

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 082**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2009** **E 09735635 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012** **EP 2283042**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo de unión al antígeno de membrana específico de la próstata, sus conjugados y usos**

30 Prioridad:

**22.04.2008 IT TO20080313**

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

**05.04.2013**

73 Titular/es:

**COLOMBATTI, MARCO (50.0%)**

**Via C. Battisti 178**

**Sant'Anna d'Alfaedo, IT y**

**FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE DEI TUMORI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COLOMBATTI, MARCO;**

**FRACASSO, GIULIO;**

**CINGARLINI, SARA;**

**CANEVARI, SILVANA y**

**FIGINI, MARIANGELA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 400 082 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo de unión al antígeno de membrana específico de la próstata, sus conjugados y usos

### **Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales y a fragmentos de unión al antígeno de los mismos definidos como scFv a partir de ahora en el presente documento, como reactivos para el diagnóstico y el tratamiento de tumores de próstata y la erradicación/detección de las células que expresan elevados niveles de antígenos de membrana específicos de próstata, denominados como PSMA a partir de ahora en el presente documento.

10 El cáncer de próstata es la forma más frecuente de cáncer en varones (seguido por el cáncer de pulmón) y representa la segunda causa de muerte debida a tumor.

Tras el inicio, el cáncer de próstata es un tumor confinado al órgano; la eliminación quirúrgica de la próstata y de las vesículas seminales y la radioterapia son eficaces en el tratamiento de esta forma de tumor.

15 Sin embargo, cuando el tumor se diagnostica en una etapa avanzada y en los casos en los que la enfermedad evoluciona a formas metastásicas más agresivas e independientes de andrógenos, el uso de diferentes soluciones farmacológicas no es eficaz.

En estos casos, pueden resultar por tanto útiles nuevas estrategias terapéuticas basadas en la inmunoterapia pasiva y en anticuerpos monoclonales específicos (moAbs) para tratar estas formas de cáncer de próstata avanzadas y metastásicas.

20 Para aplicar esta terapia, es necesario identificar los antígenos asociados a tumores (AAT), es decir, las moléculas que se expresan en exceso por el tejido neoplásico y que se pueden usar potencialmente como dianas para la terapia inmunológica.

Recientes estudios sugieren que el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) puede representar el antígeno ideal diana en el cáncer de próstata debido a sus características.

25 PSMA es una glicoproteína de aproximadamente 100 kDa con un dominio intracelular corto (aminoácidos 1-18), un dominio transmembrana (aminoácidos 19-43) y un dominio extracelular (aminoácidos 44-750). PSMA se expresa en células epiteliales prostáticas tanto normales como cancerosas, aunque con un nivel de expresión que está considerablemente aumentado en el cáncer de próstata; este nivel tiende a aumentar con la gravedad y progresión de la enfermedad.

30 Por otra parte, los tejidos extraprostáticos normales, tales como por ejemplo, los túbulos proximales del riñón, el duodeno y el colon tienen una expresión del antígeno PSMA limitada.

35 Como diana de inmunoterapias antitumorales, PSMA tiene la ventaja de expresarse principalmente en la próstata y de ser una proteína transmembrana presente sobre la superficie celular e internalizada desde la membrana celular a través de vesículas endocíticas revestidas con clatrina. Estas características permiten usar PSMA para la terapia con inmunotoxinas. De forma ventajosa, la unión de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos al dominio extracelular promueve este proceso de endocitosis.

### **Antecedente de la técnica**

40 Se conocen muchos anticuerpos monoclonales que se unen a PSMA. Por ejemplo, 7E11, que ha sido homologado por la FDA para el estudio de metástasis que expresa PSMA, es un anticuerpo monoclonal que se une a la porción intracelular de PSMA. Desafortunadamente, 7E11 no se une a células viables, sino solo a células necróticas o apoptóticas en el interior de una masa tumoral.

Se han producido posteriormente anticuerpos monoclonales tales como J591, J415, J533 y E99. Estos anticuerpos reconocen epítomos en el dominio extracelular de PSMA y se unen por tanto a células viables.

J591 se ha usado en particular para diversos estudios in vitro y en modelos animales de forma diagnóstica y terapéutica y sigue estando bajo estudio clínico experimental.

45 Finalmente, el documento EP1726650 da a conocer otro anticuerpo monoclonal y un fragmento scFv del mismo que se une a PSMA.

A partir de ahora en el presente documento, el término "fragmento del anticuerpo de unión al antígeno" indica uno o más fragmentos de este anticuerpo que mantienen/mantiene la capacidad de unirse específicamente a PSMA.

### **Breve descripción de los dibujos**

50 Para una mejor comprensión de la presente invención, esta se describe ahora también con referencia a las figuras

que la acompañan, en las que:

- La figura 1 muestra una transferencia Western llevada a cabo en un lisado de células LNCaP (PSMA+) y PC-3 (PSMA-), usando moAb D2/B y un anticuerpo J591 (dado ya ampliamente a conocer en la bibliografía) como control;
- 5 - la figura 2 muestra una transferencia Western llevada a cabo en un lisado de células LNCaP (PSMA+) y células PC-3, que no expresan la diana antigénica del PSMA, usando scFv D2/B;
- la figura 3a-d muestra los análisis citofluorimétricos de D2/B y scFv D2/B en células PSMA+;
- la figura 4a-d muestra los análisis citofluorimétricos de D2/B y scFv D2/B en células PSMA-;
- 10 - la figura 5 muestra una comparación de la capacidad de unión a células LNCaP (PSMA+) de Ab J591, Ab D2/B, scFv D2/B;
- la figura 6 muestra la formación de imágenes in vivo con un Ab D2/B conjugado con el fluoróforo Cy5.5.

### **Divulgación de la invención**

Es un objetivo de la presente invención encontrar nuevos anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer de próstata que sean selectivos para células tumorales, permitan un diagnóstico más fácil y más preciso y representen opciones terapéuticas que permitan afectar verdaderamente la biología de la enfermedad en una etapa avanzada y metastásica con el fin de hacer frente más eficazmente a un problema social y médico cada vez mayor que tiene perspectivas de solución inciertas con las actuales medidas terapéuticas.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se consigue mediante un anticuerpo monoclonal aislado o uno de sus fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, uno de sus conjugados de acuerdo con la reivindicación 5, una composición farmacéutica que comprende el mismo de acuerdo con la reivindicación 11. Se proporciona también el uso del anticuerpo y de uno de sus fragmentos, del conjugado y de la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 12 y 14.

### **Descripción detallada de la invención**

En las células prostáticas, PSMA se expresa con una estructura terciaria y cuaternaria específicas y los anticuerpos obtenidos con un PSMA aislado y desnaturalizado no reconocen eficazmente el PSMA expresado en las células tumorales. Los anticuerpos y sus fragmentos de acuerdo con la presente invención se unen ventajosamente a PSMA en su forma natural con una elevada afinidad y pueden por tanto usarse eficazmente en el tratamiento y el diagnóstico. En particular, los anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de acuerdo con la invención se unen selectivamente a PSMA reduciendo de esta forma los efectos secundarios de un tratamiento no selectivo.

30 Los fragmentos de anticuerpos usados son fragmentos de anticuerpos monocatenarios (scFv) que tienen un tamaño más pequeño y una inmunogenicidad más baja comparados con el anticuerpo correspondiente. Sin embargo, en virtud del tamaño pequeño y de la afinidad más baja por el antígeno, muestran un aumento de la permeabilidad en la microcirculación y una mejor interacción con el antígeno en el sitio de unión del anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales o sus fragmentos comprenden un nucleótido peculiar y una secuencia de aminoácidos en las regiones variables VH y VK que determinan la especificidad y la afinidad de los mismos. Las secuencias de nucleótidos del moAb D2/B y del fragmento scFv del mismo se indican como la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4. La secuencia especificada codifica un fragmento de anticuerpo que tiene una buena capacidad de unión con el antígeno PSMA diana.

40 El anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos, tal como se ha dado a conocer anteriormente, se puede conjugar con un principio activo para obtener compuestos que se pueden usar para radioinmunoterapia o formación de imágenes o también inmunotoxinas recombinantes.

El principio activo es preferiblemente un agente de marcado, de forma más preferible un radionucleido seleccionado entre  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{187}\text{Re}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , o nanopartículas fluorescentes.

45 Como alternativa, el anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos se puede conjugar con un agente citotóxico, seleccionado preferiblemente entre PE40, una cadena de ricina A, diantina, saporina.

