

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 288 017**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**G01N 33/68** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99913932 .2**(86) Fecha de presentación : **18.03.1999**(87) Número de publicación de la solicitud: **1064303**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2001**

(54) Título: **Anticuerpos monoclonales específicos para el dominio extracelular del antígeno de membrana específico de la próstata.**

(30) Prioridad: **18.03.1998 US 44668**

(73) Titular/es: **MEDAREX, Inc.
707 State Road, Suite 206
Princeton, New Jersey 08540-1437, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

(72) Inventor/es: **Murphy, Gerald, P.;
Boynton, Alton, L.;
Holmes, Eric, H. y
Tino, William, Thomas**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

(74) Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales específicos para el dominio extracelular del antígeno de membrana específico de la próstata.

5

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen al dominio extracelular del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), a líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos, y a métodos para usar tales anticuerpos para diagnóstico y tratamiento de cáncer. En particular, se refiere a un anticuerpo monoclonal generado frente a un péptido sintético sustancialmente homólogo a una parte de la región carboxilo-terminal de PSMA, anticuerpo que reacciona con PSMA expresado sobre la superficie de células tumorales y en sueros de pacientes con cáncer de próstata. Adicionalmente, se refiere a treinta y cuatro anticuerpos monoclonales generados frente a una preparación de membrana de carcinoma de próstata, anticuerpos que también reaccionan con PSMA expresado sobre la superficie celular. La presente invención también se refiere a una variante de proteína novedosa (PSM') de PSMA detectada por los anticuerpos.

10

15

2. Antecedentes de la invención

El cáncer de próstata es la segunda causa principal de muerte de cáncer entre los hombres. De hecho, el cáncer de próstata es el cáncer no cutáneo más común diagnosticado en varones americanos. El número de hombres a los que se diagnostica cáncer de próstata está aumentando de manera estable como resultado de la creciente población de hombres mayores así como una mayor conciencia de la enfermedad que conduce a su diagnóstico más temprano (Parker *et al.*, 1997, CA Cancer J. for Clin. 47:5-28). Se proyectó que se diagnosticaría cáncer de próstata a más de 334.500 hombres en 1997, y que aproximadamente resultarían 41.800 muertes de la enfermedad. El riesgo de que los hombres desarrollen cáncer de próstata a lo largo de la vida es de aproximadamente 1 de cada 5 para los caucásicos, y 1 de cada 6 para los afroamericanos. Los grupos de alto riesgo están representados por aquellos con una historia familiar positiva de cáncer de próstata o afroamericanos. A lo largo de la vida, más de 2/3 de los hombres a los que se diagnostica cáncer de próstata mueren debido a la enfermedad (Wingo *et al.*, 1996, CA Cancer J. for Clin. 46:113-25).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

ES 2 288 017 T3

con los niveles de proteína sérica de PSMA descritos anteriormente (Horoszewicz *et al.*, 1987, mencionado anteriormente; Rochon *et al.*, 1994, mencionado anteriormente; Murphy *et al.*, 1995, mencionado anteriormente; y Murphy *et al.*, 1995, mencionado anteriormente). En conexión a esto, se ha correlacionado un nivel elevado de PSMA en sueros de pacientes con cáncer de próstata con la progresión de la enfermedad frente a la remisión, y puede usarse como un marcador de pronóstico (Murphy *et al.*, 1995, mencionado anteriormente).

El epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal 7E11-C5 se ha mapeado en los 6 primeros aminoácidos de la región N-terminal intracelular de PSMA (Troyer *et al.*, 1995, Urol. Oncol. 1:29-37) (figura 1). La inmunoquímica de electrones usando 7E11-C5 ha localizado su epítopo en el citoplasma, y específicamente en la cara interna de la membrana plasmática (Troyer *et al.*, 1994, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 35:283, Abstract 1688). Además, en pruebas *in vitro*, las cepas de anticuerpo monoclonal 7E11-C5 sólo se fijaron y permeabilizaron células (Horoszewicz *et al.*, 1987, mencionado anteriormente), lo que está de acuerdo con el mapeo del epítopo 7E11-C5 en el extremo N-terminal epítopo o dominio intracelular de PSMA. Aunque 7E11-C5 es útil para detectar el cáncer de próstata *in vivo* que presumiblemente expone su epítopo mediante necrosis y/o apoptosis, un anticuerpo monoclonal específico para el dominio extracelular de PSMA permitiría una detección más eficaz de PSMA sobre la superficie de células cancerígenas. Además, el anticuerpo monoclonal 7E11-C5 no reconoce PSM', ya que PSM' carece del dominio intracelular de PSMA, basándose en la secuencia de su transcripto de ARNm.

La mención o identificación de cualquier referencia en esta sección o en cualquier otra sección de esta solicitud no debe interpretarse como admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

MURPHY G P ET AL ("Measurement of prostate-specific membrane antigen in the serum with a new antibody" PROSTATE, vol. 28, nº 4, 1996, páginas 266-271) da a conocer un anticuerpo monoclonal anti-PSMA/PSM' producido mediante el hibridoma 3F5.4G6 que se une a un epítopo lineal en la región extracelular de PSMA que se extiende sobre los residuos de aminoácidos 716-723 y trata su utilidad en la detección de PSMA en pacientes con cáncer de próstata.

El documento WO97/35616 también da a conocer el hibridoma 3F5.4G6 y anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 3D7-1.1 y 4E10-1.14, uniéndose también los dos últimos anticuerpos a epítopos lineales en la región extracelular de PSMA/PSM' que se extiende sobre los residuos de aminoácidos 134-437 y que puede unirse a células vivas que expresan PSMA.

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales específicos para un epítopo conformacional del dominio extracelular de PSMA, a líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos, y a métodos para usar los anticuerpos para el diagnóstico y tratamiento de cáncer de próstata, así como a una forma de proteína variante de PSMA conocida como PSM' reconocida por tales anticuerpos.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento del solicitante de anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio extracelular de PSMA. Los anticuerpos de la invención son útiles en combinación con un anticuerpo dirigido frente al dominio intracelular de PSMA en un ensayo de captura de dos sitios para detectar la presencia de PSMA en una muestra de prueba. Además, los anticuerpos dados a conocer en el presente documento pueden usarse en un ensayo de captura de dos sitios para detectar la presencia de PSM' en una muestra de prueba.

La presente invención abarca una amplia variedad de usos, incluyendo pero sin limitarse al, el desarrollo y uso de un inmunoensayo para detectar o determinar el estadio de cáncer de próstata en un paciente, obtención de imágenes de cáncer de próstata primario y/o metastásico *in vivo*, usos terapéuticos de los anticuerpos, incluyendo usos de anticuerpos conjugados con un agente citotóxico o quimioterapéutico; y la construcción y uso de fragmentos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos bifuncionales.

Ciertos anticuerpos descritos en el presente documento son meramente para fines de antecedentes y/o para situar la invención en contexto.

4. Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Secuencias de aminoácidos deducidas de antígenos PSMA y PSM' (SEQ ID NO: 2) (Israeli *et al.*, 1994 Cancer Res. 54: 1807-1811). El ARNm de PSM' no contiene el extremo 5' del PSMA que codificaría para los primeros 57 aminoácidos (primera línea de la secuencia de aminoácidos) y por tanto comienza presumiblemente en el aminoácido 58. Sin embargo, antes de la presente invención, nunca se había identificado PSM' en su forma de proteína. La región subrayada es el supuesto dominio transmembrana y la región en negrita (aminoácido número 716-723) es un péptido seleccionado para el desarrollo del anticuerpo monoclonal.

Figura 2. Demostración de anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 (un subclón derivado para el hibridoma primario 3F5) y su reactividad con una proteína presente en lisado de LNCaP de 120 kDa de peso molecular que corresponde a PSMA. Se desarrolló inmunotransferencia de tipo Western con HRP-anticuerpo secundario anti-IgG. Carril 1 = lisado de LNCaP analizado con sonda de 7E11-C5; Carril 2 = lisado de LNCaP analizado con sonda de 3F5.4G6.

ES 2 288 017 T3

Figura 3. Demostración mediante inmunotransferencia de tipo Western de PSMA en sueros de pacientes con cáncer de próstata (estadio D2) usando anticuerpos monoclonales 3F5.4G6 (Carriles 3 y 4) y 7E11-C5 (Carriles 1 y 2) como control.

Figura 4. Ensayo de inmunotransferencia de tipo Western de lisados de LNCaP usando anticuerpos monoclonales 7E11-C5 (Carril 1) y 3F5.4G6 (Carril 2) y desarrollado con HRP-anticuerpo secundario anti-IgM. Tanto 7E11-C5 como 3F5.4G6 reconocieron una proteína de 120 kDa de peso molecular. Además, 3F5.4G6 también reconoció una proteína de 105-110 kDa de peso molecular correspondiente a la forma de proteína prevista de PSM'. Debe observarse que 7E11-C5 no reconoció PSM' dado que no se encontró el epítopo de anticuerpo monoclonal 7E11-C5 en PSM'. El anticuerpo 3F5.4G6 reconoce la parte C-terminal de la proteína (aminoácido número 716-723), que corresponde al dominio extracelular de PSMA y PSM'.

Figura 5. Demostración de que los anticuerpos monoclonales 7E11-C5 y 3F5.4G6 reconocieron una proteína idéntica pero que 3F5.4G6 reconoció una proteína adicional correspondiente a PSM'. Se inmunoprecipitó inicialmente lisado de LNCaP con anticuerpo monoclonal 7E11-C5 y se separó el material inmunoprecipitado sobre geles de SDS y se analizó con sondas en un ensayo de inmunotransferencia tipo de Western o bien con anticuerpo monoclonal 7E11-C5 (carriles 1-4) o bien con anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 (Carriles 5-8). Los carriles 1 y 5 eran lisado de LNCaP en bruto; los carriles 2 y 6 eran lisado de LNCaP previamente aclarado; los carriles 3 y 7 eran material que inmunoprecipitaba con anticuerpo monoclonal 7E11-C5; y los carriles 4 y 8 eran proteínas que quedaban en el lisado de LNCaP previamente inmunoprecipitado. El anticuerpo 7E11-C5 inmunoprecipitó una proteína de 120 kDa (Carril 3), que también se reconoció por 3F5.4G6 (Carril 7). Sin embargo, tras la inmunoprecipitación con 7E11-C5, se reconoció una segunda proteína por 3F5.4G6 (Carril 8) que no se precipitó por 7E11-C5 (Carril 4), y que correspondía a PSM'. Por tanto, 7E11-C5 no reconoce PSM'.

Figura 6. Demostración de que los anticuerpos monoclonales 7E11-C5 y 3F5.4G6 reconocieron una proteína de 120 kD idéntica. Se inmunoprecipitó PSMA a partir de un lisado de LNCaP mediante anticuerpo monoclonal 3F5.4G6, se separaron las proteínas en el inmunoprecipitado sobre un gel de SDS, se transfirieron a Immobilon P y se analizaron con sondas en una inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo monoclonal 7E11-C5. Carril 1 = lisado de LNCaP control y analizado con sonda de 7E11-C5; Carril 2 = inmunoprecipitación con 3F5.4G6.

Figura 7A & B Demostración mediante análisis FACS del reconocimiento por anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 de células LNCaP vivas ilustrando la unión del anticuerpo al dominio extracelular de PSMA. La figura 7A representa el control con anticuerpo no primario; y la figura 7B representa células LNCaP incubadas con 100 µg/ml de 3F5.4G6 antes del análisis FACS. El desplazamiento hacia la derecha indica la unión del anticuerpo a las células LNCaP vivas.

Figura 8. Demostración de la reactividad de anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 con PSM' aislado y purificado a partir de semen. El carril 1 es lisado de LNCaP y el carril 2 es PSM' purificado a partir de semen. Se separaron proteínas sobre geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a papel de Immobilon P y se analizaron con sondas de anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 mediante procedimientos de inmunotransferencia de tipo Western. La proteína purificada a partir de semen y representada en el carril 2 tiene un peso molecular de 90 kDa, que es posible que sea un producto no glucosilado o parcialmente glucosilado de PSM' que tiene un peso molecular de 105-110 kDa.

Figura 9. Demostración de la reactividad de anticuerpos monoclonales 3D7-1.1 y 4E10-1.14 con PSMA nativa y tres fragmentos de PSMA. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con PSMA nativa o uno de los tres fragmentos de polipéptido de PSMA expresados por bacterias, y se hicieron reaccionar con sobrenadantes de hibridoma en un ensayo ELISA. Aunque los tres anticuerpos sometidos a prueba mostraron una unión comparable a PSMA nativa, 3D7-1.1 y 4E10-1.14 reaccionaron fuertemente con un fragmento correspondiente a un epítopo del dominio extracelular de PSMA.

Figura 10. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de PSMA usando anticuerpos monoclonales 3D7-1.1. Carril 1 = lisado de LNCaP; Carril 2 = lisado de PC-3; Carril 3 = PSMA purificado por inmunoafinidad.

Figura 11. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de PSMA expresado por baculovirus de longitud completa. Se sometió el PSMA recombinante a electroforesis sobre gel SDS-PAGE, se sometió a electroinmunotransferencia y se analizó con sondas de diversas preparaciones de anticuerpos. Carril 1 = blanco; Carril 2 = medio control (FCSin al 20% RPMI 1640); Carril 3 = anticuerpo monoclonal 3D7-1.1; Carril 4 = anticuerpo monoclonal 3D7-1.2; Carril 5 = anticuerpo monoclonal 3D7-1.3; Carril 6 = anticuerpo monoclonal 3D7-1.7; Carril 7 = anticuerpo monoclonal 3D7-2.7; Carril 8 = anticuerpo monoclonal 4E10 (original); Carril 9 = anticuerpo monoclonal 4E10-1.3; Carril 10 = anticuerpo monoclonal 4E10-1.14; Carril 11 = blanco; Carril 12 = blanco; Carril 13 = anticuerpo monoclonal 7E11-C5.

Figura 12 A-D. Demostración mediante análisis FACS del reconocimiento por los anticuerpos monoclonales 3D7-1.1 y 4E10-1.14 de células LNCaP vivas, ilustrando la unión de anticuerpo al dominio extracelular de PSMA. La figura 12A representa células LNCaP incubadas con 4E10-1.14. La figura 12B representa células PC-3 incubadas con 4E10-1.14. La figura 12C representa células LNCaP incubadas con 3D7-1.1. La figura 12D representa células PC-3 incubadas con 3D7-1.1. Los diferentes patrones en el desplazamiento hacia la derecha en las figuras 12A y 12C sugieren que los dos anticuerpos pueden reconocer epítopos diferentes de PSMA.

Figura 13. Detección de PSMA mediante un ELISA de captura de dos sitios usando dos anticuerpos monoclonales frente a distintos epítopos de PSMA. Se añadió PSMA purificado por inmunoafinidad diluido en serie a placas de 96 pocillos recubiertas con 7E11-C5 y se detectaron mediante incubación con sobrenadantes de 3D7-1.1 ó 4E10-1.14. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas. -●- = 3D7-1.1; -■- = 4E10-1.14.

5 Figura 14. Detección de PSMA en una variedad de muestras biológicas mediante un ELISA de captura de dos sitios usando anticuerpos monoclonales 3D7-1.1 y 4E10-1.14.

10 Figura 15. Detección de PSMA purificado por inmunoafinidad diluido en serie con suero humano normal mediante un ELISA de captura de dos sitios usando anticuerpos monoclonales 3D7-1.1 y 4E10-1.14.

15 Figura 16. Detección de PSMA mediante un ELISA de captura de dos sitios alternativo. Se añadió PSMA purificado por inmunoafinidad diluido en serie a placas de 96 pocillos recubiertas con 3D7-1.1 y se detectaron mediante incubación con 7E11-C5 biotinilado (40 µg/ml) seguido por estreptavidina conjugada con peroxidases del rábano. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas. Se biotiniló 7E11-C5 usando kits de biotinilación de enlace E-Z (Pierce) según las instrucciones del fabricante.

20 Figura 17. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de lisado de células LNCaP y diversas fracciones de expresado como un inserto de 1,9 kb en un sistema de expresión de baculovirus) analizadas con sondas de sobrenadante de cultivo tisular a partir del hibridoma 4E10-1.14. La identificación del producto de proteína a partir del constructo de 1,9 kb (aminoácidos 134-750 de PSMA) se representa por la flecha. Carril 1 = marcadores; Carril 2 = lisado en bruto de células LNCaP; Carril 3 = sedimento viral, es decir, sedimento a 100.000 xg de células SF9 lisadas infectadas con baculovirus que expresa un fragmento de PSMA de 1,9 kb; Carril 4 = fracción sobrenadante a 100.000 xg de 25 células SF9 lisadas infectadas con baculovirus que expresa un fragmento de PSMA de 1,9 kb; Carril 5 = flujo de la fracción mostrada en el carril 4 tras el paso a través de una matriz de Ni-NTA; Carril 6 = elución con NaCl 0,5 M de la matriz de Ni-NTA; Carril 7 = elución con imidazol 1 M, pH 7,6 de la matriz de Ni-NTA; Carril 8 = flujo de la fracción mostrada en el carril 4 tras el paso a través de una matriz de Ni-NTA; Carril 9 = elución con NaCl 0,5 M de 30 una matriz de Ni-NTA; y Carril 10 = elución con imidazol 1 M, pH 7, de una matriz de Ni-NTA. Obsérvese también en el carril 2 la reactividad de anticuerpo monoclonal 4E10-1.14 con PSMA nativo de longitud completa expresado en células LNCaP.

35 Figura 18. Inmunotransferencia de tipo Western de lisados en bruto de células SF9 infectadas con un baculovirus que contiene o bien un inserto irrelevante o bien un inserto de 1,9 kb que codifica para una parte de PSMA (aminoácidos 134-750 del PSMA de longitud completa) analizados con sonda de anticuerpo 7E11-C5. Carriles 1, 2 = marcadores de PM; Carril 3 = lisado de células SF9 infectadas con virus irrelevante; Carril 4 = lisado de células SF9; y Carril 5 = lisado de SF9 infectado con virus que contiene un inserto de PSMA de 1,9 kb. Obsérvese que no se observaron bandas positivas para 7E11-C5 con ningún producto de proteína presente en células SF9 o en las infectadas con cualquier virus.

40 Figura 19. Inmunotransferencia de tipo Western de PSMA y PSM' obtenidos a partir de células LNCaP, semen humano y suero humano analizados con sondas de anticuerpo monoclonal 3D7-1.1. Carril 1 = lisado de células LNCaP; Carril 2 = PSMA purificado por inmunoafinidad con 7E11-C5 a partir de células LNCaP; Carril 3 = semen humano; y Carril 4 = suero de varón humano. Se indican las posiciones de PSMA y PSM'.

45 Figura 20. Representación esquemática de PSMA y fragmentos de PSMA expresados como proteínas de fusión bacterianas. El PSMA de longitud completa se define como los aminoácidos 1 a 750. PSM' carece de los primeros 57 aminoácidos que también contienen el dominio transmembrana (TM, residuos 20 a 43) de la proteína. Los fragmentos de PSMA utilizados están compuestos por los aminoácidos 1 a 173, aminoácidos 134 a 437, y aminoácidos 438 a 50 750, tal como se indica en la figura. Los anticuerpos se enumeran bajo la región de la proteína correspondiente a la ubicación aproximada de sus epítopos de unión. La parte inferior de la figura enumera 3 anticuerpos que se encontró que se unían sólo a conformaciones nativas de la proteína y no a proteína desnaturalizada o fragmentos de proteína. Basándose en experimentos de inmunocitoquímica y citometría de flujo con células vivas, estos epítopos se mapean en el dominio extracelular, dentro de los aminoácidos 44 a 750.

