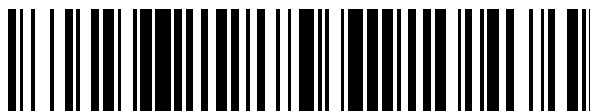


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 978**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012** **PCT/EP2012/062716**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013** **WO13001065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012** **E 12729996 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2726507**

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

30 Prioridad:

30.06.2011 DE 102011118022

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

08.05.2019

73 Titular/es:

GEMOAB MONOCLONALS GMBH (100.0%)

Tatzberg 47

01307 Dresden, DE

72 Inventor/es:

BACHMANN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 711 978 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

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

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

15 En la actualidad, se están desarrollando varios métodos de terapia basados en anticuerpos. Es crucial identificar estructuras diana en las células cancerosas que pueden servir como objetivos para terapias basadas en anticuerpos. Un sitio de orientación adecuado para el tratamiento del cáncer de próstata son las proteínas de superficie que están predominantemente presentes en el tejido de la próstata y que muestran una sobreexpresión en células malignas en
20 comparación con las sanas.

El antígeno de células madre específico de la próstata (PSCA) es una de esas moléculas de superficie que es específica de las células de la próstata y se expresa cada vez más en las células de cáncer de próstata en comparación con el tejido sano (antígeno asociado al tumor). El PSCA humano comprende 123 aminoácidos y tiene
25 una secuencia de señal N-terminal, una secuencia de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal y varios sitios de N-glicosilación. Se considera que PSCA es parte de la familia Thy-1/Ly-6 de moléculas de superficie celular ancladas a GPI, ya que presenta, entre otros, los residuos de cisteína conservados característicos de esta familia [Reiter 1998].

30 Debido al aumento de la expresión en los tumores de próstata, el PSCA es una molécula diana adecuada para el tratamiento del cáncer de próstata y hasta el momento se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas dirigidas al PSCA como objetivo. Se ha reportado evidencia de la eficacia del PSCA como un objetivo terapéutico en la terapia del cáncer en humanos, entre otros, por vacunación con células dendríticas previamente cargadas con un péptido de PSCA. Los ensayos clínicos (Fase 1 y 2) con 12 pacientes con cáncer de próstata refractarios a terapia
35 hormonal y quimioterapia mostraron que la vacunación con células dendríticas cargadas con péptido PSCA en cinco de los pacientes causó una respuesta de células T a PSCA que promedió con un tiempo de supervivencia prolongado correlacionado. En un paciente, incluso se observó una reducción en la masa tumoral [Thomas-Kaskel 2006]. El documento WO 2009/032949 A2 describe anticuerpos monoclonales anti-PSCA (1G8) utilizados para el direccionamiento de tumores y su detección. Las regiones CDR de los anticuerpos tienen las siguientes secuencias
40 de aminoácidos:

	región variable de la cadena liviana (1G8)		región variable de la cadena pesada (1G8)	
CDR1	SASSVRFIHW	SEQ ID NO. 69	DYYIHW	SEQ ID NO. 72
CDR2	DTSKLAS	SEQ ID NO. 70	WIDPENGDTFVVPKFQG	SEQ ID NO. 73
CDR3	QQWSSSPFT	SEQ ID NO. 71	TGGF	SEQ ID NO. 74

Debido a las propiedades citotóxicas del anticuerpo 1G8, no es adecuado para estrategias de focalización basadas en el reclutamiento de células efectoras (Gu 2005).

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

50 [Feldmann 2010] desarrolló anticuerpos recombinantes biespecíficos con un paratopo de unión a PSCA y un paratopo de unión a CD3. El paratopo de unión a PSCA de los anticuerpos biespecíficos se deriva del anticuerpo PSCA 7F5 [Morgenroth 2007] y comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos:

	región variable de la cadena liviana (7F5)		región variable de la cadena pesada (7F5)	
CDR1	RTSQDISNYLN	SEQ ID NO. 27	SYTMS	SEQ ID NO. 30
CDR2	YTLKLNS	SEQ ID NO. 28	YIHNGGGHTYYPDTIKG	SEQ ID NO. 31
CDR3	QQSKTLPWT	SEQ ID NO. 29	RMYYGNSHWYFDV	SEQ ID NO. 32

Los anticuerpos biespecíficos descritos en [Feldmann 2010] llevaron con éxito a la lisis específica mediada por células T de células tumorales positivas a PSCA in vitro. Para una lisis específica de aproximadamente el 40% de las células tumorales positivas a PSCA utilizadas, en una proporción de células efectoras a células tumorales positivas a PSCA de 20:1, se deben usar al menos 5 ng de los anticuerpos biespecíficos descritos en [Feldmann 2010]. In vitro, con el anticuerpo descrito en [Feldmann 2010], se podría lograr una lisis específica de como máximo el 60% de las células tumorales positivas a PSCA utilizadas (en presencia de 50-100 ng del anticuerpo). Un aumento adicional en la efectividad no pudo ser probado. Incluso en presencia de 1000 ng del anticuerpo biespecífico, no se pudo lisar una proporción mayor de células tumorales positivas a PSCA.

Los datos conocidos in vitro e in vivo muestran que el PSCA tiene un gran potencial como antígeno diana para la inmunoterapia de los carcinomas de próstata y es adecuado como diana de diagnóstico. El objeto de la invención es proporcionar anticuerpos mejorados contra PSCA, que son terapéuticamente eficaces en particular en forma de anticuerpos recombinantes biespecíficos en baja concentración y pueden lisar eficazmente células tumorales positivas a PSCA.

El objetivo se logra de acuerdo con la invención mediante un anticuerpo de unión al antígeno de células madre específico de la próstata (PSCA) (también denominado aquí anticuerpo anti-PSCA) que contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias de aminoácidos:

- CDR de la región variable de la cadena liviana: CDR1 SEQ ID NO. 1, CDR2 SEQ ID NO. 2, CDR3 SEQ ID NO. 3 y

- CDR de la región variable de la cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO. 4, CDR2 SEQ ID NO. 5, CDR3 SEQ ID NO. 6.

El anticuerpo de la invención caracterizado por las CDR anteriores también se denomina en este documento simplemente como MB1. Los inventores encontraron sorprendentemente en extensas investigaciones que el anticuerpo de acuerdo con la invención en forma de anticuerpos biespecíficos producidos de forma recombinante puede mediar la lisis específica de células tumorales positivas a PSCA incluso en cantidades muy pequeñas. Además, se encontró sorprendentemente que la lisis específica de células tumorales positivas a PSCA mediadas por los nuevos anticuerpos es más efectiva. Por lo tanto, en investigaciones in vitro con anticuerpos biespecíficos que contienen un anticuerpo anti-PSCA de acuerdo con la invención, más del 90% de las células tumorales positivas a PSCA utilizadas podrían ser lisadas. Se puede reducir significativamente con el nuevo anticuerpo anti-PSCA, por lo tanto, la cantidad de anticuerpo utilizado. Al mismo tiempo, aumenta la eficacia terapéutica, ya que las células tumorales positivas a PSCA pueden lisarse más eficazmente con el anticuerpo de acuerdo con la invención. Debido a la baja concentración en la que se puede lograr una eficacia con el anticuerpo de acuerdo con la invención, también es posible una mejor destrucción de las células metastásicas positivas a PSCA de acuerdo con la invención. Los estudios comparativos con anti-PSCA 7F5 conocido de la técnica anterior en un constructo biespecífico comparable confirman claramente la superioridad del anticuerpo de la invención tanto en estudios in vitro (Fig. 3) como in vivo (Fig. 4).

Los anticuerpos anti-PSCA preferidos de la invención contienen las regiones CDR como se definió anteriormente, en donde la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena liviana y pesada tiene al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la siguiente secuencia de aminoácidos:

- región variable de la cadena liviana SEQ ID NO. 24, región variable de la cadena pesada SEQ ID NO. 26 o

- región variable de la cadena liviana SEQ ID NO. 20, región variable de la cadena pesada SEQ ID NO. 22.

Se prefieren los anticuerpos anti-PSCA que tienen las regiones CDR definidas anteriormente cuyas regiones variables tienen una estructura humanizada. Son particularmente preferidos los anticuerpos anti-PSCA cuya región

variable de la cadena liviana contiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 24 y su región variable de la cadena pesada contiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 26.

El término "anticuerpo" en el sentido de la invención incluye todos los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse específicamente a un antígeno. En el caso de los anticuerpos recombinantes, se trata de anticuerpos producidos utilizando organismos genéticamente modificados. El término anticuerpo abarca tanto los anticuerpos monoclonales completos como sus fragmentos de unión a epítipo. Aquí, los fragmentos de unión a epítipo (también denominados aquí fragmentos de anticuerpo) incluyen aquellas partes del anticuerpo que son capaces de unirse al antígeno. Los fragmentos de anticuerpos dentro del significado de la invención incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, fragmentos de cadena única variable (scFv), anticuerpos de cadena única, fragmentos de variable unida por disulfuro (SDFV) y fragmentos que contienen una región variable de la cadena liviana (V_L) o una región variable de la cadena pesada (V_H). Los fragmentos de anticuerpos contienen las regiones variables, ya sea solas o en combinación con otras regiones seleccionadas de la región bisagra, y las regiones primera, segunda y tercera de la región constante (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}).

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

Los fragmentos de anticuerpo están opcionalmente ligados entre sí a través de un enlazador. El enlazador comprende una secuencia peptídica corta (preferiblemente de 10 a 50 residuos de aminoácidos de largo) seleccionada de modo que el fragmento de anticuerpo tenga un plegamiento tridimensional de V_L y V_H que tenga la especificidad antigénica del anticuerpo completo. Se da preferencia a los enlazadores de glicina-serina o péptidos enlazadores que tienen una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 75 o SEQ ID NO. 76.

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

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

Los anticuerpos preferidos están en forma de un fragmento scFv o un fragmento F(ab')₂. Otros anticuerpos preferidos son anticuerpos biespecíficos que se producen de forma recombinante y que contienen dos paratopos diferentes, uno de los cuales está dirigido contra el PSCA y otro no contra el PSCA. El otro paratopo del anticuerpo biespecífico está dirigido preferiblemente contra una estructura superficial en una célula efectora o contra un péptido de 10 a 50 aminoácidos de largo (preferiblemente una secuencia de 10 a 50 aminoácidos de largo de la proteína La humana, con preferencia particular, contra un péptido con una de las secuencias de aminoácidos según la SEQ ID NO. 75 o la SEQ ID NO. 76).

Se da preferencia a los anticuerpos anti-PSCA de acuerdo con la invención (anticuerpos naífs o recombinantes) conjugados con un grupo efector. La conjugación aquí significa el acoplamiento de una sustancia, es decir, el grupo efector, al anticuerpo. La conexión del anticuerpo al grupo efector se produce preferiblemente por expresión recombinante en forma de una proteína de fusión o por métodos in vitro, en donde el grupo efector se une

preferiblemente al anticuerpo a través de grupos enlazadores químicos (por ejemplo, a través de enlaces tioéter o enlaces disulfuro). También pueden estar unidos al anticuerpo por una molécula portadora intermedia, por ejemplo, albúmina de suero. Opcionalmente, un anticuerpo de acuerdo con la invención contiene varios grupos efectores. Los grupos efectores se seleccionan preferiblemente de sustancias activas, péptidos (con una longitud de 10 a 100 aminoácidos), proteínas (con una longitud de más de 100 aminoácidos), moléculas coestimuladoras, colorantes o agentes de contraste.

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

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

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

Otros anticuerpos anti-PSCA preferidos de acuerdo con la invención se conjugan con un colorante, preferiblemente un colorante fluorescente.

Otros anticuerpos preferidos de la invención se conjugan a un péptido que contiene una región de unión a la que se une específicamente un anticuerpo específico para el péptido. Preferiblemente, el péptido comprende una secuencia peptídica de 10 a 50 aminoácidos de largo de una región alfa-helicoidal de la proteína La humana (la secuencia de aminoácidos de la proteína La humana corresponde a la SEQ ID NO. 77). Son particularmente preferidos los péptidos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 99% con una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 75 o SEQ ID NO. 76.