Finalmente, el anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos se puede conjugar con biotina para aprovechar la elevada afinidad de la interacción avidina-biotina o con otras parejas moleculares que permiten protocolos terapéuticos de múltiples etapas. En particular, el conjugado con biotina se puede aplicar en técnicas de direccionamiento en el caso de tratamientos que incluyen el uso de radioisótopos. Concretamente, diversos estudios preclínicos han resaltado la superioridad del predireccionamiento con respecto al direccionamiento directo; por ejemplo; Goldenberg D.M. y col. (J. Clin. Oncol., 24: 823-834, 2006).

55 Se ha demostrado que la administración de un conjugado con el anticuerpo de acuerdo con la presente invención o uno de sus fragmentos con biotina, antes de la administración de un agente radiofarmacéutico (estreptavidina y a continuación biotina radiomarcada) permite una mejor distribución del agente radiofarmacéutico en el sitio del tumor reduciendo de esta manera los efectos secundarios.

El anticuerpo monoclonal, sus fragmentos y sus conjugados se pueden formular en composiciones farmacéuticas con los excipientes adecuados y se pueden usar para la preparación de un medicamento para el tratamiento o el diagnóstico de los tejidos tumorales que expresan en exceso el antígeno PSMA, un tumor, preferiblemente un tumor de la próstata.

5 El procedimiento para obtener anticuerpos monoclonales es como sigue:

10 Se inmunizaron ratones Balb/c, los esplenocitos de los animales se fusionaron con células de hibridoma, las células resultantes se seleccionaron en medio HAT, se identificaron los hibridomas policlonales que reconocían el antígeno diana, se clonaron y se caracterizaron de nuevo para evaluar la especificidad/afinidad de los nuevos hibridomas monoclonales, que se adaptaron finalmente para crecer en medio exento de HAT. Los anticuerpos se purificaron a continuación a partir del medio de cultivo del hibridoma por medio de técnicas bioquímicas normalizadas (cromatografía de afinidad).

Otras características de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente divulgación de algunas realizaciones proporcionadas por medio de ilustraciones no limitativas.

### Ejemplos

15 Los anticuerpos monoclonales y los scFv de la presente invención se han caracterizado mediante citometría de flujo y transferencia Western en las siguientes líneas de células de PCa humano, proporcionadas por la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD): metástasis linfonodales de PCa (LNCaP), metástasis cerebral de PCa (DU145), metástasis ósea de PCa (PC-3). Estas líneas de células se han mantenido en RPMI 1640 enriquecido con suero bovino fetal al 10 % (FBS), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y estreptomina. La temperatura de incubación fue de 37 °C y la concentración de CO<sub>2</sub> fue del 5 %. Las células se dividieron 2-3 veces por semana, separándolas con una solución de EDTA/PBS al 0,02 % o EDTA al 0,02 % y tripsina/PBS al 0,05 %.

Se hará referencia a partir de ahora en el presente documento a los anticuerpos de acuerdo con la presente invención tales como "D2/B" y "scFv D2/B".

#### Ejemplo 1

25 Preparación de anticuerpos moAb

Se obtuvo el anticuerpo tras la inmunización de ratones Balb/c con fracciones de membranas plasmáticas de células que expresaban el antígeno PSMA y con la forma recombinante de PSMA, siguiendo los protocolos establecidos que aprovechan la tecnología de los hibridomas. Poblaciones de esplenocitos que contenían linfocitos B de animales inmunizados se fusionaron con células de mieloma. Los hibridomas obtenidos, clonados mediante dilución limitante y caracterizados para evaluar la especificidad y la afinidad, se hicieron crecer en medio exento de suero adecuado. Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía de afinidad.

#### Ejemplo 2

Ensayo ELISA

35 El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es una técnica usada para detectar la presencia de una molécula por su reactividad con anticuerpos específicos.

Este ensayo se usó para determinar el isotipo de los moAb dirigidos contra PSMA anteriormente obtenidos. El kit usado (Hybridoma Subtyping Kit, Calbiochem) ha permitido la identificación del isotipo del anticuerpo entre los subtipos de IgG1, IgG2, IgG2b, IgG3, IgM e IgA, el procedimiento del ensayo se describe en la hoja de información técnica anexa al kit ELISA usado.

40 Los resultados, notificados en la Tab. 1 muestran que el anticuerpo D2/B es un IgG1; el número de fila 2 de la tabla (IgG1) muestra un valor de la absorbancia de 4,0, en oposición a un control negativo (solo el medio de cultivo) de 0,8. Los valores de la absorbancia de D2/B de los otros subtipos de IgG corresponden al valor del control negativo. Como control positivo en el ensayo los inventores usaron suero de murino que, tal como se evidenció a partir de los datos notificados en el número de columna 3, contiene todos los isotipos de inmunoglobulinas.

45

Tabla 1

	D2/B	Control negativo	Suero de ratón
IgM	0,56	0,54	2,36
IgG1	4,00	0,81	1,75
IgG2a	0,41	0,32	2,42
IgG2b	0,30	0,25	1,84
IgG3	0,30	0,28	1,24
IgA	0,25	0,23	0,18

**Ejemplo 3**

Del anticuerpo monoclonal al fragmento D2/B scFv y su producción

Tras la extracción del ARN total del hibridoma D2/b con TRIzol (Gibco), se sintetizó el ADNc usando el kit de Síntesis de ADN Superscript (Invitrogen). Usando parejas adecuadas de cebadores inversos y directos y la PCR, los inventores identificaron las combinaciones de cebadores capaces de amplificar las regiones VH y Vk variables del D2/B moAb, se identificaron las combinaciones óptimas y las regiones VH y Vk se clonaron en un vector plasmídico adjunto a una etiqueta 6-His en el extremo N de la proteína. La secuenciación del vector ha permitido la identificación de las secuencias de VH y Vk (SEQ ID 1, 2).

La producción de scFv tiene lugar en células de E. coli (cepa HB2151) que se hacen crecer a 37 °C con agitación (225 rpm) en medio 2xTY al que se adicionan 100 µg/ml de ampicilina, glucosa al 0,1 %, y se indujeron las bacterias a una D.O. de 0,8 (600 nm) con una concentración final de IPTG 1 mM durante 3 h a 37 °C. Se cosecharon las células mediante centrifugación a 5000 rpm a 4 °C durante 10 min y se expusieron durante 1 h a Tris-HCl 30 mM pH = 8,0 + EDTA 1 mM + sacarosa al 20 %; el sobrenadante (que contenía la fracción periplásmica) se recogió y el scFv D2/B se purificó mediante cromatografía usando una matriz NiNTA (Novagen) eluyendo con Tris 20 MM pH 0 8,0 + tampón imidazol 250 mM.

Se evaluó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE.

**Ejemplo 4**

Transferencia Western

Para verificar el reconocimiento potencial del anticuerpo D2/B en las transferencias Western, se llevó a cabo un SDS-PAGE (poliacrilamida al 10 %) sobre células PSMA+ LNCaP y células PSMA- PC-3. Se llevó a cabo la lisis celular mediante sonicación de las células que se volvieron a suspender en una solución de Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 8,0 que contenía Triton X-100 al 1 % e inhibidores de la proteasa (Cóctel Completo Inhibidor de la Proteasa, Roche). Se cargaron las ranuras con 20 µl de lisado que correspondían aproximadamente a 100 µg de proteínas totales; se llevó a cabo el SDS-PAGE de acuerdo con el protocolo descrito por Laemmli. Posteriormente, las proteínas separadas mediante electroforesis en gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa aplicando un campo eléctrico /procedimiento establecido, transferencia Western).

Para verificar el reconocimiento del antígeno PSMA por el anticuerpo D2/B, la membrana de nitrocelulosa se incubó toda la noche a 4 °C con agitación suave en presencia del anticuerpo primario D2/B o del anticuerpo J591 del control, usados ambos a la concentración de 10-20 µg/ml en una solución al 5 % de leche desnatada. Se eliminó el anticuerpo en exceso mediante 4 lavados usando el tampón TBST.

A continuación se usó un anticuerpo dirigido contra IgG de ratón conjugado con HRP y diluido 1:1000 en leche desnatada al 5 % en TBST; la incubación duró 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.

Después de 3 lavados en TBST y 1 lavado en PBS, la señal se detectó mediante una reacción quimioluminiscente (ECL Amersham Biosciences, Reino Unido).