55 5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales específicos para epítopos conformacionales sobre el 60 dominio extracelular de PSMA, a métodos para usar tales anticuerpos y a una variante de proteína truncada, PSM', identificada por tales anticuerpos. Aunque los procedimientos y métodos específicos descritos en el presente documento se muestran como ejemplo usando un péptido C-terminal, una preparación de membrana tumoral que expresa PSMA o PSMA purificado para ratones inmunizados, son meramente ilustrativos para la práctica de la invención. Pueden aplicarse igualmente técnicas y procedimientos análogos a una variedad de huéspedes animales inmunizados frente a PSMA en forma de proteína, péptidos, antígeno de superficie celular y preparaciones de membranas 65 en bruto.

5.1 Producción de anticuerpos y líneas celulares de hibridoma

En una realización específica a modo de ejemplo en la sección 6, a continuación, se usó un péptido sintético derivado de la región C-terminal de PSMA como inmunógeno. Los resultados muestran que un anticuerpo denominado 5 3F5.4G6 se une al dominio extracelular de PSMA, que está expuesto sobre la superficie celular de células de cáncer de próstata vivas y en el suero de pacientes con cáncer de próstata. Adicionalmente, ejemplos de funcionamiento en las secciones 7 y 8, a continuación, demuestran la producción de anticuerpos monoclonales adicionales dirigidos frente al dominio extracelular de PSMA tras la inmunización de animales con una preparación de membrana tumoral que expresa PSMA. En conexión a esto, pueden usarse células cancerígenas tales como LNCaP que expresan PSMA, células huésped transfectadas con secuencia que codifica para PSMA, PSMA purificado, péptidos del dominio extracelular de PSM' o PSMA como inmunógenos para provocar una respuesta inmunitaria en huéspedes animales para la generación de anticuerpos monoclonales específicos para el dominio extracelular de PSMA.

Las células somáticas con potencial para la producción de anticuerpo y, en particular linfocitos B, son adecuadas 15 para la fusión con una línea de mieloma de células B. Preferentemente, se fusionan las células productoras de anticuerpos que están en la fase de plasmoblasto en división. Pueden obtenerse células somáticas a partir de ganglios linfáticos, bazo y sangre periférica de animales tratados previamente con antígeno, y las células linfáticas de elección dependen en gran medida de su utilidad empírica en el sistema de fusión particular. Una vez tratados previamente o hiperinmunizados, 20 pueden usarse los animales como una fuente de linfocitos productores de anticuerpo. Los linfocitos de ratón proporcionan un porcentaje mayor de fusiones estables con las líneas de mieloma de ratón descritas a continuación. De ellos, se prefiere el ratón BALB/c. Sin embargo, también pueden usarse otras cepas de ratón, conejo, hámster, oveja y rana como huéspedes para preparar células productoras de anticuerpos. Tal como se revisa por Goding (en Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2^a ed., págs. 60-61, Orlando, Fla, Academic Press, 1986), el uso de linfocitos de rata puede proporcionar varias ventajas.

25 Alternativamente, las células somáticas humanas que pueden producir anticuerpos, específicamente linfocitos B, son adecuadas para su fusión con líneas celulares de mieloma. Aunque pueden usarse linfocitos B de ganglios linfáticos, amígdalas o bazos de individuos sometidos a biopsia, se prefieren los linfocitos B de sangre periférica más accesibles. Los linfocitos pueden derivarse de pacientes con carcinomas de próstata diagnosticados. Además, pueden inmortalizarse directamente células B humanas mediante el virus de Epstein-Barr (Cole *et al.*, 1995, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

Preferiblemente, las líneas celulares de mieloma adecuadas para su uso en procedimientos de fusión de producción de hibridomas no producen anticuerpos, tienen alta eficacia de fusión, y carencias de enzimas que las hacen incapaces 35 de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de los hibridomas deseados. Ejemplos de tales líneas celulares de mieloma que pueden usarse para la producción de híbridos de células fusionadas de la invención, incluyen P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4.1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul, todas derivadas de ratones; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210 derivadas de ratas y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, todas derivadas de seres humanos (Goding en Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2^a ed., págs. 65-66, Orlando, Fla, Academic Press, 1986; Campbell, en Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, eds. págs. 75-83, Amsterdan, Elseview, 1984).

Los métodos para generar híbridos de células de ganglios linfáticos o bazo que producen anticuerpos y células de 45 mieloma comprenden normalmente mezclar células somáticas con células de mieloma en una proporción 2:1 (aunque la proporción puede variar desde aproximadamente 20:1 hasta aproximadamente 1:1), respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que estimulan la fusión de membranas celulares. A menudo se prefiere que la misma especie de animal sirva como fuente de las células somáticas y de mieloma usadas para el procedimiento de fusión. Se han descrito métodos de fusión por Kohler y Milstein (1975, Nature 256:495-497; 1976, Eur. J. Immunol. 6:511-519), y por Gefter *et al.* (1977, Somatic Cell Genet. 3:231-236). Los agentes de estimulación de la fusión usados por los investigadores fueron virus de Sendai y polietilenglicol (PEG), respectivamente. Los métodos de fusión revisados por Goding (1986, en Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2^a ed., págs. 71-74, Orlando, Fla, Academic Press), incluyendo los anteriores así como la fusión eléctricamente inducida, también son adecuados para 50 generar anticuerpos monoclonales de la invención.

Los procedimientos de fusión producirán normalmente híbridos viables con una frecuencia muy baja, aproximadamente de 1×10^{-6} a 1×10^{-8} células somáticas. Debido a la baja frecuencia de obtención de híbridos viables, es esencial tener un medio para seleccionar los híbridos de células fusionadas del resto de las células no fusionadas, particularmente las células de mieloma no fusionadas. También es necesario un medio para detectar los hibridomas 55 que producen anticuerpos entre los otros híbridos de células fusionadas resultantes.

Generalmente, se cultivan las células fusionadas en medios selectivos, por ejemplo medio HAT que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. El medio HAT permite la proliferación de células híbridas y evita el crecimiento de células de mieloma no fusionadas que normalmente seguirían dividiéndose indefinidamente. La aminopterina bloquea 60 la síntesis *de novo* de pirimidina y purina inhibiendo la producción de tetrahidrofolato. La adición de timidina supera el bloqueo en la síntesis de pirimidina, mientras que se incluye hipoxantina en el medio para que las células inhibidas sintetizan purina usando la ruta de recuperación de nucleótidos. Las células de mieloma empleadas son mutantes que carecen de hipoxantina-fosforibosilo transferasa (HPRT) y por tanto no pueden utilizar la ruta de recuperación. En el

ES 2 288 017 T3

híbrido superviviente, el linfocito B suministra información genética para la producción de esta enzima. Ya que los propios linfocitos B tienen una vida útil limitada en cultivo (aproximadamente dos semanas), las únicas células que pueden proliferar en medio HAT son híbridos formados a partir de mieloma y células del bazo.

- 5 Para facilitar la selección de anticuerpos secretados por los híbridos y evitar que híbridos individuales proliferen más que otros, se diluye la mezcla de mieloma fusionado y linfocitos B en medio HAT y se cultiva en múltiples pocillos de placas de microtitulación. En de dos a tres semanas, cuando clones de híbridos se han vuelto visibles por microscopio, se somete a ensayo el fluido sobrenadante de los pocillos individuales que contienen clones de híbridos para detectar anticuerpos específicos. El ensayo debe ser sensible, sencillo y rápido. Las técnicas de ensayo incluyen radioinmunoanálisis, inmunoensayos enzimáticos, ensayos de citotoxicidad, ensayos en placas, ensayos de inmunounión puntual, y similares.
- 10

Una vez seleccionados y clonados los híbridos de células fusionadas deseados en líneas celulares productoras de anticuerpos individuales, cada línea celular puede propagarse de cualquiera de dos maneras habituales. Puede inyectarse una muestra del hibridoma en un animal histocompatible del tipo que se usó para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido de células fusionadas. Pueden extraerse líquidos corporales del animal, tales como suero o líquido ascítico, para proporcionar anticuerpos monoclonales en alta concentración. Alternativamente, pueden propagarse las líneas celulares individuales *in vitro* en recipientes de cultivo en laboratorio; puede recogerse el medio de cultivo, que también contiene altas concentraciones de un único anticuerpo monoclonal específico, mediante decantación, filtración o centrifugación.

20 Además de la tecnología del hibridoma, pueden producirse anticuerpos monoclonales específicos para el dominio extracelular de PSMA mediante otros métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse enfoques moleculares usando tecnología de presentación en fagos para expresar regiones variables de anticuerpos que se unen a PSMA (patentes estadounidenses números 5.223.409; 5.403.484 y 5.571.698).

30 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales o fragmentos purificados de los anticuerpos monoclonales que tienen al menos una parte de una región de unión a antígeno, incluyendo fragmentos tales como Fv, F(ab')₂, Fab (Harlow y Carril, 1988, Antibody, Cold Spring Harbor), anticuerpos de cadenas sencillas (patente estadounidense 4.946.778), anticuerpos químéricos o humanizados (Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851; Newburger *et al.*, 1984 Nature 31: 6851) y regiones determinantes de complementariedad (CDR) mediante procedimiento convencional. Puede lograrse purificación de los anticuerpos o fragmentos mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica incluyendo precipitación por sulfato de amonio o sulfato de sodio seguido por diálisis frente a solución salina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o inmunoafinidad así como filtración en gel, electroforesis por zonas, etc. (véase Goding en, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2^a ed., págs. 104-126, Orlando, Fla, Academic Press).

5.2 Caracterización de anticuerpos monoclonales y PSM'

40 Usando técnicas descritas de manera general en la sección 5.1 mencionada anteriormente e ilustradas en las secciones 6-8, a continuación, se seleccionaron treinta y cinco líneas celulares de hibridoma debido a su producción de anticuerpos monoclonales específicos para el dominio extracelular de PSMA. La presente invención abarca los anticuerpos monoclonales mostrados como ejemplos en las secciones 6, 7 y 8, a continuación, que se unen específicamente a epítopos conformacionales del dominio extracelular de PSMA y PSM', incluyendo particularmente cualquier anticuerpo que inhiba competitivamente la unión de uno cualquiera o más de los anticuerpos mencionados anteriormente a PSMA evaluado en un inmunoensayo enzimático, un radioinmunoanálisis o cualquier otro inmunoensayo de unión competitiva.

50 El anticuerpo 3F5.4G6 es un anticuerpo isótipo de IgM que se une específicamente a PSMA expresado en lisados celulares de cáncer de próstata y sobre la superficie celular de células de cáncer de próstata, así como en sueros obtenidos a partir de pacientes con carcinoma de próstata. Además, 3F5.4G6 también se une específicamente a PSM'. El epítopo de PSMA que reacciona con 3F5.4G6 es extracelular, C-terminal y distinto del reconocido por 7E11-C5 (Horoszewicz *et al.*, Anticancer Res. 7:927-936) que está asociado a la membrana en el citoplasma de la célula. Los anticuerpos 3D7-1.1 y 4E10-1.14 también son anticuerpos de IgM y se unen a PSMA expresado en lisados celulares de cáncer de próstata y sobre la superficie celular. Estos anticuerpos pueden usarse para detectar tanto tumores de cáncer de próstata primarios como metastásicos tales como metástasis óseas de cáncer de próstata. Además, se han generado treinta y dos anticuerpos del isótipo IgG y son específicos para epítopos a lo largo del dominio extracelular de PSMA. Los anticuerpos del isótipo IgG activan la citolisis mediada por el complemento y se unen a células fagocíticas mediante su región Fc. Además, su tamaño inferior y su estabilidad pueden permitir una mejor penetración que IgM en tejidos *in vivo*.

65 Durante el desarrollo de una respuesta frente a anticuerpos, las células productoras de anticuerpos segregan en primer lugar el isótipo IgM que eventualmente cambia a IgG. Tales acontecimientos de cambio de clase se producen mediante transposición de ADN de genes de región constante de manera que se conserva la misma especificidad de antígeno. Los diferentes isótipes de anticuerpos tienen diferentes funciones efectoras. Por ejemplo, IgM y todas las subclases de IgG excepto IgG4 pueden fijar el complemento tras la unión a antígeno. En cambio, IgE se une a mastocitos en una reacción alérgica para desencadenar la liberación de histamina.

ES 2 288 017 T3

Las líneas celulares de hibridoma también producen variantes de cambio de clase durante el cultivo a largo plazo. En particular, se han seleccionado anticuerpos monoclonales que cambian de IgM a IgG o de IgG₁ a IgG_{2a} por su afinidad superior para la proteína A, lo que facilita su purificación. Puede seleccionarse cualquier variante de cambio de clase para una función efectora deseable particular (Spira *et al.*, 1985, En Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine, ed. Springer, pág. 77-88, Plenum Press, NY; Harlow y Carril, 1988 Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory). En el caso de los anticuerpos mostrados como ejemplos, ya que unos pocos de los mismos son del isotipo IgM, es deseable seleccionar también variantes de IgG que presentan la misma especificidad de antígeno, que pueden ser más útiles para ciertos fines *in vitro* o *in vivo*. La presente invención abarca variantes de IgG de los anticuerpos monoclonales de la invención, incluyendo 3F5.4G6, 3D7-1.1 y 4E10-1.14.

Las secciones 6-8, a continuación, muestran que los anticuerpos mostrados a modo de ejemplo reconocen una proteína de 120 kDa de peso molecular. En particular, la mayoría de estos anticuerpos reconocen también una proteína de 105-110 kDa de peso molecular en lisados celulares de tumor de próstata. Mientras que la proteína de 120 kDa también se reconoce por anticuerpo 7E11-C5, la proteína de peso molecular inferior sólo se detecta por los anticuerpos de la invención. Por tanto, la proteína de 105-110 kDa representa el producto de un ARNm conocido como PSM'. Sin embargo, antes de la presente invención, nunca se notificó una proteína de PSM', y se pensaba que era un ARNm no traducido. Ya que se supone que la secuencia de aminoácidos de PSM' carece de las regiones citoplasmática y transmembrana de PSMA tal como se deduce a partir de su secuencia de ARN, resulta coherente que 7E11-C5 no reaccione con este producto debido a su especificidad por un epítopo intracelular. En cambio, los anticuerpos específicos para el dominio extracelular de PSMA también reconocen PSM'.

5.3 Secuencias codificantes de anticuerpos monoclonales específicos para PSMA

En otra realización de la invención, las líneas celulares de hibridoma mostradas a modo de ejemplo pueden usarse para producir composiciones que comprenden un sitio de unión a antígeno o variantes de anticuerpos que combinan las regiones hipervariable o variable murina con la región constante humana o regiones de entramado constante y variable, es decir, anticuerpos químéricos o humanizados así como anticuerpos humanizados que conservan sólo las CDR de unión a antígeno del anticuerpo original en asociación con regiones de entramado humanas (véase, Waldmann, 1991, Science 252:1657, 1662, particularmente 1658-59 y referencias citadas en el mismo). Se espera que tales anticuerpos químéricos o humanizados que conservan especificidad de unión del anticuerpo murino tengan inmunogenicidad reducida cuando se administran *in vivo* para aplicaciones diagnósticas, profilácticas o terapéuticas según la invención.

Aún en otras realizaciones, la invención abarca el uso de las líneas celulares de hibridoma como fuente de ADN o ARNm que contiene genes de inmunoglobulina activados, transpuestos, que pueden aislarse, clonarse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas y transferirse a otras células para la producción de fragmentos de unión a antígeno específicos para el dominio extracelular de PSMA. Aislando ADN transpuesto o preparando ADNc a partir de ARN mensajero de la línea celular de hibridoma de la invención, puede obtenerse una secuencia libre de intrones.

Para ilustración, y de ninguna manera a modo de limitación, puede prepararse una biblioteca de inmunoen expresión y examinarse para seleccionar fragmentos de unión a anticuerpo para PSMA y PSM' tal como sigue (véase, Huse *et al.*, 1989, Sci. 246:1275-1281; Mullinax *et al.*, 1990, Proc. Natl Acad. Sci. USA 87:8045-8099). Puede purificarse ARN total (por ejemplo, usando kits disponibles comercialmente) y convertirse en ADNc usando un cebador de oligo (dT) para la cadena ligera (L) y un cebador específico para la cadena pesada (H) usando transcriptasa inversa. Puede realizarse la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias de cadena H y L de inmunoglobulina por separado con conjuntos de pares de cebadores. Pueden diseñarse cebadores en sentido 5' para hibridarse con secuencias parcialmente conservadas en las regiones líder y/o de entramado de V_H o V_L y pueden diseñarse cebadores en sentido 3' para hibridarse con secuencias de dominio constante. Tales cebadores conservarían preferiblemente la cadena L de longitud completa y proporcionarían cadenas H correspondientes a la Fd de IgG y conservando los enlaces disulfuro H-L. Entonces se digieren por separado los fragmentos de ADN de L y H amplificados mediante PCR y se ligan en vectores de cadena H y L. Tales vectores contienen una secuencia líder pelB, un sitio de unión a ribosoma y codones de detención. Pueden prepararse vectores de fagos λ adecuados para la expresión en *E. coli* a partir de vectores comercialmente disponibles (ImmunoZAP L, ImmunoZAP H; Stratacyte, La Jolla, CA). El ADN de fago recombinante ligado se incorpora en bacteriófagos con extracto de envasado *in vitro* y se usan para infectar *E. coli*. Se explora la biblioteca de inmunoen expresión así creada para seleccionar fragmentos de unión a antígeno usando PSMA, PSM' o un péptido específico de los mismos. Pueden seleccionarse clones positivos e identificarse tal como se describe por Mullinax *et al.* (mencionado anteriormente).

5.4 Usos de composiciones de anticuerpos y anticuerpos específicos del dominio extracelular de PSMA

Aunque los procedimientos y métodos específicos descritos en el presente documento se muestran a modo de ejemplo usando los anticuerpos monoclonales de la invención, son meramente ilustrativos para la práctica de la invención. Pueden usarse fragmentos purificados de los anticuerpos monoclonales que tienen al menos una parte de la región de unión a antígeno, incluyendo fragmentos Fv, F(ab')2, Fab, anticuerpos de cadenas sencillas, anticuerpos químéricos o humanizados o CDR en los procedimientos y métodos descritos a continuación según la presente invención.

5.4.1 Aplicaciones inmunohistológicas e inmunocitológicas

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden usarse para detectar células de carcinoma de próstata en muestras histológicas y citológicas y, en particular, para distinguir tumores malignos de tejidos normales y tumores no malignos. Las muestras de tejido pueden teñirse mediante los anticuerpos y detectarse su unión mediante un segundo anticuerpo conjugado con un marcador tal como peroxidasa, fluoresceína, fosfatasa alcalina y similares.

Además, las técnicas de inmunofluorescencia pueden usar los anticuerpos monoclonales de la presente invención para examinar muestras de tejido, células y líquidos corporales humanos. En un protocolo típico, se secan con aire portaobjetos que contienen secciones de criostato de frotis citológicos o muestras de biopsia de tejido congeladas, sin fijar, se fijan con formalina o acetona, y se incuban con la preparación de anticuerpo monoclonal en una cámara humidificada a temperatura ambiente.