Se da preferencia particular a la producción recombinante de anticuerpos anti-PSCA de acuerdo con la invención. Preferiblemente, los anticuerpos anti-PSCA recombinantes de la invención contienen al menos dos unidades de unión diferentes, en donde

- al menos una de las unidades de unión se une específicamente a PSCA, que contiene el paratopo del anticuerpo anti-PSCA de acuerdo con la invención, y

- al menos una más de las unidades de unión se une específicamente a un antígeno distinto del PSCA, preferiblemente a una estructura de superficie en una célula efectora.

a unidad de unión de unión a PSCA comprende así un anticuerpo anti-PSCA de acuerdo con la invención y, en consecuencia, contiene al menos las siguientes regiones CDR:

- CDR de la región variable de la cadena liviana que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos: CDR1 SEQ ID NO. 1, CDR2 SEQ ID NO. 2, CDR3 SEQ ID NO. 3 y

- CDR de la región variable de la cadena pesada que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos: CDR1 SEQ ID NO. 4, CDR2 SEQ ID NO. 5, CDR3 SEQ ID NO. 6

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

Las unidades de unión preferidas contenidas en los anticuerpos de la invención se unen específicamente a una

célula efectora. La definición de células efectoras de acuerdo con la invención abarca todas las células del sistema inmune innato y adaptativo que median o participan activamente en las reacciones inmunes. La célula efectora se selecciona preferiblemente de linfocitos T, células NK, monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos. Particularmente preferidas son unidades de unión que se unen a estructuras superficiales en linfocitos T.

5

Si un anticuerpo recombinante de acuerdo con la invención contiene al menos dos anticuerpos diferentes (al menos un anticuerpo anti-PSCA de acuerdo con la invención y al menos un anticuerpo adicional que no se une específicamente a PSCA), entonces esto está preferiblemente en forma de diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo. Se prefieren los anticuerpos biespecíficos de anticuerpos de cadena simple (diacuerpo biespecífico de cadena simple, scBsDb) o anticuerpos tándem biespecíficos de anticuerpos de cadena simple (anticuerpo tándem biespecífico de cadena simple, scBsTaFv). Se da preferencia muy particular a un anticuerpo recombinante de acuerdo con la invención en forma de un scBsTaFv.

10

Los anticuerpos que no se unen a PSCA preferidos contenidos en un anticuerpo recombinante de la invención (en cuyo caso el anticuerpo recombinante es un anticuerpo biespecífico) son anticuerpos que se unen específicamente a una estructura de superficie de una célula efectora. En este caso, la unidad de unión que no se une a PSCA contiene al menos el paratopo del anticuerpo que se une a una estructura superficial de una célula efectora. Se prefieren en especial los anticuerpos dirigidos contra las siguientes estructuras de superficie en células efectoras: CD3, CD8, CD4, CD25, CD28, CD16, NKG2D, NKp46, NKp44, receptores activantes de KIR (activating Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors). Los más preferidos son los anticuerpos dirigidos contra CD3 (anticuerpo anti-CD3), el anticuerpo anti-CD3 que contiene regiones CDR que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

15

- CDR de la región variable de la cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO. 66, CDR2 SEQ ID NO. 67, CDR3 SEQ ID NO. 68 y

25

- CDR de la región variable de la cadena liviana: CDR1 SEQ ID NO. 58, CDR2 SEQ ID NO. 59, CDR3 SEQ ID NO. 60.

30

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

35

40

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

45

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

50

55

60

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

Preferiblemente, los anticuerpos están presentes en la composición farmacéutica de la invención en forma recombinante como anticuerpos quiméricos o más preferiblemente humanizados que tienen inmunogenicidad reducida.

5

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden diversas formas de dosificación y son preferiblemente adecuadas para administración parenteral, más preferiblemente para administración intravenosa. Preferiblemente, la composición farmacéutica parenteral está en una forma de dosificación adecuada para inyección. Las composiciones farmacéuticas particularmente preferidas son, por lo tanto, soluciones, emulsiones o suspensiones del anticuerpo en un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

10

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

15

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

20

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención contiene preferiblemente al menos dos anticuerpos diferentes (preferiblemente recombinantes), en donde está contenido al menos un anticuerpo anti-PSCA de acuerdo con la invención y al menos un anticuerpo recombinante adicional que se une específicamente con el anticuerpo anti-PSCA de acuerdo con la invención. Particularmente preferidas son las siguientes combinaciones:

25

a) un anticuerpo anti-PSCA recombinante conjugado con un péptido de 10 a 50 aminoácidos de largo y otro anticuerpo recombinante que se une específicamente al péptido o

30

b) un anticuerpo anti-PSCA biespecífico que adicionalmente contiene un anticuerpo que se une a un péptido de 10 a 50 aminoácidos de largo y otro anticuerpo recombinante que se une a un antígeno distinto del PSCA y que contiene un péptido al que se une el anticuerpo anti-PSCA biespecífico.

35

Los al menos dos anticuerpos diferentes están presentes preferiblemente empaquetados por separado en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

40

Una composición farmacéutica preferida que contiene la combinación definida en a) comprende:

- Un anticuerpo anti-PSCA recombinante conjugado a un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos de 10 a 50 aminoácidos de largo de una región alfa-helicoidal de la proteína La humana (la secuencia de aminoácidos de la proteína La humana corresponde a la SEQ ID NO: 77). Preferiblemente, el anticuerpo anti-PSCA está conjugado con un péptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, particularmente preferiblemente al menos el 99% con respecto a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 75 o SEQ ID NO. 76.

45

- Un anticuerpo adicional (preferiblemente recombinante) que contiene un paratopo que se une específicamente al péptido del anticuerpo anti-PSCA y que contiene una unidad de unión adicional que se une específicamente a una estructura de superficie de una célula efectora. Las unidades de unión preferidas corresponden a las definidas anteriormente. En el caso de que el anticuerpo anti-PSCA recombinante esté conjugado con un péptido tenga una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente de al menos el 95%, con preferencia particular, de al menos el 99% con respecto a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 75 o SEQ ID NO. 76, el anticuerpo recombinante adicional, preferiblemente como un paratopo, que se une al péptido contiene las siguientes secuencias de aminoácidos:

50

55

o CDR de la región variable de la cadena liviana: CDR1 SEQ ID NO. 78, CDR2 SEQ ID NO. 79, CDR3 SEQ ID NO. 80 y CDR de la región variable de la cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO. 81, CDR2 SEQ ID NO. 82,

60

CDR3 SEQ ID NO. 83 (en este caso, también denominado como paratopo "5B9") o CDR de la región variable de la cadena liviana: CDR1 SEQ ID NO. 84, CDR2 SEQ ID NO. 85, CDR3 SEQ ID NO. 86 y CDR de la región variable de la cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO. 87, CDR2 SEQ ID NO. 88, CDR3 SEQ ID NO. 89 (en este caso, también denominado como paratopo "7B6").

5

De ellas, son combinaciones preferidas

- un anticuerpo anti-PSCA que contiene un péptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 99% con una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 75 con otro anticuerpo que contiene el paratopo 5B9 o

- un anticuerpo anti-PSCA que contiene un péptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 99% con una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 76 con otro anticuerpo que contiene el paratopo 7B6.

15

Una composición farmacéutica preferida que contiene la combinación definida en b) comprende:

- Un anticuerpo adicional que se une específicamente a una estructura superficial de una célula efectora y que contiene una secuencia de aminoácidos de 10 a 50 aminoácidos de largo de una región alfa-helicoidal de la proteína La humana, preferiblemente un péptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, de manera particularmente preferible al menos el 99% de una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 75 o SEQ ID NO. 76.

- Un anticuerpo biespecífico anti-PSCA conjugado con un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de 10 a 50 aminoácidos de largo de una región alfa-helicoidal de la proteína La humana. En el caso de que el anticuerpo recombinante adicional contenga un péptido con una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, con preferencia particular al menos el 99% con una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 75 o SEQ ID NO. 76, el anticuerpo anti-PSCA biespecífico contiene preferiblemente un paratopo 5B9 o paratopo 7B6 como se definió anteriormente.

30

De ellas, son combinaciones preferidas

- un anticuerpo anti-PSCA biespecífico que contiene el paratopo 5B9 y otro anticuerpo recombinante que contiene un péptido con una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 99% con una de las secuencias de aminoácidos según la SEQ ID NO. 75 o

- un anticuerpo anti-PSCA biespecífico que contiene el paratopo 7B6 y otro anticuerpo recombinante que comprende un péptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 99% con una de las secuencias de aminoácidos según la SEQ ID NO. 76.

40

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

45

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

50

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

- CDR de la región variable de la cadena liviana: CDR1 SEQ ID NO. 7, CDR2 SEQ ID NO. 9, CDR3 SEQ ID NO. 11 y CDR de la región variable de la cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO. 13, CDR2 SEQ ID NO. 15, CDR3 SEQ ID NO. 17 o

- CDR de la región variable de la cadena liviana: CDR1 SEQ ID NO. 8, CDR2 SEQ ID NO. 10, CDR3 SEQ ID NO. 12 y CDR de la región variable de la cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO. 14, CDR2 SEQ ID NO. 16, CDR3 SEQ ID NO.

60

18.

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

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

La invención comprende además una célula huésped o un organismo huésped no humano que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención. La secuencia de nucleótidos o el vector están contenidos de forma recombinante en la célula huésped o en el organismo huésped no humano.

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

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

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

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

Con referencia a las siguientes figuras y realizaciones, la invención se explicará con más detalle, sin limitar la invención a estas.

Fig. 1 Representación esquemática de diferentes anticuerpos recombinantes inventivos. A) Anticuerpo biespecífico

en forma de scBsTaFv que contiene una unidad de unión contra PSCA y una unidad de unión contra CD3. B) Un anticuerpo recombinante contra PSCA que contiene una etiqueta peptídica (5B9) de acuerdo con la invención, para usar con el anticuerpo biespecífico también mostrado en forma de scBsTaFv que contiene una unidad de unión contra CD3 y una unidad de unión contra la región 5B9 de la proteína La humana. C) Anticuerpo recombinante

5 contra PSCA que contiene una etiqueta peptídica (7B6) de acuerdo con la invención, para uso con el anticuerpo biespecífico que también se muestra en forma de scBsTaFv que contiene una unidad de unión contra CD3 y una unidad de unión contra la región 7B6 de la proteína La humana. Las respectivas subunidades VH y VL están unidas a través de los péptidos enlazadores a las secuencias de aminoácidos que se indican en las figuras.

10 Fig. 2 anticuerpo recombinante según SDS-PAGE. Carril 1: anticuerpo humanizado biespecífico CD3-7B6 (scBsTaFv CD3-7B6); carril 2: anticuerpo humanizado biespecífico CD3-5B9 (scBsTaFv CD3 (G4S)-5B9); carril 3: anticuerpo murino biespecífico de la invención CD3-PSCA (7F5) (scBsTaFv CD3-PSCA (7F5)); carril 4: anticuerpo humanizado monoespecífico scFv PSCA (MB1)-7B6 según la invención; carril 5: anticuerpo humanizado biespecífico CD3-PSCA (MB1) (scBsTaFv CD3-PSCA (MB1)); carril 6: anticuerpo humanizado monoespecífico scFv PSCA (MB1)-5B9 de

15 acuerdo con la invención. M... marcadores con tamaños de fragmentos (de arriba a abajo): 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa.