La figura 1 muestra una transferencia Western llevada a cabo con un lisado de células LNCaP (PSMA+) y PC-3 (PSMA-), usando el anticuerpo J591, ya descrito en la bibliografía, como control positivo; tal como se muestra en la figura, el anticuerpo D2/B es capaz de reconocer el antígeno presente en el lisado celular así como el anticuerpo J591 (bandas 1 y 2, respectivamente). Se puede apreciar también que no se puede observar la señal usando un lisado de células negativas al antígeno (PC-3) (bandas 3 y 4 para el anticuerpo D2/B y el anticuerpo J591, respectivamente).

Igualmente, se evaluó la capacidad de reconocimiento del anticuerpo scFv D2/B en la transferencia Western usando los mismo lisados celulares que anteriormente, pero desvelando la unión de un anticuerpo de conejo dirigido contra la etiqueta myc (Sigma) seguido por un anticuerpo dirigido contra la IgG de conejo conjugado con HRP (Sigma). El scFv D2/B detectó PSMA en los lisados de células LNCaP, pero no se observó la señal con lisados de células PC-3, ya que carecen de la diana antigénica PSMA (Figura 2).

**Ejemplo 5**

Inmunofluorescencia

Se hicieron crecer células LNCaP (PSMA+) en cubreobjetos revestidos de polilisina en una placa de microvaloración de 24 pocillos. Antes de llevar a cabo el ensayo de inmunofluorescencia, se descartó el medio de cultivo celular y se lavaron las células dos veces con PBS.

A continuación se fijaron las células con paraformaldehído al 2 % durante 10 min a temperatura ambiente y las células se lavaron adicionalmente con PBS durante tres veces para deshacerse del fijador en exceso.

Seguidamente, las células se incubaron a temperatura ambiente en presencia de anticuerpo primario dirigido contra PSMA a la concentración de 10 µg/ml. Se usaron los siguientes anticuerpos: D2/B, 7E11 (usado como un anticuerpo de referencia bien conocido para un epítipo intracelular de PSMA), un anticuerpo de tipo I dirigido contra MHC (como un control positivo para la tinción celular) y un control isotópico (control negativo).

- 5 Se eliminó el anticuerpo en exceso mediante 4 lavados como una solución de BSA al 0,2 % en PBS.

Se llevó a cabo la incubación con un anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón etiquetado con FITC (fluoresceína) (Beckman Coulter, EE.UU.) diluido 1:200 durante 1 h a temperatura ambiente.

Después de 2 lavados más con PBS, se añadieron 2 gotas de PBS/glicerol y se montó el cubre sobre un porta de vidrio y se selló.

- 10 A continuación se observó la muestra mediante un microscopio de fluorescencia Axioskop 20 (Carl Zeiss, Alemania).

El anticuerpo D2/B monoclonal puede reconocer específicamente células LNCaP (PSMA+) pero no puede detectar células que carecen del antígeno PSMA (es decir, células DU145).

### Ejemplo 6

Inmunohistoquímica de muestras de tejido incluidas en parafina

- 15 Se usaron secciones de carcinoma de próstata humano incluidas en parafina para evaluar la capacidad de reconocimiento de los tejidos tumorales humanos por el anticuerpo D2/B en comparación con la ya conocida y descrita del anticuerpo J591. Los tejidos incluidos en parafina se colocaron en un horno a 60 °C (30 a 60 min), se trataron 5 veces con xilol durante 4 min cada vez, se rehidrataron secuencialmente dos veces en etanol al 100 %, 95 %  
20 %, 75 % durante 3 min cada vez y se sumergieron en H<sub>2</sub>O durante 5 min; para no desenmascarar el antígeno PSMA, las muestras se colocaron seguidamente en un baño de vapor en tampón citrato 10 mM pH 6,0 durante 15 min a 95 °C. Después de 3 lavados en PBS durante 5 min cada vez, incubación en PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % durante 6 min y 3 lavados más en PBS durante 5 min cada vez, las muestras se trataron con PBS + BSA al 0,1 % durante 30-40 min para saturar los sitios de unión no específicos; se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario (D2/B o J591, ambos a 2 µg/ml) toda la noche a 4 °C; después de 3 lavados con PBS durante 5 min cada uno se usó el kit  
25 EnVision Detection System HRP/DAB (Dako), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se llevó a cabo la contratinción con hematoxilina Gill durante 5 s, seguida por lavados con H<sub>2</sub>O abundante, y posteriormente con soluciones al 75 %, 80 %, 95 %, 100 % secuenciales de etanol y a continuación con xilol durante 4 veces, 5 min cada vez. Seguidamente se montaron los portas con resina y se observaron mediante un microscopio óptico normalizado.

### 30 Ejemplo 7

Citometría de flujo

- La citometría de flujo permite la evaluación de importantes parámetros fisicoquímicos de partículas en suspensión. Usando una emisión laser y detectores ópticos, el sistema registra la luz fluorescente emitida por un fluorocromo (compuesto orgánico que emite luz fluorescente cuando se excita adecuadamente) unido a un anticuerpo  
35 monoclonal específico para las moléculas expresadas en la superficie y/o en el citoplasma de una célula bajo investigación. La señal emitida se convierte a continuación en señales analógicas/digitales.

Se usó esta técnica para evaluar parámetros importantes, tales como:

- 40 la especificidad, es decir, la capacidad de los anticuerpos obtenidos (D2/B y scFv D2B) para unirse selectivamente al antígeno relevante sobre la superficie de células positivas para el antígeno sin unirse específicamente a células negativas para el antígeno;  
la concentración del anticuerpo que satura los sitios del antígeno expresados en la superficie de células LNCaP, en comparación con el anticuerpo J591 del control.

- Las células LNCaP y PC-3 cultivadas a 37 °C se despegaron de las superficies plásticas con Tripsina/EDTA durante 4 min a 37 °C, se neutralizaron con medio completo, se lavaron dos veces con 10 ml de una solución fría de PBS/BSA al 0,2 % mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C y finalmente se incubaron 2-3 x 10<sup>5</sup>  
45 células/0,5 ml con D2/B, J591 o un isótopo control durante 1 h a 4 °C. Tras 2 lavados con 3 ml de PBS/BSA al 0,2 % a 4 °C para eliminar el exceso de anticuerpo primario, las células que se volvieron a suspender en 100 µl de PBS/BSA al 0,2 % se incubaron durante 30 min a 4 °C en presencia de una cantidad saturante de un anticuerpo secundario (aproximadamente 1 µg/100 µl), IgG de cabra dirigida contra IgG de ratón etiquetada con FITC (fluoresceína).  
50

Al final del tiempo de incubación, tras un lavado adicional y resuspensión de las células en 500 µl de PBS/BSA al 0,2 %, se llevó a cabo el análisis de citometría de flujo usando un citofluorímetro (BD FACSCanto). Para detectar la unión de scFv D2/B se usó un anticuerpo secundario de ratón dirigido contra la etiqueta myc seguido por un

anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón etiquetado con FITC.

Los parámetros que se consideraron en el análisis fueron: intensidad promedio de la fluorescencia (MFI) de las células investigadas y el porcentaje de células encontradas en una ventana comprendida entre el canal 500 y el canal 256,000; las células comprendidas en este intervalo se consideraron positivas.

- 5 Para verificar la capacidad de unión de los anticuerpos, se incubaron células LNCaP con cantidades crecientes de anticuerpos D2/B o scFvD2b dirigidos contra PSMA o con el anticuerpo J591 del cual se conoce la afinidad de unión. Con los valores de MFI obtenidos se representó gráficamente una curva de unión en la que el valor que daba como resultado una saturación del 100 % de los sitios del antígeno corresponde a la concentración del anticuerpo para la que se registró el valor de la fluorescencia más elevado.
- 10 Tal como se ilustra en las Figuras 3.A y 3.B los anticuerpos D2/B y scFv D2/B reconocen el antígeno expresado en la membrana plasmática a un valor de MFI de aproximadamente 8000 y 1500, respectivamente. En las Figuras 3.C y 3.D se notifican los controles negativos. Usando la misma técnica, los inventores evaluaron también la especificidad del moAb analizando la unión no específica con las células negativas para el antígeno, PC-3 (metástasis ósea del carcinoma de próstata); los resultados, resumidos en las Figuras 4.A y 4.B, muestran la ausencia de unión del moAb D2/B y scFv D2/B, respectivamente. Las Figuras 4.C y 4.D muestran los respectivos controles negativos.
- 15

La concentración de J591, D2/B y scFv D2/B que satura los sitios del antígeno (PSMA) expresados en la superficie de las células LNCaP se muestran en la Figura 5.

