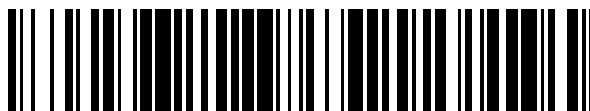


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 366**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06735489 .4**
- 96 Fecha de presentación: **17.02.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1851250**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2007**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal humano contra el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA)**

30 Prioridad:
18.02.2005 US 654125 P
26.09.2005 US 720499 P
08.12.2005 US 748417 P

73 Titular/es:
Medarex, Inc.
Route 206 & Province Line Road
Princeton, NJ 08543-4000, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.08.2012

72 Inventor/es:
HUANG, Haichun;
KING, David, John;
PAN, Chin y
CARDARELLI, Josephine M.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.08.2012

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 386 366 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal humano contra el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA)

5 **Antecedentes de la Invención**

El cáncer de próstata es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre los hombres. Los tratamientos para el cáncer de próstata incluyen cirugía, hormonas, radiación y quimioterapia. Existe un tratamiento muy poco efectivo para la enfermedad metastásica de la próstata. Por lo tanto, resulta crítica la identificación de genes y/o de productos génicos que representen los marcadores de diagnóstico y pronóstico, así como dianas para la terapia. El antígeno específico de la próstata (PSA) es uno de tales marcadores de cáncer, que es útil en el diagnóstico clínico y la estadificación del cáncer de próstata. Sin embargo, el PSA no puede diferenciar la hiperplasia benigna de próstata (HBP) de la prostatitis o del cáncer de próstata en el intervalo de 4-10 ng/ml, por lo que se necesita una evaluación citológica y/o histológica para confirmar el diagnóstico correcto (Barren, R.J. *et al.* (1998) *Prostate* 36:181-188).

El antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) es una glicoproteína transmembrana de tipo II, de 750 aminoácidos, de aproximadamente 110 kD que tiene un 54% de homología con el receptor de transferrina. La PSMA tiene 3 dominios estructurales, que incluyen un dominio intracelular de 19 aminoácidos, un dominio transmembrana de 24 aminoácidos y un dominio extracelular de 707 aminoácidos. La proteína PSMA presenta actividad neurocarboxipeptidasa y folato hidrolasa y se ha notificado que está implicada en la regulación neuroendocrina del crecimiento y la diferenciación de la próstata (Heston, W.D. (1996) *Urologe-Ausgabe A.* 35:400-407). La PSM' es una forma empalmada alternativa de la PSMA que se localiza en el citoplasma.

La PSMA se expresa predominantemente en las células epiteliales de la próstata. La expresión de PSMA es mayor en el cáncer de próstata, especialmente en los carcinomas pobremente diferenciados, metastásicos, y refractarios a hormonas (Gregorakis, AK *et al.* (1998) *Seminars in Urologic Oncology* 16:2-12; Silver, DA (1997) *Clinical Cancer Research* 3:81-85). Se observa un bajo nivel de expresión de PSMA en los tejidos extraprostáticos tales como el intestino delgado, las glándulas salivales, la mucosa duodenal, los túbulos renales proximales, y el cerebro (Silver, D.A. (1997) *Clinical Cancer Research* 3:81-85). La PSMA también se expresa en las células endoteliales de los vasos capilares en las áreas peritumorales y endotumorales de determinados tumores malignos, que incluyen los carcinomas de células renales, y los carcinomas de colon, pero no en los vasos sanguíneos de los tejidos normales. Además, se ha notificado que la PSMA está relacionada con la angiogénesis tumoral (Silver, DA (1997) *Clinical Cancer Research* 3:81-85). Recientemente, se ha demostrado que la PSMA se expresa en las células endoteliales de la neovascularización asociada al tumor en los carcinomas de colon, de mama, de vejiga, de páncreas, de riñón y en el melanoma (Chang, S.S. (2004) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5:611-5).

