseudomonas*.

La citotoxicidad se ensayó como se ha descrito en el ejemplo 12.

25 La inmunotoxina promovió la muerte de células LNCaP de una manera dependiente del tiempo; se pudieron observar los efectos citotóxicos más elevados después de 48 h de incubación.

En este momento se observaron valores de CI50 de aproximadamente 200 pM para H12-PE40 y D7-PE40 (Figura 17).

30 Adicionalmente, se ensayó la citotoxicidad de H12-PE40 y D7-PE40 en las líneas celulares negativas para PSMA DU145, PC-3, MCF7 y HCT 15. No se observó citotoxicidad en estas líneas celulares a concentraciones de hasta 25.000 pM.

Ejemplo 16

Construcción de un diacuerpo anti-PSMA/CD3

35 Se generó un diacuerpo biespecífico específico para PSMA y la cadena CD3 del complejo de receptor de células T. El diacuerpo biespecífico se expresó en *E. coli* usando un vector que contiene el operon dicistrónico para cosecreción de scFv de VhCD3-VIA5 y VhA5-VICD3 (Figura 18). Para la construcción de diacuerpo anti-A5/CD3 se usaron los plásmidos pKID 19x3 y pKID 3x19 [Kipriyanov, Int. J. Cancer 1998, pág. 763]. La expresión y purificación

periplasmática bacteriana fue similar al scFv.

Ejemplo 17

Inducción de citotoxicidad específica mediante diacuerpo A5-CD3

5 La capacidad del diacuerpo específico de inducir lisis de células tumorales mediante la redirección de citotoxicidad mediada por células T se investigó usando PBMC a partir de donantes sanos como células efectoras. Después de la incubación con o sin IL-2 durante 4 días, las células se añadieron a células diana LNCaP, que se sembraron a $1,5 \times 10^4$ células/pocillo de una placa de 96 pocillos. La proporción de efector-diana fue 10:1. El diacuerpo se añadió a diferentes concentraciones. Después de 48 horas de incubación los cultivos se pulsaron con 15 μ l/pocillo de reactivo WST y se incubaron durante 90 min a 37 °C y CO₂. Después se midieron las absorbancias espectrofotométricas de las muestras a 450 nm (referencia 690 nm).

En este ensayo *in vitro* el diacuerpo pareció ser bastante potente para redirigir PBMC activado e inactivado para lisar las células LNCaP diana de una manera dependiente de la concentración (Figura 19).

Ejemplo 18

Diacuerpo A5-A5

15 Este diacuerpo monoespecífico bivalente se generó de forma similar al diacuerpo A5-CD3 (ejemplo 16). La expresión y purificación periplasmática bacteriana fue similar a los scFv.

Mediante citometría de flujo se pudo demostrar una unión marcada y específica de diacuerpo A5-A5 a células LNCaP.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Universitaetsklinikum Freiburg
 <120> Anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo de cadena única frente a antígeno prostático específico de membrana de superficie celular
 <130> ZEE20050222c
 <150> EP 05011536.9
 25 <151> 27-05-2005
 <160> 24
 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 251
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> scFv E8
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103)..(103)
 <223> Xaa significa Tyr o Ser
 <400> 1

ES 2 362 795 T5

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> Secuencia 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> Secuencia 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> Secuencia de CDR
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> xaa significa Tyr o 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> Secuencia 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> Secuencia de CDR
<400> 6

Thr Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Secuencia 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

5

```

atggccgagg tgcagctgca gcagtcagga cccgacctgg tgaagcctgg ggcctcaatg 60
aagatttcct gcaaggcttc tggatacaca ttcactgact acaacatgga ctgggtgaag 120
gagagacatg gaaagagcct tgagtggtatt ggagatatta atcctaataa tggcggttact 180
atttacaacc agaagttcaa gggcaaggcc acattgactg tagacaagtc ctccaccaca 240
gcctacatgg agctccgag 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 tcctggtcta tactgcaaca aacttagcag atggtgtgcc ctcaagggtc 600
agtggcagtg gatcaggcac acagtattcc ctcaagatca acagcctgca gtctgatgat 660
tctgggactt attactgtca acatttttgg ggtactccgt acacgttcgg aggggggacc 720
aagctggaaa taaaacgggc tgatgctgcg gcc 753
    
```

10

<210> 9
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> inverso y complemento de SEC ID N°:8
 <400> 9

15

```

ggccgcagca tcagcccgtt ttatttccag cttggtcccc cctccgaacg tgtacggagt 60
accccaaaaa tgttgacagt aataagtccc agaatcatca gactgcaggc tgttgatctt 120
gaggggaatac tgtgtgacctg atccactgcc actgaacctt gagggcacac catctgctaa 180
gtttgttgca gtatagacca ggagctgagg agattttccc tgtttctgct gataccatgc 240
taaattactg taaatattct cacttgttcg acatgtgatg gtgacagttt ctcccacaga 300
tacagatagg gaggctggag actgtgtcat ctgaatgtct acgcgtgctt ctgaaaattc 360
accttcttca agcttgggkg tcgttttggc tgaggagact gtgagactgg tgccttggcc 420
ccagtagtca aagtagttac catagkagtc ccctcttgca caataataga ctgcagtgtc 480
ttcagatgtc aggctgcgga gctccatgta ggctgtgggtg gaggacttgt ctacagtcaa 540
tgtggccttg cccttgaact tctggttgta aatagtaacg ccatttttag gattaatatc 600
tccaatccac tcaaggctct ttccatgtct ctccttcacc cagtccatgt tgtagtcagt 660
gaatgtgtat ccagaagcct tgcaggaaat cttcattgag gccccaggct tcaccaggtc 720
gggtcctgac tgctgcagct gcacctcggc cat 753
    
```

ES 2 362 795 T5

5 <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> Secuencia de CDR

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
5 <213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de CDR
<400> 12

Ile Ile Ser Asp Gly Gly Tyr
1 5

10 <210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
15 <223> Secuencia de CDR
<400> 13

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

<210> 14
<211> 11
20 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de CDR
<400> 14

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

25 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
30 <220>
<223> Secuencia de CDR
<400> 15

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

35 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de CDR
40 <400> 16

Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

ES 2 362 795 T5

<210> 17
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> SCFV A5
 <400> 17

5

```

atggccgacg tgaagttggt ggagctctggg ggaggccttag tgaagcctgg agagtcacctg      60
aaactctcct gtatagcctc tggattcact ttcagtgact attatatgta ttgggttcgc      120
cagactccgg aaaagagggt ggagtggggtc gcaatcatta gtgatgggtg ttattatacc      180
tactattcag acattatcaa ggggcgattc accatctcca gagacaatgc caagaacaac      240
ctgtacctcc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatgtatta ctgtacaaga      300
ggttttcctc tactacggca cggggctatg gactactggg gtcttggaac ctcagtcacc      360
gtctcctcaa ccaaacgac acccaagctt gaagaagggtg aattttcaga agcacgcgta      420
gacattcaga tgacccagtc tccaaaattc atgtccacat cggtaggaga cagggtcagc      480
gtcacctgca aggccagtca gaatgtggat actaatgtag cctgggtatca acagaaacca      540
ggacaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtga cgtccctgat      600
cgcttcacag gcagtgaatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct      660
gaagacttgg cagagtatct ctgtcagcaa tatgacagct atccatacac gttcggaggg      720
gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat gctgcggcc      759
  
```

<210> 18
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> inverso y complemento de SEC ID N°:17
 <400> 18