### Ejemplo 8

Síntesis de inmunotoxinas, Reticulación química de RTA

- 20 Se ha llevado a cabo la síntesis de inmunotoxinas tal como se describe a continuación.

Antes de la conjugación, se cargó el anticuerpo D2/B en una columna de gel AffiBlue para eliminar la fracción de anticuerpos que podrían unirse a la matriz y que podrían contaminar las preparaciones de inmunotoxina y reducir su eficacia citotóxica. El D2/B eluido se dializó en PBS y se derivatizó con SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfametil-alfa(2-piridilditio)tolueno) disuelto en una concentración 10 mM en dimetilformamida anhidra, con una relación de IgG:reticulante de aproximadamente 1:2,5.

25

Se eliminó el exceso de reticulante mediante filtración en gel en columnas PD-10 (Pharmacia, Uppsala, Suiza).

- Se determinó el número de grupos SH introducidos, que corresponden al número de posibles uniones que enlazan la toxina al anticuerpo basándose en el hecho de que DTT, por la reducción de los grupos tiol, libera el grupo piridina-2-tiona, que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 343 nm. Este valor estaba comprendido entre 1,2 y 1,5.
- 30

Se trató RTA recombinante, producida y purificada de acuerdo con el protocolo descrito por Chignola y col. (J. Biol. Chem., 270: 23345-51, 1995) con DTT 25 mM (ditiotreitól) a temperatura ambiente durante 2 h para reducir cisteínas y convertirlas en disponibles para la conjugación.

- Se eliminó posteriormente DTT mediante filtración en gel sobre columnas PD-10 y la toxina, reducida y purificada, se concentró mediante Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA).
- 35

Se llevó a cabo la reacción de conjugación para enlazar el anticuerpo D2/B derivatizado y RTA a temperatura ambiente durante 48 h.

La inmunotoxina resultante se purificó mediante filtración en gel en una columna TSK3000SW (Beckman, San Ramon, CA), con un flujo de 0,5 ml/min y PBS como tampón de elución.

- 40 Los picos que correspondían a las especies moleculares de 150-180 kDa (D2/B+1 RTA) y 210-240 kDa (Ab+2/3 RTA) se purificaron adicionalmente en gel AffiBlue, con un gradiente salino 150 nM – 1 M en tampón fosfato 5 mM. La toxina sola tiene un peso molecular de aproximadamente 3 kDa mientras que el anticuerpo tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa.

- 45 A continuación se usó una columna de gel AffiBlue debido a que su matriz se puede unir a enzimas que aprovechan NAD como coenzima o que tienen secuencias de nucleótidos como sustrato, análogamente al RTA, por estas razones, este gel puede unirse específicamente a RTA (y a los anticuerpos conjugados de RTA) permitiendo a la vez que el anticuerpo libre pase a su través.

- Las fracciones que contenían la proteína de interés se combinaron, se concentraron con Centricon-10, se dializaron frente a PBS. La concentración de la proteína se evaluó espectrofotométricamente y las diferentes combinaciones se esterilizaron mediante filtración.
- 50

**Ejemplo 9**

Obtención de la inmunotoxina scFv D2/B-PE40 mediante fusión génica 8secuencias de nucleótidos de la SEQ. ID N° 5)

5 La secuencia de scFv D2/B se clonó en un vector pET11d entre los sitios de restricción Nco I y Hind III, en la dirección 3' con respecto a Hind III se insertó la secuencia de nucleótidos que codificaba la toxina PE40.

10 La proteína de fusión se produjo en la cepa BL21(DE3)pLysS de E. coli transformada anteriormente con el vector plasmídico que codificaba la inmunotoxina; la bacteria creció a 37 °C con agitación (225 rpm) en medio LB al que se adicionó glucosa al 0,5 %, MgSO<sub>4</sub> al 0,05 %, 100 µg/ml de ampicilina, 34 µg/ml de cloranfenicol, se indujeron a una absorbancia de 0,8 a 600 nm con IPTG 1 mM final. Tras 3 h de incubación las bacterias cosechadas mediante  
15 centrifugación a 5000 rpm se lisaron mediante incubación y sonicación en tampón de lisis (Tris 20 mM pH = 7,5 + EDTA 10 mM + Triton-X100 al 1 %) al que se agregaron 0,1 mg/ml de lisozima, PMSF 0,1 mM, inhibidores de la proteasa (Roche). Se cosecharon los cuerpos de inclusión (IB) mediante centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C, estos se lavaron dos veces en tampón de lisis y se solubilizaron a una concentración de 20 mg/ml en tampón CAPS 50 mM pH = 11 al que se adicionó N-laurilsarcosina a una concentración final de 0,8-1,0 % y DTT 1 mM. El material  
20 insoluble se eliminó mediante centrifugación y la proteína se replegó mediante diálisis sucesivas. Se llevaron a cabo las diálisis I y II durante 12 h a 4 °C en Tris 20 mM pH = 8,5 + DTT 0,1 mM + PMSF 0,1 mM, se llevaron a cabo las diálisis III y IV durante 12 h en Tris 20 mM pH = 8,5 + PMSF 0,1 mM, se llevó a cabo la diálisis V durante 24 h en Tris 0,1 M pH = 8,0 + l-glutatión 5 mM reducido + L glutatión 0,5 mM oxidado + L-arginina 0,4 M + PMSF 0,1 mM, se llevó a cabo la diálisis VI durante 24 h en Tris 20 mM pH = 7,4 + PMSF 0,1 mM.

20 A continuación se purificó la proteína en 2 ciclos mediante una columna QAE (Bio-Rad) con un gradiente lineal 0-0,05 M de 200 ml de NaCl en Tris 20 mM pH = 7,4, el volumen de las fracciones recuperadas fue de 2,5 ml.

La pureza de la proteína se evaluó en SDS-PAGE y se identificó mediante transferencia Western.

**Ejemplo 10**

Citotoxicidad en monocapas de células

25 Se evaluó el efecto citotóxico del inmunoconjugado en células positivas para PSMA y negativas para PSMA midiendo la inhibición de la proliferación celular, en comparación con la toxina en solitario.

Se sembraron células LNCaP p PC-3 en placas de microvaloración de 96 pocillos en medio completo en cantidades adecuadas hasta alcanzar la subconfluencia en los pocillos del control sin tratar a las 32 h del ensayo.

30 Algunos pocillos se trataron con cantidades crecientes de inmunotoxinas D2/B-RTA (obtenidas mediante conjugación química usando el reticulante SMPT) o scFv D2/B-PE40 (obtenidas mediante fusión génica) o con la inmunotoxina J591-RTA del control (obtenida mediante conjugación química con el reticulante SMPT), otros pocillos se trataron con RTA, PE o PE40 solamente, el moAb D2/B o scFv D2/B solamente, durante 22 h a 37 °C.

Seguidamente se cosecharon las células sobre filtros de fibras mediante un cosechador de células y se midió la radioactividad incorporada mediante centelleo líquido en un contador β.

35 El efecto citocida se expresó como una función de la incorporación de la timidina tritiada en comparación con un control representado por las células sin tratar, los resultados se expresaron como un porcentaje de inhibición de la proliferación. Cuánto más pequeña es la emisión radiactiva, menor será la incorporación de la timidina tritiada, y mayor se considera por tanto la inhibición del crecimiento celular.

40 A continuación se calculó la CI50, es decir, la concentración del fármaco que es capaz de inhibir el 50 % de la proliferación celular; este valor puede compararse fácilmente con la CI50 medida usando diferentes moléculas en el ensayo de citotoxicidad.