Se han descrito anticuerpos contra el dominio extracelular de PSMA (véanse, por ejemplo, Liu, H. *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:3629-3634; Murphy, G.P. *et al.* (1998) *J. Urol.* 160: 2396-2401; Wang, S. *et al.* (2001) *Int. J. Cancer* 92:871-876; Kato, K. *et al.* (2003) *Int. J. Urol.* 10:439-444; la patente de Estados Unidos N° 6.150.508 y la patente de Estados Unidos N° 6.107.090). Más recientemente, se han descrito anticuerpos humanos y humanizados que se unen a PSMA (véanse, por ejemplo, Bander, NH. *et al.* (2003) *Semin. Oncol.* 30:667-676; la publicación PCT WO 02/098897; la publicación PCT WO 01/09192; la publicación PCT WO 03/064606; la publicación PCT WO 03/034903, y la solicitud de Estados Unidos N° 2004/0033229). Tales anticuerpos se han utilizado para obtener imágenes de las células del cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Yao, D. *et al.* (2002) *Semin. Urol. Oncol.* 20:211-218; Bander, N.H. *et al.* (2003) *J. Urol.* 170:1717-1721). También se han utilizado anticuerpos anti-PSMA para la intervención terapéutica en el tratamiento del cáncer de próstata, por lo general como un conjugado con un agente quimioterapéutico o isótopo radiactivo (véase, por ejemplo, Nanus, D.M. *et al.* (2003) *J. Urol.* 170:S84-89; Milowsky, M.I. *et al.* (2004) *J. Clin. Oncol.* 22:2522-2531; Henry, M.D. *et al.* (2004) *Cancer Res.* 64:7995-8001).

Por consiguiente, la PSMA representa una diana valiosa para el tratamiento del cáncer de próstata y una variedad de otras enfermedades caracterizadas por la expresión de PSMA y se desean agentes terapéuticos adicionales que reconozcan PSMA.

55 **Resumen de la Invención**

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- 60 (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 10,
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 14,
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 18,
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 22,
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 26 y
- 65 (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 30.

Otros anticuerpos preferentes de la invención, o partes de unión a antígeno del mismo, comprenden:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6.

5 Los anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo de un isotipo IgG1 o IgG4. De manera alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab o Fab'2, o anticuerpos monocatenarios.

10 La invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o parte de unión a antígeno del mismo, unido a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radiactivo. La invención también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, unida a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente que dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo.

15 También se proporcionan las composiciones que comprenden un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo o un inmunoconjugado o una molécula biespecífica de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, de la invención, también quedan abarcados por la invención, así como los vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos y las células hospedadoras que comprenden tales vectores de expresión. Además, la invención proporciona un ratón transgénico que comprende los transgenes de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina humana, en el que el ratón expresa un anticuerpo de la invención, así como los hibridomas preparados a partir de un ratón de este tipo, en el que el hibridoma produce el anticuerpo de la invención.

25 En otro aspecto más, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de las células tumorales en un sujeto, en el que las células tumorales o las células endoteliales vasculares próximas a las células tumorales expresan PSMA, que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo humano anti-PSMA de la presente invención en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las células tumorales. En una forma de realización preferente, se inhibe el crecimiento de células tumorales de la próstata.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor (por ejemplo, de próstata, de colon, renal, rectal, urotelial, de mama, de vejiga, de hígado, de páncreas o un melanoma) en un sujeto, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor expresan PSMA. El método incluye administrar a un sujeto un anticuerpo anti-PSMA, o parte de unión a antígeno del mismo, en combinación con un agente antitumoral en una cantidad eficaz para inhibir o prevenir el crecimiento del tumor.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para estimular la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) de un tumor en un sujeto, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor expresan PSMA. El método incluye administrar a un sujeto un anticuerpo anti-PSMA, o parte de unión a antígeno del mismo, en combinación con un agente antitumoral en una cantidad eficaz para estimular la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) del tumor.

40 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para inhibir la caquexia relacionada con el tumor en un sujeto, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor expresan PSMA. El método incluye administrar a un sujeto un anticuerpo anti-PSMA, o parte de unión a antígeno del mismo, en combinación con un agente antitumoral en una cantidad eficaz para inhibir la caquexia relacionada con el tumor en el sujeto.

45 En una forma de realización de la invención, la administración a un sujeto del anticuerpo anti-PSMA, o parte de unión a antígeno del mismo, en combinación con el agente antitumoral, conduce a un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento del tumor. En otra forma de realización, el agente antitumoral provoca daños en la masa tumoral, conduciendo de ese modo a una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) más eficaz del tumor.