Fig. 3 células tumorales PC3-PSCA cargadas con Lyse⁵¹Cr específicas en un experimento de acuerdo con el Ejemplo 4. Las barras corresponden a los siguientes experimentos: 1 (negro) ... scBsTaFv CD3-PSCA biespecífico

20 humanizado (MB1) de la realización 1; 2 (blanco) ... scBsTaFv CD3-PSCA biespecífico murino (MB1) de la realización 1; 3 (rayado) ... scBsTaFv CD3-PSCA humanizado biespecífico (7F5) (ejemplo comparativo); 4 (punteado) ... scBsTaFv CD3-PSCA biespecífico murino (7F5) (ejemplo comparativo)..

Fig. 4 Área tumoral formada después de la transferencia de células tumorales positivas a PSCA, células T y

25 anticuerpos como se describe en el Ejemplo 5. A) Relación objetivo-efector 1:1; B) Relación efector-objetivo 10:1. Las líneas numeradas corresponden a los siguientes experimentos: 1 ... anticuerpo de control biespecífico anti-CD3xanti-5B9 (control); 2 ... scFv anti-PSCA(MB1) humanizado monoespecífico del ejemplo de realización 1 (control); 3 ... ensayo de control sin anticuerpo (control negativo); 4 ... scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) humanizado biespecífico del ejemplo de realización 1 (según la invención); 5 ... scBsTaFv CD3-PSCA(7F5) humanizado

30 biespecífico como se describe en el Ejemplo 3 (ejemplo comparativo); 6 ... scBsDb CD3xPSCA(7F5) humanizado biespecífico que contiene regiones variables de unión a PSCA del anticuerpo 7F5 (ejemplo comparativo).

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

35 Con el propósito de dirigirse a las células PSCA+, se preparó un anticuerpo biespecífico (diacuerpo biespecífico de cadena simple, scBsTaFv) que se une al PSCA con una unidad de unión y a CD3 con la otra unidad de unión. El anticuerpo biespecífico también se denomina aquí más simplemente como CD3-PSCA(MB1) y se muestra esquemáticamente en la Figura 1A.

40 El dominio de unión a PSCA que contiene la región variable del anticuerpo anti-PSCA MB1 de la invención (anticuerpo murino anti-PSCA: cadena pesada SEQ ID NO: 22, cadena liviana SEQ ID NO: 20, anticuerpo anti-PSCA humanizado: cadena pesada SEQ ID NO 26, cadena liviana SEQ ID NO 24). Sirve para unirse a las células tumorales positivas a PSCA. El otro dominio se une a CD3, un componente del complejo receptor de células T, y

45 sirve para activar las células T. Esto permite el reclutamiento de células T en las células positivas a PSCA, mediando así la lisis específica de las células positivas a PSCA por parte de las células T.

Para la generación de anticuerpos monoclonales anti-PSCA MB1, se inmunizaron ratones H-2d C3Hx Balb/cF1 positivos con células P815 que expresaban PSCA recombinantemente en la superficie. Por fusión de células de

50 bazo y células de mieloma se produjeron células de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales anti-PSCA. Después de la clonación de células individuales de estas células de hibridoma, se pudo seleccionar el clon MB1. Para la generación de anticuerpos MB1 anti-PSCA recombinantes, se identificaron las secuencias de ácido nucleico del dominio variable de la cadena de anticuerpos pesada (V_H) y liviana (V_L). Primero, se aisló el ARNm de las células de hibridoma secretoras de MB1 anti-PSCA y se transcribió en ADNc. Posteriormente, el dominio variable de la

55 cadena pesada del isotipo IgG1 se amplificó con cebadores degenerados (par de cebadores SEQ ID NOs: 90 y 91) y el dominio variable de la cadena liviana κ usando cebadores degenerados (par de cebadores SEQ ID NOs: 92 y 93). Los productos de la PCR se subclonaron cada uno en el vector pGEM T-easy y se secuenciaron.

Para la clonación del fragmento murino de una sola cadena (scFv) del anticuerpo anti-PSCA MB1 (denominado en

60 este documento "scFv MB1") en el que la región variable de la cadena pesada está unida a través de tres

enlazadores de glicina-serina (G4S, SEQ ID NO. 131) vinculada a la variable de la región de la cadena liviana, la secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo MB1 anti-PSCA se amplificó con ayuda del par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 94 y 95. La secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo MB1 anti-PSCA se amplificó con ayuda del par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 96 y 97. Los ácidos nucleicos amplificados se fusionaron mediante PCR superpuesta al scFv PSCA MB1 y se clonaron a través de SfiI y NotI en el vector de expresión eucariótico pSecTag2B (el vector de expresión también se conoce aquí como "pSecTag2B_scFv MB1 murino").

Para la clonación del anticuerpo en tándem biespecífico (scBsTaFv), que está dirigido contra PSCA y CD3 y que contiene las regiones CDR del anticuerpo MB1 murino, se amplificó la secuencia de ácido nucleico de un scFv anti-CD3 murino con un par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 98 y 99 y se clonó a través del lado 3' Apal del scFv MB1 murino en el vector de expresión previamente producido "pSecTag2B_scFv MB1 murino", de modo que se creó el vector "pSecTag2B_scBsTaFv PSCA (MB1)-CD3 murino".

Para la clonación del anticuerpo tándem biespecífico (scBsTaFv), que se dirige contra PSCA y CD3 y que contiene las regiones CDR del anticuerpo MB1 humanizado, se humanizaron las regiones marco (FWR) de los anticuerpos PSCA MB1 y CD3. Para hacer esto, los FWR de los dominios de anticuerpos murinos variables se reemplazaron con las secuencias FWR humanas de una IgG1 humana altamente homóloga. Además, las secuencias de anticuerpos humanizados se optimizaron para su expresión y secreción por líneas celulares humanas. Para la humanización de scFv CD3 murino o scFv MB1, primero las secuencias V_H y V_L humanizadas se amplificaron individualmente como se describió con anterioridad y luego se unieron por PCR. La humanización de la secuencia de V_H o V_L se llevó a cabo mediante el ensamblaje de oligonucleótidos superpuestos y la posterior amplificación de la secuencia de ácido nucleico de V_H o V_L humanizada. Para poder determinar las secuencias de los oligonucleótidos superpuestos, la secuencia V_H o V_L murina se alineó primero contra una base de datos de IgG humana (NCBI IgBlast), que identifica la IgG humana con la mayor homología y, en última instancia, crea la secuencia V_H o V_L humanizada teóricamente y sintetiza los oligonucleótidos superpuestos. Se construyeron varios anticuerpos biespecíficos utilizando péptidos enlazadores de diferentes longitudes.

Humanización del anticuerpo anti-CD3

Para la humanización de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3, se reunieron los oligonucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO. 100 a 105. Posteriormente, la secuencia de ácido nucleico humanizado de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 (con un péptido enlazador G4S, SEQ ID NO: 132) se amplificó utilizando el par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 105 y 106. Para la humanización de la región variable de cadena liviana del anticuerpo anti-CD3, se reunieron oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 107 a 112. La secuencia de ácidos nucleicos humanizada de la región variable de cadena liviana del anticuerpo anti-CD3 se amplificó con el par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 112 y 113.

Para la generación del scFv humanizado del anticuerpo anti-CD3, en el que la región variable de la cadena pesada a través de un enlace glicina-serina (G4S) está vinculada a la región variable de la cadena liviana, primero se clonó la secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 a través de SfiI y BamHI se clonó en el vector de expresión pSecTag2B y luego se colocó a través de BamHI y NotI la secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de cadena liviana del anticuerpo anti-CD3 corriente abajo en el mismo vector de expresión.

Para la generación del scFv humanizado del anticuerpo anti-CD3, en la cual la región variable de la cadena pesada está unida a través del enlazador de glicina-serina (G4S) con la región variable de la cadena liviana, se preparó primero la secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 con tres enlazadores de glicina-serina (G4S). Para este propósito, se amplificó la secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 (con tres péptidos enlazadores G4S) con ayuda del par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 105 y 114 y se clonó a través de SfiI y BamHI en el vector de expresión pSecTag2B y luego se colocó a través de BamHI y NotI la secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo anti-CD3 corriente abajo en el mismo vector de expresión.

Humanización del anticuerpo anti-PSCA MB1

Para la humanización de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo anti-PSCA MB1 se reunieron oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 115 a 118. La secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la

región variable de la cadena liviana del anticuerpo anti-PSCA MB1 se amplificó con el par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 119 y 120.

- 5 Para la humanización de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-PSCA MB1 se reunieron oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 121 a 125. La secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-PSCA MB1 se amplificó con el par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 126 y 127.

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

- 10 Finalmente, las secuencias de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo MB1 se reunieron mediante PCR de superposición usando los cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 128 y 129 y se amplificaron. La secuencia de ácido nucleico así generada que codifica el scFv MB1 humanizado (en la organización V_L -G₄SG₄SGASAAG₄SG₄S-V_H, péptido enlazador según la SEQ ID NO: 130) se clonó mediante XhoI y ApaI corriente abajo del scFv humanizado con anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente (con tres péptidos enlazadores de G₄S), por lo que se generó el vector de expresión "pSecTag2B_scBsTaFv PSCA(MB1)-CD3 humano".

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

Ejemplo de realización 2: preparación de anticuerpos recombinantes biespecíficos que se unen específicamente con PSCA (direccionamiento modular)

Para proporcionar una composición farmacéutica según la invención ("modulares Targeting System 1", representado esquemáticamente en la Fig. 1B), se prepararon los sgs anticuerpos recombinantes:

- 30 - anticuerpo anti-PSCA recombinante según la invención que contiene un péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 75 (aquí también "E5B9"). Este anticuerpo se denomina a continuación scFv PSCA(MB1)-E5B9.
- 35 - anticuerpo biespecífico (scBsTaFv), que está dirigido contra CD3 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 75. El paratopo dirigido contra CD3 comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de las regiones variables: cadena pesada SEQ ID NO. 65, cadena liviana SEQ ID NO. 57. El paratopo dirigido contra el péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 75 comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de las regiones variables: cadena liviana CDR1 SEQ ID NO. 78, CDR2 SEQ ID NO. 79, CDR3 SEQ ID NO. 80, cadena pesada CDR1 SEQ ID NO. 81, CDR2 SEQ ID NO. 82, CDR3 SEQ ID NO. 83. Este anticuerpo se denomina a continuación scBsTaFv CD3-5B9. Se prepararon dos diferentes scBsTaFv CD3-5B9, que se distinguen entre sí únicamente en el péptido de enlazador entre VH y VL del anticuerpo anti-CD3 (ver la Fig. 1B).

Clonación del scFv PSCA(MB1)-E5B9 humanizado:

- 45 Para la generación del scFv PSCA(MB1) humanizado con el epítipo E5B9 en el término C (MB1 [V_L -G₄SG₄SGASAAG₄SG₄S-MB1 V_H]-[G₄S-E5B9], representado en la Fig. 1B abajo), se amplificó el scFv PSCA(MB1) humanizado descrito en el Ejemplo de realización 1 (MB1 V_L -G₄SG₄SGASAAG₄SG₄S-MB1 V_H-G₄S, péptidos enlazadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 130 y 132) por medio del cebador de acuerdo con la SEQ ID NO. 134 y 135 y luego se clonó por SfiI y NotI en pSecTag2B. Después del ensamblaje de los oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 136 y 137, se clonó la secuencia de ácidos nucleicos para E5B9 a través de NotI y XhoI del lado 3' del scFv PSCA(MB1) humanizado, produciéndose el constructo "pSecTag2B_scFv PSCA(MB1)-E5B9 humanizado".

Clonación de dos módulos efectos que se unen con células T y con el péptido E5B9 "scBsTaFv CD3(G₄S)-5B9" y "scBsTaFv CD3(3xG₄S)-5B9"

- 55 Como se representa esquemáticamente en la Fig. 1B, se prepararon para la estructuración del sistema de direccionamiento modular I que comprende el scFv PSCA(MB1)-5B9 dos llamados módulos efectores (anticuerpos biespecíficos scBsTaFv CD3-5B9), que se distinguen en la cantidad de los elementos de glicina-serina (G₄S) del péptido enlazador entre la cadena V_H y V_L del dominio anti-CD3 y, por ello, se designaron como "scBsTaFv CD3(G₄S)-5B9" o bien "scBsTaFv CD3(3xG₄S)-5B9".