Tabla 2

	LNCap PSMA+ ng/ml	PC-3 PSMA- ng/ml
J591-smpt-RTA	7,4	> 1.260
D2/B-smpt-RTA	21	> 16.800
scFv D2/B-PE40	1,3	> 6.500
moAb D2/B	> 6.000	> 6.000
scFv D2/B	> 3.300	> 3.300
Toxina PE	2,4	3,4
Toxina PE40	1.950	
Toxina RTA	12.000	9.000

**Ejemplo 11**

scFv D2/B monobiotinilado

Se obtuvieron scFv D2/B monobiotinilados clonando la molécula de scFv entre los sitios de restricción NcoI y NotI; en el vector de clonación en 3' con respecto al sitio NotI se clonaron sucesivamente; una secuencia de codificación de un dominio derivado de la región bisagra de IgA, una secuencia de codificación de un tramo peptídico denominado (BAD) (Dominio Aceptor de Biotina) y una secuencia de codificación de un fragmento escindible reconocido por las proteasas enteroquinasa y Factor X. La región bisagra de IgA es un separador entre scFv y el dominio BAD, que fue monobiotinilado en una reacción catalizada por la enzima BirA. Se llevó a cabo la producción de proteínas biotiniladas en bacterias transformadas con el plásmido de interés y capaces de biotinar el sitio BAD; mediante la inducción de IPTG y la adición de biotina libre al medio de cultivo se obtuvo la proteína en investigación, esto incluye el dominio scFv dotado con la especificidad deseada y una única molécula de biotina.

La proteína scFv-biotina se purificó sobre un gel NiNTA en condiciones parcialmente desnaturizantes para facilitar la exposición de la etiqueta 5-His del extremo N y la unión a la columna. Se analizó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE a la vez que se confirmó su identidad mediante transferencia Western usando anticuerpos secundarios etiquetados con el scFv y con la etiqueta His.

A continuación se evaluaron las propiedades funcionales del scFv biotinilado mediante el análisis FACS llevado a cabo con células PSMA+ (LNCaP) y PSMA- (PC-3).

La MFI en células LNCaP es de 161, 728 y 314 para el control negativo (avidina-FITC solo), del anticuerpo D2/B químicamente biotinilados y el scFv-D2/B enzimáticamente etiquetado, respectivamente, mientras que los valores de MFI obtenidos con células PC-3 son de 132, 151 y 180, respectivamente.

**Ejemplo 12**

Ejemplo de la formación de imágenes in vivo usando el anticuerpo D2/B etiquetado con trazadores fluorescentes

Para abordar la posibilidad de aplicar las técnicas de formación de imágenes in vivo basadas en el uso de los anticuerpos D2/B o scFv D2/B etiquetados con trazadores fluorescentes, se inocularon ratones SCID inmunodeficientes con células LNCaP pretratadas in vitro con anticuerpo D2/B unido al fluorocromo Cy5.5, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo ha permitido trazar un implante s.c. de  $7,5 \times 10^5$  células PSMA+, pero los inventores tienen indicaciones buenas de que se pueden identificar menores números de células (es decir, por debajo de  $10^6$  células). Figura 6

**Ejemplo 13**

Ejemplo de reticulación con un isótopo radioactivo

La elección del agente quelante usado para derivatizar un anticuerpo es dependiente de la elección de radionucleidos que necesitan conjugarse con el propio anticuerpo; adicionalmente, la sustancia quelante debe dotarse con un grupo funcional disponible que se puede desarrollar para unirse al anticuerpo. Por ejemplo, el compuesto DOTA se puede reticular directamente con el anticuerpo mediante uno de los 4 grupos carboxilo disponibles; el anticuerpo se concentró, se lavó con DTPA al 1 % (pH = 5,0), se dializó en tampón fosfato 0,1 M (pH = 7,0) y se hizo reaccionar con ésteres activos de DOTA. Los ésteres activos de DOTA se crearon disolviendo 0,361 mmol (146 mg) y 0,313 mmol (36 mg) de N-hidroxisuccinimida en 2 ml de H<sub>2</sub>O y ajustando el pH a pH = 7,3 con NaOH antes de la adición de 10 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. La mezcla de reacción se enfrió en hielo durante 1 h antes de añadirse al anticuerpo que se iba a derivatizar. El conjugado DOTA-anticuerpo resultante se separó del DOTA y resto de reactivos en exceso mediante filtración en gel (columnas PD-10) o mediante centrifugación (concentradores Amicon) usando una solución de acetato de amonio 0,3 M. El radiomarcado de DOTA con <sup>111</sup>In se consiguió mediante la adición de <sup>111</sup>In-<sup>13</sup>C en HCl 0,01 M a la solución 0,3 M de DOTA-Ab.

Tras 20 min, la mezcla de reacción se separó mediante columnas Biogel-P6 equilibradas con HSA-PBS al 1 %. La cantidad de radioisótopo libre se evaluó mediante cromatografía TLC.

Listado de secuencias

<110> Universidad de Verona

<120> ANTICUERPO MONOCLONAL AISLADO O FRAGMENTO DEL MISMO DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE LA PRÓSTATA, SUS CONJUGADOS Y USOS

5 <130> 840-07

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 366

10 <212> ADN

<213> Ratón

<220>

<221> región\_v

<222> (1)..(366)

15 <223> cadena pesada variable de Ab D2/B

<220>

<221> misc\_feature

<222> (97)..(114)

<223> CDRH1

20 <220>

<221> misc\_feature

<222> (157)..(204)

<223> CDRH2

25 <220>

<221> misc\_feature

<222> (301)..(336)

<223> CDRH3

<400> 1

<b>atggccgagg tgaagctcca ggagtcagga cctggcctcg ttaaaccctc tcagtctctg</b>	<b>60</b>
<b>tctctcacct gctctgtcac tggctactcc atcaccagtg gttattactg gaactggatc</b>	<b>120</b>
<b>cggcagtttc caggaaaca actggagtgg atgggctcca taagtctcga cggtacaat</b>	<b>180</b>
<b>aactacaacc catctctcag aaatcgaatc tccatcactc gtgacacatc taagaaccag</b>	<b>240</b>
<b>tttttctga agttgaattc tgtgactact gaagacacag ctacatatta ctgtgcaaga</b>	<b>300</b>
<b>gagggagatt actacggtag tagcttcttt acttactggg gccaaaggac tctggtcact</b>	<b>360</b>
<b>gtctctg</b>	<b>366</b>

30 <210> 2

<211> 327

<212> ADN

<213> Ratón

<220>

35 <221> región\_v

<222> (1)..(327)

<223> cadena ligera variable de Ab D2/B

<220>

<221> misc\_feature

40 <222> (76)..(108)

<223> CDRL1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (154)..(174)

5 <223> CDRL2

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (271)..(294)

10 <223> CDRL3

<400> 2

```

gcaactcgaca ttgtgatgac tcagtctcca gcttcaactgt ctgcatctgt gggagaaact      60
gtcaccctca catgtggagc aagtgagaat atttacgggtg ctttaaattg gtatcagcgg      120
aaacagggaa aatctcctca actcctgatc tatggagcaa ccaacttggc agatggcatg      180
tcatcgaggt tcagtggcag cggatctggt agacagtatt ctctcaagat cagtagcctg      240
catcctgacg atgttgcaac gtattactgt caaaatgtgt ttcgtactta cacgttcgga      300
ggggggacaa agttggaaat aaaacgg      327

```

<210> 3  
 <211> 822  
 <212> ADN

15 <213> Ratón

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(822)  
 <223> scFv D2/B

20 <220>  
 <221> región\_v  
 <222> (1)..(366)  
 <223> cadena pesada variable de scFv D2/B

25 <220>  
 <221> región\_v  
 <222> (415)..(741)  
 <223> cadena ligera variable de scFv D2/B

<400> 3

ES 2 400 082 T3

atg	gcc	gag	gtg	aag	ctc	cag	gag	tca	gga	cct	ggc	ctc	ggt	aaa	cct	48
Met	Ala	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	
1				5			10							15		
tct	cag	tct	ctg	tct	ctc	acc	tgc	tct	gtc	act	ggc	tac	tcc	atc	acc	96
Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	
			20				25						30			
agt	ggt	tat	tac	tgg	aac	tgg	atc	cgg	cag	ttt	cca	gga	aac	aaa	ctg	144
Ser	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	
		35					40					45				
gag	tgg	atg	ggc	tcc	ata	agt	ttc	gac	ggt	aac	aat	aac	tac	aac	cca	192
Glu	Trp	Met	Gly	Ser	Ile	Ser	Phe	Asp	Gly	Asn	Asn	Asn	Tyr	Asn	Pro	
	50					55					60					
tct	ctc	aga	aat	cga	atc	tcc	atc	act	cgt	gac	aca	tct	aag	aac	cag	240
Ser	Leu	Arg	Asn	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	
65					70					75					80	
ttt	ttt	ctg	aag	ttg	aat	tct	gtg	act	act	gaa	gac	aca	gct	aca	tat	288