Entonces se lavan los portaobjetos y se incuban adicionalmente con una preparación de anticuerpo dirigido frente al anticuerpo monoclonal, normalmente algún tipo de inmunoglobulina anti-ratón si los anticuerpos monoclonales usados se derivan de la fusión de un linfocito de bazo de ratón y una línea celular de mieloma de ratón. Esta inmunoglobulina anti-ratón se marca con un compuesto, por ejemplo rodamina o isotiocianato de fluoresceína, que fluoresce a una longitud de onda particular. Entonces se determinan el patrón de tinción y las intensidades dentro de la muestra mediante microscopía óptica fluorescente y opcionalmente se registran fotográficamente.

Aún como otra alternativa, puede usarse el análisis de imágenes de fluorescencia potenciado por ordenador o citometría de flujo para examinar muestras de tejido o células exfoliadas, es decir, preparaciones de una única célula a partir de biopsias de aspiración de tumores de próstata usando los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos monoclonales de la invención son particularmente útiles en la cuantificación de células tumorales vivas, es decir, preparaciones de una única célula a partir de biopsias de aspiración de tumores de próstata mediante un analizador de imágenes de fluorescencia potenciado por ordenador o con un citómetro de flujo. Los anticuerpos de la invención son particularmente útiles en tales ensayos para diferenciar tumores de próstata benignos de malignos ya que el PSMA al que se unen los anticuerpos monoclonales se expresa en cantidades aumentadas por tumores malignos. El porcentaje de población de células positivas para PSMA, solo o junto con la determinación de la ploidía del ADN de estas células, puede proporcionar adicionalmente información de pronóstico muy útil proporcionando un indicador temprano de la progresión de la enfermedad.

Aún en otra realización alternativa, los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden usarse en combinación con otros anticuerpos de próstata conocidos para proporcionar información adicional referente al fenotipo maligno de un carcinoma de próstata.

5.4.2 Aplicaciones inmunoserológicas

El uso de los anticuerpos monoclonales de la invención puede extenderse para examinar líquidos biológicos humanos para determinar la presencia de determinantes antigenicos específicos reconocidos. La evaluación inmunoserológica *in vitro* de líquidos biológicos extraídos de pacientes permite así el diagnóstico no invasivo de cánceres. A modo de ilustración, pueden tomarse líquidos biológicos humanos tales como líquido prostático, semen, sangre completa, suero u orina de un paciente y someterse a ensayo para detectar el epítopo específico, ya sea como antígeno liberado o unido a membrana sobre células en el líquido de muestra, usando anticuerpos monoclonales específicos para el dominio extracelular de PSMA y PSM' en radioinmunoanálisis habituales o inmunoensayos unidos a enzimas, inmunoensayos unidos a enzimas de unión competitiva, inmunotransferencia puntual o inmunotransferencia de tipo Western, u otros ensayos conocidos en la técnica.

Además, puede desarrollarse un ensayo diagnóstico más sensible para detectar proteína PSMA o PSM' mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a epítopos no solapantes sobre PSMA y PSM'. Los anticuerpos específicos para extremos opuestos de PSMA tales como 7E11-C5 y los anticuerpos de la invención son particularmente adecuados para su uso en un ensayo de este tipo. Con respecto a esto, puede anclarse un anticuerpo a un sustrato para capturar PSMA o PSM' en un líquido biológico, mientras que se usa el otro anticuerpo para detectar el antígeno unido a anticuerpo. Además, ya que la expresión de PSMA y PSM' está aumentada en cáncer de próstata y tejidos de próstata normales, respectivamente, pueden usarse anticuerpos que distinguen estas dos formas para proporcionar un modo más preciso de monitorizar la regresión del tumor frente a su progresión, tras el tratamiento. Ya que la mayoría de los anticuerpos de la invención reconocen ambas formas, pero 7E11-C5 sólo se une a PSMA, estos anticuerpos pueden usarse en conjunción para determinar los niveles precisos de cada forma en un paciente, correlacionando así sus cantidades con la carga tumoral. Por ejemplo, puede usarse 7E11-C5 como anticuerpo anclado en un ensayo de captura de dos sitios, y puede usarse uno cualquiera de los otros anticuerpos específicos para el dominio extracelular como un anticuerpo de detección para cuantificar el PSMA. Por otra parte, puede usarse cualquier combinación de dos de los anticuerpos específicos para el dominio extracelular de PSMA en un ensayo de captura de dos sitios similar para medir específicamente las concentraciones totales de PSM' más PSMA. Una simple sustracción de PSMA de PSMA y PSM' total cuantifica específicamente el PSM'.

Además de la detección de PSMA y PSM' de dominio extracelular por un anticuerpo monoclonal en tejidos y líquidos corporales, pueden utilizarse mediciones de la actividad enzimática de NAALADasa para cuantificar PSMA y/o PSM' de dominio extracelular en tejidos y/o líquidos corporales.

Por ejemplo, pueden determinarse niveles tisulares homogeneizando y solubilizando tejidos con disolvente, sedimentando el material insoluble mediante centrifugación y midiendo la actividad de NAALADasa en el sobrenadante restante. Igualmente, también puede medirse la actividad de NAALADasa en líquidos corporales sedimentando en primer lugar el material celular mediante centrifugación y realizando un ensayo enzimático típico para determinar la actividad de NAALADasa en el sobrenadante.

También pueden aplicarse protocolos de ensayo de NAALADasa que aprovechan las especificidades de unión a anticuerpos. Por ejemplo, pueden usarse superficies sólidas recubiertas o bien con 7E11-C5, o bien con los anticuerpos de la invención para capturar la proteína PSMA o PSM' para su detección usando un ensayo enzimático de NAALADasa. Por tanto, esto puede usarse para detectar y cuantificar diferencialmente PSM' y proteína PSMA de longitud completa en una muestra dado que un anticuerpo específico para el dominio extracelular se une tanto a PSMA como a PSM', mientras que 7E11-C5 sólo se unirá a PSMA.

También pueden aplicarse ensayos enzimáticos de NAALADasa más convenientes, que aprovechan las propiedades de reacción de la glutamato deshidrogenasa (Frieden, 1959, J. Biol. Chem., 234:2891). En este ensayo, el producto de reacción de la enzima NAALADasa es ácido glutámico. Se deriva de la escisión catalizada por enzimas de glutamato de N-acetilaspartilo para dar ácido N-acetilaspártico y ácido glutámico. El ácido glutámico, en una etapa que requiere NAD(P)⁺, da 2-oxoglutarato más NAD(P)H en una reacción catalizada por glutamato deshidrogenasa. El avance de la reacción puede medirse fácil y convenientemente mediante el cambio en la absorbancia a 340 nm debido a la conversión de NAD(P)⁺ en NAD(P)H. Por tanto, pueden lograrse mejoras al ensayo de la actividad de NAALADasa aplicables a un formato en fase sólida con anticuerpos de captura inmovilizados. De esta manera, pueden realizarse múltiples ensayos simultáneamente en un lector de microplacas basándose en el cambio de absorbancia a 340 nm antes y después de la adición de NAD⁺ o NADP⁺. No se limitará a ensayos en fase sólida, ya que también serán posibles ensayos en disolución, por ejemplo, de suero con este tipo de ensayo de NAALADasa.

Pueden prepararse kits que contienen los anticuerpos monoclonales de la invención o fragmentos de los mismos para diagnóstico, pronóstico y/o monitorización del carcinoma de próstata *in vitro* mediante los métodos inmunohistológicos, inmunocitológicos e inmunoserológicos descritos anteriormente. Los componentes de los kits pueden envasarse o bien en medio acuoso o bien en forma liofilizada. Cuando los anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos) se usan en los kits en forma de conjugados en los que está unido un resto marcador, tal como una enzima o un ión metálico radiactivo, los componentes de tales conjugados pueden suministrarse o bien en forma completamente conjugada, en forma de productos intermedios o bien como restos separados para conjugarse por el usuario del kit.

Un kit puede comprender un vehículo que se compartmentaliza para alojar en confinamiento cerrado en el mismo uno o más medios recipientes o series de medios recipientes tales como tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringuillas o similares. Uno primero de dichos medios recipientes o series de medios recipientes puede contener el anticuerpo monoclonal (o fragmento del mismo) o PSMA o PSM'. Un segundo medio recipiente o serie de medios recipientes puede contener un marcador o producto intermedio de ligador-marcador que puede unirse al anticuerpo primario (o fragmento del mismo), PSMA o PSM'.

5.4.3 Usos de diagnóstico, profilácticos y terapéuticos *in vivo*

Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos de esta invención son particularmente útiles para seleccionar como diana células de cáncer de próstata *in vivo*. Pueden usarse para la localización de tumores para la detección y monitorización así como para el tratamiento de carcinoma de próstata primario y metástasis. Para estas aplicaciones *in vivo*, es preferible usar anticuerpos monoclonales purificados o fragmentos purificados de los anticuerpos monoclonales que tienen al menos una parte de una región de unión a antígeno, incluyendo fragmentos tales como Fv, F(ab')₂, Fab (Harlow y Carril, 1988, Antibody Cold Spring Harbor), anticuerpos de cadenas sencillas (patente estadounidense 4.946.778), anticuerpos químéricos o humanizados (Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851; Newuberger *et al.*, 1984 Nature 81:6851), CDR, y similares. La purificación de los anticuerpos o fragmentos puede lograrse mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, precipitación mediante sulfato de amonio o sulfato de sodio seguido por diálisis frente a solución salina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o inmunoafinidad así como filtración en gel, electroforesis de zona, etc. (véase Goding en, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2^a ed., págs 104-126, Orlando, Fla, Academic Press).

Para su uso en la detección y/o monitorización *in vivo* del carcinoma de próstata, los anticuerpos monoclonales purificados pueden unirse covalentemente, o bien directamente o bien mediante un ligador, a un compuesto que sirve como grupo indicador para permitir la formación de imágenes de tejidos u órganos específicos tras la administración y localización de los conjugados o complejos. Una variedad de diferentes tipos de sustancias puede servir como grupo indicador, incluyendo tales como tintes radiopacos, isótopos metálicos y no metálicos radiactivos, compuestos fluorogénicos, compuestos fluorescentes, isótopos de emisión de positrones, metales no paramagnéticos, etc.

Para su uso en el tratamiento *in vivo* del carcinoma de próstata, los anticuerpos monoclonales purificados pueden usarse solos o unidos covalentemente, o bien directamente o bien mediante un ligador, a un compuesto que destruye y/o inhibe la proliferación de las células o tejidos malignos tras la administración y localización de los conjugados. Cuando se usa el propio anticuerpo, puede mediar la destrucción del tumor mediante fijación del complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse en combinación con un fármaco quimioterapéutico para dar como resultado efectos terapéuticos sinérgicos (Baslya y Mendelsohn,

1994 Breast Cancer Res. and Treatment 29:127-138). Puede conjugarse directamente una variedad de diferentes tipos de sustancias al anticuerpo para usos terapéuticos, incluyendo isótopos metálicos y no metálicos radiactivos, fármacos quimioterapéuticos, toxinas, etc. (Vitetta y Uhr, 1985, Annu. Rev. Immunol. 3:197).

- 5 Según una realización alternativa, para el tratamiento *in vivo* del carcinoma de próstata los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden modificarse para estar en forma de un anticuerpo bifuncional o biespecífico, es decir, un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno específica para el dominio extracelular del antígeno de membrana específico de la próstata y una región de unión a antígeno específica para una célula efectora que tiene actividad tumoricida o inhibidora de tumores. Las dos regiones de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico o bien están unidas químicamente o bien pueden expresarse por una célula diseñada mediante ingeniería genética para producir el anticuerpo biespecífico. (Véase generalmente, Fanger *et al.*, 1995 Drug News & Perspec. 8(3):133-137). Las células efectoras adecuadas que tienen actividad tumoricida incluyen, pero no se limitan a, células T citotóxicas (principalmente células CD8⁺), linfocitos citolíticos naturales, etc. Se administra una cantidad eficaz de un anticuerpo biespecífico según la invención a un paciente con cáncer de próstata y el anticuerpo biespecífico destruye y/o inhibe la proliferación de las células malignas tras la localización en los sitios de tumores primarios o metastásicos que llevan PSMA.

Se describen métodos para la preparación de conjugados de anticuerpo de los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) de la invención útiles para la detección, monitorización y/o tratamiento en las patentes estadounidenses números 4.671.958; 4.741.900 y 4.867.973.

También pueden conjugarse anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno con un péptido o proteína heteróloga mediante conjugación química o tecnología de ADN recombinante. La proteína químérica resultante tiene la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo y la función de la proteína heteróloga. Por ejemplo, puede fusionarse genéticamente un polinucleótido que codifica para la región de unión a antígeno de un anticuerpo específico para el dominio extracelular de PSMA con una secuencia codificante para la cadena zeta del receptor de células T. Tras expresar este constructo en células T, se expanden las células T *ex vivo* y se administran por infusión a un paciente con cáncer de próstata. Las células T que expresan esta proteína químérica se dirigen específicamente a tumores que expresan PSMA como resultado de la especificidad de unión a anticuerpo y provocan la destrucción de células tumorales. Alternativamente, se fusiona un anticuerpo con una proteína que induce la migración de leucocitos o tiene una afinidad para atraer otros compuestos a un sitio tumoral. Una proteína específica de este tipo es la estreptavidina. La unión de un anticuerpo conjugado con estreptavidina a una célula tumoral puede seguirse mediante la adición de un radioisótopo, toxina o fármaco biotinilados para provocar la destrucción específica del tumor.

Pueden prepararse kits para su uso con tales métodos de tratamiento y localización de tumores *in vivo* que contienen los anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos) conjugados con cualquiera de los tipos anteriores de sustancias. Los componentes de los kits pueden envasarse o bien en medio acuoso o bien en forma liofilizada. Cuando los anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos) se usan en los kits en forma de conjugados en los que se une un marcador o un resto terapéutico, tal como un ión metálico radiactivo o un resto de fármaco terapéutico, los componentes de tales conjugados pueden suministrarse o bien en forma completamente conjugada, en forma de productos intermedios o bien como restos separados para conjugarse por el usuario del kit.

6. Ejemplo: Producción de un anticuerpo monoclonal frente a péptido PSMA

45 6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Preparación de péptido de inmunización

Se acopló péptido PSMA nº 716-723 (NH₂-ESKVDPSK-) (SEQ ID NO: 1) a hemocianina de lapa californiana (KLH) como vehículo usando el método de EDC de Pierce (Rockford, IL). Se emulsionó el complejo péptido-KLH en adyuvante incompleto de Freund (Sigma, St. Louis, MO) que contenía dipéptido muramilo 1 mg/ml (MDP, Pierce, Rockford, IL) a una concentración final de 250 µg/ml. Se almacenó la preparación de antígeno emulsionada a 4°C.

6.1.2 Inmunización

55 Se inmunizaron ratones hembra BALB/c por vía subcutánea con 0,1 ml del complejo péptido-vehículo emulsionado cada catorce días durante un periodo de seis semanas. Se sangraron los ratones y se sometieron a prueba sus sueros en un radioinmunoanálisis específico para péptido (RIA) para detectar la presencia de anticuerpos anti-péptido. Se usaron los ratones que dieron positivo para anticuerpos anti-péptido con un título de 1:1.000 o superior como donantes en un protocolo de fusión. Tres días antes de la fusión, se inmunizaron los ratones por vía intraperitoneal con 50 µg de complejo péptido-KLH disuelto en solución salina.

6.1.3 Fusión celular

65 Tres días tras la dosis de refuerzo final con el mismo complejo péptido-KLH, se extrajo de manera aséptica el bazo de un ratón BALB/c y se preparó una suspensión de una única célula. Se lisaron los glóbulos rojos mediante choque osmótico y se suspendieron los linfocitos restantes en medio RPMI-1640. Se mezclaron los esplenocitos con células de mieloma P3X63Ag8U.1 (X63) (CRL 1597 de ATCC, Rockville, MD) con una razón de 10:1 (100 X 10⁶

esplenocitos: 10×10^6 células de mieloma X63). Se realizó la fusión de los esplenocitos con células X63 mediante el método de Galfre y Milstein (1981, Methods in Enzymology, Vol.73, Immunochemical Techniques, Part B). Se seleccionaron células de hibridoma mediante la inclusión de aminopterina en el medio de cultivo celular (RPMI-1640-suero de ternero fetal al 20%).

5

6.1.4 Exploración de hibridomas primarios

Se retiraron cincuenta microlitos (μl) de sobrenadante de cultivo celular de cultivos de hibridomas individuales y se sometieron a prueba en un RIA específico para péptido para detectar la presencia de anticuerpos específicos para péptido. En resumen, se añadieron los sobrenadantes a los pocillos de una placa Pro-Bind de 96 pocillos (Falcon) que se había recubierto previamente con péptido acoplado a albúmina sérica bovina (BSA) a $50 \mu\text{g}/\text{ml}$. Tras una incubación durante la noche a 4°C , se lavaron las placas cuatro veces con PBS-BSA al 0,1%. Se añadieron cincuenta microlitros de una dilución 1:500 de IgM e IgG de conejo anti-ratón (ICN) a cada pocillo y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas cuatro veces tal como anteriormente y se añadieron $50 \mu\text{l}$ de ^{125}I -Proteína A a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces tal como anteriormente. Se expusieron las placas a una película de autoradiografía (Kodak, X-OMAT) durante la noche y se revelaron. Se seleccionaron los pocillos positivos y se expandieron las células en medio de cultivo celular para pruebas adicionales.

20 6.1.5 Selección mediante inmunotransferencia de tipo western

Se sometieron a prueba los sobrenadantes de los pocillos positivos y expandidos en un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western para detectar anticuerpos anti-PSMA. Se hicieron pasar lisados de la línea de células tumorales LNCaP (CRL 1740 de ATCC, Rockville, MD), un tumor de próstata que expresa PSMA, sobre un gel de SDS-poliacrilamida durante 90 minutos a 175 voltios. Se sometieron a electroinmunotransferencia las proteínas sometidas a electroforesis en una membrana Immobilon-PTM y se bloqueó la membrana mediante una incubación durante la noche con BLOTOO al 5% en solución salina tamponada con Tris. Se colocó la membrana en un aparato de múltiples selecciones de Bio-Rad (Bio-Rad) y se pipetearon aproximadamente $650 \mu\text{l}$ de sobrenadante de hibridoma en carriles individuales. Se incubó la membrana durante 90 minutos a temperatura ambiente y se lavó la inmunotransferencia 5 veces con solución salina tamponada con Tris-Tween-20 al 0,5% (TBS-T). Se incubó la inmunotransferencia lavada con una disolución 1:5.000 de IgG de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la inmunotransferencia 5 veces tal como anteriormente y se incubó durante 1 minuto con 2 ml de sustrato quimioluminiscente LumiGLOTM (KPL, Gaithersburg, MD). Se expuso la inmunotransferencia a una película de autoradiografía y se reveló. Se identificaron pocillos de hibridoma positivos (reactividad anti-PSMA) y se seleccionaron para desarrollo adicional.