10

15

```

ggccgcagca tcagcccgtt ttatttccag cttgggtcccc cctccgaacg tgtatggata      60
gctgtcatat tgctgacaga aatactctgc caagtcttca gactgcacat tgctgatggg      120
gagagtgaag tctgtcccag attcactgcc tgtgaagcga tcagggacgt cactgtaccg      180
gtaggatgcc gagtaaatca gtgctttagg agattgtcct gggttctgtt gataaccaggc      240
tacattagta tccacattct gactggcctt gcaggtgacg ctgaccctgt ctccctaccga      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 cggaggtctgg cgaaccaaat acatataata      660

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

ES 2 362 795 T5

<210> 19
 <211> 777
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> scFv H12
 <220>
 <221> misc_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 10 <223> n e s a, c, g, o t
 <400> 19

 atggcgaggt tcagctccag cagtctggat ctgaactggg atagcctggg gcttcagntg 60
 aaattgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcacatact ttgacataaa ctggttgaga 120
 cagaggcctg aacagggact tgagtggatt ggagtgattt ctcctggaga tggcaataca 180
 aactacaatg agaacttcaa gggcaaggcc acactgacta tagataaatc ctccaccaca 240
 gcctacattc agcttagcag gctgacatct gaggactctg ctgtctatct ctgtgcaaga 300
 gatggcaact tcccttacta tgctatggac tcatggggtc aaggaacctc agtcaccgctc 360
 tcctcagcca aaacgacacc caagcttgaa gaaggtgaat tttcagaagc acgcgtagac 420
 atttgtatga cccagattcc actctccctg cctgtcattc ttggagatca agcctccatc 480
 tcttgagatg ctagtcagag ccttgatatac agtaatggaa acacctatct acattgggttc 540
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca atgtttccaa cctattttct 600
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggactg atttcacact caagatcagc 660
 agagtggagg ctgaggatct gggaatttat ttctgctctc aaagtacaca tgttcccacg 720
 ttcgaggagg ggaccaagct ggaaataaaa cgggctgatg ctgcggccgc tggatcc 777

<210> 20
 <211> 259
 15 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> SCFV H12
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> La 'xaa' en el emplazamiento 20 representa Met, val, o Leu.
 <400> 20

Met Ala Arg Phe Ser Ser Ser Ser Leu Asp Leu Asn Trp Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Gln Xaa Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

ES 2 362 795 T5

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 Val 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 Val Met Thr
 130 135 140
 Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ile Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile
 145 150 155 160
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr 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 Asn Val Ser Asn Leu 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 Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Thr
 225 230 235 240
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Ser

<210> 21
 <211> 777
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>

ES 2 362 795 T5

<223> scFv D7

<400> 21

```

atggcccagg tgcagctgca gcagtctggg gctgaactgg tagagcctgg ggcttcagtg      60
aaactgtcct gcaaggcttc tggtacacc ttcacatact ttgacataaa ctggttgaga      120
cagaggcctg aacagggact tgagtggatt ggagggattt ctcttgaga ttgtaataca      180
aactacaatg agaacttcaa gggcaaggcc acactgacta tagacaaatc ctccaccaca      240
gcctacattc agctcagcag gctgacatct gaggactctg ctgtctatct ctgtgcaaga      300
gatggcaact tcccttacta tgctatggac tcatgggggc aaggaacctc agtcaccgtc      360
tcctcagcca aaacgacacc caagcttgaa gaaggtgaat tttcagaagc acgcgtagac      420
attgagctca cccaatctcc actctccctg cctgtcattc ttggagatca agcctccatc      480
tcttgagatc ctagtcagag ccttgtagac agtaatggaa acacctatct acattgggtt      540
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca cagtttccaa ccgattttct      600
ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc      660
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtaccca tggtcccacg      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
145 150 155 160

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
225 230 235 240

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
5 <213> artificial
<220>
<223> scFv H12-inverso y complemento de SEC ID N°:19
<220>
10 <221> misc_FEATURE
<222> (720)..(720)
<223> n es a, c, g, o t
<400> 23

ggatccagcg gccgcagcat cagcccgttt tatttccagc ttggtccccc ctccgaacgt 60
gggaacatgt gtactttgag agcagaaata aattcccaga tcctcagcct ccactctgct 120
gatcttgagt gtgaaatcag tccctgatcc actgccactg aacctgtctg ggaccccaga 180
aaatagggttg gaaacattgt agatcaggag ctttgaggac 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

ES 2 362 795 T5

```

tgcacagaaa tagacagcag agtcctcaga tgtcagcctg ctaagctgaa tgtaggctgt 540
ggtggaggat ttatctatag tcagtgtggc cttgcccttg aagttctcat tgtagtttgt 600
attgccatct ccaggagaaa tcaactccaat ccaactcaagt ccctgttcag gcctctgtct 660
caaccagttt atgtcaaagt atgtgaaggt gtagccagaa gccttgacag acaatttcac 720
ctgaagcccc aggctatacc agttcagatc cagactgctg gagctgaacc tcgccat . 777

```

<210> 24

<211> 777

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> scFv D7 inverso y complemento de SEC ID N°:21

<400> 24

```

ggatccagcg gccgcagcat cagcccgttt tatttccagc ttgggtcccc ctccgaacgt 60
gggaacatgg gtactttgag agcagaaata aactcccaga tcctcagcct ccaactctgt 120
gatcttgagt gtgaaatctg tccctgatcc actgccactg aacctgtctg ggaccccaga 180
aaatcggttg gaaactgtgt agatcaggag ctttgagagac tggcctggct tctgcagaaa 240
ccaatgtaaa taggtgtttc cattactgtg tacaaggctc tgactagatc tgcaagagat 300
ggaggcttga tctccaagaa tgacaggcag ggagagtggg 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 ccaactcaagt ccctgttcag gcctctgtct 660
caaccagttt atgtcaaagt atgtgaaggt gtagccagaa gccttgacag acagtttcac 720
tgaagcccca ggctctacca gttcagcccc agactgctgc agctgcacct gggccat 777

```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo que
 - a) se une a antígeno prostático específico de membrana en su forma nativa que está presente en la superficie de células tumorales
 - b) se puede internalizar por una célula tumoral.
 - c) se une de forma marcada a células LNCAP pero no se une o se une únicamente de forma mínima a células que carecen de la expresión de antígeno prostático específico de membrana y
 - d) se une a un marcador o a un agente citotóxico, **caracterizado porque**
 - e) el mismo comprende las CDR que tienen SEC ID N°: 11 a SEC ID N°: 16 o las CDR designadas como CDR H1, H2, H3, L1, L2 y L3 como se muestra en la Figura 20 o las regiones de CDR correspondientes como se muestra en la Figura 21.
2. Anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado porque** la intensidad de fluorescencia de PE (IFM) del mAb es mayor que 1000 y la del scFv mayor que 40 a saturación de antígeno.
3. Anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 que muestra una actividad de unión elevada a células LNCAP que alcanza el 50% de la saturación de los sitios de PSMA a concentraciones entre 1 nM y 120 nM.
4. Anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1- 3 **caracterizado porque** el marcador es una partícula que emite radiación radiactiva o de fluorescencia.
5. Anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 **caracterizado porque** el agente citotóxico es una sustancia tóxica a células seleccionada entre el grupo que consiste en toxinas.
6. Anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** la toxina se selecciona entre el grupo de taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaina, propranolol y/o puromicina.
7. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
8. Un anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento de cáncer.
9. Kit diagnóstico para la detección de células tumorales que comprende un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
10. Un procedimiento para la identificación *in vitro* de células tumorales **caracterizado porque** las células tumorales a identificar se ponen en contacto con un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
11. Un anticuerpo monoclonal aislado o una parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la identificación de diagnóstico de células tumorales.
12. Uso de un polinucleótido aislado que comprende una secuencia contigua de al menos 20 nucleótidos de cualquier secuencia del grupo que consiste en SEC ID N°: 17, 18, 19, 21, 23 y 24 en la preparación de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