Phe	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr		
				85					90					95			
tac	tgt	gca	aga	gag	gga	gat	tac	tac	ggt	agt	agc	ttc	ttt	act	tac		336
Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Tyr		
			100					105					110				
tgg	ggc	caa	ggg	act	ctg	gtc	act	gtc	tcg	agt	ggt	gga	ggc	ggt	tca		384
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
		115					120					125					
ggc	gga	ggt	ggc	tct	gga	ggt	ggc	ggt	agt	gca	ctc	gac	att	gtg	atg		432
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Asp	Ile	Val	Met		
	130					135					140						
act	cag	tct	cca	gct	tca	ctg	tct	gca	tct	gtg	gga	gaa	act	gtc	acc		480
Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr		
145				150						155					160		
ctc	aca	tgt	gga	gca	agt	gag	aat	att	tac	ggt	gct	tta	aat	tgg	tat		528
Leu	Thr	Cys	Gly	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Gly	Ala	Leu	Asn	Trp	Tyr		
				165					170					175			
cag	cgg	aaa	cag	gga	aaa	tct	cct	caa	ctc	ctg	atc	tat	gga	gca	acc		576
Gln	Arg	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Thr		
			180					185					190				
aac	ttg	gca	gat	ggc	atg	tca	tcg	agg	ttc	agt	ggc	agc	gga	tct	ggt		624
Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Met	Ser	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly		
		195					200					205					
aga	cag	tat	tct	ctc	aag	atc	agt	agc	ctg	cat	cct	gac	gat	ggt	gca		672
Arg	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	His	Pro	Asp	Asp	Val	Ala		
	210					215					220						
acg	tat	tac	tgt	caa	aat	gtg	ttt	cgt	act	tac	acg	ttc	gga	ggg	ggg		720
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Val	Phe	Arg	Thr	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly		
225					230					235				240			
aca	aag	ttg	gaa	ata	aaa	cgg	gcg	gcc	gca	cat	cat	cat	cac	cat	cac		768
Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His		
				245				250						255			
ggg	gcc	gca	gaa	caa	aaa	ctc	atc	tca	gaa	gag	gat	ctg	aat	ggg	gcc		816
Gly	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala		
			260				265						270				
gca	tag																822
Ala																	

<210> 4  
 <211> 273  
 <212> PRT  
 5 <213> Ratón  
 <400> 4

Met	Ala	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro		
1				5					10					15			
Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr		
			20					25					30				
Ser	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu		
		35					40					45					

Glu Trp Met Gly Ser Ile Ser Phe Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro  
 50 55 60  
 Ser Leu Arg Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 65 70 75 80  
 Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Thr Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met  
 130 135 140  
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr  
 165 170 175  
 Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr  
 180 185 190  
 Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 195 200 205  
 Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp Val Ala  
 210 215 220  
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Phe Arg Thr Tyr Thr Phe Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala His His His His His His  
 245 250 255  
 Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala  
 260 265 270

Ala

<210> 5  
 <211> 1830  
 <212> ADN  
 5 <213> Ratón y Bacterias

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1830)  
 <223> scFv D2/B-PE40

<220>  
 <221> región\_v  
 <222> (1)..(738)  
 <223> región variable de la cadena pesada y ligera de scFv D2/B

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (739)..(1830)  
 <223> secuencia de la Toxina PE40

<400> 5

atg gcc gag gtg aag ctc cag gag tca gga cct ggc ctc gtt aaa cct	48
Met Ala Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro	
1 5 10 15	
tct cag tct ctg tct ctc acc tgc tct gtc act ggc tac tcc atc acc	96
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr	
20 25 30	
agt ggt tat tac tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg	144
Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu	
35 40 45	
gag tgg atg ggc tcc ata agt ttc gac ggt aac aat aac tac aac cca	192
Glu Trp Met Gly Ser Ile Ser Phe Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro	
50 55 60	
tct ctc aga aat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag	240
Ser Leu Arg Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln	
65 70 75 80	
ttt ttt ctg aag ttg aat tct gtg act act gaa gac aca gct aca tat	288
Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr	
85 90 95	
tac tgt gca aga gag gga gat tac tac ggt agt agc ttc ttt act tac	336
Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Thr Tyr	
100 105 110	
tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tgc agt ggt gga ggc ggt tca	384
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
115 120 125	
ggc gga ggt ggc tct gga ggt ggc ggt agt gca ctc gac att gtg atg	432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met	
130 135 140	
act cag tct cca gct tca ctg tct gca tct gtg gga gaa act gtc acc	480
Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr	
145 150 155 160	
ctc aca tgt gga gca agt gag aat att tac ggt gct tta aat tgg tat	528
Leu Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr	
165 170 175	
cag cgg aaa cag gga aaa tct cct caa ctc ctg atc tat gga gca acc	576
Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr	
180 185 190	
aac ttg gca gat ggc atg tca tcg agg ttc agt ggc agc gga tct ggt	624
Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
195 200 205	
aga cag tat tct ctc aag atc agt agc ctg cat cct gac gat gtt gca	672
Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp Val Ala	

210			215			220										
acg Thr 225	tat Tyr	tac Tyr	tgt Cys	caa Gln	aat Asn 230	gtg Val	ttt Phe	cgt Arg	act Thr	tac Tyr 235	acg Thr	ttc Phe	gga Gly	ggg Gly	ggg Gly 240	720
aca Thr	aag Lys	ttg Leu	gaa Glu	ata Ile 245	aaa Lys	gct Ala	ttc Phe	ggc Gly	ggc Gly 250	agc Ser	ctg Leu	gcc Ala	gcg Ala	ctg Leu 255	acc Thr	768
gcg Ala	cac His	cag Gln	gct Ala 260	tgc Cys	cac His	ctg Leu	ccg Pro	ctg Leu 265	gag Glu	act Thr	ttc Phe	acc Thr	cgt Arg 270	cat His	cgc Arg	816
cag Gln	ccg Pro	cgc Arg 275	ggc Gly	tgg Trp	gaa Glu	caa Gln	ctg Leu 280	gag Glu	cag Gln	tgc Cys	ggc Gly	tat Tyr 285	ccg Pro	gtg Val	cag Gln	864
cgg Arg	ctg Leu 290	gtc Val	gcc Ala	ctc Leu	tac Tyr	ctg Leu 295	gcg Ala	gcg Ala	cgg Arg	ctg Leu	tcg Ser 300	tgg Trp	aac Asn	cag Gln	gtc Val	912
gac Asp 305	cag Gln	gtg Val	atc Ile	cgc Arg	aac Asn 310	gcc Ala	ctg Leu	gcc Ala	agc Ser	ccc Pro 315	ggc Gly	agc Ser	ggc Gly	ggc Gly	gac Asp 320	960
ctg Leu	ggc Gly	gaa Glu	gcg Ala	atc Ile 325	cgc Arg	gag Glu	cag Gln	ccg Pro	gag Glu 330	cag Gln	gcc Ala	cgt Arg	ctg Leu	gcc Ala 335	ctg Leu	1008
acc Thr	ctg Leu	gcc Ala	gcc Ala 340	gcc Ala	gag Glu	agc Ser	gag Glu	cgc Arg 345	ttc Phe	gtc Val	cgg Arg	cag Gln	ggc Gly 350	acc Thr	ggc Gly	1056
aac Asn	gac Asp	gag Glu 355	gcc Ala	ggc Gly	gcg Ala	gcc Ala	aac Asn 360	gcc Ala	gac Asp	gtg Val	gtg Val	agc Ser 365	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys	1104
ccg Pro	gtc Val 370	gcc Ala	gcc Ala	ggt Gly	gaa Glu	tgc Cys 375	gcg Ala	ggc Gly	ccg Pro	gcg Ala	gac Asp 380	agc Ser	ggc Gly	gac Asp	gcc Ala	1152
ctg Leu 385	ctg Leu	gag Glu	cgc Arg	aac Asn	tat Tyr 390	ccc Pro	act Thr	ggc Gly	gcg Ala	gag Glu 395	ttc Phe	ctc Leu	ggc Gly	gac Asp	ggc Gly 400	1200
ggc Gly	gac Asp	gtc Val	agc Ser	ttc Phe 405	agc Ser	acc Thr	cgc Arg	ggc Gly	acg Thr 410	cag Gln	aac Asn	tgg Trp	acg Thr	gtg Val 415	gag Glu	1248
cgg Arg	ctg Leu	ctc Leu	cag Gln 420	gcg Ala	cac His	cgc Arg	caa Gln	ctg Leu 425	gag Glu	gag Glu	cgc Arg	ggc Gly	tat Tyr 430	gtg Val	ttc Phe	1296
gtc Val	ggc Gly	tac Tyr 435	cac His	ggc Gly	acc Thr	ttc Phe	ctc Leu 440	gaa Glu	gcg Ala	gcg Ala	caa Gln	agc Ser 445	atc Ile	gtc Val	ttc Phe	1344
ggc Gly	ggg Gly 450	gtg Val	cgc Arg	gcg Ala	cgc Arg	agc Ser 455	cag Gln	gac Asp	ctc Leu	gac Asp	gcg Ala 460	atc Ile	tgg Trp	cgc Arg	ggt Gly	1392
ttc Phe 465	tat Tyr	atc Ile	gcc Ala	ggc Gly	gat Asp 470	ccg Pro	gcg Ala	ctg Leu	gcc Ala	tac Tyr 475	ggc Gly	tac Tyr	gcc Ala	cag Gln	gac Asp 480	1440
cag Gln	gaa Glu	ccc Pro	gac Asp	gca Ala 485	cgc Arg	ggc Gly	cgg Arg	atc Ile	cgc Arg 490	aac Asn	ggt Gly	gcc Ala	ctg Leu	ctg Leu 495	cgg Arg	1488