50 En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PSMA puede ser el anticuerpo 2A10.

55 En una forma de realización de la invención, el agente antitumoral es un agente quimioterapéutico, tal como Taxotere® (docetaxel). En otra forma de realización, el agente antitumoral es un agente antiangiogénico, tal como angiostatina K1-3, Arresten, AAAT, Canstatina, DL- α -difluorometil-ornitina, Endostatina, Fumagilina, Genisteína, Minociclina, Estaurosporina, Talidomida, y Tumstatina. En otra forma de realización, el agente antitumoral es un agente inmunomodulador, tal como anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-CTLA-4, oligodesoxirribonucleótido fosforotiolato (1018 ISS), vacunas de genes GM-CSF, interleucina-2, interleucina-7 (CYT 99 07), interleucina-12 e interleucina-21.

65

En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un agente antitumoral capaz de actuar sinérgicamente con un anticuerpo anti-PSMA en la inhibición o la prevención del crecimiento de un tumor, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor expresan PSMA. El método incluye poner en contacto una composición indicadora con (a) un agente antitumoral de ensayo en solitario, (b) un anticuerpo anti-PSMA en solitario, y (c) un agente antitumoral de ensayo y un anticuerpo anti-PSMA; y comparar la capacidad de (a) el agente antitumoral de ensayo en solitario y (b) el anticuerpo anti-PSMA en solitario para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor con la capacidad de (c) el agente antitumoral de ensayo y el anticuerpo anti-PSMA para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor, en el que la inhibición o la prevención del crecimiento del tumor por (c) en una cantidad que es mayor que el efecto aditivo de (a) y (b) conducirá a la identificación de un agente antitumoral capaz de actuar sinérgicamente con un anticuerpo anti-PSMA en la inhibición o la prevención del crecimiento de un tumor.

En otro aspecto, la invención concierne a una composición que comprende un anticuerpo anti-PSMA (por ejemplo, 2A10) y un agente antitumoral (por ejemplo, Taxotere® (docetaxel), angiostatina K1-3, Arresten, AAAT, Canstatina, DL- α -difluorometil-ornitina, Endostatina, Fumagilina, Genisteína, Minociclina, Estaurosporina, Talidomida, y Tumstatina. Un anticuerpo anti-PD1, un anticuerpo anti-CTLA-4, oligodesoxirribonucleótido fosforotiolato (1018 ISS), una vacuna de genes GM-CSF, interleucina-2, interleucina-7 (CYT 99 07), interleucina-12 e interleucina-21) en una cantidad eficaz para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor y un excipiente farmacéuticamente aceptable o en una cantidad eficaz para estimular la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) de un tumor y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada y de los ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 33) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 1) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1C3. Se definen las regiones CDR1 (SEC ID N°: 9) CDR2, (SEC ID N°: 13) y CDR3 (SEC ID N°: 17) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 37) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 5) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1C3. Se definen las regiones CDR1 (SEC ID N°: 21) CDR2, (SEC ID N°: 25) y CDR3 (SEC ID N°: 29) y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 34) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2A10. Se definen las regiones CDR1 (SEC ID N°: 10), CDR2 (SEC ID N°: 14) y CDR3 (SEC ID N°: 18) y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 38) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 6) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2A10. Se definen las regiones CDR1 (SEC ID N°: 22) CDR2, (SEC ID N°: 26) y CDR3 (SEC ID N°: 30) y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 35) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 3) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2F5. Se definen las regiones CDR1 (SEC ID N°: 11), CDR2 (SEC ID N°: 15) y CDR3 (SEC ID N°: 19) y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 39) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 7) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2F5. Se definen las regiones CDR1 (SEC ID N°: 23) CDR2, (SEC ID N°: 27) y CDR3 (SEC ID N°: 31) y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 36) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 4) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2C6. Se definen las regiones CDR1 (SEC ID N°: 12), CDR2 (SEC ID N°: 16) y CDR3 (SEC ID N°: 20) y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 40) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 8) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2C6. Se definen las regiones CDR1 (SEC ID N°: 24), CDR2 (SEC ID N°: 28) y CDR3 (SEC ID N°: 32) y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena

pesada de 1C3 (SEC ID N°: 1) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana VH 3-30.3 (SEC ID N°: 41) y la línea germinal JH6b (SEC ID N°: 45).

5 La Figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2A10 (SEC ID N°: 2), 2F5 (SEC ID N°: 3), y 2C6 (SEC ID N°: 4) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana VH 5-51 (SEC ID N°: 42).