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

Para la humanización de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 5B9 (específicamente dirigido contra el péptido E5B9), se reunieron oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 138 a 142. Luego se amplificó la secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 5B9 (con un péptido enlazador G₄S, SEQ ID NO. 132) con ayuda del par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 143 y 144. Para la humanización de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo 5B9, se reunieron los oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 145 a 149. La secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo 5B9 se amplificó con el par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 150 y 151.

Finalmente, se reunieron las secuencias de ácidos nucleicos humanizados para 5B9 V_H y 5B9 V_L por medio de PCR de superposición usando el cebador de acuerdo con la SEQ ID NO. 152 y 153 y se amplificaron. La secuencia de ácidos nucleicos así generada para el scFv 5B9 humanizado (V_H-3xG₄S-V_L) se clonó a través de XhoI y ApaI corriente abajo del scFv CD3 V_H-G₄S-V_L humanizado en el "pSecTag2B_scFv CD3 V_H-G₄S-V_L" humanizado, produciéndose el vector "pSecTag2B_scBsTaFv CD3(G₄S)-5B9 humanizado".

- Clonación del "scBsTaFv CD3(3xG₄S)-5B9" humanizado (para el esquema, ver la Fig. 1B centro):

La secuencia humanizada para scFv 5B9 (V_H-3xG₄S-V_L) se clonó a través de XhoI y ApaI corriente abajo de scFv CD3 humanizado (V_H-3xG₄S-V_L) en el "pSecTag2B_scFv CD3 V_H-3xG₄S-V_L" humanizado, produciéndose el vector "pSecTag2B_scBsTaFv CD3(3xG₄S)-5B9 humanizado".

Para proporcionar una composición farmacéutica según la invención ("modulares Targeting System 2", representado esquemáticamente en la Fig. 1C), se prepararon los siguientes anticuerpos recombinantes:

- anticuerpo anti-PSCA recombinante según la invención que contiene un péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 76 (aquí también denominado "E7B6"). Este anticuerpo se denomina a continuación scFv PSCA(MB1)-E7B6.

- anticuerpo biespecífico (scBsTaFv), que está dirigido contra CD3 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 76. El paratopo dirigido contra CD3 comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de las regiones variables: cadena pesada SEQ ID NO. 65, cadena liviana SEQ ID NO. 57. El paratopo dirigido contra el péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 76 comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de las regiones variables: cadena liviana CDR1 SEQ ID NO. 84, CDR2 SEQ ID NO. 85, CDR3 SEQ ID NO. 86, cadena pesada CDR1 SEQ ID NO. 87, CDR2 SEQ ID NO. 88, CDR3 SEQ ID NO. 89. Este anticuerpo se designa a continuación como scBsTaFv CD3-7B6.

Clonación del scFv PSCA(MB1)-E7B6 humanizado:

Para la generación del scFv PSCA(MB1) humanizado con el epítopo E7B6 en el término C MB1 [VL-G₄SG₄SGASAAG₄SG₄S-MB1 V_H]-[G₄S-E7B6], representado en la Fig. 1C abajo), primero se llevó a cabo el ensamblaje de los oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 154 y 155 y luego la clonación de la secuencia de ácidos nucleicos E7B6 a través de NotI y XhoI del lado 3' en "pSecTag2B_scFv PSCA(MB1) humanizado" (V_L-G₄SG₄SGASAAG₄SG₄S-V_H-G₄S, análogamente al constructo arriba descrito con el péptido E5B9), produciéndose el vector "pSecTag2B_scFv PSCA(MB1)-E7B6 humanizado".

Clonación de un módulo efecto que se une a células T y al péptido E7B6 "scBsTaFv CD3(3xG₄S)-7B6" humanizado:

Para la humanización de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 7B6 (específicamente dirigido contra el péptido E7B6), se reunieron oligonucleótidos superpuestos de acuerdo con la SEQ ID NO. 156 y 160. Luego se amplificó la secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 7B6 (con un péptido enlazador de G₄S, SEQ ID NO. 132) con ayuda de un par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 161 y 162. Para la humanización de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo 7B6, se reunieron oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 163 a 167. La secuencia de ácidos nucleicos humanizados de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo 7B6 se amplificó con el par de cebadores de acuerdo con la SEQ ID NO. 168 y 169.

Finalmente, se reunieron y amplificaron las secuencias de ácidos nucleicos humanizados para 7B6 V_H y 7B6 V_L por medio de PCR de superposición usando el cebador de acuerdo con la SEQ ID NO. 170 y 171. La secuencia de ácidos nucleicos así generada para scFv 7B6 humanizado (V_H-3xG₄S-V_L) se clonó a través de XhoI y ApaI corriente abajo del scFv CD3 V_H-G₄S-V_L humanizado en el "pSecTag2B_scFv CD3 V_H-G₄S-V_L" humanizado, produciéndose el

vector "pSecTag2B_scBsTaFv CD3(G₄S)-7B6 humanizado".

Para la expresión de las distintas proteínas de fusión de los sistemas de direccionamiento modular 1 y 2, se transfectaron células Hek293T con los vectores de expresión y scFv (scFv PSCA-E5B9 o scFv PSCA-E7B6) recombinantes secretados y los anticuerpos biespecíficos (scBsTaFv CD3(G₄S)-5B9 o bien scBsTaFv CD3(3xG₄S)-5B9 y scBsTaFv CD3-7B6) se purificaron del sobrenadante del cultivo celular con ayuda de cromatografía por afinidad sobre Ni-NTA Agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania) (opcionalmente en combinación por medio de una precipitación de sulfato de amonio fraccionado). Por SDS-Page e Immunoblot se comprobaron la pureza y la estabilidad de los derivados de anticuerpos recombinantes (Fig. 2)

Ejemplo de realización 3: Determinación de la constante de disociación de unión a PSCA

La determinación de la constante de afinidad para el dominio anti-PSCA respectivo de los anticuerpos biespecíficos recombinantes con el anticuerpo anti-PSCA MB1 (según la invención) y el anticuerpo anti-PSCA 7F5 (ejemplo comparativo, anticuerpo de [Feldmann 2010]) se basó en un análisis de citometría de flujo de la unión con células PC3 positivas a PSCA.

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

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

Para detectar la unión específica de los anticuerpos CD3-PSCA recombinantes, se usó un anticuerpo de detección de IgG-FITC anti-c-myc de ratón (AbD Serotec, Dusseldorf, Alemania), que después de completar la primera etapa de tinción durante 30 min a 4 °C se incubaron con células positivas a PSCA marcadas con anticuerpos anti-PSCA. Como control negativo, se llevó una muestra en la que las células positivas a PSCA se tiñeron sólo con el anticuerpo de detección anti-c-myc IgG-FITC de ratón. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Calibur BD FACS (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Alemania) y los datos se evaluaron utilizando el software WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, La Jolla, CA, EE. UU.).

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

Se determinaron los siguientes valores K_D de este modo para la unión con PSCA:

	K _D
scBsTaFv CD3xPSCA(MB1)	$6,3 \times 10^{-7}$
scBsTaFv CD3xPSCA(7F5)	$2,3 \times 10^{-6}$

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

5

Ejemplo de realización 4: lisis específica de células PSCA+ con anticuerpos biespecíficos anti-PSCA

En el ensayo de liberación de cromo, las PBMC preactivadas 5×10^4 se cocultivaron con 5×10^3 células tumorales PC3-PSCA cargadas con ^{51}Cr (relación objetivo-efector = 10:1) en presencia y ausencia de los anticuerpos recombinantes en medio RPMI en un volumen total de 200 μl . Para este propósito, se usaron los anticuerpos de acuerdo con la invención del Ejemplo 1 (tanto en forma murina como humanizada). Como ejemplo comparativo, el anticuerpo anti-PSCA (7F5) murino conocido de la técnica anterior se usó en un anticuerpo biespecífico construido de manera similar. Las regiones variables del anticuerpo 7F5 corresponden a: la cadena pesada SEQ ID NO. 48, cadena liviana SEQ ID NO. 50. Los experimentos se llevaron a cabo con las siguientes construcciones de anticuerpos específicos:

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

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

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

Los resultados del experimento in vitro se muestran gráficamente en la FIG. 3. Se muestra el porcentaje de células PC3 lisadas en el total de células PC3 utilizadas (eje y). Mientras que los anticuerpos de acuerdo con la invención de los grupos experimentales 1 y 2 ya muestran una fuerte lisis de las células positivas a PSCA en cantidades menores a 1 ng, en el anticuerpo 7F5 conocido en un constructo comparable (grupos de prueba 3 y 4) se ha de determinar una lisis sólo cuando se usan varios ng del anticuerpo. A lo sumo, se encontró una lisis de aproximadamente el 60% de las células PC3 utilizadas. Con los anticuerpos de acuerdo con la invención, ya se pudo detectar una lisis de aproximadamente el 80% de las células PC3 utilizadas cuando se usa una cantidad significativamente menor de anticuerpo. A lo sumo, más del 90% de las células PC3 utilizadas podrían lisarse con un anticuerpo de acuerdo con la invención (grupo de prueba 1).

Ejemplo de realización 5: Inhibición del crecimiento tumoral por scBsTaFv CD3-PSCA(MB1) humanizado in vivo

40

Para demostrar la eficacia del anticuerpo MB1 anti-PSCA de la invención, se probó el efecto de un anticuerpo biespecífico scBsTaFv CD3-PSCA (MB1) derivado de un ejemplo de realización 1 (mostrado esquemáticamente en la Fig. 1A, supra) en el modelo de tumor murino. Como organismo modelo, se usaron ratones desnudos, que forman tumores después de la transferencia de células tumorales PC3 positivas a PSCA. En el experimento, las células tumorales positivas a PSCA se transfirieron en combinación con células T y un anticuerpo.

45

Se utilizaron los siguientes anticuerpos, con 10 μg de anticuerpo inyectado por ratón:

- (1) Anticuerpo de control biespecífico anti-CD3xanti-5B9 (control)
- (2) scFv anti-PSCA (MB1) humanizado monoespecífico del Ejemplo de realización 1 (control)
- (3) Experimento de control sin anticuerpo (control negativo)
- (4) scBsTaFv CD3-PSCA (MB1) humanizado del Ejemplo de realización 1
- (5) scBsTaFv CD3-PSCA (7F5) humanizado como se describe en el ejemplo 3 (ejemplo comparativo)
- (6) scBsDb CD3xPSCA (7F5) biespecífico humanizado que contiene las regiones variables de unión a PSCA del anticuerpo 7F5 (Ejemplo comparativo)

55

El efecto de los anticuerpos biespecíficos se basa en el reclutamiento de las células T positivas a CD3 en las células

tumorales positivas a PSCA y la lisis de las células tumorales mediadas de este modo.

En un primer experimento, se transfirieron 5×10^3 células tumorales positivas a PSCA a 8 ratones desnudos por grupo experimental y 5×10^3 células T (relación objetivo-efector 1:1). En los grupos de control (1) y (3), se detectó un crecimiento rápido del tumor en ausencia de un anticuerpo anti-PSCA. Además, el experimento de control (2), en el que se inyectó el scFv anti-PSCA (MB1) monoespecífico, mostró un rápido crecimiento del tumor. Como resultado, es posible excluir un efecto citotóxico del anticuerpo monoespecífico y atribuir la actividad únicamente a la construcción biespecífica. El área tumoral de los tumores formados se determinó 25 días después de la transferencia celular. Los tres grupos de control no mostraron diferencias significativas en el área del tumor (Figura 4A).