gtc tat gtg ccg cgc tcg agc ctg ccg ggc ttc tac cgc acc agc ctg 1536  
 Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu  
 500 505 510  
 acc ctg gcc gcg ccg gag gcg gcg ggc gag gtc gaa cgg ctg atc ggc 1584  
 Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly  
 515 520 525  
 cat ccg ctg ccg ctg cgc ctg gac gcc atc acc ggc ccc gag gag gaa 1632  
 His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu  
 530 535 540  
 ggc ggg cgc ctg gag acc att ctc ggc tgg ccg ctg gcc gag cgc acc 1680  
 Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr  
 545 550 555 560  
 gtg gtg att ccc tcg gcg atc ccc acc gac ccg cgc aac gtc ggc ggc 1728  
 Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly  
 565 570  
 gac ctc gac ccg tcc agc atc ccc gac aag gaa cag gcg atc agc gcc 1776  
 Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala  
 580 585 590  
 ctg ccg gac tac gcc agc cag ccc ggc aaa ccg ccg cgc gag gac ctg 1824  
 Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu  
 595 600 605  
 aag taa 1830  
 Lys

<210> 6  
 <211> 609  
 <212> PRT  
 5 <213> Ratón y Bacterias  
 <400> 6

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

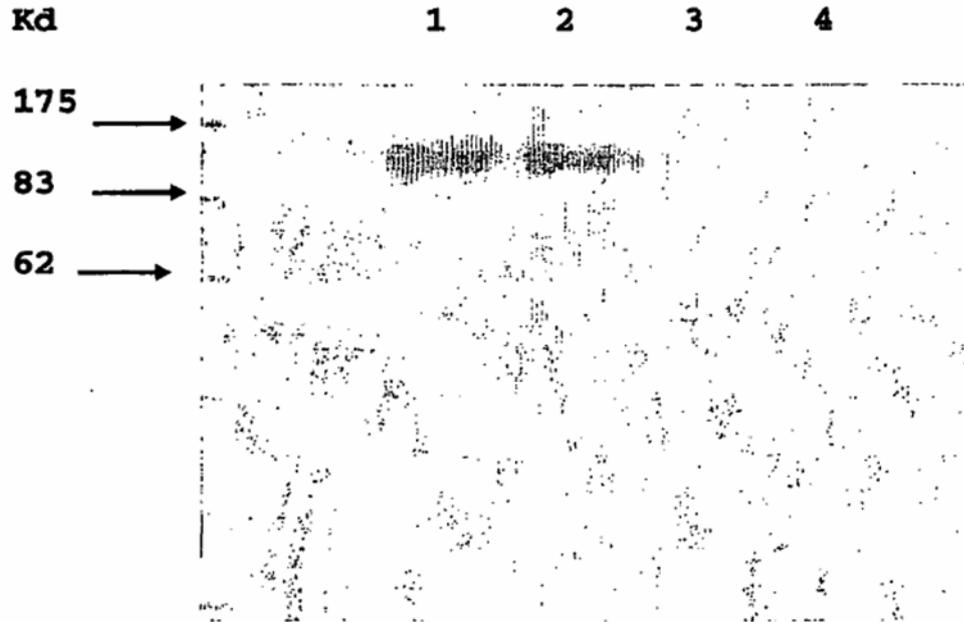
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser  
 115 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met  
 130 135 140  
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr  
 165 170  
 Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr  
 180 185 190  
 Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 195 200 205  
 Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp Val Ala  
 210 215 220  
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Phe Arg Thr Tyr Thr Phe Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Phe Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr  
 245 250 255  
 Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg  
 260 265 270  
 Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln  
 275 285  
 Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val  
 290 300  
 Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu  
 325 330 335  
 Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly  
 340 345 350  
 Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365  
 Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala  
 370 375 380  
 Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly



**REIVINDICACIONES**

1. Un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) que se une a un anticuerpo monoclonal D2/B aislado **caracterizado porque** comprende una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de las regiones variables VH y VK de la SEQ ID NO: 1 y 2.
- 5 2. Un fragmento de anticuerpo D2/B scFv que se une a un antígeno, **caracterizado porque** comprende una proteína codificada por una secuencia de al menos 741 nucleótidos consecutivos que caracteriza las regiones variables VH y VL de la SEQ ID NO: 3 que se unen a un antígeno.
3. El anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento del mismo que se une a un antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el PSMA se une en su forma natural sobre la superficie de células tumorales
- 10 4. El anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento del mismo que se une a un antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se une selectivamente al PSMA.
5. Un conjugado entre principio activo y anticuerpo que comprende un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo que se une a un antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores conjugado con un principio activo seleccionado entre el grupo que consiste en un agente de marcado, un agente citotóxico o un vehículo.
- 15 6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** dicho agente de marcado es un radionucleido o nanopartículas fluorescentes.
7. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, **caracterizado porque** dicho agente de marcado se selecciona entre el grupo que consiste en <sup>188</sup>Re, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>187</sup>Re, <sup>111</sup>In, <sup>90</sup>Y, <sup>99m</sup>Tc, <sup>177</sup>Lu.
- 20 8. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** dicho agente citotóxico es PE40, la cadena de ricina A, saporina y diantina.
9. El conjugado scFv D2/B-PE40 de la SEQ ID NO: 5.
10. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** dicho vehículo es biotina o nanopartículas.
- 25 11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo que se une a un antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.
12. Uso de un anticuerpo monoclonal aislado o de un fragmento del mismo que se une a un antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, o de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o el diagnóstico de un tumor.
- 30 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado porque** dicho tumor es un tumor de próstata.
14. Anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo que se une a un antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 para el uso en la angiogénesis de células PSMA+ de los tumores de cualquier histotipo.
- 35