10 La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1C3 (SEC ID N°: 5), 2A10 (SEC ID N°: 6) y 2F5 (restos 1-107 de la SEC ID N°: 7) con la secuencia de aminoácidos de VK de la línea germinal humana L18 (SEC ID N°: 43) y la línea germinal JK4 (SEC ID N°: 46).

15 La Figura 8 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2C6 (SEC ID N°: 8) con secuencia de aminoácidos de VK de la línea germinal humana L6 (SEC ID N°: 44) y la línea germinal JK3 (SEC ID N°: 47).

20 La Figura 9 muestra los resultados de los experimentos de citometría de flujo que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos 2F5, 2A10 y 2C6, dirigidos contra la PSMA humana, se unen a la superficie celular de las células LNCaP que expresan PSMA.

La Figura 10 muestra los resultados de los experimentos de ELISA que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra la PSMA humana se unen específicamente a PSMA purificada a partir de células LNCaP.

25 Las Figuras 11A-11B son los resultados de estudios de competición de unión a anticuerpos que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos 2A10 y 7F12, dirigidos contra PSMA humana, compiten por la unión a las células del cáncer de próstata LNCaP que expresan PSMA. La Figura 11 muestra la competición de ¹²⁵I-2A10 con anticuerpo 7F12 frío. La Figura 11B muestra la competición de ¹²⁵I-7F12 con anticuerpo 2A10 frío.

30 Las Figuras 12A-12B muestran los resultados de los experimentos de internalización que demuestran que el anticuerpo monoclonal humano 2A10, dirigido contra PSMA humana, entra en las células del cáncer de próstata LNCaP que expresan PSMA mediante un ensayo de liberación de ³H-timidina. La Figura 12A muestra los resultados para las células LNCaP sembradas durante 2 horas antes de la introducción del anticuerpo. La Figura 12B muestra los resultados para las células LNCaP sembradas durante toda la noche antes de la introducción del anticuerpo.

35 Las Figuras 13A-13B son gráficos que representan la media y la mediana de las curvas de crecimiento de los xenoinjertos de tumores LNCaP para ratones tratados con: el anticuerpo 7F12 anti-PSMA, el anticuerpo de control de isotipo Rituxan, Taxotere (2 mg/kg), Taxotere (4 mg/kg), el anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con Taxotere (2 mg/kg), el anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con Taxotere (4 mg/kg), el anticuerpo de control de isotipo Rituxan en combinación con Taxotere (2 mg/kg), el anticuerpo de control de isotipo Rituxan en combinación con Taxotere (4 mg/kg), o PBS. Las Figuras 13C-13D son gráficos que representan la media y la mediana del cambio de peso corporal de ratones portadores de tumores LNCaP tratados con: el anticuerpo 7F12 anti-PSMA, el anticuerpo de control de isotipo Rituxan, Taxotere (2 mg/kg), Taxotere (4 mg/kg), el anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con Taxotere (2 mg/kg), el anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con Taxotere (4 mg/kg), el anticuerpo de control del isotipo Rituxan en combinación con Taxotere (2 mg/kg), el anticuerpo de control de isotipo Rituxan en combinación con Taxotere (4 mg/kg), o PBS.

40 Las Figuras 14A-14B son gráficos que representan la media y la mediana de las curvas de crecimiento de los xenoinjertos de tumores LNCaP para ratones tratados con: el anticuerpo 7F12 anti-PSMA, el anticuerpo de control de isotipo Rituxan, o PBS. Las Figuras 14C-14D son gráficos que representan la media y la mediana del cambio de peso corporal de ratones portadores de tumores LNCaP tratados con: el anticuerpo 7F12 anti-PSMA, el anticuerpo de control de isotipo Rituxan, o PBS.

45 Las Figuras 15A-15B son gráficos que representan la media y la mediana de las curvas de crecimiento de los xenoinjertos de tumores LNCaP para ratones tratados con: Taxotere (4 mg/kg), el anticuerpo de control de isotipo Rituxan en combinación con Taxotere (4 mg/kg), el anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con Taxotere (4 mg/kg), o PBS. Las Figuras 15C-15D son gráficos que representan la media y la mediana del cambio de peso corporal de ratones portadores de tumores LNCaP tratados con: Taxotere (4 mg/kg), el anticuerpo de control de isotipo Rituxan en combinación con Taxotere (4 mg/kg), el anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con Taxotere (4 mg/kg), o PBS.