6.1.6 Clonación de dilución limitante

Se clonaron mediante dilución limitante los pocillos con hibridoma primario positivo identificados mediante su reactividad frente a PSMA en el ensayo de inmunotransferencia de tipo Western descritos anteriormente. Se ajustaron las células hasta 1 célula/ml en medio de cultivo celular completo que contenía timocitos singénicos como población de células de alimentación. Se dispuso la suspensión celular en alícuotas de $200 \mu\text{l}$ en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Tras 7-10 días de cultivo, las colonias de células eran visibles. Se escogieron los pocillos que contenían colonias únicas y se expandieron las células en placas de 24 pocillos (cultivos de 1,5 ml). Se recogieron sobrenadantes de las células clonales y se sometieron a prueba para detectar anticuerpos anti-PSMA en el ensayo de inmunotransferencia de tipo Western descrito anteriormente. Se expandieron los clones positivos y se congelaron en nitrógeno líquido.

50 6.1.7 Generación de líquido ascítico y purificación de anticuerpos

Se trataron previamente ratones BALB/c con 0,4 ml de pristano por vía intraperitoneal 7-10 días antes de la inyección de 10×10^6 células de hibridoma. Se extrajo el líquido ascítico que contenía anticuerpo monoclonal a intervalos periódicos y se almacenó a 4°C . Se purificó el anticuerpo monoclonal del líquido ascítico usando el kit de purificación de IgM ImmunoPureTM de Pierce (Rockford, IL).

55

6.1.8 Inmunoprecipitación de PSMA

Se incubaron aproximadamente 10×10^6 células tumorales LNCaP con 1 ml de tampón de lisis NP-40 (NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, Tris 50 mM) durante 30 minutos a 4°C . Se centrifugó el lisado a 12.000 rpm y se aclaró previamente el sobrenadante resultante incubando con $50 \mu\text{l}$ de suero de ratón normal durante 30 minutos seguido por la adición de $60 \mu\text{l}$ de una suspensión al 20% de perlas de agarosa con IgM anti-ratón. Tras la incubación durante 1 hora a 4°C , se centrifugó la preparación para eliminar las perlas y se hizo reaccionar el sobrenadante resultante con anticuerpo monoclonal 3F5.4G6. Se añadieron diversas cantidades de anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 (2,5, 5, y $10 \mu\text{g}$) a tres lisados repetidos y se incubaron durante 1 hora a 4°C . Se añadieron cien microlitros de una suspensión al 10% de perlas de agarosa con IgM anti-ratón (Sigma) y se incubaron los lisados durante otra hora a 4°C . Se centrifugaron los lisados a 12.000 rpm y se lavaron las perlas de agarosa tres veces con tampón de lisis NP-40. Se añadieron treinta microlitros de tampón de muestra de electroforesis a las perlas y se calentaron durante diez minutos a 95°C . Se centrifugaron brevemente las perlas a 12.000 rpm y se cargó el tampón de muestra sobre un gel de SDS-

ES 2 288 017 T3

poliacrilamida. Tras la electroforesis, se sometieron a electroinmunotransferencia las muestras tal como se describió anteriormente y se realizó una inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo monoclonal específico para PSMA 7E11-C5 como anticuerpo indicador.

5 6.1.9 Análisis de citometría de flujo

En primer lugar se aclararon las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadió una disolución de Versene (0,2 g de EDTA.4Na/L) (2 ml para un recipiente de 75 cm²). Se eliminó la mayor parte de la disolución de Versene mediante aspiración antes de la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió PBS y se desalojaron las células mediante pipeteado. Se lavaron las células dos veces con PBS y se realizó el recuento. Se incubaron de quinientas mil a un millón de células sobre hielo con 50 µl de anticuerpo primario durante 30 minutos, seguido por dos lavados con PBS. Posteriormente se incubaron las células sobre hielo con 50 µl de anticuerpo secundario marcado con FITC (IgG de cabra anti-ratón para 7E11-C5 o IgM de cabra anti-ratón para 4G6) durante 30 minutos. Se eliminó mediante lavado el anticuerpo secundario en exceso de las células con PBS. Se analizó la fluorescencia usando un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA). Se excluyeron los desechos celulares de las poblaciones celulares que se analizaron basándose en sus perfiles de dispersión directa y lateral.

20 6.1.10 Ensayos de suero mediante inmunotransferencia de tipo western

Se diluyeron muestras de suero 1:7 en tampón de lisis (Triton X-100 al 1%, HEPES 50 mM, glicerol al 10%, MgCl₂ 15 mM, AEBSF 1 mM, EGTA 1 mM). Se diluyó lisado de LNCaP 1:35 en tampón de lisis. Entonces se combinaron las muestras diluidas a una razón de 2:3 con tampón de muestra (tampón reductor de SDS). Se hicieron pasar muestras (20 µl) sobre SDS al 8,5% -PAGE (concentración final de proteína de 93 mg por muestra, tal como se determinó usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad), y se sometieron las proteínas separadas a inmunotransferencia sobre membrana PVDF durante una hora a 90 voltios. Entonces se bloquearon las membranas durante la noche en leche al 5%-TBS. Al día siguiente, se analizaron las membranas con sonda de anticuerpo 7E11-C5 3 µg/ml en TBS-T durante una hora, se lavaron 5 veces durante cinco minutos en TBS-T, y se analizaron con sonda de anticuerpo secundario de oveja marcado con peroxidasa del rábano anti-ratón 167 ng/ml en TBS-T durante 30 minutos. De nuevo, se lavaron las membranas 5 veces durante cinco minutos cada vez en TBS-T y se revelaron las membranas usando el kit de sustrato quimioluminiscente (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) (Rochon *et al.*, 1994, The Prostate 25:219-223).

Se visualizaron las inmunotransferencias mediante exposición de película de rayos X, revelando una banda de proteína de aproximadamente 120 kD. Se exploró la imagen de inmunotransferencia con un explorador Microtek ScanMaker IIHR y se midieron las intensidades de banda mediante "análisis realizado en un ordenador Macintosh Quadra 605 usando el programa de imagen NIH de dominio público (escrito por Wayne Rasband en los Institutos Nacionales Estadounidenses de la Salud y disponibles en internet mediante ftp anónimo de zippy.nimh.nih.gov o en discuetes de NTIS, 5285 Port Royal Rd., Springfield, VA 22161, número de parte PB93-504868)". Se evaluaron todas las muestras de pacientes frente a una muestra de donante normal sano, y una muestra de paciente con cáncer de próstata con PSMA elevado, de la misma inmunotransferencia de tipo Western que los controles habituales.

45 6.1.11 Detección de la actividad enzimática de PSM'

Se recogieron cien mil ml de semen humano de donantes pagados según las directrices de la OMS para pruebas de fertilidad. Se sedimentó el material celular mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 minutos y se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se dializó durante la noche frente a dos cambios de tampón Tris 20 mM, pH 7,6. Se centrifugó el dializado de nuevo a 10.000 rpm y se cargó sobre una columna de DEAE-sephacryl que se había lavado previamente con tampón Tris 20 mM, pH 7,6. Entonces se lavó de nuevo la columna cargada con 500 ml del mismo tampón y se separaron las proteínas aplicando un gradiente de tampón Tris de 20 mM a 200 MM a pH 7,6. Se recogieron fracciones de 5 ml. Se determinó la presencia de PSMA en cada fracción mediante inmunotransferencia puntual de tipo Western usando el anticuerpo monoclonal 7E11-C5. Se combinaron las fracciones que contenían bandas proteicas que reaccionan con 7E11-C5 y se precipitaron usando sulfato de amonio al 70%. Se sedimentaron las proteínas precipitadas mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 minutos y luego se resuspendieron en 1 litro de tampón Tris 200 mM, pH 7,6. Entonces se dializaron las proteínas solubilizadas frente a dos cambios de tampón Tris 20 mM, pH 7,6. Entonces se cargó el material dializado sobre una columna de Sephadryl previamente lavada y se eluyeron las proteínas, se recogieron fracciones de tres ml. Se realizó una inmunotransferencia puntual de tipo Western sobre la proteína eluida usando el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6. Las fracciones 88-96 fueron positivas y cada una de esas fracciones se sometió a prueba para determinar la pureza mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

60 6.2 Resultados

Con el fin de generar anticuerpos monoclonales frente al dominio extracelular de PSMA, se analizaron varias regiones de la proteína con respecto a su hidrofilia relativa basándose en el método de Hopp y Woods (1983, Mol. Immunol. 20:483-489).

ES 2 288 017 T3

La tabla 1, a continuación, ilustra la hidrofilia relativa de varios péptidos examinados. En particular, se sintetizó un péptido que tiene la secuencia de ESKVDPSK (Glu-Ser-Lys-Val-Asp-Pro-Ser-Lys) (SEQ ID NO: 1) correspondiente a residuos de aminoácidos números 716-723 en la región C-terminal de PSMA. Adicionalmente, podían usarse otras partes del dominio extracelular tal como se muestra en la tabla 1 o el propio dominio extracelular entero para producir anticuerpos frente al dominio extracelular. En cambio, dos péptidos de aminoácidos correspondientes al residuo nº 44-58 y residuo nº 196-213 indujeron respuestas de anticuerpo anti-péptido que no se unieron a PSMA nativo.

10

TABLA 1

15

Hidrofilia relativa de péptidos PSMA

20

25

PÉPTIDO (aminoácido nº)	HIDROFILIA RELATIVA
63-69	1,41
183-191	1,24
404-414	1,45
479-486	1,5
716-723	1,39

Antes de la inmunización, se conjugó en primer lugar el péptido ESKVDPSK (SEQ ID: NO: 1) con KLH como vehículo. Entonces se inmunicaron los ratones y se administraron dosis de refuerzo con el mismo material conjugado a intervalos semanales. Se aislaron bazos de animales con títulos séricos de anti-péptido detectables y se fusionaron con células de mieloma.

Se realizaron selecciones iniciales mediante ensayos de unión usando BSA unido a péptido como antígeno. Se retiraron cincuenta μ l de sobrenadante de cultivo celular de los cultivos de hibridomas individuales y se sometieron a prueba en un radioinmunoanálisis específico para péptido para detectar la presencia de anticuerpos específicos para péptido. En resumen, se añadieron los sobrenadantes a pocillos de una placa de 96 pocillos Pro-Bind que se habían recubierto previamente con péptido acoplado a albúmina sérica bovina (BSA). Tras una incubación durante la noche a 4°C, se lavaron las placas con PBS. Se añadieron cincuenta μ l de una dilución 1:500 de IgM e IgG de conejo anti-ratón a cada pocillo y se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las placas 4X y se añadieron 50 μ l de 125 I-Proteína A a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron 4X tal como anteriormente. Se expusieron las placas a película de autoradiografía durante la noche y se revelaron. Se seleccionaron pocillos positivos y se expandieron las células en medio de cultivo celular para pruebas adicionales. Entre los pocillos positivos identificados, se sometió adicionalmente a prueba un hibridoma denominado 3F5 en un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western y se mostró que su anticuerpo secretado reaccionaba con PSMA contenido en lisados de LNCaP. Se cultivaron las células LNCaP tal como se describe por Horoszewicz *et al.* (1983, Cancer Res. 43:1809-1818), y se prepararon los lisados tal como se describe por Rochon *et al.* (1994, Prostate 25:219-223). Se clonaron las células de hibridoma 3F5 mediante dilución limitante, se expandieron en números y volvieron a someterse a prueba en un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western. Un subclon del anticuerpo denominado como 3F5.4G6 reaccionó con una proteína de 120 kDa de peso molecular en los lisados de LNCaP (figura 2). Se determinó el isotpico de este anticuerpo como IgM. Se usó ISOStrip obtenido de Boehringer Mannheim para determinar el isotpico de anticuerpos monoclonales de ratón, para determinar el isotpico de 3F5.4G6. Se diluyó el anticuerpo monoclonal 1:100 en PBS y se añadió la muestra diluida (150 μ l) a un tubo de revelado suministrado con el kit y se incubó durante 30 segundos a temperatura ambiente y después se agitó brevemente. Entonces se introdujo la tira de isotpico dentro del tubo y se reveló durante 5 minutos. Apareció una banda azul o bien en la sección lambda o bien en la kappa de la tira así como en una de las secciones de clase o subclase. Se identificó el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 como un isotpico IgM.

Se sometió a pruebas adicionales el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 frente a sueros tomados de pacientes con cáncer de próstata en estadio D2 en progresión, usando anticuerpo monoclonal 7E11-C5 como control (figura 3). Ambos anticuerpos identificaron una banda de aproximadamente 120 kDa de peso molecular (figura 3). Se realizó un ensayo adicional de inmunotransferencia de tipo Western de células LNCaP usando el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 usando un anticuerpo secundario específico para IgM (figura 4). Mientras que el anticuerpo monoclonal 7E11-C5 reconoció una única banda de aproximadamente 120 kDa, es decir, PSMA, 3F5.4G6 reconoció una banda de peso molecular similar así como una banda de aproximadamente 105-110 kDa. Esta banda corresponde a la forma de proteína prevista de PSM', y demuestra la utilidad de un anticuerpo que reconoce específicamente el dominio extracelular tanto de PSMA como de PSM'.

La reactividad de 7E11-C5 con una proteína de 120 kDa en los sueros de pacientes con cáncer de próstata era específica del anticuerpo, y no debida a la reactividad no específica del anticuerpo secundario con proteínas séricas en general. En un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western, se hizo reaccionar papel Immobilon P que contenía proteínas separadas derivadas de muestras de suero o bien con anticuerpo monoclonal 7E11-C5 más anticuerpo secundario acoplado a HRP o bien sólo con anticuerpo secundario acoplado a HRP. Se expuso la película durante 1 min o se sobreexpresó durante 45 min con el fin de demostrar la no reactividad del anticuerpo secundario con cualquier proteína de 120 kDa en los sueros. También se usó el mismo anticuerpo secundario con 3F5.4G6 para detectar el mismo antígeno. Por tanto, el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 fue específico para PSMA y PSM'.

La figura 5 confirma que la proteína identificada por 7E11-C5 también se reconoció por el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6. Además, el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 también reconoció una proteína de 105-110 kDa no detectada por el anticuerpo monoclonal 7E11-C5. Esta proteína de migración más rápida correspondía a PSM'. Cuando se precipitó en primer lugar el lisado con 7E11-C5, y se analizaron las proteínas restantes con sonda de 7E11-C5, el anticuerpo no detectó ninguna proteína (carril 4). En cambio, cuando se analizó el lisado tratado previamente con 7E11-C5 con sonda de 3F5.4G6, detectó una proteína de aproximadamente 110 kDa. La figura 6 muestra que la proteína de 120 kDa, es decir PSMA, inmunoprecipitada por 3F5.4G6 también se reconocía por 7E11-C5.

La figura 7A y B demuestra que el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 reconoció células LNCaP vivas mediante análisis de FACS, confirmando que 3F5.4G6 reconocía el dominio extracelular de PSMA. Un anticuerpo de este tipo que reconoce el dominio extracelular de PSMA es particularmente útil como herramienta de diagnóstico y/o terapéutica en el cáncer de próstata.

Se hizo reaccionar semen humano con un anticuerpo específico para PSMA y se sometió a ensayo para detectar la actividad enzimática. La figura 8 ilustra que la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 en el carril 2 tiene un peso molecular aproximado de 90 kDa. Aunque se mostró que PSM' tiene un peso molecular de 105-110 kDa en lisados de LNCaP, era posible que la proteína de 90 kDa en el semen fuera un producto no glucosilado o parcialmente glucosilado de PSM'. Ya que PSM' contiene varios sitios de glucosilación, este peso molecular inferior fue el resultado de actividades por glucosidasas en el semen. Se ilustra que PSMA no estaba presente en esta preparación purificada por el hecho de que 3F5.4G6 reconoció una proteína de 120 kDa de peso molecular (carril 1) presente en un lisado de células LNCaP que es PSMA, pero no reconoció una proteína de este peso molecular en el carril 2. Además, el anticuerpo 7E11-C5 no reconoció la banda de 90 KDa en el semen.

Entonces se sometió a ensayo esta preparación purificada de PSM' reconocida por el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 para determinar la actividad de NAALADasa. Se usó el sobrenadante de alta velocidad preparado a partir de un lisado de LNCaP como control positivo. La proteína que reaccionaba positivamente con el anticuerpo monoclonal 3F5.4G6 y que era coherente con que fuese PSM', contenía actividad NAALADasa inherente de 16,9 nmol/min/mg de proteína usando el ensayo descrito en Robinson *et al.* (1987, J. Biol. Chem. 262:14498-14506).

7. Ejemplo: Producción de anticuerpos monoclonales frente a una preparación de membrana de células tumorales que contiene PSMA

7.1 Materiales y métodos

7.1.1 Inmunización

Se obtuvieron células de carcinoma de próstata LNCaP de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD. Se prepararon membranas de LNCaP a partir de dos placas de 150 mm eliminando las células en una disolución de Versene seguido por centrifugación hasta sedimentar las células. Se añadió agua destilada al sedimento celular y se homogeneizaron las células usando un homogeneizador de tipo Dounce. Se centrifugó la suspensión homogeneizada a 30.000 xg y se usó la fracción de membrana sedimentada para la inmunización.

Se inmunizaron ratones BALB/c hembra adultos por vía intraperitoneal cuatro veces (intervalos de 2-3 semanas) con una preparación de membrana de LNCaP emulsionada en adyuvante completo de Freund. Cinco días antes de la fusión celular, se administró una dosis de refuerzo a los ratones de 50 µg de PSMA en PBS purificado por inmunoafinidad. Se realizó la fusión celular tal como se describe en la sección 6.1.3 mencionada anteriormente.

7.1.2 Selección de hibridomas primarios

Se empleó un ensayo basado en ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) en fase sólida para la detección de anticuerpos específicos para PSMA. Se recubrieron PSMA purificado por inmunoafinidad, PSMA de longitud completa expresado en baculovirus, o proteínas de fusión expresadas por bacterias que contienen fragmentos de PSMA sobre pacas de 96 pocillos Maxi-Sorp (Nunc Immuno, Rochester, NY) con una incubación durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas con PBS-Tween-20 al 0,2% y se bloquearon los sitios restantes con una disolución al 5% de BSA durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron cincuenta microlitros (μ l) de sobrenadante de los cultivos de hibridoma a los pocillos recubiertos con PSMA y se incubaron las placas durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tal como anteriormente y se añadieron 50 μ l de dilución 1:600 de IgG de conejo anti-ratón e IgM de conejo anti-ratón (ICN, Costa Mesa, CA) a cada pocillo. Tras una incubación de una hora a temperatura ambiente, se lavaron las pacas tal como anteriormente y se añadieron 50 μ l de una dilución 1:400 de Proteína A conjugada

con HRP (Sigma, St. Louis, MO) a cada pocillo. Tras una incubación de una hora a temperatura ambiente, se lavaron las placas tal como anteriormente y se añadieron 100 μ l de disolución ABTS (150 mg de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico en 500 ml de ácido cítrico 0,1 M, pH 4,35)/H₂O₂ (10 μ l de H₂O₂ al 30% por 10 ml de disolución ABTS) cromógeno/sustrato a cada pocillo. Se leyeron las placas en un lector de microplacas y se midió la DO405. Se clonaron las células de hibridoma que producían sobrenadantes con valores de DO 0,0 por encima del fondo mediante dilución limitante y se sometieron a análisis adicional.