Tras la transferencia de los anticuerpos biespecíficos comparativos que contienen las regiones variables del anticuerpo anti-PSCA 7F5 (grupos comparativos (5) en forma de un anticuerpo en tándem y (6) en forma de diacuerpo), también se observó un rápido crecimiento del tumor (datos no mostrados). Además, en un segundo experimento en el que las células tumorales se expusieron en una relación de efector-objetivo de 10:1 (es decir, a 10 veces las células T; la transferencia de 5×10^3 células tumorales positivas a PSCA y 5×10^4 células T), se comprobó un rápido crecimiento del tumor que no mostró una diferencia estadísticamente significativa con el grupo de control (1) (Figura 4B). El crecimiento del tumor no fue inhibido por los anticuerpos anti-PSCA 7F5, pero sólo se retrasó levemente. Por lo tanto, incluso con el exceso de células T, no se puede detectar una inhibición in vivo del crecimiento del tumor por el anticuerpo anti-PSCA 7F5.

La transferencia del anticuerpo biespecífico de la invención scBsTaFv CD3-PSCA (MB1) del Ejemplo de realización 1 a una relación de efector-objetivo 1:1 podía reducir significativamente el crecimiento del tumor. Durante 25 días después de la transferencia celular, aparecieron tumores con un área significativamente pequeña (diámetro de aproximadamente 2 mm) en 2 de los 8 animales experimentales, 6 de los 8 animales experimentales permanecieron libres de tumor (Figura 4A). El anticuerpo anti-PSCA MB1 de acuerdo con la invención (grupo de prueba (4)) es claramente superior al anticuerpo anti-PSCA 7F5 construido de manera similar (grupo de prueba (5)) en términos de eficacia in vivo en condiciones experimentales idénticas.

Bibliografía no de patentes citada

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

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

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Técnica de Dresde

<120> Anticuerpos contra el antígeno de células madre específico de la próstata y su uso

<130> 00017P0179DEWO

<150>DE 10 2011 118 022.6

<151> 2011-06-30
 <160> 172
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 5 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 1

	Gly	Thr	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Asn
10	1				5					10	

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 2

Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser
1				5		

20 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

	Gln	Gln	Ser	Lys	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr
25	1				5				

<210> 4
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4

Ser	Tyr	Ser	Met	Ser
1				5

35 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40 <400> 5

Tyr	Ile	Asn	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Phe	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly
 45 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6

	Arg	Met	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	His	Trp	His	Phe	Asp	Val
50	1				5					10			

<210> 7
 <211> 33
 55 <212> ADN

<213> Mus musculus
<400> 7

5 gggacaagtc aggacattaa caattattta aac 33
<210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens
10 <400> 8

ggtacatccc aagacatcaa taattatctc aac 33
<210> 9
15 <211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 9

20 tacacatcaa gattacactc g 21
<210> 10
<211> 21
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens
<400> 10

tacacatcca ggctgcattc c 21
30 <210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 11

35 caacagtcta agacgcttcc gtggacg 27
<210> 12
<211> 27
40 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 12

cagcagtcaa agacattacc atggaca 27
45 <210> 13
<211> 15
<212> ADN
<213> Mus musculus
50 <400> 13

tcctattcca tgtct 15
<210> 14
55 <211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 14

60 agttactcta tgtca 15

ES 2 711 978 T3

<210> 15
 <211> 51
 <212> ADN
 5 <213> Mus musculus
 <400> 15

 tacattaatg atagtgggtg tagcaccttt tatccagaca ctgtgaaggg c 51

 10 <210> 16
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 15 tacattaatg attcaggtgg aagtacattc tatccggaca cggtaaagg t 51

 <210> 17
 <211> 39
 20 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 17

 cggatgtact acggaatag ccactggcac ttcgatgtc 39
 25
 <210> 18
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 18

 cgtatgtatt atggcaatag tcactggcac ttgacgtc 39

 <210> 19
 35 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 19

 gatattgtga tgacacagtc tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcaattgcg ggacaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gatggaagtg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcggg agtcccatcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 ggggatattg ccacttactt ctgccaacag tctaagacgc ttccgtggac gttcgggtgga 300
 40 ggcaccaagc tggaactcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatcc 348

 <210> 20
 <211> 116
 <212> PRT
 45 <213> Mus musculus
 <400> 20

ES 2 711 978 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gly Thr Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ser Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Gly Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110
 Pro Thr Val Ser
 115

<210> 21
 <211> 363
 5 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 21

10 gtacagctgc aggagtcagg gggagtttta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 60
 tgtgcagcct ctggattcac ttccagttcc tattccatgt cttggattcg ccagactcca 120
 gacaggaggc tggagtgggt cgcatacatt aatgatagtg gtggtagcac cttttatcca 180
 gacactgtga agggccgatt ctccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctc 240
 caaataagca gactgaggtc tggggacacg gccatttatt actgttcaag acggatgtac 300
 tacggtaata gccactggca cttcgatgtc tggggcgag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 22
 <211> 121
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 22

ES 2 711 978 T3

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
 20 25 30

Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Arg Arg Leu Glu Trp Val Ala
 35 40 45

Tyr Ile Asn Asp Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 50 55 60

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

Gln Ile Ser Arg Leu Arg Ser Gly Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ser
 85 90 95

Arg Arg Met Tyr Tyr Gly Asn Ser His Trp His Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 321
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

gatatccaga tgactcaaag tcctagttcc ctgtctgcat cagtgggaga ccgggtgacc 60

attacatgcg gtacatccca agacatcaat aattatctca actggtatca gcagaagcca 120

ggcaaagttc ctaagttatt aatctactac acatccaggc tgcattccgg ggtgccctcc 180

cgcttttcgg gctccgggtc gggaaaccgac ttaccctaa ccatactctc cctgcagcct 240

gaagacgttg caacgtacta ttgtcagcag tcaaagacat taccatggac atttggtggt 300

gggacgcaac tcactgtact t 321

<210> 24
 <211> 107
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

ES 2 711 978 T3

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

<210> 25
 <211> 366
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

caggtgcagc tagtggagtc cgggtggcggc ctcggttaagc cgggcggatc gctgcgcctt 60
 tcatgtgccg catcaggatt cacattctcc agttactcta tgatcatggat tcggcaggca 120
 cctggcaagg gattggaatg ggtctcgtac attaatgatt caggtggaag tacattctat 180
 ccggacacgg ttaaaggtag atttaccatc agccgtgata acgcgaagaa tagcttgtac 240
 ttacagatga atagcctgcg tgcagaggat actgctgtat attattgcgc tcgacgtatg 300
 tattatggca atagtcactg gcactttgac gtctggggcc agggcacgac agttactgtc 360
 tcttcg 366

10
 <210> 26
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 26

ES 2 711 978 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Asn Asp Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Met Tyr Tyr Gly Asn Ser His Trp His Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

10 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 28

Tyr Thr Leu Lys Leu Asn Ser
 1 5

20 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 29

Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Trp Thr
 1 5

25 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus
 <400> 30

ES 2 711 978 T3

Ser Tyr Thr Met Ser
1 5

<210> 31
5 <211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 31

Tyr Ile His Asn Gly Gly Gly His Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Ile Lys
1 5 10 15

10 Gly

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
15 <213> Mus musculus
<400> 32

Arg Met Tyr Tyr Gly Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

20 <210> 33
<211> 33
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 33

25 aggacaagcc aggacattag caactattta aac 33

<210> 34
<211> 33
30 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 34

cggacctcac aagacatcag caactatctg aat 33

35 <210> 35
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus
40 <400> 35

tacacattaa aattaaattc a 21

<210> 36
45 <211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 36

50 tacacattaa aactaaattc c 21

<210> 37
<211> 27
<212> ADN

<213> Mus musculus
<400> 37

caacagagta aaacacttcc gtggacg 27

5 <210> 38
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 38

cagcagtcca aaaccctgcc ttggacc 27

15 <210> 39
<211> 15
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 39

20 tcctatacca tgtct 15

<210> 40
<211> 15
<212> ADN

25 <213> Homo sapiens
<400> 40

agctatacaa tgtct 15

30 <210> 41
<211> 51
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 41

35 tacattcata atgggtggtg tcacacctac tatccagaca ccataaaggg c 51

<210> 42
<211> 51

40 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 42

tacatccata atggaggcgg tcacacctac tatkctgaca ctatcaaagg a 51

45 <210> 43
<211> 39
<212> ADN
<213> Mus musculus

50 <400> 43

cgaatgtact acggtaatag ccactggtac ttcgatgtc 39

<210> 44

55 <211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 44

60 cgtatgtact acgggaacag ccactggtac ttcgacgtg 39

ES 2 711 978 T3

<210> 45
 <211> 348
 <212> ADN
 5 <213> Mus musculus
 <400> 45

```

gatattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctctgggcga cagagtcacc      60
atcaattgca ggacaagcca ggacattagc aactatttaa actggtatca gctgacacca      120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acattaaaat taaattcagg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccattaacaa cctggagaaa      240
gaggattttg ccacttattt ttgccaacag agtaaaacac ttccgtggac gttcggtgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgggctgat gctgcaccaa ctgtatcc      348
  
```

10 <210> 46
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 46

```

15      Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
        1              5              10              15

      Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
        20              25              30

      Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Thr Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
        35              40              45

      Tyr Tyr Thr Leu Lys Leu Asn Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50              55              60

      Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Lys
        65              70              75              80

      Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Trp
        85              90              95

      Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
        100              105              110

      Pro Thr Val Ser
        115
  
```

20 <210> 47
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 47

25

ES 2 711 978 T3

```

caggtgaagc tgcaggagtc tgggggaggt ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tcctgtgtag cctctggatt cactttcagt tcctatacca tgtcttgggt tcgccggact      120
ccagagaaga ggctggaatg ggtcgcatatc attcataatg gtgggtgggtcacacctactat      180
ccagacacca taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgttc      240
ctggaaatga gcagtctgaa gtctgaagac acggccatgt attactgtac aagacgaatg      300
tactacggta atagccactg gtacttcgat gtctggggcg cagggacctc ggtcacctc      360
tcc                                                                 363

```

<210> 48

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Thr Met Ser Trp Val Arg Arg Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ala Tyr Ile His Asn Gly Gly Gly His Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Ile
          50          55          60

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

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

Thr Arg Arg Met Tyr Tyr Gly Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100          105          110