Figura 1 - Transferencia Western con moAb D2/B



1 D2/B LNCaP; 2 J591 LNCaP; 3 D2/B PC-3; 4 J591 PC-3

Figura 2 - Transferencia Western con scFv D2/B

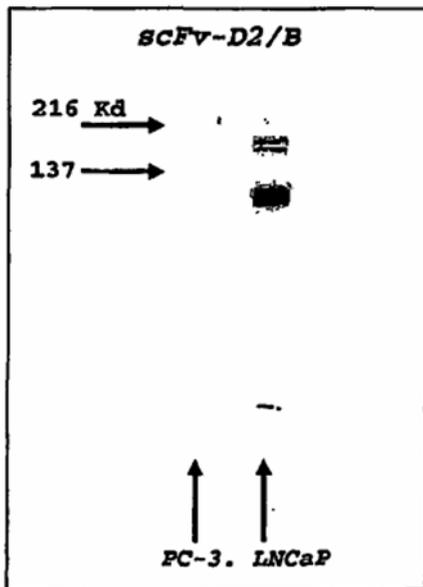


Figura 3 - Análisis de citometría de flujo con D2/B y scFv D2/B en células PSMA+

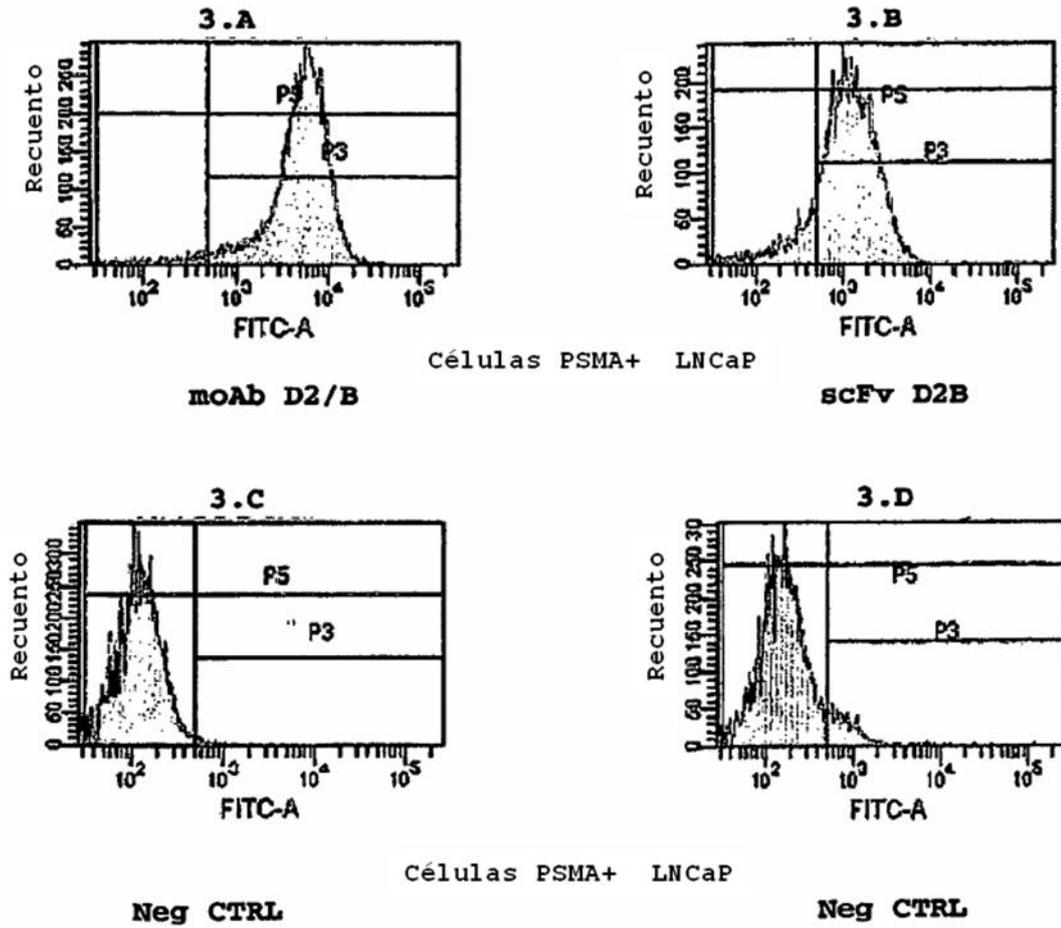


Figura 4 - Análisis de citometría de flujo con D2/B y scFv D2/B en células PSMA-

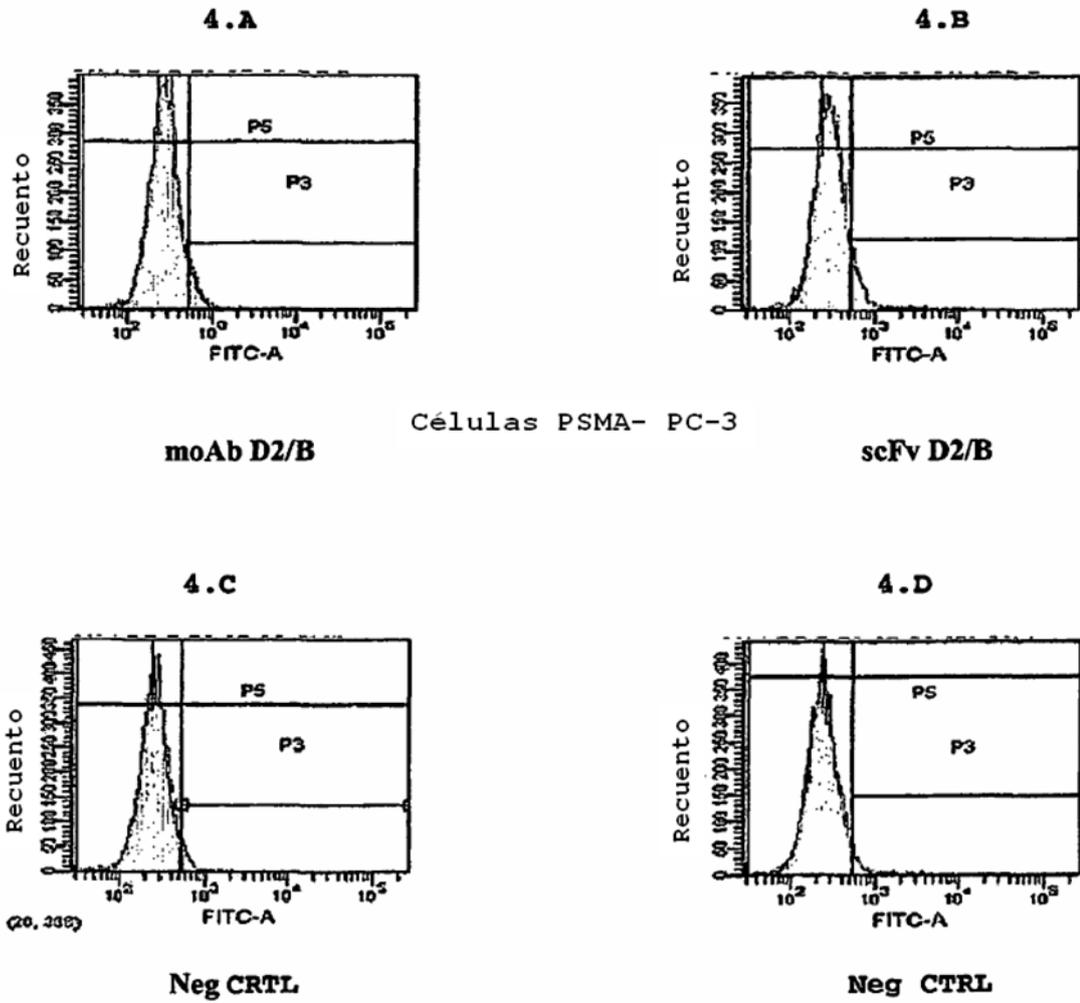


Figura 5 Comparación de la unión con células LNCaP (PSMA+) de J591, D2/B, y scFv D2/B

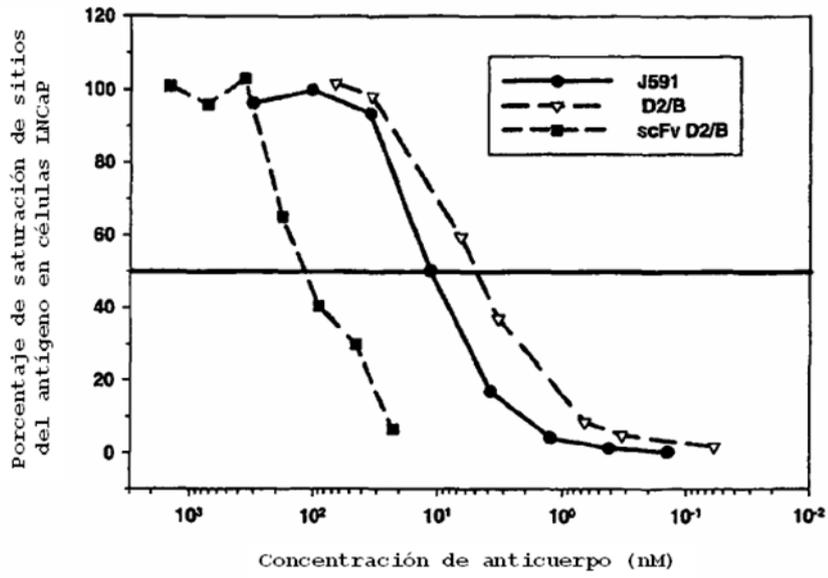


Figura 6 formación de imágenes in vivo con el anticuerpo D2/B unido al fluoróforo Cy5.5