Para una captura en fase sólida de PSMA, se modificó el ensayo mencionado anteriormente tal como sigue: se añadieron cincuenta microlitros de una disolución 40 μ g/ml de anticuerpo monoclonal 7E11-C5 anti-PSMA en tampón de unión NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,2 a pocillos de una placa Maxi-Sorp y se dejaron adherirse durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas y se bloquearon tal como anteriormente. Se añadieron cincuenta microlitros de PSMA purificado por inmunoafinidad diluido en serie a los pocillos recubiertos con 7E11-C5 y se incubaron las placas durante dos horas a temperatura ambiente. Tras un lavado extenso, se añadieron 50 μ l de un sobrenadante de cultivo tisular no diluido de clones de hibridoma o bien de 3D7-1.1 o bien de 4E10-1.14 a los pocillos y se incubaron las placas durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras lavarlas tal como anteriormente, se analizaron los pocillos con sondas de 50 μ l de una dilución 1:1000 de IgM de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Tras un lavado extenso, se añadieron 100 μ l de ABTS/H₂O₂ a cada pocillo y se leyeron las placas en un lector de microplacas tal como se describió anteriormente.

7.1.3 Purificación por inmunoafinidad de PSMA

Se homogeneizaron diecisésis mililitros de células LNCaP empaquetadas en 5 volúmenes de Tris-HCL 25 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 al 1% (Sigma, St. Louis, MO) mediante dos carreras de un homogeneizador Potter-Elvehjem seguido por agitación durante la noche a 4°C. Se centrifugó el extracto a 100.000 xg durante 1 hora y volvió a extraerse el sedimento tal como anteriormente. Se mezclaron los sobrenadantes combinados en frío durante la noche con Immunobeads de 7E11-C5 (Pierce, Rockford, IL) (volumen de lecho de resina de 3-5 ml). Se centrifugaron las perlas, se lavaron extensamente con tampón de homogenización y se vertieron en una columna. Se lavaron las perlas de nuevo con tampón de homogenización adicional que contenía NP-40 al 1% seguido por un lavado adicional con tampón que contenía Triton X-100R al 1% (Aldrich, Milwaukee, WI). Se eluyeron las perlas lavadas con tampón de glicina 100 mM, pH 2,5, NaCl 150 mM, Triton X-100R al 1% en fracciones de 2 ml. Se monitorizó la elución de proteínas a DO280.

Se analizaron fracciones que contenían proteína mediante geles SDS-PAGE usando tinción con plata e inmunotransferencia de tipo Western. En preparaciones típicas, la banda de proteína de 120 kDa correspondiente a la reactividad de 7E11-C5 en una inmunotransferencia de tipo Western fue pura al 60-80%. Un rendimiento aproximado de 16 ml de células empaquetadas fue de 1 miligramo de proteína PSMA. Se eliminó el detergente en la preparación de PSMA haciendo pasar la disolución sobre una columna Extractigel (Pierce). Se liofilizó la proteína y se dializó extensamente con PBS antes de su uso en la inmunización o selección de hibridomas.

7.1.4 Análisis por citometría de flujo

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos monoclonales para reconocer epítopos externos o extracelulares de PSMA mediante citometría de flujo. Se recogieron células LNCaP (que expresan PSMA) y PC-3 (que no expresan PSMA) recientes de recipientes de cultivo tisular y se preparó una suspensión de una única célula. Se resuspendieron aproximadamente un millón de células en un ml de sobrenadante de cultivo tisular no diluido de clones de hibridoma o bien 3D7-1.1 o bien 4E10-1.14 y se incubaron sobre hielo durante dos horas. Se lavaron las células dos veces con PBS-BSA al 0,1%, azida de Na al 0,01%, se resuspendieron en 100 μ l de una dilución 1:100 de IgM de conejo anti-ratón conjugada con FITC (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA) y se incubaron sobre hielo durante otros 30 minutos. Se lavaron las células dos veces tal como anteriormente, se resuspendieron en 500 μ l de tampón de lavado y se analizaron para determinar la tinción fluorescente mediante FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA) con el software de adquisición CellQuest.

7.1.5 Análisis de inmunotransferencia de tipo western

Se sometieron a prueba sobrenadantes de cultivo tisular de los clones de hibridoma 3D7-1.1 y 4E10-1.14 en un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la reactividad de PSMA. Se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western siguiendo el protocolo de Pelletier y Boynton (1994, J. Cell. Physiol. 158:427-434). En resumen, se sometieron a electroforesis lisados de células LNCaP y PC-3, PSMA purificado por inmunoafinidad, o PSMA de longitud completa expresado por baculovirus, en un gel de SDS al 8,5%-PAGE, y se sometieron a electroinmunotransferencia las proteínas separadas sobre una membrana PVDF durante una hora a 90 voltios. Se bloquearon las membranas durante la noche en BLOTTTO al 5% y se incubaron durante 90 minutos con 20 ml de sobrenadante de cultivo tisular no diluido del clon apropiado. Se retiró el sobrenadante, se lavaron las inmunotransferencias cinco veces con TBS-Tween-20 al 0,5% (TBS-T) y se analizaron con una sonda de dilución 1:5.000 de anticuerpo secundario IgM de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (Jackson) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó la membrana cinco veces con TBS-T, se reveló usando el kit de sustrato quimioluminiscente (KPL, Gaithersburg, MD) y se visualizó exponiendo la película de rayos X (Kodak).

7.1.6 Preparación de PSMA recombinante mediante sistema de expresión de baculovirus

Se clonó un inserto que contenía la secuencia codificante de longitud completa de PSMA (Israeli *et al.*, 1993, Cancer Res. 53:227-230) a partir de una biblioteca humana de pDR2 Lambda (Clontech, Palo Alto, CA) usando sondas específicas para la secuencia de genes. Se escindió el inserto de este vector mediante digestión con SmaI y SspI y se clonó en el vector de transferencia pAcHLT-C (Pharmingen, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante. La transfección conjunta del vector de transferencia con ADN viral linealizado BacPAK6 (Clontech) dio el virus que codificaba para la proteína PSMA de longitud completa que contenía una cola de polihistidina en el extremo N-terminal de la proteína que va a usarse para el aislamiento de proteínas mediante unión a una columna de Ni-NTA. 5 Se produjo la proteína PSMA aislando partículas de baculovirus recombinantes purificadas en placas, amplificando e infectando células Sf9 a una multiplicidad de infección de aproximadamente 1:2 en presencia de medio SFM II (Gibco-BRI, Gaithersburg, MD) complementado con FBS al 5% (Hyclone, Logan, UT). Tras una incubación de 48 h, se recogieron las células infectadas y se lisaron en CHAPS al 1% y se recuperaron mediante Ni-NTA-Agarosa 10 (Quiagen, Chatsworth, CA) con elución con imidazol según las instrucciones del fabricante. Se dializó el producto final extensamente frente a PBS. 15

7.2 Resultados

Se generaron anticuerpos monoclonales frente a membranas de carcinoma de próstata que contenían PSMA. Se seleccionaron dos clones de hibridoma, 3D7-1.1 y 4E10-1.14, mediante un inmunoensayo en fase sólida usando PSMA nativo purificado por inmunoafinidad de células LNCaP y fragmentos de PSMA expresados por bacterias correspondientes a las regiones de aminoácidos 1-173, 134-437, y 438-750. Los sobrenadantes de los clones de hibridomas 3D7-1.1 y 4E10-1.14 demostraron una unión comparable al PSMA nativo comparado con el anticuerpo 7E11-C5 (figura 9). La unión a BSA no específica de fondo fue esencialmente comparable para las tres preparaciones de 20 anticuerpos. 25

Cuando se sometió a prueba la especificidad de unión a epítopo, el anticuerpo monoclonal 7E11-C5 se unió al fragmento de aminoácidos 1-173 que contiene el dominio intracelular N-terminal de PSMA. Aunque 3D7-1.1 y 4E10-1.14 presentaron una unión modesta a este fragmento, estos dos anticuerpos monoclonales demostraron la unión más fuerte al fragmento de aminoácidos 134-437 de PSMA, que es parte del dominio extracelular de PSMA (figura 9). Ya que este fragmento es una parte de PSM', estos anticuerpos también reaccionan con PSM'. 30

Se sometió a prueba adicionalmente el sobrenadante del clon de hibridoma 3D7-1.1 en un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western frente a lisados de células LNCaP y PC-3, y PSMA purificado por inmunoafinidad. 35 La figura 10 muestra que 3D7-1.1 reacciona con una banda de 120 kDa presente en células LNCaP (carril 1) pero no en células PC-3 (carril 2). Ambos carriles 1 y 2 presentan reactividad que se debió lo más posiblemente a unión no específica del reactivo de anticuerpo secundario. El carril 3 que contiene PSMA purificado por inmunoafinidad muestra una banda principal a 120 kDa cuando se analiza con sonda de anticuerpo monoclonal 3D7-1.1. También se obtuvieron datos de inmunotransferencia de tipo Western similares con sobrenadante del clon 4E10-1.14 40 aunque el fondo no específico de la inmunotransferencia fue muy superior al de 3D7-1.1. Por tanto, tanto 3D7-1.1 como 4E10-1.14 reaccionan con una banda de 120 kDa presente en células LNCaP y con PSMA purificado por inmunoafinidad. 45

Se sometió a electroforesis PSMA de longitud completa expresado por baculovirus sobre un gel SDS-PAGE y se sometió a electroinmunotransferencia a una membrana PVDF. Se insertó la inmunotransferencia en un aparato Mini-Protean II Multi-Screen (Bio-Rad), se analizó con sondas de una variedad de preparaciones de anticuerpos y se reveló como una inmunotransferencia de tipo Western. La figura 11 muestra que los anticuerpos monoclonales 3D7-1.1 y 4E10-1.14 reaccionaron con una banda de proteína que correspondía a la misma banda unida por el anticuerpo monoclonal 7E11-C5. 50

Se tiñeron células LNCaP y células PC-3 con sobrenadantes de clones de hibridomas 3D7-1.1 y 4E10-1.14 y se analizaron mediante citometría de flujo. Ambos anticuerpos tiñeron células LNCaP vivas, no fijadas, pero no tiñeron células PC-3 (figura 12A-D). Estos resultados confirman que estos dos anticuerpos reaccionan con epítopos en el dominio extracelular de la molécula de PSMA. Además, el distinto desplazamiento en la tinción de LNCaP observados con anticuerpo monoclonal 4E10-1.14 comparado con el hombro observado con 3D7-1.1 sugiere que estos dos anticuerpos reconocen diferentes epítopos en esta región particular de la molécula de PSMA. 55

Se desarrolló un ELISA de captura de dos sitios para PSMA utilizando el anticuerpo monoclonal 7E11-C5 como reactivo de captura de PSMA y anticuerpos monoclonales 3D7-1.1 y 4E10-1.14 como anticuerpos indicadores o de detección. Ya que estos anticuerpos reconocen diferentes epítopos en la molécula de PSMA (7E11-C5 reactivo con los 6 aminoácidos N-terminales; 3D7-1.1 y 4E10-1.14 reactivos con una secuencia en la región de aminoácidos 134-475), forman un par eficazmente en el ensayo de captura de dos sitios. Usando PSMA purificado por inmunoafinidad diluido en serie como antígeno de prueba, los sobrenadantes tanto de 3D7-1.1 como de 4E10-1.14 pudieron detectar PSMA tras la captura sobre placas de 96 pocillos recubiertas con 7E11-C5 (figura 13). Adicionalmente, se sometió a prueba PSMA purificado de células LNCaP y semen así como una preparación en bruto de PSMA de longitud completa expresado por baculovirus (figura 14). Se observaron lecturas de DO_{405} significativas para el antígeno control PSMA, semen, y la preparación de PSMA de baculovirus. Cuando se diluyó PSMA purificado en suero humano normal de mujeres y se sometieron a ensayo las muestras usando el ensayo de captura de dos sitios, los mismos anticuerpos

ES 2 288 017 T3

también detectaron PSMA (figura 15). Por tanto, el ensayo de captura de dos sitios desarrollado con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a diferentes partes de PSMA detectó PSMA de una variedad de fuentes de una manera específica para el antígeno.

5 Se desarrolló un ELISA de captura de dos sitios alternativa para PSMA usando anticuerpo monoclonal 3D7-1.1 como reactivo de captura de PSMA y anticuerpo monoclonal 7E11-C5 como anticuerpo indicador o de detección. Se usó PSMA purificado por inmunoafinidad diluido en serie como antígeno de prueba, se capturó sobre placas recubiertas con 3D7-1.1 y se detectó usando anticuerpo monoclonal 7E11-C5 biotinilado. Los resultados se muestran en la figura 16. La figura 16 demuestra que los anticuerpos monoclonales tales como 3D7-1.1 o 4E10-1.14 que se unen 10 específicamente al dominio extracelular de PSMA son útiles en un ELISA de captura de dos sitios para PSMA.

La utilidad de 3D7-1.1 para la captura de PSMA indica que otros inmunoensayos alternativos que se basan exclusivamente en el dominio extracelular de la proteína PSMA serán útiles. Un ensayo de este tipo que utiliza dos anticuerpos específicos para el dominio extracelular para la captura y detección podría detectar PSM' debido a la ubicación de la proteína de su epítopo. Por tanto, cualquier ensayo que utilice 7E11-C5 o bien para la captura o bien para la detección excluirá específicamente PSM'. Un ejemplo de un ensayo específico para PSM' incluiría la captura de PSMA y PSM' por un anticuerpo tal como 3D7-1.1 o uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales específicos para el dominio extracelular de PSMA en pruebas paralelas. La detección posterior usando tanto 4E10-1.14 para PSMA y 15 PSM' total como 7E11-C5 sólo para PSMA dará la cantidad de PSM' mediante una sustracción sencilla. A partir de 20 estos datos se deriva una razón PSM' con respecto a PSMA que tendrá una relevancia de diagnóstico en vistas de la referencia por Su *et al.*, Cancer Res., 55:1441-1443 (1995).

Su muestra que el transcripto que codifica para PSMA se detecta preferiblemente en pacientes con cáncer de próstata (comparado con varones normales) aunque Su no presenta una demostración de que el transcripto de PSMA se traduce de hecho en una proteína en estos pacientes. Adicionalmente, Su muestra que el transcripto que codifica para PSM' se detecta preferiblemente en varones normales (comparado con pacientes con cáncer de próstata), aunque Su nunca detectó ninguna proteína PSM'. Los presentes inventores, en esta solicitud, demuestran que la proteína PSMA está potenciada en tejidos y/o líquidos corporales de pacientes normales (comparado con varones normales) y que la proteína PSM' está potenciada en tejidos y/o líquidos corporales de varones normales (comparado con pacientes con 25 cáncer de próstata). Por tanto, según la presente invención, la razón de PSM' con respecto a PSMA tendrá utilidad de diagnóstico y/o pronóstico para la evaluación clínica de pacientes con cáncer de próstata.

Se expresó un fragmento de PSMA correspondiente a los aminoácidos 34 a 750 de PSMA de longitud completa en un sistema de expresión de baculovirus como un inserto de 1,9 kb en un sistema de expresión de baculovirus. El 35 fragmento de PSMA expresado por baculovirus es muy similar a PSM' (que corresponde a los residuos 58-750 de PSMA de longitud completa) excepto porque faltan 76 aminoácidos adicionales del dominio extracelular de PSMA del extremo N-terminal del fragmento. Se desarrollaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western de diversos fragmentos de PSMA semipurificado expresado por baculovirus y lisado de células LNCaP con anticuerpo monoclonal 4E10-1.14 como sonda. Se muestran los resultados en la figura 17.

40 Se desarrolló un análisis de inmunotransferencia de tipo Western de lisados en bruto de células SF9 infectadas con baculovirus que contenían o bien un inserto irrelevante o bien el inserto de 1,9 kb que codifica para el fragmento de PSMA, es decir los aminoácidos 134-750 de PSMA de longitud completa, con anticuerpo monoclonal 7E11-C5 como sonda. Se muestran los resultados en la figura 18.

45 La figura 17 indica que anticuerpos tales como 4E10-1.14 que son específicos para el dominio extracelular de PSMA también pueden unirse a un producto de proteína expresado por baculovirus muy similar a PSM'. En cambio, la figura 18 indica que esto no es una propiedad del anticuerpo monoclonal 7E11-C5 debido a su especificidad de epítopo (véase la reactividad negativa de 7E11-C5 con el fragmento de PSMA expresado por baculovirus en la figura 50 18). El fragmento de proteína PSM expresado por baculovirus es idéntico a PSM' (que corresponde a los residuos 58-750 de PSMA de longitud completa) excepto porque carece de 76 aminoácidos adicionales del extremo N-terminal, todos los cuales están en el dominio extracelular. Debido a la especificidad de epítopo tanto 3D7-1.1 como 4E10-1.14 55 se mapean con una región del dominio extracelular contenida tanto en PSM' como en el fragmento de PSMA de los aminoácidos 134-750 (véase la figura 9), ambos anticuerpos tendrán la propiedad inherente de unirse a PSM' nativo, una propiedad no compartida por 7E11-C5.

Se usó el anticuerpo monoclonal 3D7-1.1 como sonda en una inmunotransferencia de tipo Western con PSMA derivado de células LNCaP así como semen y suero humano que también se sabe que contienen PSMA. Se muestran los resultados en la figura 19.

60 Una banda correspondiente a PSMA que migra a aproximadamente 120 Kd está presente en todas las fracciones. Además, se observó una segunda banda que migra más rápido de 90 a 100 Kd de peso molecular en el suero y el semen tal como se reveló por el anticuerpo 3D7-1.1. Esta banda que migra más rápido no se observa en las inmunotransferencias de tipo Western con suero usando el anticuerpo 7E11-C5 (véase Holmes *et al.*, 1996, The Prostate, Sup. 7:25-29). Esta banda de proteína que reacciona con 3D7-1.1 que migra más rápido está lo más probablemente PSM' 65 presente en líquidos biológicos.

ES 2 288 017 T3

8. Ejemplo: Producción de anticuerpos monoclonales de isotipo IgG frente a PSMA

8.1 Materiales y métodos

5 8.1.1 Inmunización

- Se inmuniñaron ratones BALB/c y A/J por vía intraperitoneal con membrana de LNCaP en adyuvante completo de Freund, seguido por una inmunización posterior (intervalos de 2-3 semanas) con membrana celular en adyuvante incompleto de Freund y tres administraciones de refuerzo con 50 µg de PSMA purificado por inmunoañidad en PBS.
- 10 Se purificó el PSMA según el método descrito en la sección 7.1.3, mencionada anteriormente. Cinco días tras la última administración de refuerzo, se realizó la fusión celular.

8.1.2 Inmunocitoquímica

- 15 Se hicieron crecer células LNCaP sobre portaobjetos de vidrio para los estudios de inmunocitoquímica con células o bien viables o bien fijadas. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4%-PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con BSA al 1%-PBS, se extinguieron durante 10 minutos en NH₄Cl 50 mM en PBS, y se aclararon con BSA al 1%-PBS. Se permeabilizaron las células fijadas con Triton X-100 al 0,075% en BSA al 1%-PBS durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- 20 Se añadió anticuerpo primario como sobrenadante de cultivo (+Triton X-100 al 0,075% para células fijadas) durante 60 minutos a 4°C para células viables o a temperatura ambiente para células fijadas. Tras el tratamiento con anticuerpo primario, se fijaron las células viables en metanol frío durante 20 minutos. Se incubó anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con FITC (diluido 1:100 en BSA al 1%-PBS + Triton X-100 al 0,075% para células fijadas) durante 25 60 minutos y se lavó extensamente con BSA al 1%-PBS. Se montaron los portaobjetos con glicerol y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia.