Gly Ala Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115          120

```

<210> 49

<211> 321

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 49

ES 2 711 978 T3

gatatccaga tgacgcaatc accgagttct ctatccgcgt cgggtggcga cagagtgact 60
atcacatgtc ggacctcaca agacatcagc aactatctga attggtatca acaaaagcca 120
ggcaaggctc ccaagctatt aatttattac acattaaaac taaattccgg tgtcccatcc 180
agattctcgg gtagcgggtc ggggacggat tttaccttca cgatatacctc cctccagcct 240
gaggacatcg ccacgtacta ctgccagcag tccaaaaccc tgccttggac cttcggtgga 300
gggaccaaag tcgaaattaa g 321

<210> 50

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Leu Lys Leu Asn Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 51

<211> 366

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 51

gaggtagcgc ttgttgaatc tggaggtggc ctggttcagc ccggcggctc actaaggctt 60
agttgtgccg cttcagggtt cacattttcc agctatacaa tgtcttgggt ccgacaggca 120
ccgggaaaag gactggagtg ggtgagctac atccataatg gaggcggtca cacctactat 180
cctgacacta tcaaaggaag gttcactatc agtogagata atgcgaagaa ctcactctac 240
ctacagatga acagcctgcg cgccgaagac accgctgtat actattgcgc acgccgtatg 300
tactacggga acagccactg gtacttcgac gtgtggggtc aaggtacgac cgttaccgtg 360
tcttcc 366

ES 2 711 978 T3

<210> 52
<211> 122
<212> PRT

5 <213> Homo sapiens
<400> 52

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Tyr	Ile	His	Asn	Gly	Gly	Gly	His	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Ile	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Arg	Met	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	
			100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120									

10 <210> 53
<211> 318
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 53

15 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gtgccagttc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccaaca gaaacctggc 120
caggctccca ggctcctcat ctatgacaca tccaaactgg cttctggcat cccagccagg 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 240
gattttgcag tttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt cggcggaggg 300
accaaggtgg agatcaaa 318

20 <210> 54
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 54

25 agtgccagtt caagtgaag ttacatgcac 30

ES 2 711 978 T3

<210> 55
<211> 21
<212> ADN

5 <213> Homo sapiens
<400> 55

gacacatcca aactggcttc t 21

10 <210> 56
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 56

15 cagcagtgga gtagtaaccc gctcacg 27

<210> 57
<211> 106
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 57

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

25 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 58
<211> 10
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 58

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

35 <210> 59
<211> 7

ES 2 711 978 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 59

	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser
5	1				5		

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 60

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr
1				5				

15 <210> 61
<211> 351
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 61

20	caggttcagc	tggtgcagtc	tgagagctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
	tcctgtaagg	cttctgggta	cacctttacc	aaatatgtta	tacattgggt	gcgacaggcc	120
	cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatat	attaatcctt	acaatgatgt	tagtaagtac	180
	aatgagaagt	tcagaggcag	agtcaccatg	accacagaca	catccacgag	cacagcctac	240
	atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagaaataag	300
	gattactatc	ctatggacta	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	g	351

<210> 62
<211> 15
25 <212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 62

aaatatgtta tacat 15

30 <210> 63
<211> 51
<212> ADN
<213> Mus musculus
35 <400> 63

tatattaatc cttacaatga tgtagtaag tacaatgaga agtcagagg c 51

<210> 64
40 <211> 27
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 64

45 aataaggatt actatcctat ggactac 27

<210> 65
<211> 117
<212> PRT

ES 2 711 978 T3

<213> Homo sapiens
<400> 65

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
          20          25          30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
          50          55          60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asn Lys Asp Tyr Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Thr Val Thr Val Ser
          115

```

5
 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <400> 66

```

Lys Tyr Val Ile His
1          5

```

15
 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 67

```

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Arg
1          5          10          15

```

20 Gly
 <210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Mus musculus
 <400> 68

```

Asn Lys Asp Tyr Tyr Pro Met Asp Tyr
1          5

```

ES 2 711 978 T3

<210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 69

Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile His Trp
 1 5 10

10 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 70

15

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 71
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 71

Gln Gln Trp Ser Ser Ser Pro Phe Thr
 1 5

25

<210> 72
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <400> 72

Asp Tyr Tyr Ile His Trp
 1 5

<210> 73
 35 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 73

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Phe Val Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

40

Gly

<210> 74
 <211> 4
 <212> PRT
 45 <213> Mus musculus
 <400> 74

Thr Gly Gly Phe
 1

50 <210> 75
 <211> 10
 <212> PRT

ES 2 711 978 T3

<213> Homo sapiens
<400> 75

Lys Pro Leu Pro Glu Val Thr Asp Glu Tyr
1 5 10

5

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <400> 76

Glu Lys Glu Ala Leu Lys Lys Ile Ile Glu Asp Gln Gln Glu Ser Leu
1 5 10 15

Asn Lys

<210> 77
15 <211> 408
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 77

ES 2 711 978 T3

Met	Ala	Glu	Asn	Gly	Asp	Asn	Glu	Lys	Met	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Lys	1	5	10	15
Ile	Cys	His	Gln	Ile	Glu	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Asp	Phe	Asn	Leu	Pro	Arg	20	25	30	
Asp	Lys	Phe	Leu	Lys	Glu	Gln	Ile	Lys	Leu	Asp	Glu	Gly	Trp	Val	Pro	35	40	45	
Leu	Glu	Ile	Met	Ile	Lys	Phe	Asn	Arg	Leu	Asn	Arg	Leu	Thr	Thr	Asp	50	55	60	
Phe	Asn	Val	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Ser	Lys	Ser	Lys	Ala	Glu	Leu	Met	65	70	75	80
Glu	Ile	Ser	Glu	Asp	Lys	Thr	Lys	Ile	Arg	Arg	Ser	Pro	Ser	Lys	Pro	85	90	95	
Leu	Pro	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Tyr	Lys	Asn	Asp	Val	Lys	Asn	Arg	Ser	100	105	110	
Val	Tyr	Ile	Lys	Gly	Phe	Pro	Thr	Asp	Ala	Thr	Leu	Asp	Asp	Ile	Lys	115	120	125	
Glu	Trp	Leu	Glu	Asp	Lys	Gly	Gln	Val	Leu	Asn	Ile	Gln	Met	Arg	Arg	130	135	140	
Thr	Leu	His	Lys	Ala	Phe	Lys	Gly	Ser	Ile	Phe	Val	Val	Phe	Asp	Ser	145	150	155	160
Ile	Glu	Ser	Ala	Lys	Lys	Phe	Val	Glu	Thr	Pro	Gly	Gln	Lys	Tyr	Lys	165	170	175	
Glu	Thr	Asp	Leu	Leu	Ile	Leu	Phe	Lys	Asp	Asp	Tyr	Phe	Ala	Lys	Lys	180	185	190	
Asn	Glu	Glu	Arg	Lys	Gln	Asn	Lys	Val	Glu	Ala	Lys	Leu	Arg	Ala	Lys	195	200	205	
Gln	Glu	Gln	Glu	Ala	Lys	Gln	Lys	Leu	Glu	Glu	Asp	Ala	Glu	Met	Lys	210	215	220	
Ser	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Gly	Cys	Leu	Leu	Lys	Phe	Ser	Gly	Asp	Leu	225	230	235	240

ES 2 711 978 T3

Asp Asp Gln Thr Cys Arg Glu Asp Leu His Ile Leu Phe Ser Asn His
 245 250 255
 Gly Glu Ile Lys Trp Ile Asp Phe Val Arg Gly Ala Lys Glu Gly Ile
 260 265 270
 Ile Leu Phe Lys Glu Lys Ala Lys Glu Ala Leu Gly Lys Ala Lys Asp
 275 280 285
 Ala Asn Asn Gly Asn Leu Gln Leu Arg Asn Lys Glu Val Thr Trp Glu
 290 295 300
 Val Leu Glu Gly Glu Val Glu Lys Glu Ala Leu Lys Lys Ile Ile Glu
 305 310 315 320
 Asp Gln Gln Glu Ser Leu Asn Lys Trp Lys Ser Lys Gly Arg Arg Phe
 325 330 335
 Lys Gly Lys Gly Lys Gly Asn Lys Ala Ala Gln Pro Gly Ser Gly Lys
 340 345 350
 Gly Lys Val Gln Phe Gln Gly Lys Lys Thr Lys Phe Ala Ser Asp Asp
 355 360 365
 Glu His Asp Glu His Asp Glu Asn Gly Ala Thr Gly Pro Val Lys Arg
 370 375 380
 Ala Arg Glu Glu Thr Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ser Lys Gln Gln Lys
 385 390 395 400
 Thr Glu Asn Gly Ala Gly Asp Gln
 405

<210> 78

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Pro Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

10

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 79

Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser
 1 5

ES 2 711 978 T3

<210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <400> 80

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Leu Thr
 1 5

<210> 81
 10 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 81

His Tyr Tyr Ile Tyr
 15 1 5

<210> 82
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus
 <400> 82

Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr His Phe Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ser
 <210> 83
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 83

Ser Glu Tyr Asp Tyr Gly Leu Gly Phe Ala Tyr
 30 1 5 10

<210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus
 <400> 84

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 85
 40 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 85

45 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 86
 <211> 8

ES 2 711 978 T3

<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 86

5 Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Pro Thr
1 5

<210> 87
<211> 5
<212> PRT

10 <213> Mus musculus
<400> 87

Asp Phe Trp Met Asn
1 5

15 <210> 88
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 88

20 Gln Ile Arg Asn Lys Pro Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser
1 5 10 15

Leu Lys Gly

<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 89

Leu Gly Asn Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5

30 <210> 90
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador
<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)

40 <223> n e s a, c, g o t
<400> 90

ttttggatc csargtnmag ctgsagsagt cwgg 34

45 <210> 91
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

50 <223> Cebador
<400> 91

ggaagatcta tagacagatg ggggtgtcgt 30

<210> 92
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 92

 ttttgaatt ctgayattgt gmtsacmcar wctmca 36
 10
 <210> 93
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 93

 ttttgggcc cggatacagt tggcgcagca tc 32
 20
 <210> 94
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 94

 ggcccagccg gccatggcgg actacaaaga agtacagctg caggagtcag g 51
 30
 <210> 95
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 95

 ggagccgccc ccgccagaac caccaccacc tgaggagacg gtgaccgtgg 50
 40
 <210> 96
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 96

 ggcggcgccg gctccggtgg tggcggatcc gatattgtga tgacacagtc tac 53
 50
 <210> 97
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 97

 gcggccgcgg atacagttgg tgcagcatc 29
 60

<210> 98
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 98

 gggcccgaat tcatggcgga ctacaaagag gtgcagctg 39
 10
 <210> 99
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 99

 gggcccaagc ttggatacag ttggtgcagc atcagcccg 39
 20
 <210> 100
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 100

 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgtaagg cttctgggta cacctttacc aaatatgtta 100
 30
 <210> 101
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 101

 acatcattgt aaggattaat atatcccatc cactcaagcc cttgtccagg ggcctgtcgc 60
 acccaatgta taacatatatt ggtaaagggtg taaccagaag 100
 40
 <210> 102
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 102

 gatgggatat attaatcctt acaatgatgt tagtaagtac aatgagaagt tcagagggcag 60
 agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 100
 50
 <210> 103
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 103

gatagtaatc cttattttctc gcacagtaat acacggccgt gtcgtcagat ctcaggetcc 60
 5 tcagctccat gtaggctgtg ctcgtggatg tgtctgtggt 100

<210> 104
 <211> 86
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 104

attactgtgc gagaaataag gattactatc ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg 60
 15 tcaccgtctc gggaggagga ggatcc 86

<210> 105
 <211> 37
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 105

25 ggcccagccg gcccaggttc agctggtgca gtctgga 37

<210> 106
 <211> 39
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 106

35 ggatcctct cctcccgaga cggtgaccgt ggtcccttg 39

<210> 107
 <211> 90
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 107

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 45 ctctcctgca gtgccagttc aagtgttaagt 90

<210> 108
 <211> 91
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 108

tgtgtcatag atgaggagcc tgggagcctg gccaggtttc tggttggtacc agtgcattga 60
acttacactt gaactggcac tgcaggagag g 91

<210> 109
<211> 91
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 109

10 ccaggctccc aggctcctca tctatgacac atccaaactg gcttctggca tcccagccag 60
gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt c 91

<210> 110
<211> 91
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 110

20 ---
ccactgctga cagtaataaa ctgcaaaatc ttcaggctct aggctgctga tggtagagat 60
gaagtctgtc ccagaccac tgccactgaa c 91

<210> 111
<211> 79
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 111

30 agattttgca gtttattact gtcagcagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggcggagg 60
gaccaagggtg gagatcaaa 79

<210> 112
<211> 27
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 112

40 ggatccgaaa ttgtgtgac acagtct 27

<210> 113
<211> 29
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 113

50 gcggccgctt tgatctccac cttgtccc 29

<210> 114
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 114

 ggatccgccg ccgccagaac caccaccacc ggagcctcct cctcccgaga 50
 10
 <210> 115
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 115

 gatataccaga tgactcaaag tcctagtacc ctgtctgcat cagtgggaga ccgggtgacc 60
 attacatgcg gtacatccca agacatcaat aattatctca 100
 20
 <210> 116
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 116

 cggaatgcag cctggatgtg tagtagatta ataacttagg aactttgcct ggcttctgct 60
 gataccagtt gagataatta ttgatgtctt gggatgtacc 100
 30
 <210> 117
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 117

 aatctactac acatccaggc tgcattccgg ggtgccctcc cgcttttcgg gctccgggtc 60
 ggaaccgac ttaccctaa ccatatcttc cctgcagcct 100
 40
 <210> 118
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 118

 aagtacagt agttgcgtcc caccacaaa tgcctatggt aatgtctttg actgctgaca 60
 atagtacgtt gcaacgtctt caggctgcag ggaagatatg gttagggtaa a 111
 50
 <210> 119
 <211> 29