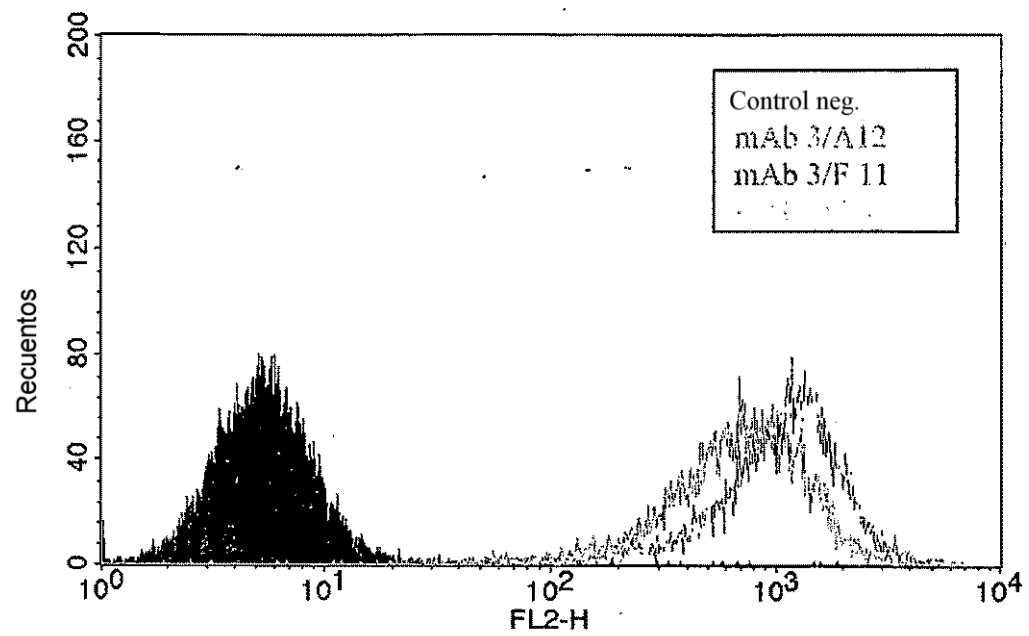


Fig 1

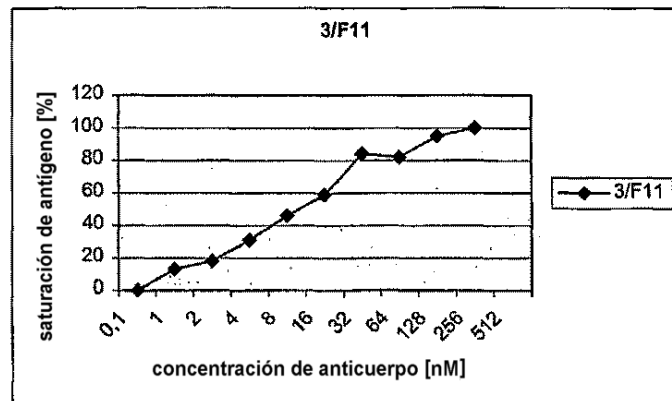


Fig 1a

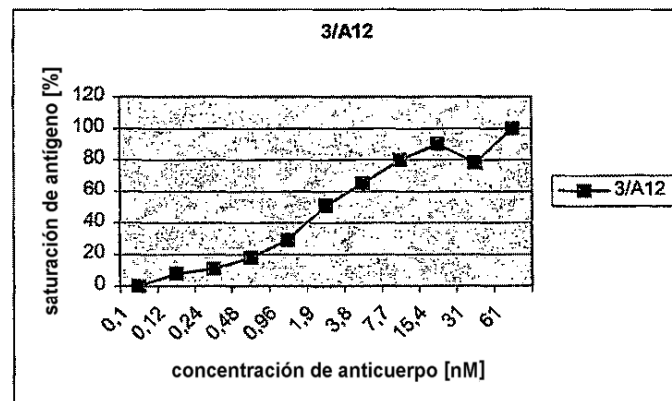


Fig 1b

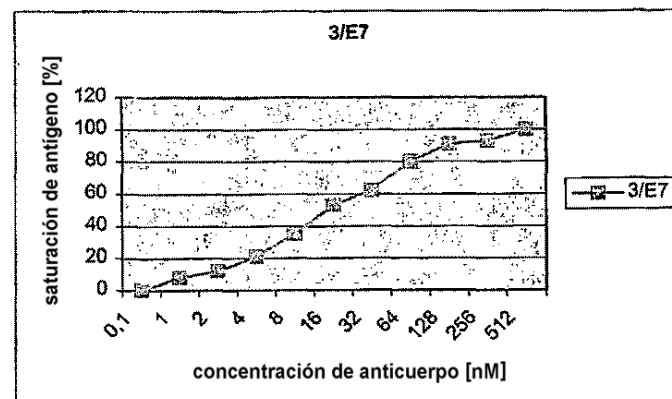


Fig 1c

Fig 1a-c

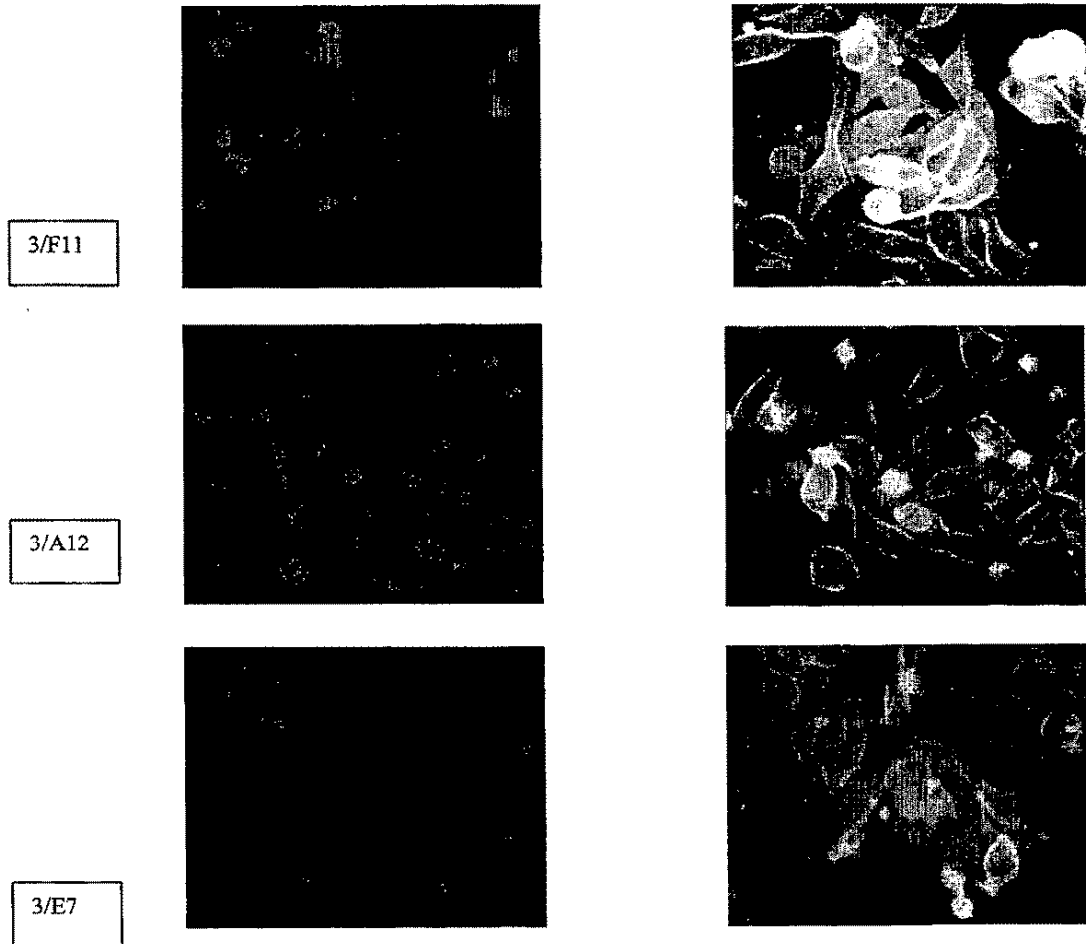


Fig 2

3/F11



3/A12



3/E7

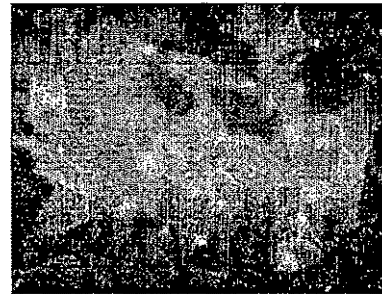


Fig 3

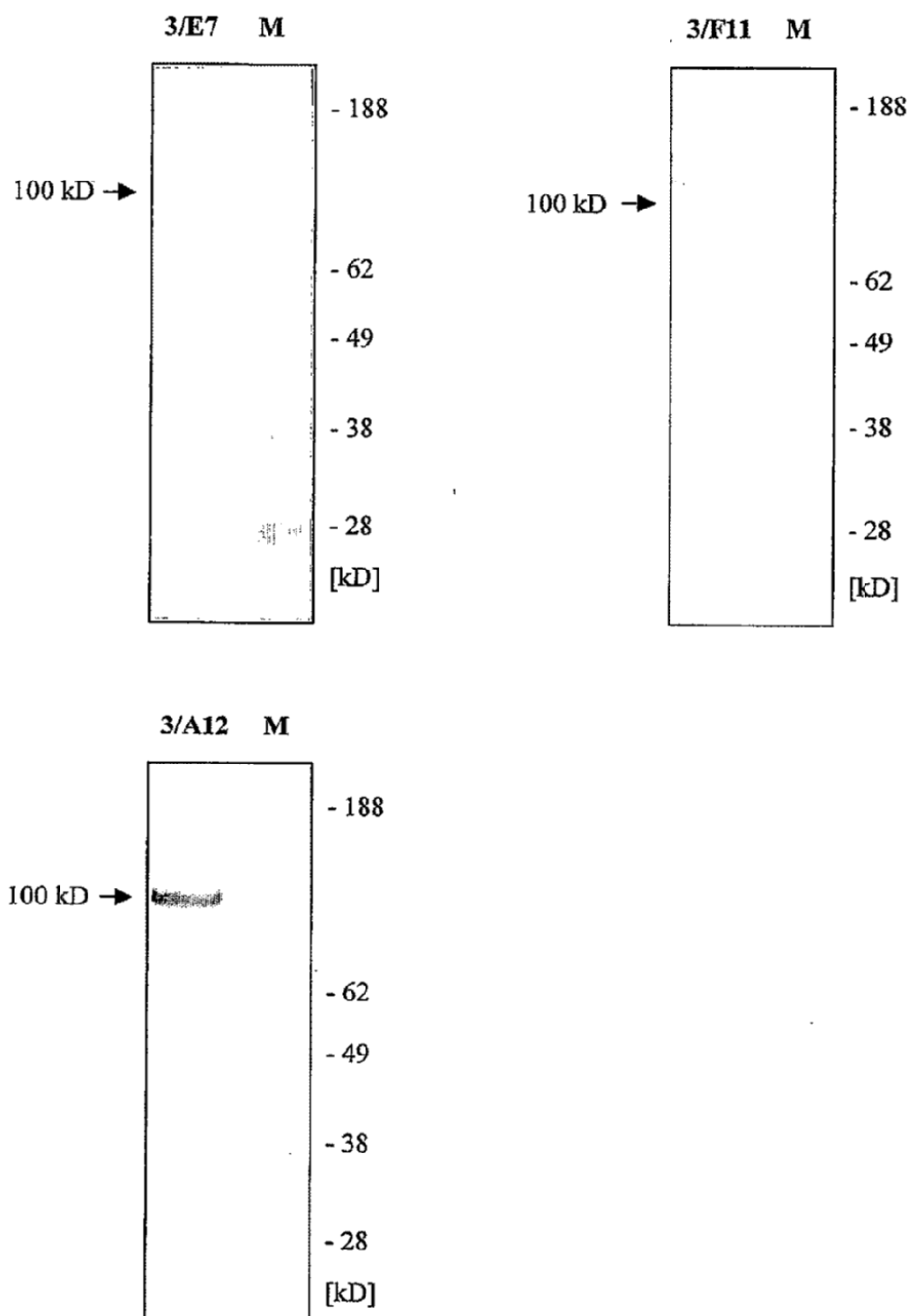


Fig 4