8.2 Resultados

- 30 La inmunización de animales con PSMA derivado de membrana y purificado por inmunoañidad dio como resultado títulos crecientes en suero tras cada inyección. Se realizaron fusiones celulares usando células del bazo de animales que tenían títulos en suero en exceso de dilución 1:100.000. Se seleccionaron los hibridomas mediante ELISA en fase sólida con PSMA de longitud completa y se compararon con la reactividad con proteínas de fusión expresadas por bacterias que contienen partes de la proteína PSMA tal como se describe en la sección 7.1.2, mencionada anteriormente, excepto porque se usó un reactivo de IgG anti-ratón secundario para seleccionar anticuerpos de isotipo IgG. Además, se evaluó la reactividad de anticuerpo mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western, análisis de citometría de flujo y en un ELISA de tipo sándwich usando anticuerpo 4E10-1.14 como anticuerpo de captura y un anticuerpo secundario IgG de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa.
- 40 Se realizaron inmunoensayos en fase sólida para determinar la ubicación aproximada del epítopo de unión para cada anticuerpo monoclonal IgG obtenido. Se resumen los resultados en la tabla 2, que incluye la subclase de isotipo para cada anticuerpo. Entre el total de 32 anticuerpos sometidos a prueba, se encontró que múltiples anticuerpos se unían a cada fragmento de PSMA, y todos los anticuerpos se unían a PSMA nativo. Dos anticuerpos, 3C2 y 3C4, reaccionaron con los fragmentos tanto 1-173 como 134-437 de PSMA sugiriendo que sus epítopos están en la región solapante de estos fragmentos. Tres anticuerpos 3C6, 4D4 y 1G9 sólo se unieron a PSMA nativo sugiriendo que estos anticuerpos reconocen una conformación de proteína nativa que no está presente en ninguno de los fragmentos de PSMA desnaturalizados. Otros dos anticuerpos, 3G6 y 3F6, tampoco se unieron a fragmentos de PSMA pero pudieron unirse a PSMA desnaturalizado en las inmunotransferencias de tipo Western.
- 45

50

TABLA 2

Especificidad de unión e isotipo de anticuerpos específicos para PSMA frente a PSMA nativo o fragmentos de PSMA

55	Anticuerpo	PSMA nativo	1-173	134-437	437-750	Isotipo ^a
	3E11	+	+	-	-	IgG _{2b}
60	3F6	+	-	-	-	IgG _{2b}
	3G6	+	-	-	-	IgG _{2b}
	2E4	+	débil	-	-	IgG _{2a}
65	3C2	+	+	+	-	IgG _{2a}

ES 2 288 017 T3

5	3C4	+	+	+	-	IgG _{2a}
10	3C9	+	-	+	-	IgG ₁
15	2C7	+	-	+	-	IgG ₁
20	2D4	+	-	+	-	IgG _{2b}
25	4C8G8	+	-	+	-	IgG _{2b}
30	2C4	+	-	+	-	IgG ₁
35	4C11	+	-	+	-	IgG ₁
40	1D11	+	-	+	-	IgG _{2b}
45	4E8	+	-	+	-	IgG _{2b}
50	2G5	+	-	+	-	IgG _{2b}
55	4E6	+	-	+	-	IgG ₁
60	1F4	+	-	+	-	IgG ₁
65	1G3	+	-	-	+	IgG _{2a}
70	4C8B9	+	-	-	+	IgG _{2a}
75	2E3	+	-	-	+	IgG _{2a}
80	3D8	+	-	-	+	IgG _{2a}
85	4F8	+	-	-	+	IgG _{2a}
90	3D2	+	-	-	+	IgG _{2a}
95	1G7	+	-	-	+	IgG _{2a}
100	3D4	+	-	-	+	IgG _{2a}
105	3C6	+	-	-	-	IgG ₁
110	4D4	+	-	-	-	IgG ₁
115	1G9	+	-	-	-	IgG ₁
120	5G10	+	-	+	-	IgG ₁
125	5E9	+	-	+	-	IgG ₁
130	4D8	+	+	-	-	IgG _{2b}
135	3E6	+	+	-	-	IgG ₁

^a Se determinó la especificidad de isotipo usando pruebas IsoStrip (Boehringer-Mannheim) para determinaciones isotipo de anticuerpos murinos que se realizaron según las instrucciones del fabricante.

Se realizó el análisis de inmunotransferencia de tipo Western utilizando PSMA de una variedad de fuentes, es decir, células LNCaP, PSMA expresado por baculovirus recombinante y semen. Los resultados indican generalmente una fuerte unión del anticuerpo a PSMA de todas las fuentes, y reactividad negativa con lisados de células PC-3 negativas para PSMA. En ciertos casos (anticuerpos 3E11, 2E4, 3G6, y 3F6), no se observó reactividad frente a PSMA expresado por baculovirus aunque se observó una fuerte reactividad frente a PSMA derivado de LNCaP y semen. Presumiblemente, esto se debió a diferencias en la cripticidad de epítopos de anticuerpo en esta región, quizás como resultado de la presencia de la sustitución N-terminal de polihistidina en la proteína expresada por baculovirus.

Los treinta y dos anticuerpos monoclonales pueden agruparse basándose en su capacidad para unirse a una banda de proteína de aproximadamente 100 kDa que migra más rápido presente en lisados de células LNCaP. También se

ES 2 288 017 T3

realizaron inmunotransferencias de tipo Western utilizando un lisado de células LNCaP carente de PSMA de longitud completa mediante unión a 7E11.C5-ImmunoBeads. Los resultados confirman la unión a PSM' para todos los anticuerpos específicos para los fragmentos de PSMA 134-437 y 438-750. Además, los anticuerpos 3C2 y 3C4 que son los más reactivos con el fragmento de aminoácidos 1-173, también se unen a PSM'. Esto indica adicionalmente que el epítopo de proteína para estos anticuerpos está en PSM' y lo más posiblemente en la región solapante entre los fragmentos 1-173 y 134-437.

Estos resultados sugieren que los anticuerpos 2E4 y 3E11 son específicos para los epítopenos contenidos en los primeros 57 aminoácidos ya que ninguno de ellos se une a la banda de proteína correspondiente a PSM'. Sin embargo, no se observó reactividad con estos dos anticuerpos frente a un péptido correspondiente a la parte intracelular de PSMA de longitud completa. Además, estos anticuerpos pueden unirse a células no fijadas mediante análisis de FACS, indicando que no pueden ser específicos para epítopenos contenidos en el dominio transmembrana de la proteína. Por tanto, los anticuerpos 2E4 y 3E11 deben unirse a epítopenos contenidos en el dominio extracelular de PSMA, lo más posiblemente entre los residuos 44 y 57. Este mismo análisis indica que los anticuerpos 3E6 y 4D8 (que se unen al fragmento de PSMA de 1-173 pero no al fragmento de 134-437) son específicos para una parte de la proteína PSMA aproximadamente entre los residuos 57-134 ya que ambos anticuerpos se unen a la proteína PSM' mediante inmunotransferencia de tipo Western.

El análisis de FACS usando este panel de anticuerpos muestra la tinción positiva de células LNCaP que expresan PSMA. Se observaron los desplazamientos más fuertes con los anticuerpos 3C6, 1G3, 3C9, 3C4, 3G6, 3F6, 3E11, 1D11, 3D8, 1G9 y 4D4. Presumiblemente, al menos algo de la variabilidad en el grado de tinción celular con estos anticuerpos se debe a los efectos de la glucosilación a través de los 10 posibles sitios unidos en N que están distribuidos en la parte más C-terminal de la proteína.

Se realizó inmunocitoquímica en células LNCaP tanto vivas como fijadas usando este panel de anticuerpos. En general, la intensidad de tinción de células vivas reflejó los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. La tinción de células fijadas también fue similar con algunas excepciones tal como se trata a continuación.

El anticuerpo 7E11.C5 anti-PSMA es específico para los primeros 6 aminoácidos de PSMA y está ubicado en el lado intracelular de la membrana plasmática. La tinción inmunocitoquímica en células LNCaP vivas con 7E11.C5 fue negativa, mientras que la tinción fue fuerte en células fijadas. Por tanto, este resultado demuestra la integridad de las células LNCaP vivas usadas en la inmunocitoquímica con respecto a la incapacidad de los anticuerpos para atravesar la membrana plasmática de células vivas. Se observó una fuerte tinción de células LNCaP vivas mediante los anticuerpos 3C6, 4D4, y 1G9, indicando que se unen a epítopenos distribuidos de manera extracelular. Se observó tinción débil o negativa de células fijadas con estos anticuerpos, confirmando que estos anticuerpos reconocen conformaciones de proteína nativa que se destruyen mediante desnaturización o fijación de la proteína. Estos tres anticuerpos pueden ser particularmente útiles para el diagnóstico *in vivo* y tratamiento de tumores, incluyendo formación de imágenes de tumores.

Se desarrolló un ELISA de tipo sándwich utilizando el anticuerpo 4E10-1.14 IgM como reactivo de captura seguido por cada IgG para la detección. Se observó una respuesta lineal sensible a la concentración de antígeno independientemente del anticuerpo usado para la detección.

En conclusión, se seleccionó un total de treinta y dos anticuerpos monoclonales IgG con especificidad para PSMA. Los anticuerpos se unen a epítopenos distribuidos a lo largo del dominio extracelular de PSMA. La figura 20 resume la distribución de especificidades de epítopo de anticuerpo de estos anticuerpos. Tres anticuerpos son específicos para epítopenos más complejos relacionados con las conformaciones de proteína nativa. Todos los anticuerpos IgG específicos para la parte de PSMA que abarca los residuos 134-750 también se unen a PSM'.

50 9. Depósito de líneas celulares

Se depositaron las siguientes líneas celulares de hibridoma el 12 de marzo de 1996, el 11 de marzo de 1997, el 17 de marzo de 1998 y el 16 de marzo de 1999 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, y se les asignaron los siguientes números de registro:

	<u>Hibridoma</u>	<u>Número de registro de ATCC</u>
60	3F5.4G6	HB12060
	3D7-1.1	HB12309
	4E10-1.14	HB12310
	1G3	HB12489
	1G9	HB12495
65	2C7	HB12490
	3C4	HB12494
	3C6	HB12491

ES 2 288 017 T3

(Continuación)

	<u>Hibridoma</u>	<u>Número de registro de ATCC</u>
5	3C9	HB12484
	3E6	HB12486
	3E11	HB12488
10	3G6	HB12485
	4D4	HB12493
	4D8	HB12487
	4C8B9	HB12492
15	3F6	
	2E4	
	3C2	
	2D4	
	4C8G8	
20	2C4	
	4C11	
	1D11	
	4E8	
25	2G5	
	4E6	
	1F4	
	2E3	
30	3D8	
	4F8	
	3D2	
	1G7	
35	3D4	
	5G10	
	5E9	

40 El alcance de la presente invención no se limita por las realizaciones mostradas como ejemplo que se pretende que sean ilustraciones de aspectos únicos de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Se pretende que tales modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Línea celular de hibridoma que consiste en 3C6 que tiene el número de registro de ATCC HB12491, 4D4 que tiene el número de registro de ATCC HB12493, o 1G9 que tiene el número de registro de ATCC HB 12495.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal obtenido a partir de dicha línea celular de hibridoma según la reivindicación 1.
- 15 3. Anticuerpo monoclonal que tiene una región de unión a antígeno que se une a un epítopo conformacional del dominio extracelular de PSMA e inhibe competitivamente la unión inmunoespecífica de un segundo anticuerpo monoclonal a su epítopo diana dentro del dominio extracelular del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en el que dicho segundo anticuerpo es según la reivindicación 2.
- 20 4. Método *in vitro* para detectar la presencia de proteína PSMA o PSM' en una muestra biológica, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 2 ó 3 y detectar cualquier PSMA unido un anticuerpo, o proteína PSM' unida un anticuerpo.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que la muestra es una muestra de biopsia o un líquido corporal.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, en el que el líquido corporal es sangre completa, suero, semen, u orina.
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la detección de PSMA unido un anticuerpo se realiza mediante un segundo anticuerpo específico para PSMA, o mediante la actividad enzimática de NAALADasa.
- 40 8. Método según la reivindicación 7, en el que la actividad de NAALADasa se detecta mediante un aumento de NAD(P)H.
- 45 9. Método *in vitro* para detectar la presencia de PSMA expresado por células de cáncer, que comprende poner en contacto una muestra de células con un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 2 ó 3 y detectar cualquier PSMA unido un anticuerpo.
- 50 10. Método según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo se une covalentemente a un marcador.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, en el que el marcador es una enzima, un tinte radiopaco, un isótopo metálico radiactivo, un isótopo no metálico radiactivo, un compuesto fluorogénico, un compuesto fluorescente, un isótopo que emite positrones, o un metal no paramagnético.
- 60 12. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 2 ó 3 en la fabricación de un medicamento para destruir células de cáncer de próstata en un paciente.
- 65 13. Uso según la reivindicación 12 en el que el anticuerpo está conjugado con un fármaco, una toxina o un radioisótomo.
- 70 14. Uso según las reivindicaciones 12 ó 13 en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo biespecífico, que comprende además una región de unión a antígeno adicional específica para una célula efectora que tiene actividad tumoricida o inhibidora de tumores.
- 75 15. Uso según la reivindicación 14 en el que el anticuerpo está conjugado con un péptido o proteína heteróloga.
- 80 16. Uso según la reivindicación 15 en el que la proteína heteróloga selecciona como diana células tumoricidas frente a células de la próstata.
- 85 17. Uso según la reivindicación 16 en el que la proteína heteróloga selecciona como diana un compuesto citotóxico frente a células de la próstata.
- 90 18. Kit para diagnóstico, prognosis o monitorización de cáncer de próstata, que comprende un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 2 ó 3.
- 95 19. Kit según la reivindicación 18, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se envasa en un medio acuoso o en forma liofilizada.
- 100 20. Kit según la reivindicación 19 que comprende además un segundo anticuerpo específico para PSMA.
- 105 21. Kit según la reivindicación 19 que comprende además glutamato deshidrogenasa.

MWNLLHETDSAVATARRPRWL <u>CAGALYLAGGFFLUGFLFGWEIKSSNEATNITPKHN</u>	57
MK AFLDELEKAENIKKFLYNTQIPHLAGTEQN FQLAKQIQS QWKEFGLD SVELAHYDVL	116
LSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDL	174
VYVN YARTEDFFKLERDMKNCNGKIVIARYGKVFRGNKVKNAOLAGAKGVILYS DPA	232
DYFAPGVKSYPDGWNLPGGVQRGNIILNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLP	290
SIPVHPIGYYDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKV PYNVGP GFTGNFSTQKVKMHHS	348
TNEVTRIYNVIGTLRGAVERDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLK	406
KEGWRPARTILFASWDAEEFGLLSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRV	464
DCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEKSLYESWTKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFE	522
VFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFGSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVR	580
GGMVFELANSIVLPFD CRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTSVSFDSLFSAVKN	638
FTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMINDQLMFLERAFIGDPLGLPDRPFYRHVIYAPSS	696
HNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVA AFTVQAAAETLSEVA	750