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5 <400> 119

 ctcgaggaga tatccagatg actcaaagt 29

 <210> 120
 10 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 120

 agcggcactt gctccgctcc ctctccacc actgccacct ccaccaagta cagtgag 57

 <210> 121
 20 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 25 <400> 121

 caggtgcagc tagtggagtc cgggtggcggc ctcgttaagc cgggcggatc gctgcgcctt 60
 tcatgtgccg catcaggatt cacattctcc agttactcta 100

 <210> 122
 30 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 35 <400> 122

 cttccacctg aatcattaat gtacgagacc cattccaatc ccttgccagg tgcctgccga 60
 atccatgaca tagagtaact ggagaatgtg aatcctgatg 100

 <210> 123
 40 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 45 <400> 123

 ggtctcgtac attaatgatt caggtggaag tacattctat ccggacacgg ttaaaggtag 60
 atttaccatc agccgtgata acgcgaagaa tagcttgtac 100

 <210> 124
 50 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido

ES 2 711 978 T3

<400> 124

tgccataata catacgtcga ggcgaataat atacagcagt atcctctgca cgcaggctat 60
tcattctgtaa gtacaagcta ttcttcgcgt tatcacggct 100

5

<210> 125
<211> 86
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Oligonucleótido
<400> 125

attattgcgc tcgacgtatg tattatggca atagtcactg gcactttgac gtctggggcc 60
agggcacgac agttactgtc tcttcg 86

15

<210> 126
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador
<400> 126

ggagcaagt cgcctggagg cggagggtca ggcggtggtg gaagccaggt gcagctag 58

25

<210> 127
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador
<400> 127

gggccccgaa gagacagtaa ctgtcgt 27

35

<210> 128
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Cebador
<400> 128

ctcaggaga tatccagatg actcaaagt 29

45

<210> 129
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Cebador
<400> 129

gggccccgaa gagacagtaa ctgtcgt 27

55

<210> 130
<211> 25
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 130

5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 131

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 131

15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 132

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 132

25

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 133

<211> 5

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 133

35

Ala Ala Ala Arg Gly
1 5

<210> 134

<211> 40

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 134

45

ggcccagccg gccggatccg atatccagat gactcaaagt 40

<210> 135

<211> 41

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 135

gcggccgcgg atcctcctcc tccgaagag acagtaactg t 41

5 <210> 136
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

10 <223> Oligonucleótido
<400> 136

ggccgctaaa cccctacctg aagtactga tgagtatgc 39

15 <210> 137
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

20 <223> Oligonucleótido
<400> 137

tcgagcatat tcatcagta cttcaggtag gggtttagc 39

25 <210> 138
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

30 <223> Oligonucleótido
<400> 138

caagtgaac tgggtccagtc aggtgctgag gtgaaaaaac ccggagccag tgtcaaagta 60

agctgcaagg cctctgggta tactttcacc cattactata 100

35 <210> 139
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

40 <223> Oligonucleótido
<400> 139

ccaccgttcg aagggttgac tccacccatc cactcaagcc cctgacctgg agcttgacga 60

acccagtata tatagtaatg ggtgaaagta taccagagg 100

45 <210> 140
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

50 <223> Oligonucleótido
<400> 140

gatgggtgga gtcaaccctt cgaacgggtgg cactcacttc aatgaaaagt ttaaaagccg 60

cgtaaccatg acgcgagata cttccatttc cacagcttat 100

<210> 141
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 141

 cataatcata ttcacttcta gcacagtaat aaacggccgt gtcactactg cgtaacctac 60
 taagttccat ataagctgtg gaaatggaag tatctcgcgt 100
 10
 <210> 142
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 142

 attactgtgc tagaagtgaa tatgattatg ggttgggttt cgcttactgg ggccagggaa 60
 ccctcgtcac cgtgtccagt 80
 20
 <210> 143
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 143

 ctcgaggaca agtgcaactg gtccagtcag gtg 33
 30
 <210> 144
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 144

 agaaccgcca ccaccgcatc ctccaccacc actggacacg gtgacgaggg ttccc 55
 40
 <210> 145
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 145

 gacattgtta tgacgcagag ccctgattca ctgcgagtgt ccctaggaga gcgggccacc 60
 atcaactgta aaagttctca gtcctctgctg aacagcagga 100
 50
 <210> 146
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 146

gccacagtaaa tgagcagctt aggcggctgt ccaggtttct gttggtacca tgccaggtaa 60
 5 ttcttaggcg tctgctgtt cagcagggac tgagaacttt 100

<210> 147
 <211> 100
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 147

acagccgcct aagctgctca ttactgggc ctccacacgg aagagcggcg tgcccgaccg 60
 15 gttttccggg agcggctccg gcaccgaatt taccttgacc 100

<210> 148
 <211> 100
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 148

caaatgtcag gagattgtaa gattgcttgc aatagtatac ggccacgtct tctgcctgca 60
 25 gggaaactgat ggtcaaggta aagtcggtgc cggagccgct 100

<210> 149
 <211> 56
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 149

35 gcaagcaatc ttacaatctc ctgacatttg gcggcggcac aaaagtgag atcaaa 56

<210> 150
 <211> 55
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 150

45 ggtggtggcg gttctggcgg aggcggatcc gacattgta tgacgcagag ccctg 55

<210> 151
 <211> 31
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 151

gggccctttg atctccactt ttgtgccgcc g 31

<210> 152
<211> 33

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 152

10 ctcgaggaca agtgcaactg gtccagtcag gtg 33

<210> 153
<211> 31

15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 153

20 gggccctttg atctccactt ttgtgccgcc g 31

<210> 154
<211> 72

25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 154

30 gggcgctctg gagaaagaag cactgaagaa aataatagaa gaccaacaag aatccctaaa 60

caaagcagct gc 72

<210> 155
<211> 72

35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 155

40 tcgagcagct gctttgttta gggattcttg ttgggtcttct attattttct tcagtgttcc 60

tttctccaga gc 72

<210> 156
<211> 100

45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 156

50 gaggtgcaac tgggtcgaaag tggcggtggt ttagttcagc ctggtggaag tctacggctt 60

agctgcgcag catccggttt caccttttagc gacttttgga 100

<210> 157
<211> 100

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 5 <400> 157

 ttattcgggtt tgttgcggat ttgcccaacc cactccagtc ctttgcccgg agcctgccga 60
 acccagttca tccaaaagtc gctaaagggtg aaaccggatg 100

 <210> 158
 10 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 15 <400> 158

 ggttgggcaa atccgcaaca aaccgaataa ctacgaaact tattactcag atagcctgaa 60
 gggtcgattc accatcagca gggatgattc aaagtcaatc 100

 <210> 159
 20 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 25 <400> 159

 aggagttacc tagtgtacag taatacacccg cagtatcctc cgctcttaat gagttcatct 60
 gtaggtaagt gattgacttt gaatcatccc tgctgatggt 100

 <210> 160
 30 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 35 <400> 160

 cgggtgtatta ctgtacacta ggtaactcct ggttcgcgta ttggggacag ggcacccttg 60
 taaccgtctc cagc 74

 <210> 161
 40 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 45 <400> 161

 ggtggcggcg gctccggagg tgggtggttcc ggcgggtggcg gatcggaggt gcaactggtc 60
 gaaag 65

 <210> 162
 50 <211> 27
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 162
 5 gggcccgcgtg gagacgggta caagggg 27

 <210> 163
 <211> 100
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 163
 15 gacattgtta tgaccagag cccggactct ctgcgtgtta gtcttggtga gcgagcgact 60
 attaactgcc ggagcagtc gagtttggtg gactcacgga 100

 <210> 164
 <211> 100
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 164
 25 gcccaatata tcagtaattt aggtgggttg cccggcttct gctggtacca tgccaggtag 60
 ttctttctcg tccgtgagtc caacaaactc tgactgctcc 100

 <210> 165
 <211> 100
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 165
 35 ccaaccacct aaattactga tatattgggc gtcgactcgt gagtcagggg taccggacag 60
 gttttctgga agcggatcag gaacagactt cactttgacg 100

 <210> 166
 <211> 100
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 166
 45 caaatgtcgg cagattatag ctttgcttac aataataaac cgcaacgtcc tcggcttgaa 60
 gcgaagagat cgtcaaagtg aagtctgttc ctgatccgct 100

 <210> 167
 <211> 56
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido
<400> 167