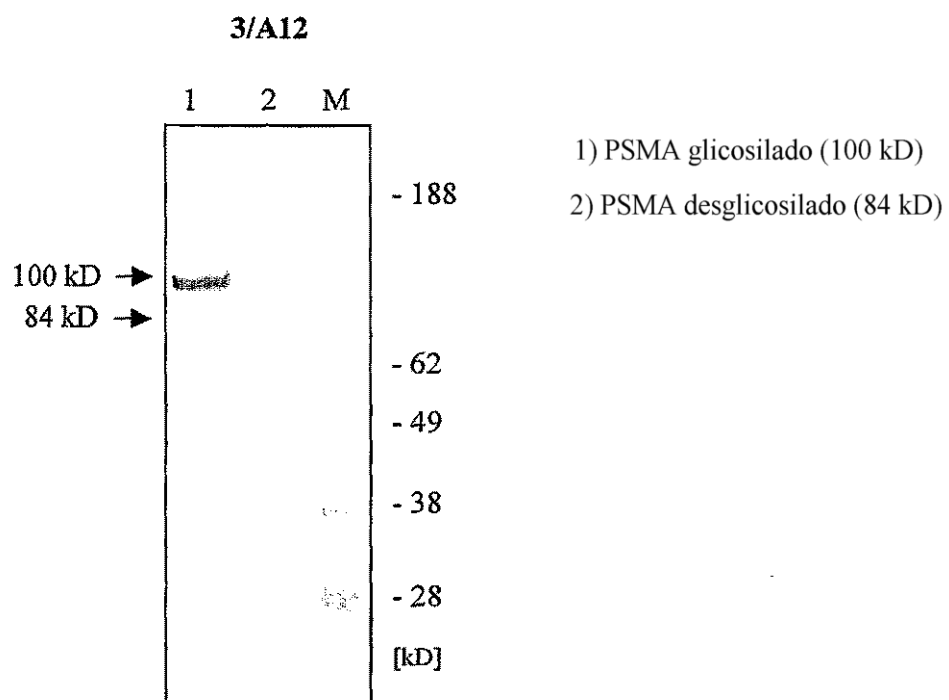


Fig 5

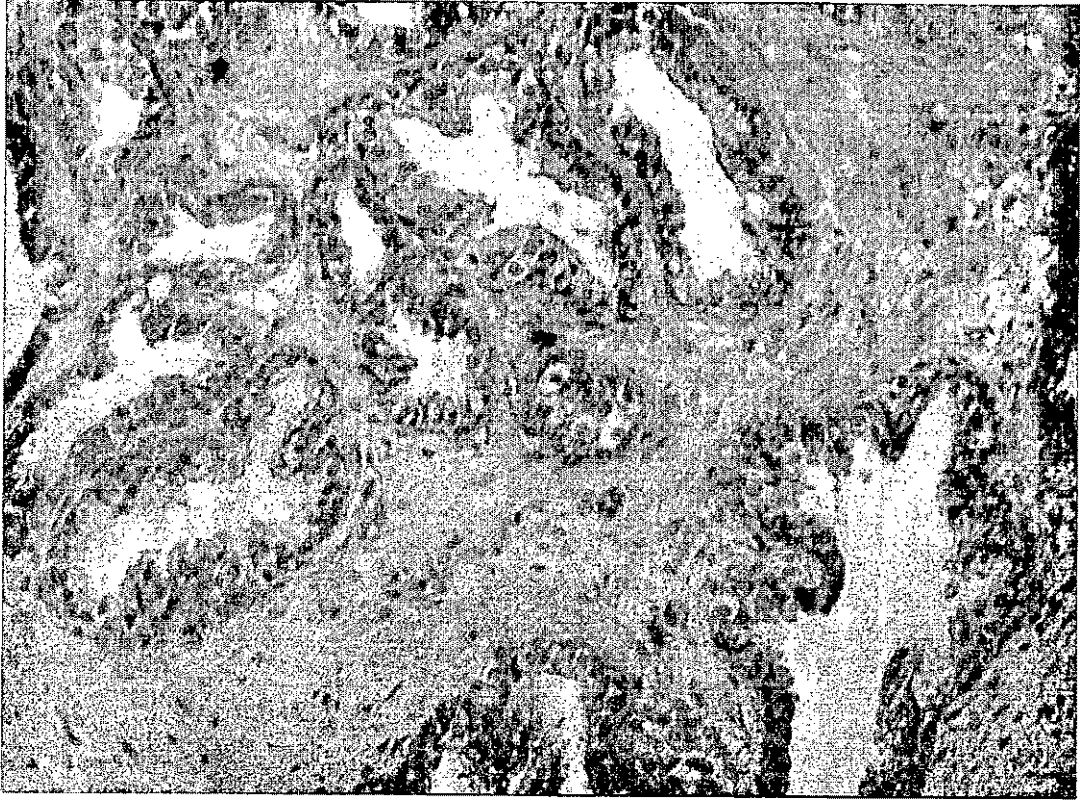


Fig 6

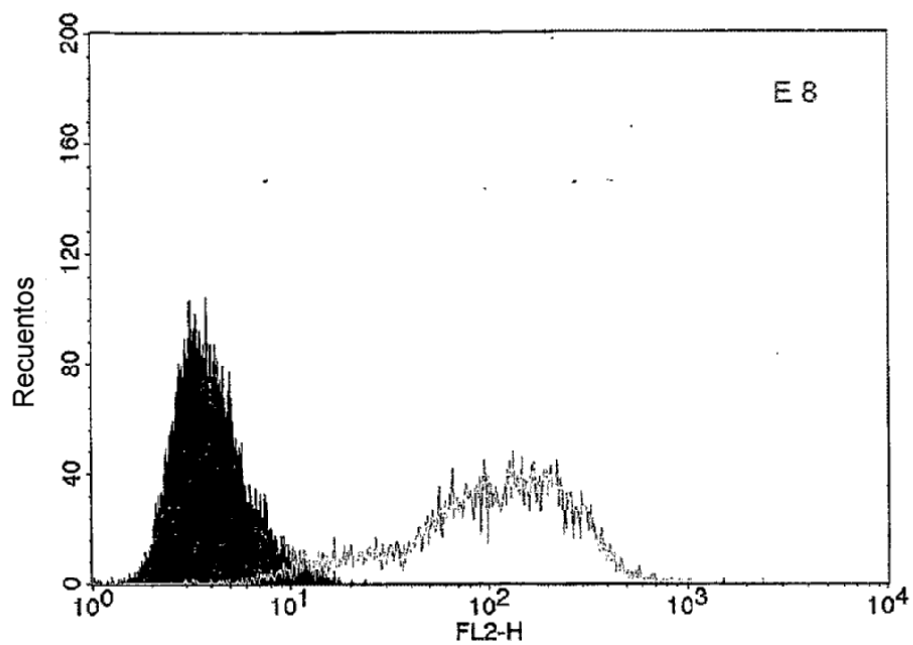


Fig 7 a

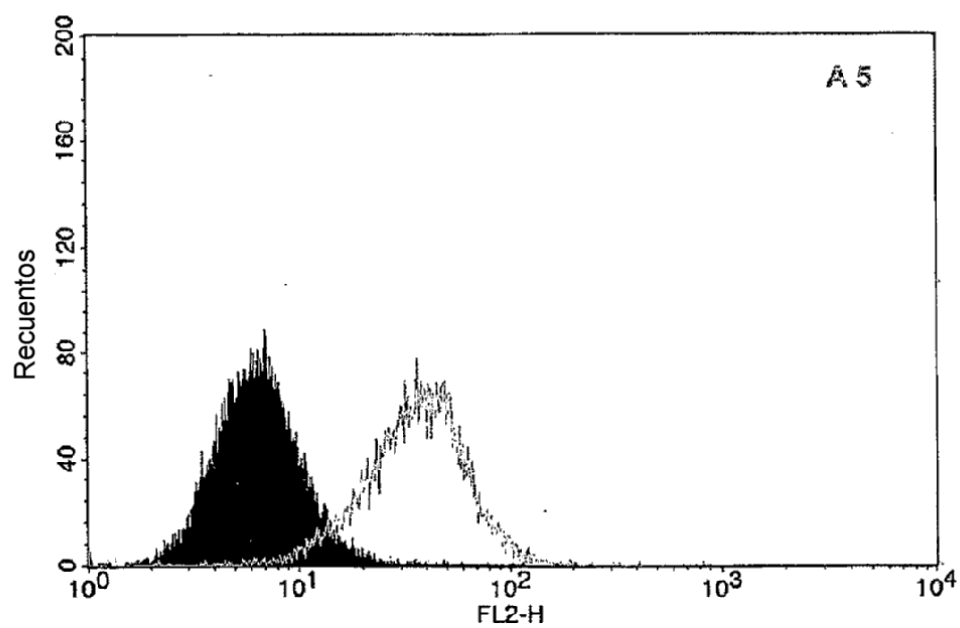


Fig 7 b

Fig 7 a,b

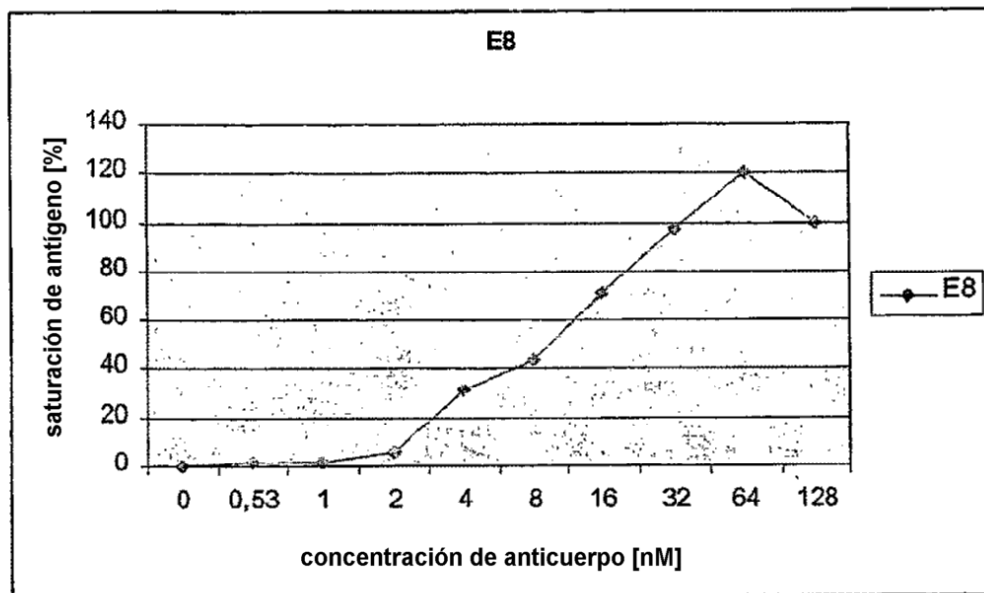


Fig 7c

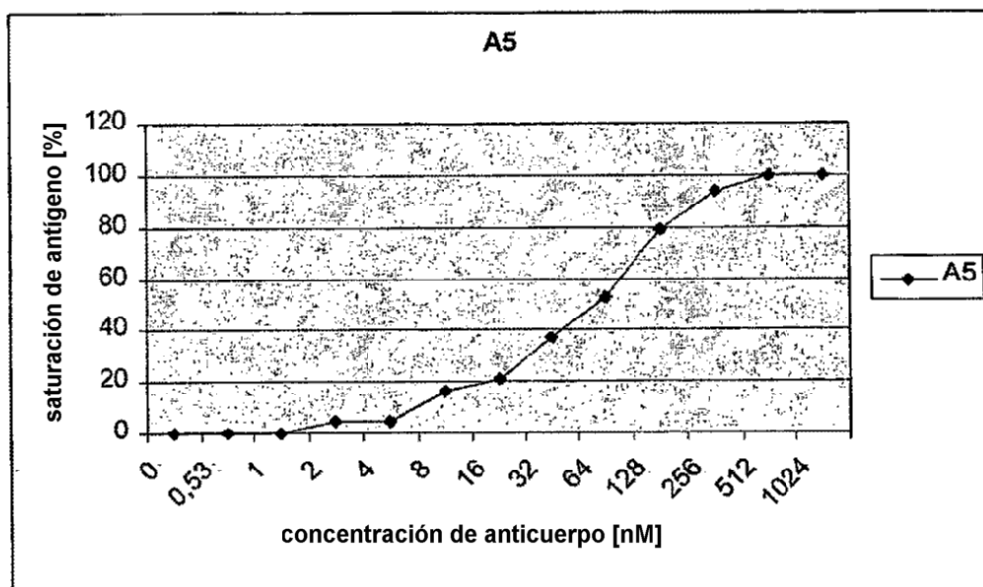


Fig 7d

Fig 7c,d

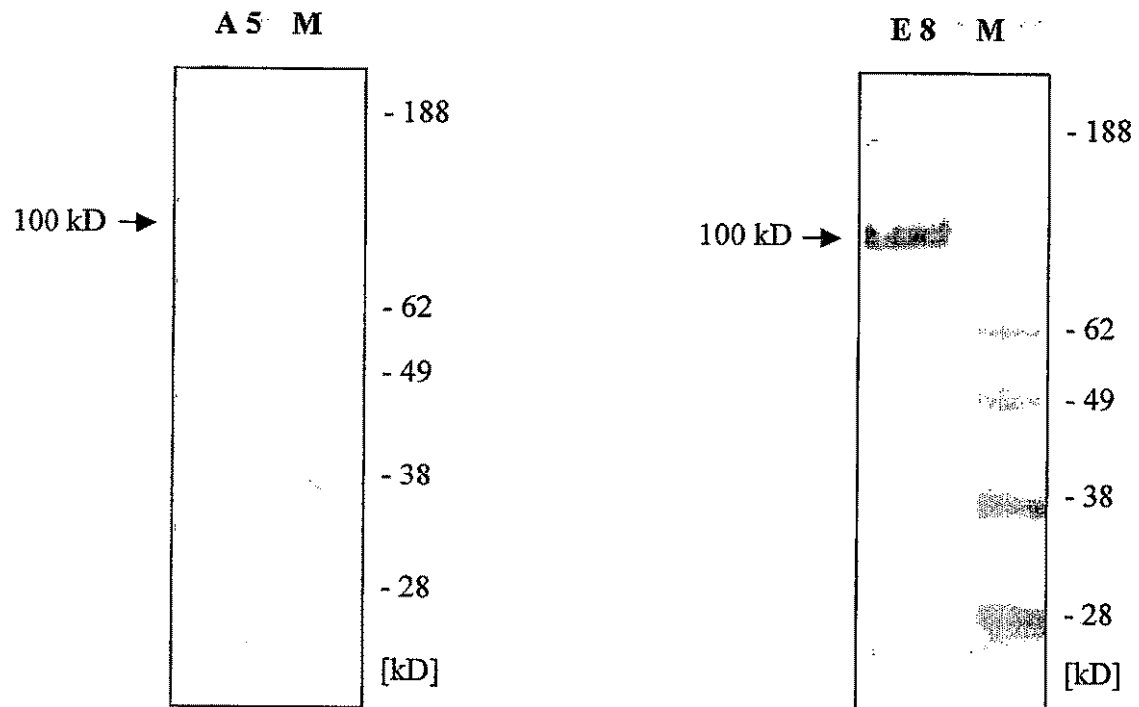


Fig 8