FIG. 1

ES 2 288 017 T3

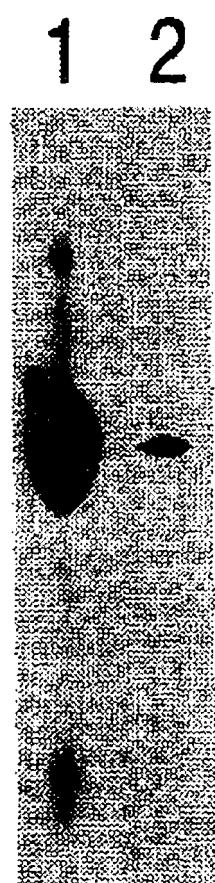


FIG.2

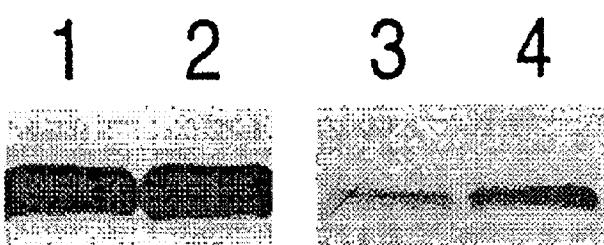


FIG.3

ES 2 288 017 T3



FIG.4

ES 2 288 017 T3

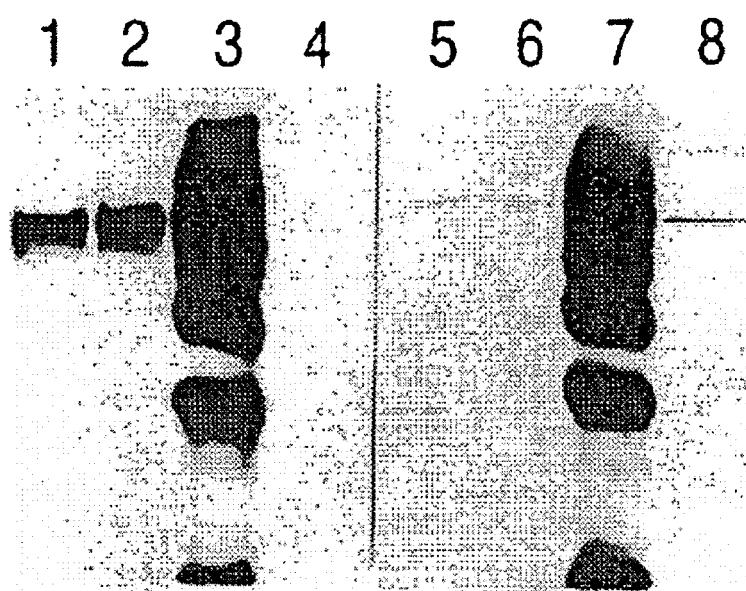


FIG.5

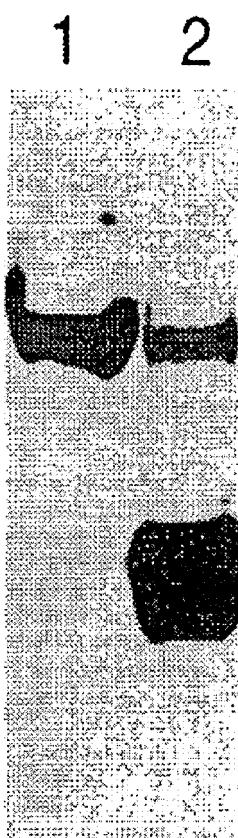


FIG.6

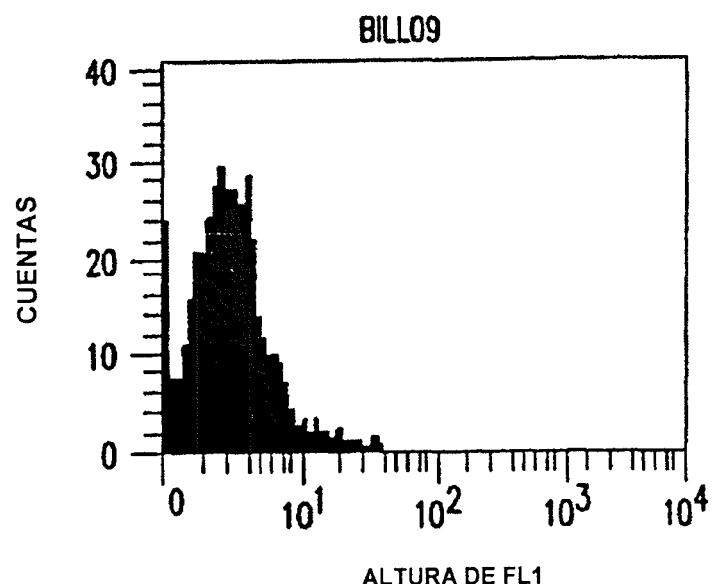


FIG.7A

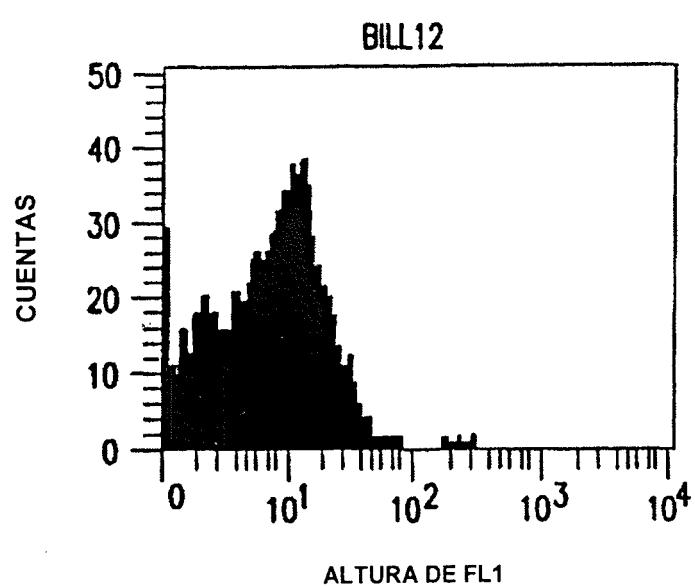


FIG.7B

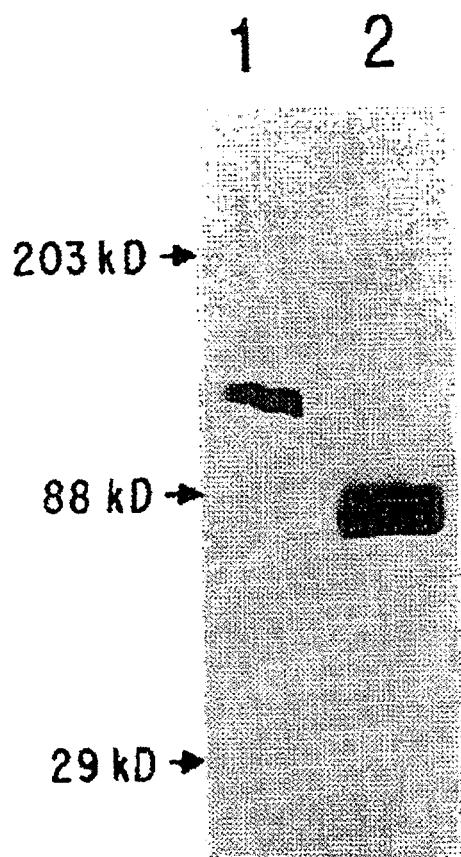


FIG.8

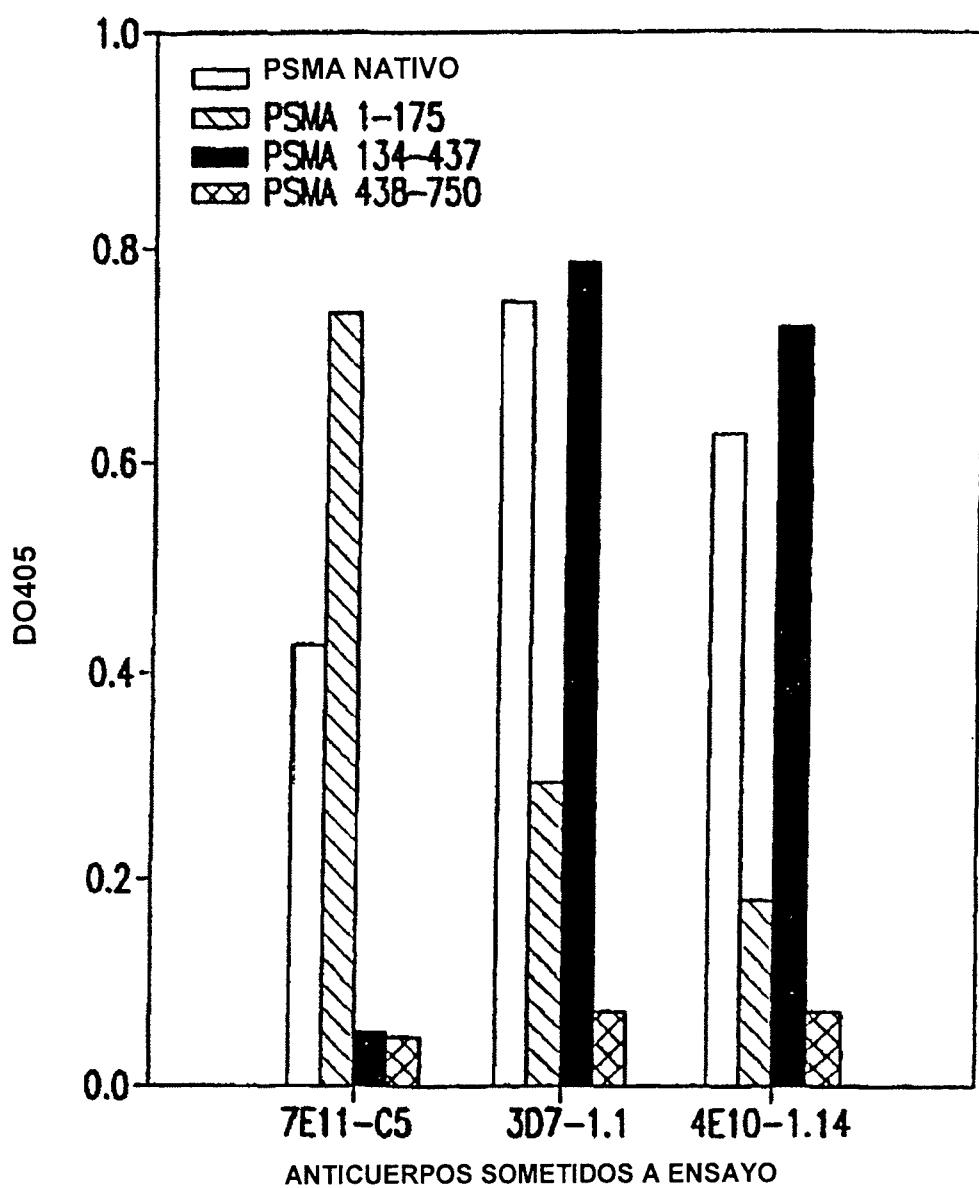


FIG.9

ES 2 288 017 T3

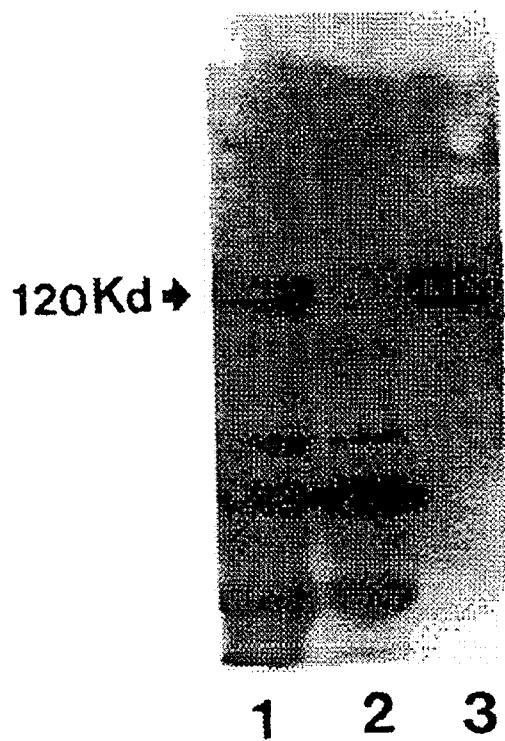


FIG. 10

ES 2 288 017 T3

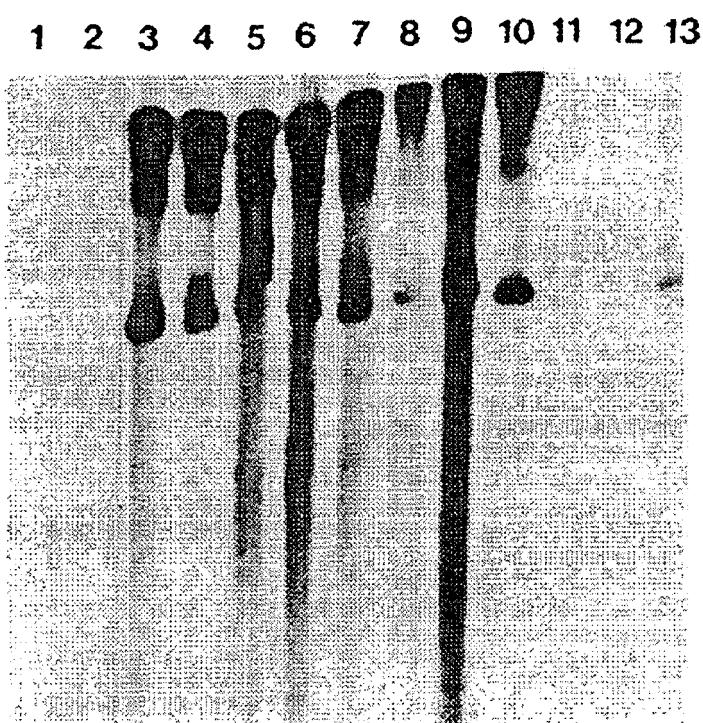


FIG. 11

ES 2 288 017 T3

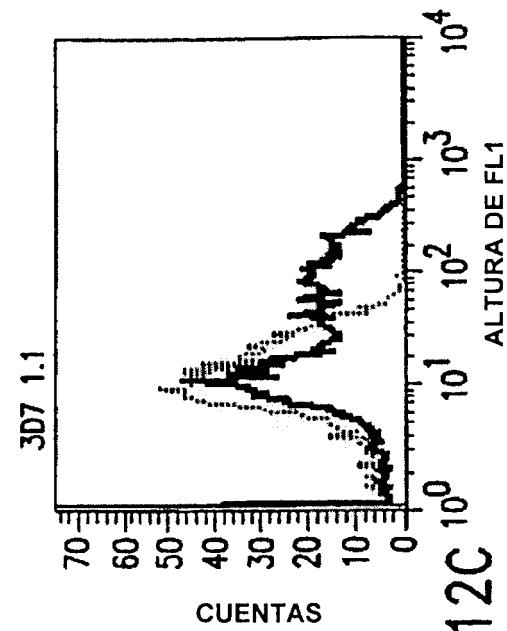


FIG. 12C

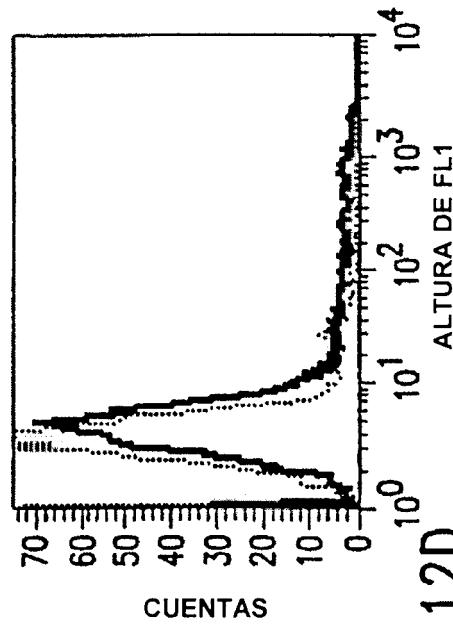


FIG. 12D

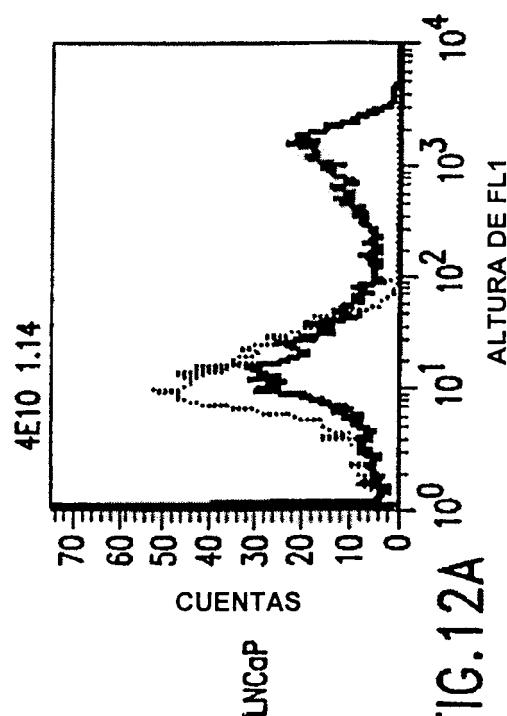
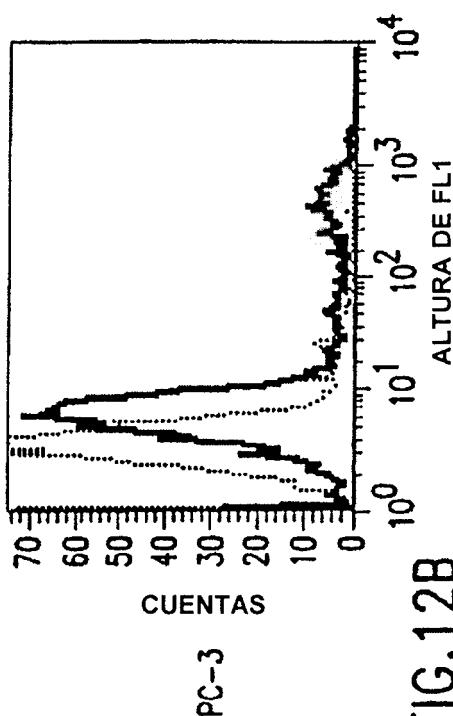