50 Las Figuras 16A-16B son gráficos que representan la media y la mediana de las curvas de crecimiento de los xenoinjertos de tumores LNCaP para ratones tratados con: Taxotere (2 mg/kg), el anticuerpo 7F12

anti-PSMA en combinación con Taxotere (2 mg/kg), el anticuerpo de control de isotipo Rituxan en combinación con Taxotere (2 mg/kg), o PBS. Las Figuras 16C-16D son gráficos que representan la media y la mediana del cambio de peso corporal de ratones portadores de tumores LNCaP tratados con: Taxotere (2 mg/kg), el anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con Taxotere (2 mg/kg), el anticuerpo de control de isotipo Rituxan en combinación con Taxotere (2 mg/kg), o PBS.

La Figura 17A-B muestra los resultados de un ensayo de proliferación celular que demuestra que los anticuerpos anti-PSMA monoclonales humanos conjugados con toxina muestran citotoxicidad frente a las células de cáncer de próstata (A) con un lavado de tres horas y (B) con un lavado continuo.

La Figura 18 es un gráfico de los cambios en el volumen del tumor a lo largo del tiempo para ratones a los que se ha administrado un conjugado anticuerpo control de isotipo-fármaco, un conjugado anticuerpo α PSMA-fármaco, o un tampón de conjugación en solitario (vehículo).

La Figura 19 es un gráfico de los cambios en el volumen del tumor a lo largo del tiempo para ratones a los que se ha administrado diversas cantidades de un conjugado anticuerpo α PSMA-fármaco o un tampón de conjugación en solitario (vehículo).

La Figura 20 es un gráfico de los cambios en el volumen del tumor a lo largo del tiempo para ratones a los que se ha administrado diversas cantidades de un conjugado anticuerpo de control de isotipo-fármaco o un tampón de conjugación en solitario (vehículo).

La Figura 21 es un gráfico del cambio de peso corporal a lo largo del tiempo para ratones a los que se ha administrado diversas cantidades de un conjugado anticuerpo de control de isotipo-fármaco o un tampón de conjugación en solitario (vehículo).

La Figura 22 es un gráfico del cambio de peso corporal a lo largo del tiempo para ratones a los que se ha administrado diversas cantidades de un conjugado anticuerpo α PSMA-fármaco o un tampón de conjugación en solitario (vehículo).

La Figura 23 es un gráfico de los cambios en el volumen del tumor a lo largo del tiempo, para los tumores que tienen un volumen de tumor inicial medio de 240 mm³, para ratones a los que se ha administrado un conjugado anticuerpo de control de isotipo-fármaco, un conjugado anticuerpo α PSMA-fármaco, o un tampón de conjugación en solitario (vehículo).

La Figura 24 es un gráfico de los cambios en el volumen del tumor a lo largo del tiempo, para los tumores que tienen un volumen del tumor inicial medio de 430 mm³, para ratones a los que se ha administrado un conjugado anticuerpo α PSMA-fármaco o un tampón de conjugación en solitario (vehículo).

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, en concreto anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente a PSMA con alta afinidad. En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la invención se derivan de secuencias concretas de la línea germinal de cadena pesada y ligera y/o comprenden características estructurales concretas tales como las regiones CDR que comprenden secuencias concretas de aminoácidos. La invención proporciona anticuerpos aislados, métodos de generación de tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, los inmunoconjugados o las moléculas biespecíficas de la invención. La invención también se refiere a métodos para utilizar los anticuerpos, como para tratar enfermedades tales como el cáncer.

Con el fin de que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

Las expresiones "antígeno de membrana específico de la próstata" y "PSMA" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, e incluyen cualquier variante, isoforma y homólogos de especies de PSMA humana que son expresados de manera natural por las células y que mantienen la unión a los anticuerpos 1C3, 2A10, 2F5 ó 2C6 que se describen en el presente documento. La secuencia completa de aminoácidos de la proteína PSMA humana tiene el número de registro del Genbank NP_004467. La secuencia completa de ADNc que codifica la proteína PSMA humana tiene el número de registro del Genbank NM_004476.

Una "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que juega un papel en la transmisión de una señal desde una parte de una célula hasta otra parte de una célula. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la

presente invención es el receptor PSMA.