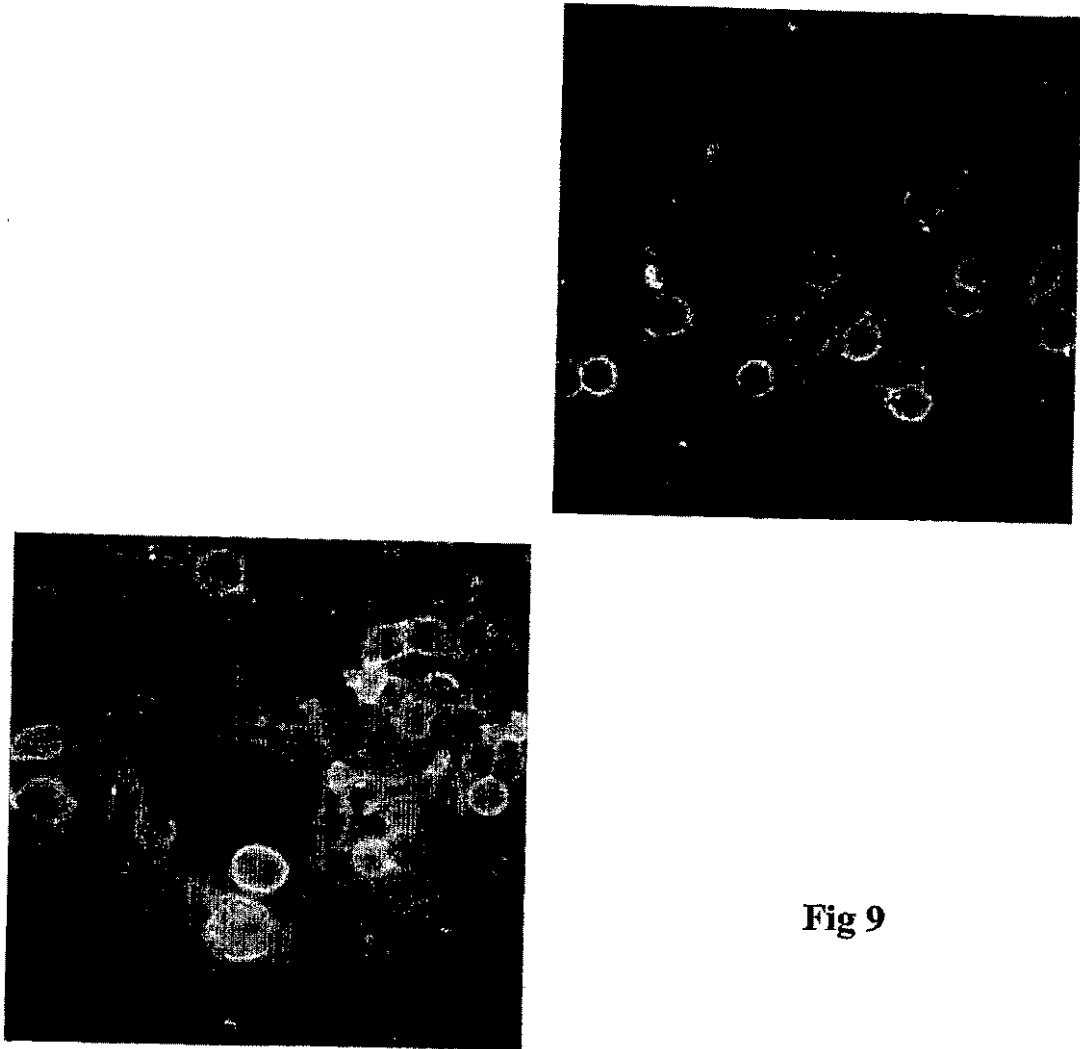


Fig 9

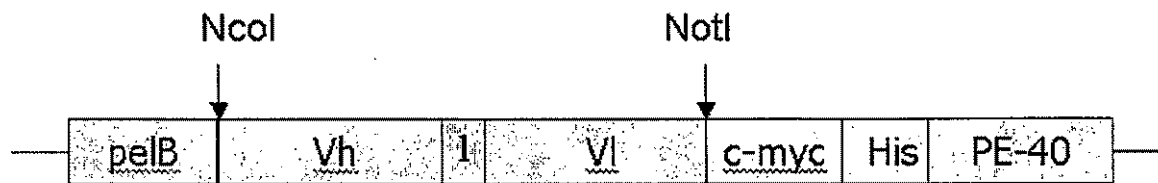


Fig 10

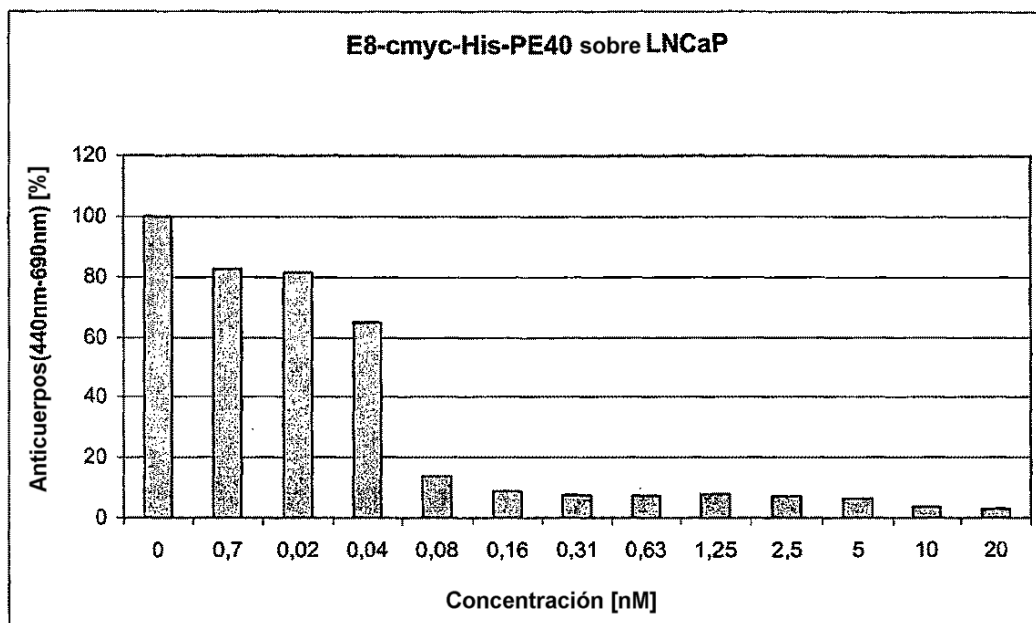


Fig 11

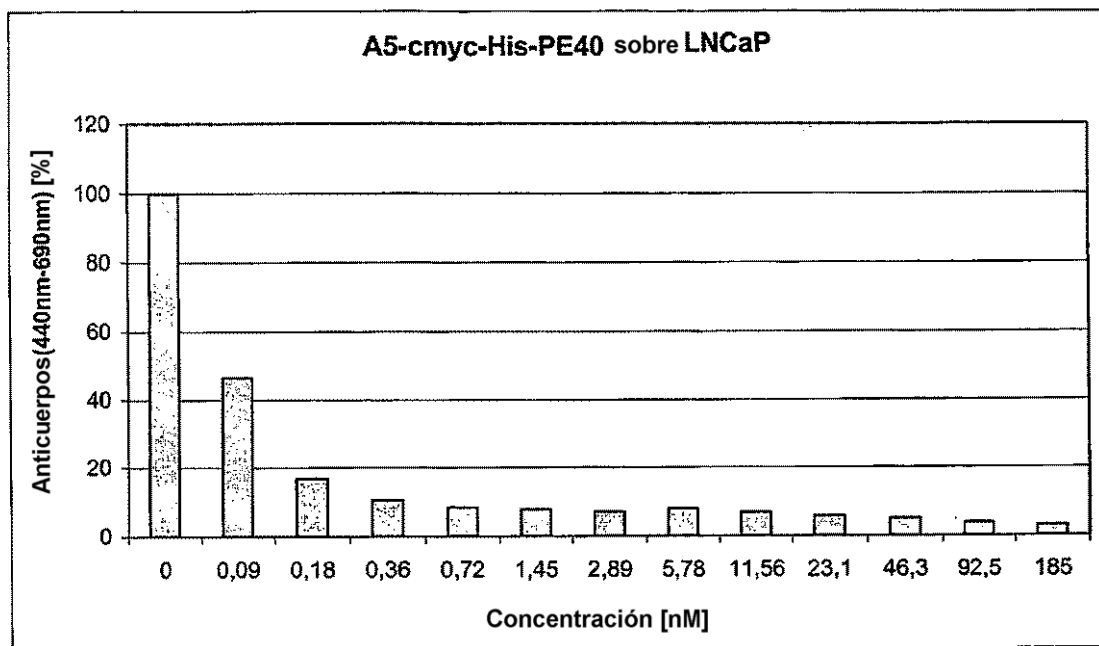


Fig. 12

```

      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 GAC 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 GAT TGA
   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 GGG GAC TMC TAT GGT AAC TAC TTT
   CTT CTG TGA CGT CAG ATA ATA ACA CGT TCT CCC CTG AAG ATA CCA TTG ATG AAA
   D   Y   W   G   Q   G   T   S   L   T   V   S   S   A   K   T   T   P
325 GAC TAG 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 TKG 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 GCA
   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 GCA 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 TGA CGT TGT TTG AAT CGT 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 CCG TAG
   GTC AGA CTA CTA AGA CCC TGA ATA ATG ACA GTT GTA APA ACC CCA TGA GGC ATG
   T   F   G   G   G   T   K   L   E   I   K   R   A   D   A   A   A
703 ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCG GCC
   TCG AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCC CGA CTA CGA CGC CGG