FIG. 12A



PC-3

FIG. 12B

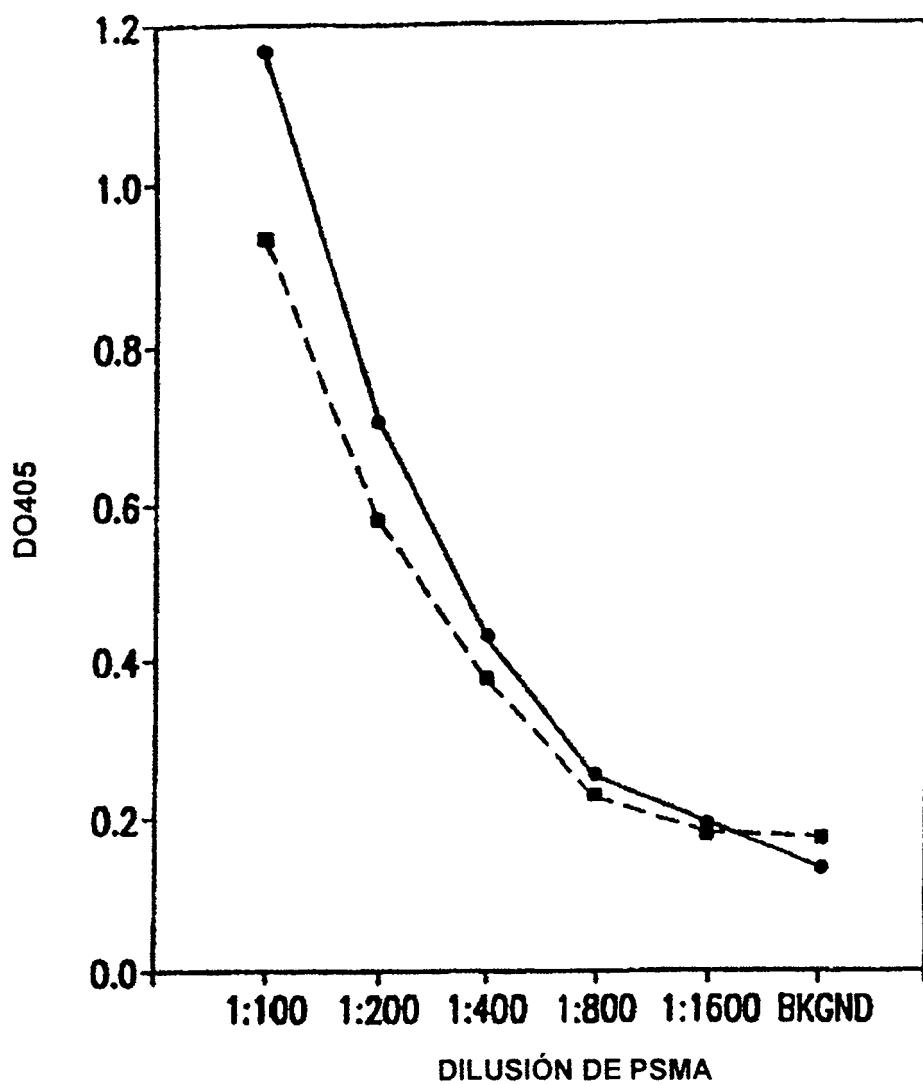


FIG.13

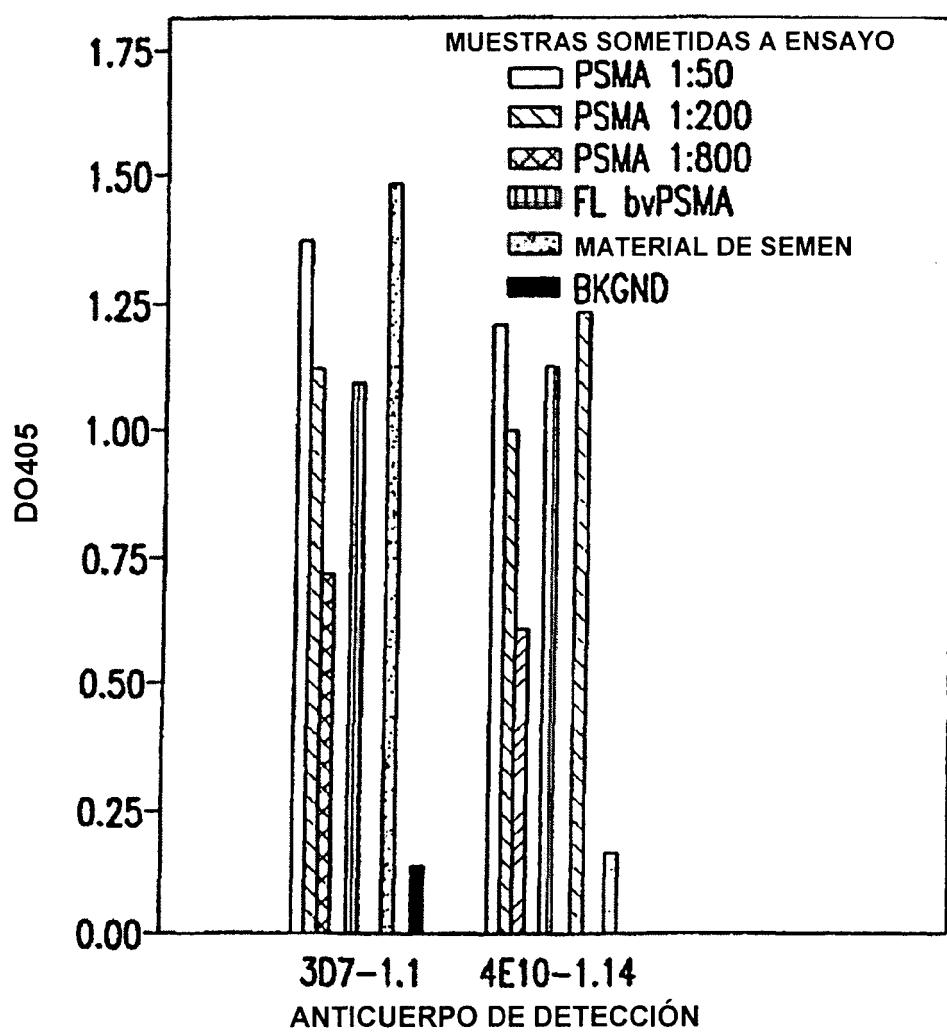


FIG.14

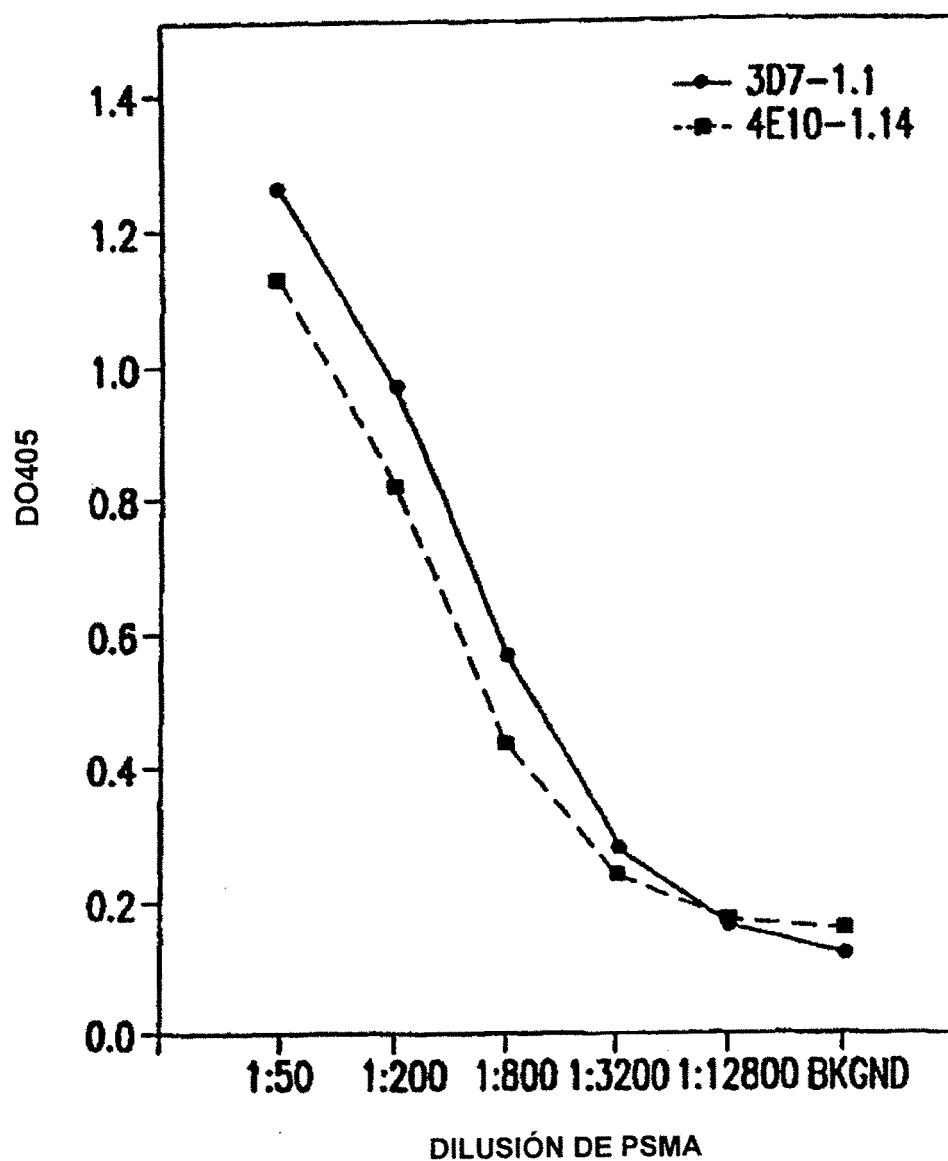


FIG.15

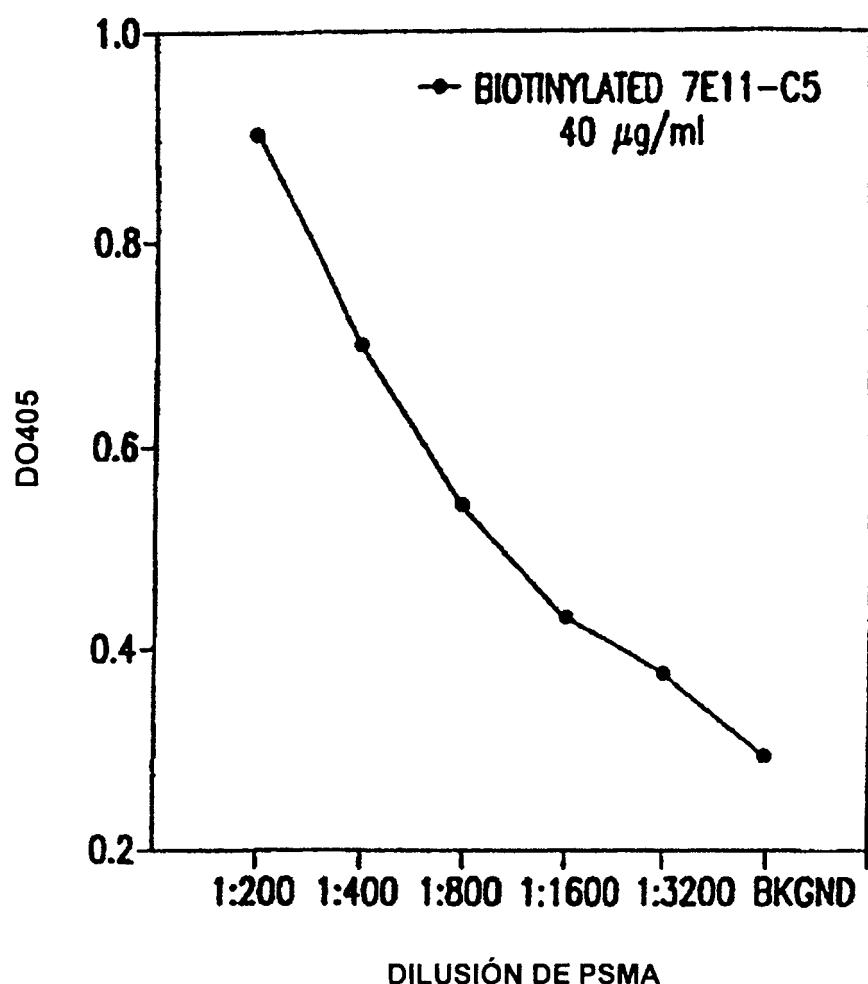


FIG.16

ES 2 288 017 T3

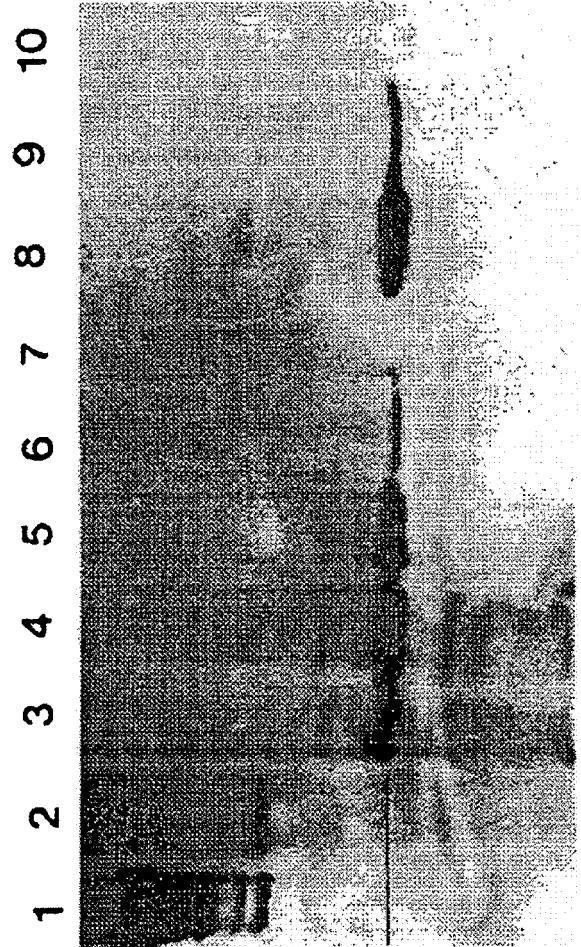


FIG. 17

ES 2 288 017 T3

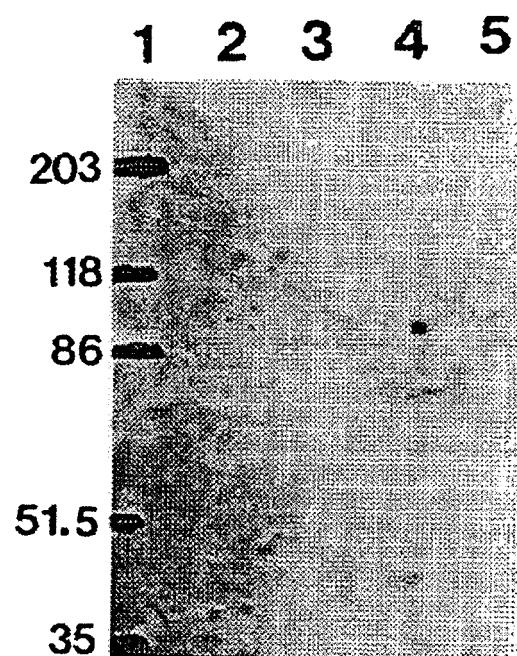


FIG. 18

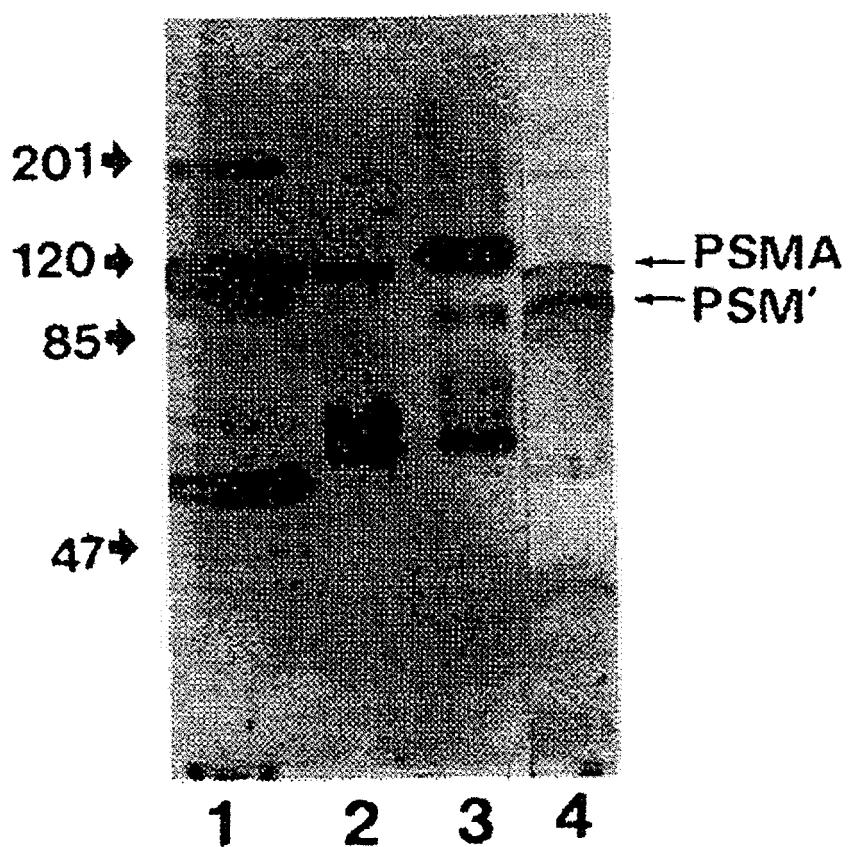


FIG.19

ES 2 288 017 T3

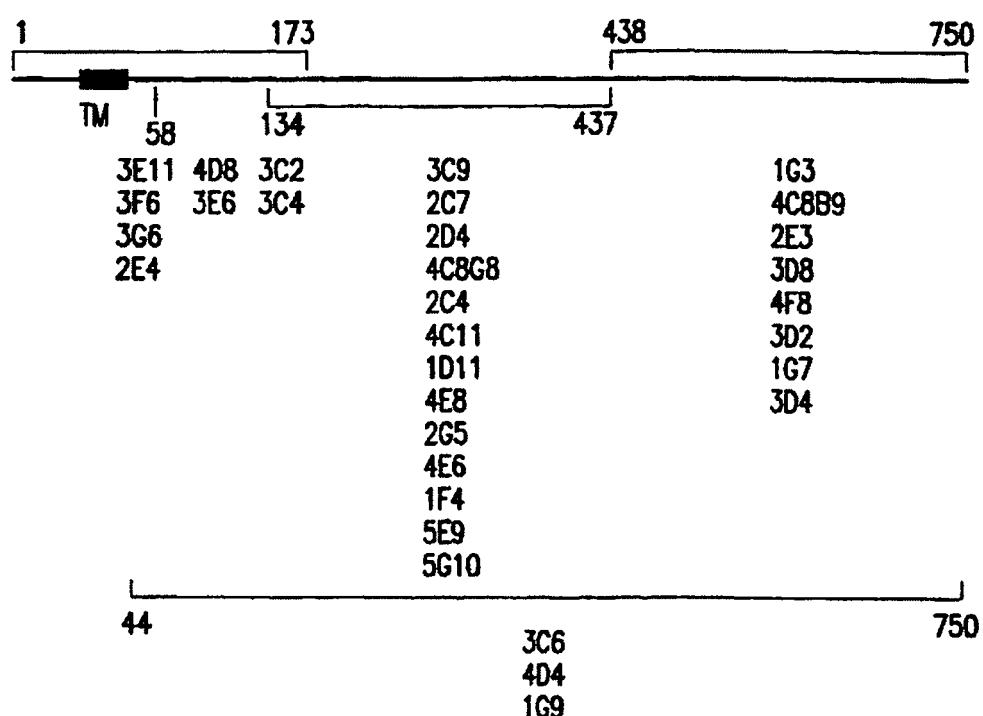


FIG.20

ES 2 288 017 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Northwest Biotherapeutics, Inc.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS PARA EL DOMINIO EXTRACELULAR DEL ANTÍGENO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE LA PRÓSTATA
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: Pennie & Edmonds, LLP
- (B) CALLE: 1155 Avenue of the Americas
- (C) CIUDAD: Nueva York
- (D) ESTADO: NY
- (E) PAÍS: EE.UU.
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 10036-2811
- (v) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: IBM Compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: Windows
- (D) SOFTWARE: FastSEQ para Windows Versión 2.0b
- 30 (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 09/044,668
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 18-MAR-1998
- 40 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Baldwin, Geraldine F
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 31.232
- 45 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/CASO: 8511-0013-228
- (ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: 650-493-4935
- 50 (B) FAX: 650-493-5556
- (C) TELEX: 66141 PENNIE

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 60 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Ninguno
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

ES 2 288 017 T3

Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys
1 5

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 750 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 10 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Ninguno

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
20 1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
25 20 25 30

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
35 35 40 45

Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
50 50 55 60

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile
65 65 70 75 80

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
85 85 90 95

Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
100 100 105 110

40

45

50

55

60

65

ES 2 288 017 T3

	Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile			
	115	120	125	
5	Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe			
	130	135	140	
	Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro			
10	145	150	155	160
	Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr			
	165	170	175	
15	Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met			
	180	185	190	
	Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val			
	195	200	205	
20	Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly			
	210	215	220	
	Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys			
25	225	230	235	240
	Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Val Gln Arg Gly			
	245	250	255	
30	Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr			
	260	265	270	
	Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly			
	275	280	285	
35	Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys			
	290	295	300	
	Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg			
40	305	310	315	320
	Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn			
	325	330	335	
45	Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val			
	340	345	350	
	Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro			
	355	360	365	
50	Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly			
	370	375	380	
	Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg			
55	85	390	395	400
	Ter Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile			
	405	410	415	
60	Ser Phe Ala Ser Trp Asp Ala Trp Trp Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr			
	420	425	430	
	Ile Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala			
	435	440	445	
65	Ter Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val			

ES 2 288 017 T3

450	455	460
Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu 465	470	475
Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser 485	490	495
Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile 500	505	510
Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu 515	520	525
Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn 530	535	540
Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu 545	550	555
Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val 565	570	575
Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val 580	585	590
Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala 595	600	605
Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr 610	615	620
Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr 625	630	635
Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser 645	650	655
Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu 660	665	670
Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg 675	680	685
His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser 690	695	700
Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp '05	710	715
Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala 725	730	735
he Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala 740	745	750

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Northwest Biotherapeutics, Inc.

5 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS PARA EL DOMINIO EXTRACELULAR DEL ANTÍGENO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE LA PRÓSTATA

<130> P10985EP

10 <140> EP 99913932.2

<141> 18-03-1999

<150> PCT/US99/05864

<151> 18-03-1999

15 <150> US 09/044.668

<151> 18-03-1998

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido que contiene los residuos de aminoácidos 716-723 de Seq ID No. 2

30 <400> 1

Glu	Ser	Lys	Val	Asp	Pro	Ser	Lys
1							5

35 <210> 2

<211> 750

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

45 Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
 1 5 10 15

50 Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
 20 25 30

 Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
 35 40 45

55 Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
 50 55 60

60 Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile
 65 70 75 80

 Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
 85 90 95

65 Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
 100 105 110

ES 2 288 017 T3

Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
 115 120 125
 5 Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
 130 135 140
 10 Glu Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
 145 150 155 160
 15 Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
 165 170 175
 20 Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met
 180 185 190
 25 Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val
 195 200 205
 30 Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly
 210 215 220
 35 Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys
 225 230 235 240
 40 Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Val Gln Arg Gly
 245 250 255
 45 Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
 260 265 270
 50 Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly
 275 280 285
 55 Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys
 290 295 300
 60 Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg
 305 310 315 320
 65 Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn
 325 330 335
 70 Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val
 340 345 350
 75 Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro
 355 360 365
 80 Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly
 370 375 380
 85 Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg
 390 395 400
 90 Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile
 405 410 415
 95 Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Trp Trp Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr
 420 425 430
 100 Ile Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala
 435 440 445
 105 Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val

ES 2 288 017 T3

	450	455	460
	Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu		
5	465	470	475
	Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser		
	485	490	495
10	Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile		
	500	505	510
	Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu		
	515	520	525
15	Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn		
	530	535	540
20	Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu		
	545	550	555
	Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val		
	565	570	575
25	Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val		
	580	585	590
	Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala		
	595	600	605
30	Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr		
	610	615	620
	Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr		
35	625	630	635
	640		
	Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser		
	645	650	655
40	Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu		
	660	665	670
	Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg		
	675	680	685
45	His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser		
	690	695	700
	'he Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp		
50	'05	710	715
	720		
	'ro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala		
	725	730	735
55	'he Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala		
	740	745	750

60

65