El término "anticuerpo" contemplado en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada se compone de una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviado en el presente documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden intervenir en la unión de la inmunoglobulina a los factores o a los tejidos del hospedador, que incluye diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, las células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión "partes de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte del anticuerpo"), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PSMA). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} , (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} , (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546.), que consiste en un dominio V_H , y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite generarse como una única cadena de proteínas en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios también pretenden estar abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia, y los fragmentos se criban para verificar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está prácticamente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PSMA está prácticamente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de PSMA). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a PSMA puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas PSMA de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar prácticamente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utilizan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpos monoclonales presenta afinidad y especificidad de unión única para un epítipo concreto.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir los restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, las mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas sobre secuencias de armazón humano.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan especificidad de unión única que tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR se derivan de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de la cadena ligera y un transgen de la cadena pesada humana fusionadas a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulinas humanas o un hibridoma preparado a partir del mismo (que se describe adicionalmente más adelante), (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas formas de realización, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, la mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana, no puede existir de manera natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Tal como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que es codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno."

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humanizado" pretende referirse a los anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado sobre las secuencias de armazón humano. Pueden hacerse modificaciones adicionales de la región marco dentro de las secuencias de armazón humano.

La expresión "anticuerpo quimérico" pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente a la PSMA humana" pretende referirse a un anticuerpo que se une a la PSMA humana con una K_D de 5 x 10⁻⁸ M o menos, más preferentemente 1 x 10⁻⁸ M o menos, más preferentemente 5 x 10⁻⁹ M o menos, más preferentemente 1,2 x 10⁻⁹ M o menos, aún más preferentemente entre 1,2 x 10⁻⁹ M y 1,2 x 10⁻¹⁰ M o menos.

El término "K_{assoc}" o "K_a", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo concreta, mientras que el término "K_{dis}" o "K_d", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo concreta. El término "K_D", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene de la relación entre K_d y K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D para los anticuerpos pueden determinarse utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferente para la determinación de la K_D de un anticuerpo es utilizando la resonancia de plasmón superficial, preferentemente utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menos, más preferentemente 10⁻⁸ M o menos, más preferentemente 10⁻⁹ M o menos, e incluso más preferentemente 10⁻¹⁰ M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menos, más preferentemente 10⁻⁸ M o menos, incluso más preferentemente 10⁻⁹ o menos. El término "vector", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que los segmentos adicionales de ADN pueden ligarse en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tiene un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) puede integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las

técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula sujeto concreta sino a la progenie de una célula de este tipo. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía están incluida dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal como se utiliza en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, células CHO, transfectomas, y células linfocíticas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye a cualquier animal humano o no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

La expresión "animal transgénico no humano" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transcromosomas o transgenes de la cadena pesada y/o ligera humana (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que son capaces de expresar anticuerpos totalmente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transcromosoma o transgen de la cadena ligera humana y un transgen de la cadena pesada humana de la cadena pesada humana, de manera que el ratón produzca anticuerpos humanos anti-PSMA cuando se inmuniza con el antígeno PSMA y/o células que expresan PSMA. El transgen de la cadena pesada humana puede estar integrado en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso, por ejemplo, de los ratones HuMAb transgénicos, o el transgen de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de los ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir múltiples isotipos de los anticuerpos monoclonales humanos contra PSMA (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) al someterse a la recombinación VDJ y cambio de isotipo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye a cualquier animal humano o no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, gallinas, anfibios, reptiles, etc.

En las subsecciones siguientes se describen con mayor detalle diversos aspectos de la invención.

Anticuerpos anti-PSMA

Los anticuerpos de la invención se caracterizan por propiedades o características funcionales concretas de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a PSMA humana. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a PSMA con alta afinidad, por ejemplo con una K_D de 5×10^{-7} M o menos. Como otro ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a una línea celular LNCaP que expresa PSMA (ATCC CRL-1740). Los ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a PSMA son conocidos en la técnica, incluyendo por ejemplo, análisis de ELISA, transferencia de Western y RIA. En los ejemplos se describen en detalle ensayos adecuados. La cinética de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tal como mediante ELISA, análisis de Biacore y de Scatchard. Otras propiedades preferentes de los anticuerpos de la invención incluyen la capacidad de ser internalizados por las células que expresan PSMA y una alta termoestabilidad. La internalización de los anticuerpos puede evaluarse como se describe en el Ejemplo 6. La termoestabilidad puede evaluarse como se describe en el Ejemplo 7. Los anticuerpos preferentes de la invención tienen un punto de fusión de por lo menos 65°C , más preferentemente, por lo menos 66°C , incluso más preferentemente por lo menos 67°C , incluso más preferentemente por lo menos 68°C , incluso más preferentemente por lo menos 69°C , incluso más preferentemente por lo menos 70°C e incluso más preferentemente por lo menos 71°C . Preferentemente un anticuerpo de la invención tiene un punto de fusión en un intervalo de 67°C a 72°C , más preferentemente 68°C a 72°C , ó 69°C a 72°C , ó 70°C a 72°C ó 69°C a $71,43^\circ\text{C}$, o el anticuerpo tiene un punto de fusión de aproximadamente $71,43^\circ\text{C}$.