```

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

```

Secuencia de scFv A5

Fig. 14

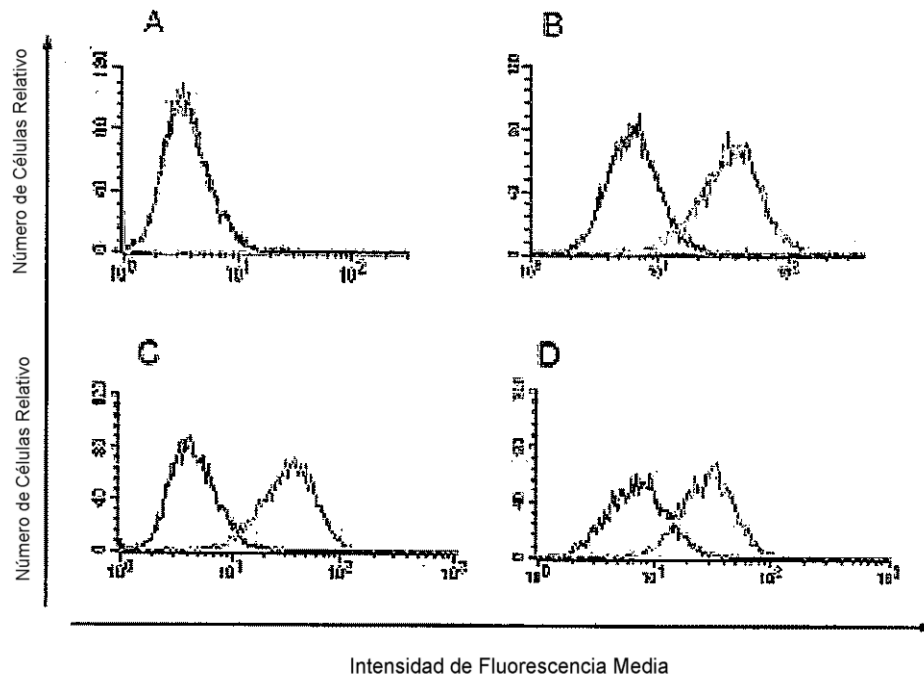


Fig. 15

Unión de los scFV A5, H12 y D7 a células DU145 negativas para PSMA (A) y células LNCaP positivas para PSMA (A5=B, H12=C, D7=D). Las células se tiñeron con los mAb y un mAb anti-IgG de ratón conjugado con PE. Los histogramas representan los logaritmos de la fluorescencia de PE en citómetro de flujo. Control negativo con anticuerpo secundario en solitario.

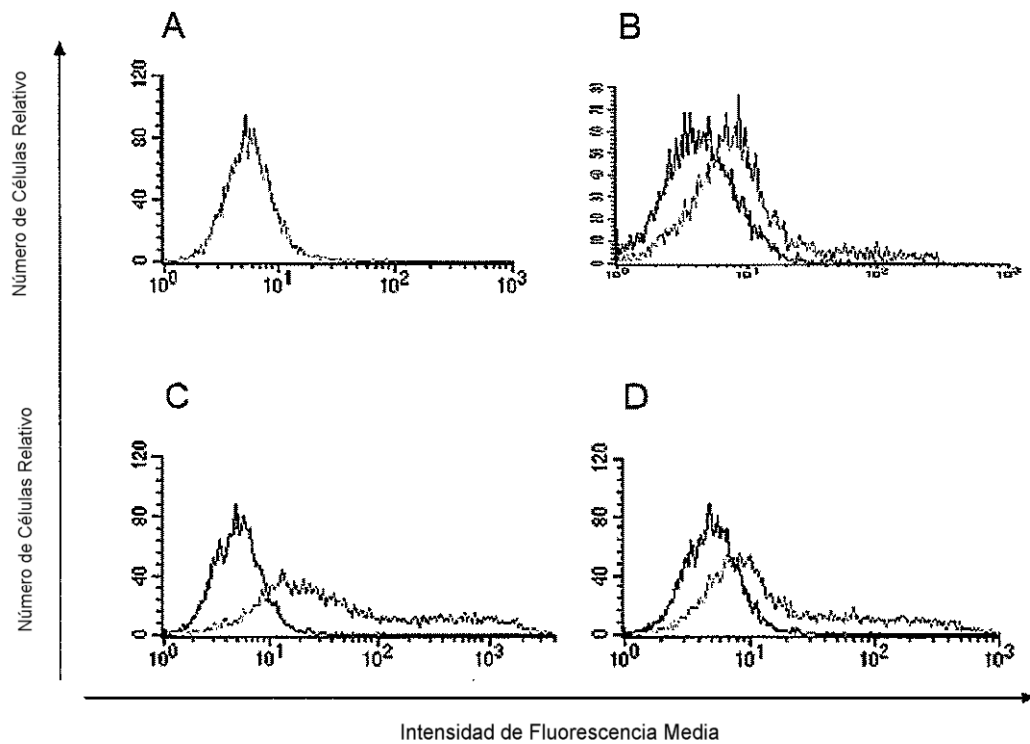


Fig 16

Unión de los scFV A5, H12 y D7 a células BOSC negativas para PSMA (A) y células BOSC transfectadas con PSMA (A5=B, H12=C, D7=D). Las células se tiñeron con los scFV, mAb anti-c-myc y anti-IgG de ratón conjugado con PE. Los histogramas representan los logaritmos de la fluorescencia de PE en citómetro de flujo. Control negativo con anticuerpo secundario en solitario.

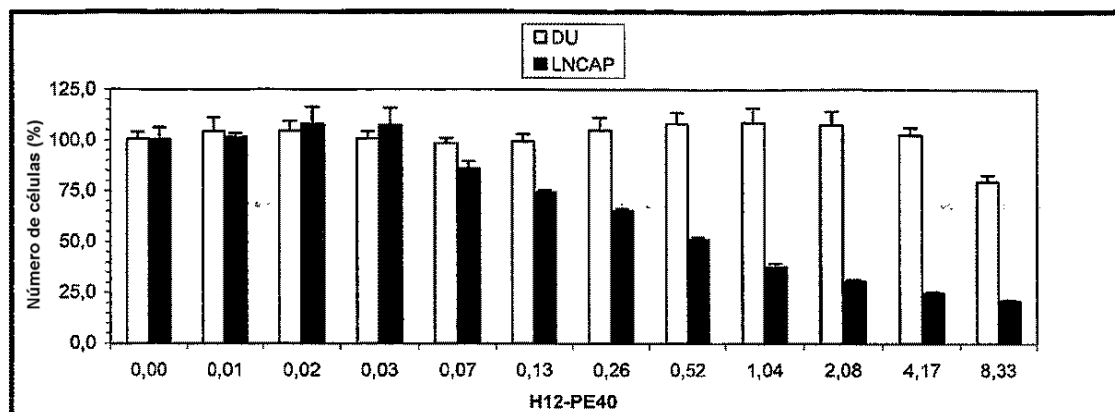


Fig. 17

Efecto citotóxico de inmunotoxina recombinante H12-PE40 sobre células LNCaP (negro) y DU (blanco)

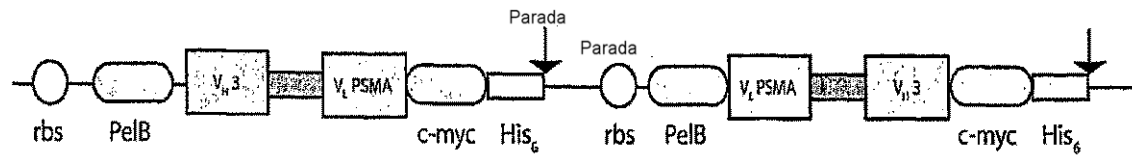


Fig. 18

Esquema de construcción del diacuerpo A5-CD3

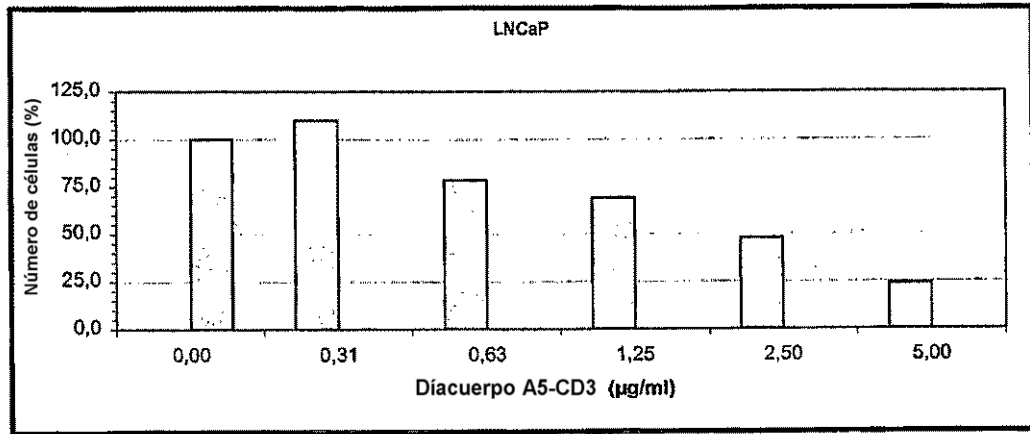


Fig. 19

Efecto citotóxico de diacuerpo A5/CD3 a diferentes concentraciones y linfocitos de sangre periférica (proporción efector diana 10:1) sobre células LNCaP después de 48 h de incubación

```

+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 TGG TAT AGC CTG GGG CTT CAG NTG
   TAC CGC TCC AAG TCG AGG TCG TCA GAC CTA GAC TTG ACC ATA TCG GAC CCC GAA GTC NAC

                                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 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 V I S P G D G N T
121 CAG AGG CCT 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 AGA GGA CCT CTA CCG 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 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
   CGG 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 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 CTC AGT ACC CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG

                                Epitopo 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 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 CCT CTA GTT CGG 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 GTA ACC AAG

                                CDR-L2
                                ~~~~~
+1 L Q K P 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 AGA

```

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 AGA 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

```

Secuencia 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 GTG 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
CGG 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

Epitopo 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 GTG 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 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

```

Secuencia de scFv D7

Fig. 21 b