gtaagcaaag ctataatctg ccgacatttg gtggcggcac caaggttgaa attaag 56

5
<210> 168
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador
<400> 168

ctcgaggaga cattgttatg acccagagc 29

15
<210> 169
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador
<400> 169

ggagccgccc ccaccggaac cgccgcccgc agatcctccg ccgcccttaa tttcaacctt 60

ggtgc 65

25
<210> 170
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador
<400> 170

ctcgaggaga cattgttatg acccagagc 29

35
<210> 171
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador
<400> 171

gggcccgcctg gagacgggta caagggc 27

45
<210> 172
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

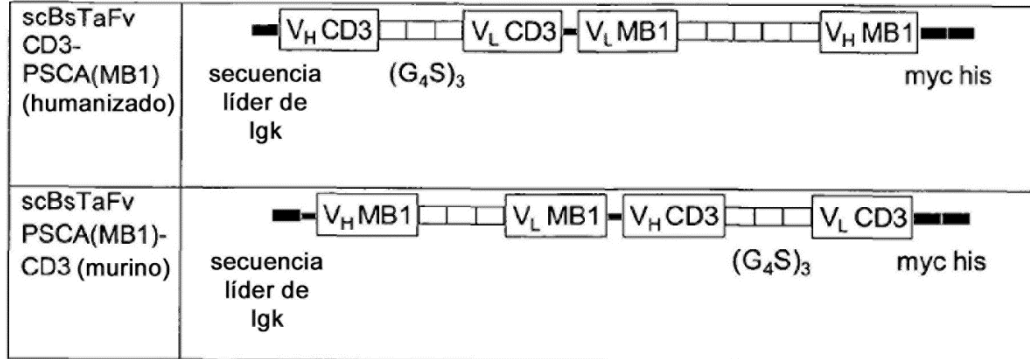
50 <220>
<223> Péptido
<400> 172

Met Ala Asp Tyr Lys
1 5

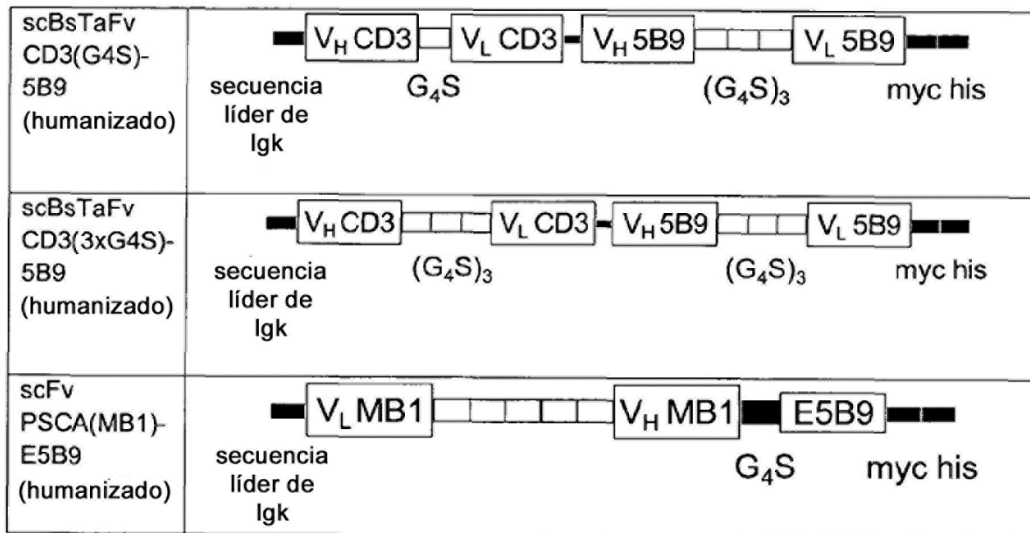
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une con antígeno de células madre específico de la próstata, en donde
- 5 - las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena liviana comprende las siguientes secuencias de aminoácidos: CDR1 SEQ ID NO. 1, CDR2 SEQ ID NO. 2, CDR3 SEQ ID NO. 3 y
- las CDR de la región variable de la cadena pesada comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos: CDR1
SEQ ID NO. 4, CDR2 SEQ ID NO. 5, CDR3 SEQ ID NO. 6.
- 10 2. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, cuyas regiones variables presentan una secuencia de aminoácidos humanizada.
3. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende al menos dos unidades de unión distintas, en
15 donde
- al menos una de las unidades de unión se une con antígeno de células madre específico de la próstata y comprende las regiones determinantes de complementariedad definidas en la reivindicación 1 y
20 - al menos otra de las unidades de unión se une específicamente con otro antígeno distinto del antígeno de células madre específico de la próstata.
4. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la unidad de unión adicional se une específicamente con la estructura de superficie en una célula efectora, en donde la unidad de unión se selecciona preferiblemente de una
25 unidad de unión de un anticuerpo o ligando que se une con la estructura de superficie de una célula efectora.
5. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula efectora se selecciona de linfocitos T, células NK y monocitos, preferiblemente linfocitos T.
- 30 6. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la unidad de unión adicional se une específicamente con un péptido de 10 a 50 aminoácidos de largo, preferiblemente un péptido con una secuencia de aminoácidos que equivale a una secuencia parcial de 10 a 50 aminoácidos de largo de la proteína La humana, con preferencia particular, un péptido con una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 75 o SEQ ID NO. 76.
- 35 7. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 6 en forma de un diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo.
8. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 para usar como medicamento, en especial para el tratamiento de enfermedades tumorales, con preferencia, cáncer de próstata, o como diagnóstico.
- 40 9. Ácido nucleico, cuya secuencia nucleotídica codifica un anticuerpo recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Vector que contiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9.
- 45 11. Célula huésped u organismo huésped no humano que contiene una secuencia nucleotídica de acuerdo con la reivindicación 9 o un vector de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, con preferencia, en una forma apropiada para la administración intravenosa.
- 50 13. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, que contiene al menos dos anticuerpos recombinantes distintos, de ellos al menos un anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 y al menos un anticuerpo recombinante adicional que forma una unión específica con el anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7.
- 55 14. Composición diagnóstica que contiene un anticuerpo recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7.
- 60

A



B



C

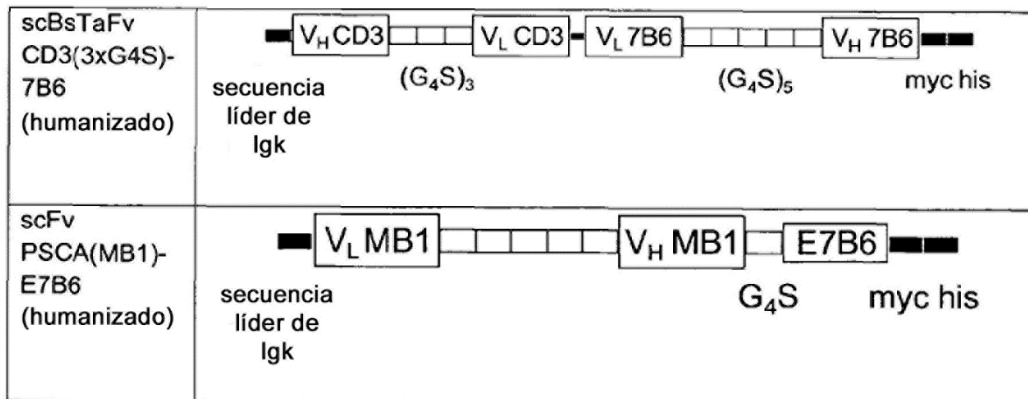


Fig. 1

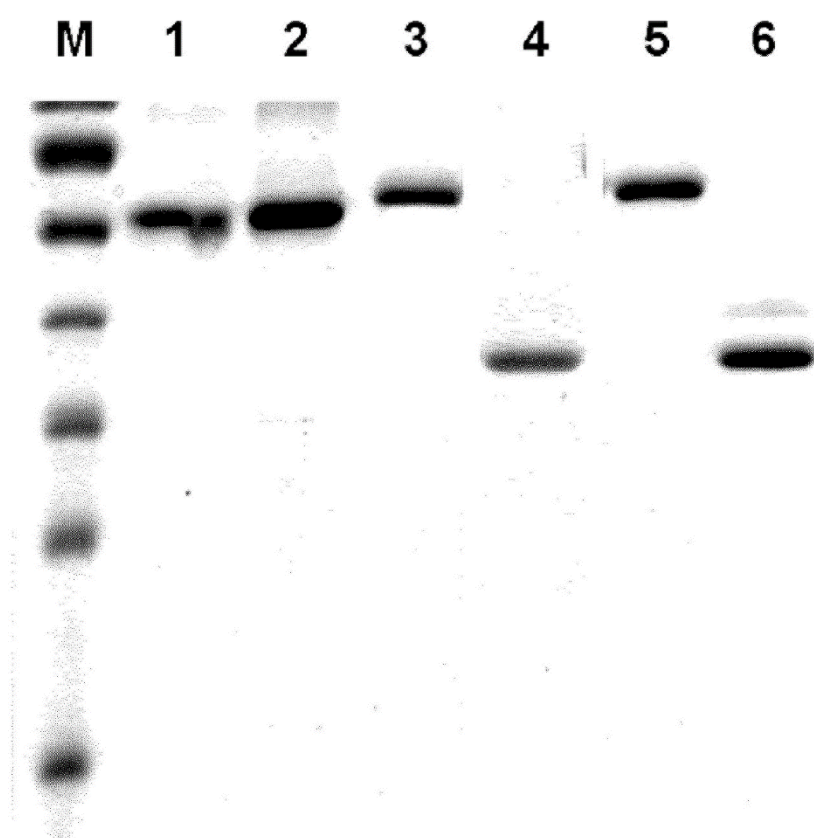


Fig. 2

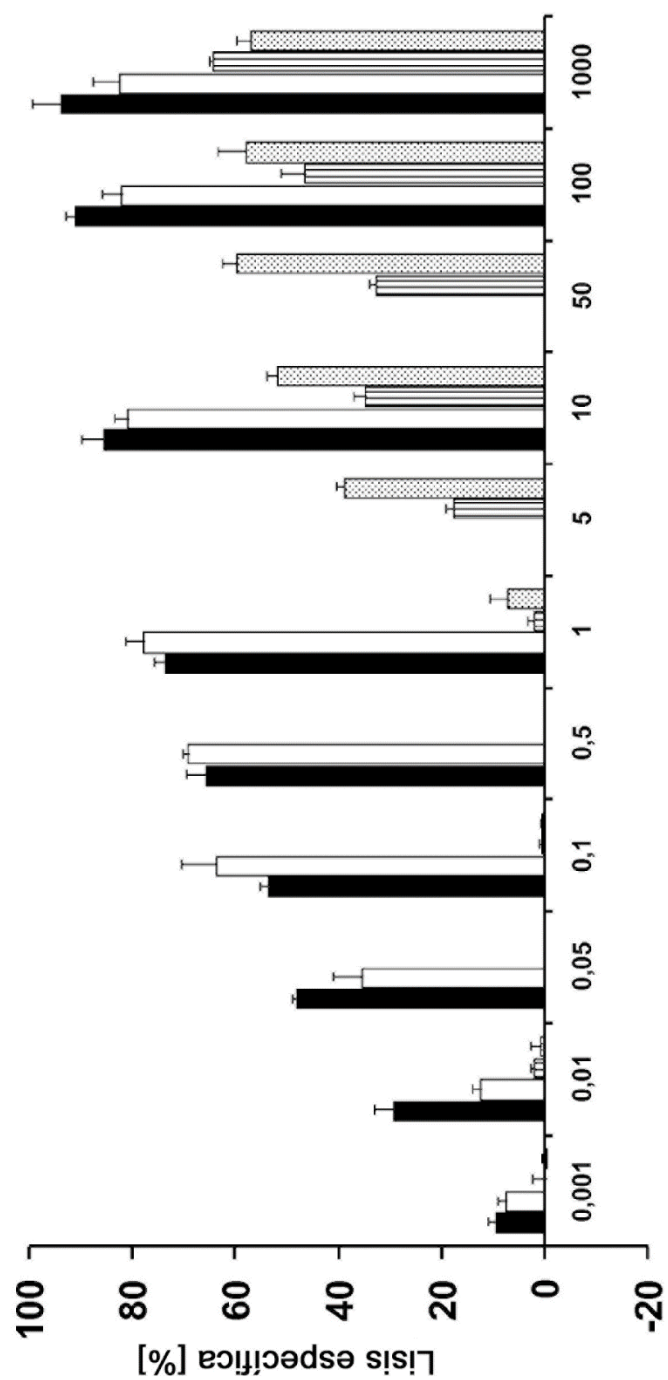


Fig. 3

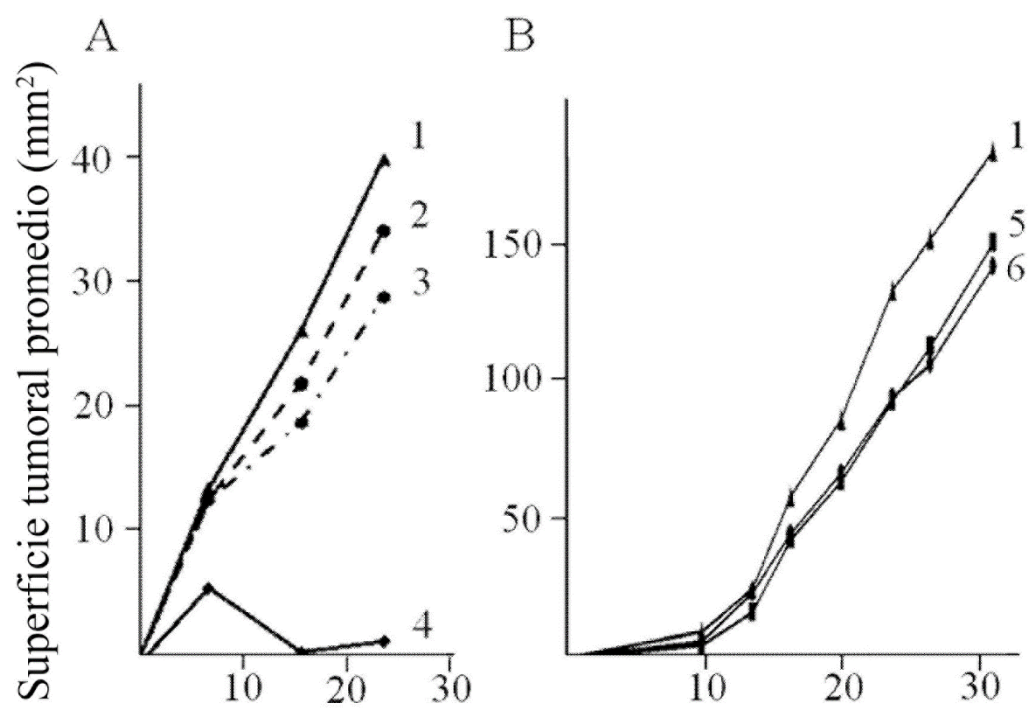


Fig. 4