Anticuerpo monoclonal 2A10

Un anticuerpo preferente de la invención es el anticuerpo monoclonal 2A10 humano aislado y caracterizado estructuralmente como se describe en los Ejemplos 1 y 2. La secuencia de aminoácidos de V_H de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 2. La secuencia de aminoácidos de V_L de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 6.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1s CDR2s y CDR3s de la cadena pesada y de la cadena ligera de 2A10. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_H de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 10. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_H de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 14. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_H de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 18. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_k de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 22. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_k de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 26. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_k de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 30. Las regiones CDR se definen utilizando el sistema de Kabat (Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Estados Unidos Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242).

En una forma de realización preferente, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 10,
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende LA SEC ID N°: 14,
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 18,
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 22,
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 26 y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 30.

20 Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de células, o en una forma parcialmente purificada o prácticamente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o se "hace prácticamente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otras proteínas o ácidos nucleicos celulares mediante técnicas convencionales, que incluyen el tratamiento alcalino/SDS, bandeado con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una forma de realización preferente, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención puede obtenerse utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo generado por el hibridoma pueden obtenerse mediante técnicas convencionales de clonación de ADNc o amplificación por PCR. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulinas (por ejemplo, utilizando técnicas de expresión en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferentes de la invención son las que codifican las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal 2A10. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 34. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 2A10 se muestra en la SEC ID N°: 38.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de las cadenas de anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, se une operativamente un fragmento de ADN que codifica la VL o VH a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante del anticuerpo o un conector flexible. La expresión "unido operativamente", tal como se utiliza en este contexto, se refiere a que los dos fragmentos de ADN se unen de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en fase.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica la VH a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferentemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica la VH puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) por unión operativa del ADN que codifica la VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de la

cadena ligera humana son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero lo más preferentemente es una región constante kappa.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican la VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃ (SEC ID N°: 48), de manera que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas por el conector flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) Nature 348:552-554).

Producción de los anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) de la presente invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, que incluyen la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque resultan preferentes los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio pueden emplearse otras técnicas para producir el anticuerpo monoclonal, por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferente para la preparación de hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Las técnicas y los protocolos de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse del hibridoma murino de interés y modificarse por ingeniería genética para contener secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, pueden unirse regiones variables murinas a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, pueden insertarse regiones CDR murinas en un armazón humano utilizando métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.225.539 de Winter, y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

En una forma de realización preferente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PSMA pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb y ratones KMTM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones para Ig humana"

El ratón HuMAb@ (Medarex, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulinas humanas que codifican las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas sin reordenar, junto con las mutaciones diana que inactivan la μ endógena, y los locus de la cadena κ (véase, por ejemplo, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de κ o IgM de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan mutación somática y cambio de clase para generar IgG κ humana de alta afinidad monoclonal ((Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones portadas por tales ratones genómicos, se describen adicionalmente en Taylor, L. *et al.* (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, el contenido de todas las cuales queda incorporado específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad. Véanse adicionalmente las patentes de Estados Unidos N°s 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.789.650, 5.877.397, 5.661.016, 5.814.318, 5.874.299 y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la patente de Estados Unidos N° 5.545.807 de Surani *et al.*, las publicaciones PCT N°s WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la publicación PCT N° WO 01/14424 de Korman *et al.*

En otra forma de realización, los anticuerpos humanos de la invención puede generarse utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulinas humanas en los transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgen de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Tales ratones,

denominados en el presente documento "ratones KM™", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*

5 Aún más, los sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulinas humanas están disponibles en la técnica y puede utilizarse para generar los anticuerpos anti-PSMA de la invención. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenorratón (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N^{os} 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati *et al.* .

10 Además, están disponibles en la técnica sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulinas humanas y que pueden utilizarse para generar los anticuerpos anti-PSMA de la invención. Por ejemplo, pueden utilizarse ratones que portan un transcromosoma de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan
15 puede utilizarse para generar los anticuerpo anti-PSMA de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando métodos de expresión en fagos para el cribado de genotecas de inmunoglobulinas humanas. Tales métodos de expresión en fagos para el aislamiento de anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo: las patentes de Estados Unidos N^{os} 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner *et al.*; las patentes de Estados Unidos N^{os} 5.427.908 y 5.580.717 de Dower *et al.*; las patentes de Estados Unidos N^{os} 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty *et al.*, y las patentes de Estados Unidos N^{os} 5.885.793, 6.521.404, 6.544.731, 6.555.313, 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths *et al.*

25 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera que pueda generarse una respuesta de los anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N^{os} 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson *et al.*

30 Inmunización de ratones para Ig humana

Cuando se utilizan ratones para Ig humana para generar los anticuerpos humanos de la invención, tales ratones pueden inmunizarse con una línea celular que expresa PSMA, tal como la línea celular LNCaP (ATCC CRL-1740), una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA y/o PSMA recombinante, o una proteína de fusión PSMA, como se describe en Lonberg, N. *et al.* (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, y en las publicaciones PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, los ratones tendrán de 6 a 16 semanas de edad en la primera infusión. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) de antígeno PSMA para inmunizar los ratones para Ig humana por vía intraperitoneal.

40 En el Ejemplo 1 que se presenta más adelante se describen procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra PSMA. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP cada dos semanas hasta un total de 6, con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, también resultan eficaces otros adyuvantes distintos del de Freund. Además, las células enteras en ausencia de adyuvante resultan ser altamente inmunogénicas. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse a lo largo del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse mediante ELISA (como se describe más adelante), y para las fusiones pueden utilizarse los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-PSMA. Los ratones pueden reforzarse por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y la extracción del bazo. Pueden resultar necesarias de 2 a 3 fusiones para cada inmunización. Por lo general se inmunizan entre 6 y 24 ratones para cada antígeno. Habitualmente se utilizan cepas HCo7 y HCo12. Además, pueden desarrollarse transgenes HCo7 y HCo12 conjuntamente en un único ratón que tenga dos transgenes de la cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). De manera alternativa o adicional, puede utilizarse la cepa de
55 ratones KM™.

Generación de hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales humanos de la invención

60 Para generar hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales humanos de la invención, pueden aislarse esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse para verificar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) con PEG al 50%. Las células se sembraron en placa a aproximadamente 2×10^5 en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contenía suero de clon fetal al 20%, medio acondicionado "653" al 18%, origen

(IGEN) al 5%, L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en un medio en el que el HAT se sustituye con HT. A continuación pueden cribarse los pocillos mediante ELISA para la detección de los anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce el crecimiento extenso de los hibridomas, el medio puede observarse habitualmente después de 10 a 14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden volver a sembrarse en placa, cribarse de nuevo, y si todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse por lo menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, los subclones estables pueden cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales humanos, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de agitación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Puede comprobarse la IgG eluida por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar su pureza. La solución tampón puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por OD280 utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Pueden tomarse alícuotas de los anticuerpos monoclonales y almacenarse a -80°C.

Generación de transfectomas que producen los anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de célula hospedadora utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conocen bien en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse ADN que codifiquen cadenas pesadas y ligeras de longitud parcial o completa, mediante técnicas convencionales de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés) y pueden insertarse los ADN en vectores de expresión de manera que los genes se unan operativamente a secuencias de control de la transcripción y de la traducción. En este contexto, la expresión "unido operativamente" se refiere a que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y de la traducción dentro del vector cumplan la función prevista de regulación de la transcripción y de la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula de expresión hospedadora utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores distintos o, más generalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos convencionales (por ejemplo, ligación de los sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden utilizarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifiquen las regiones constante de la cadena ligera y constante de la cadena pesada del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H esté unido operativamente al segmento o a los segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_k esté unido operativamente al segmento C_L dentro del vector. De manera adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo a partir de una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal esté unido en fase al extremo amino terminal del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la materia comprenderán que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferentes para la expresión en células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)) y polioma. De manera alternativa, pueden utilizarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la β -globina. Aún más, los elementos reguladores compuestos por secuencias procedentes de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia humana de células T tipo 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de las secuencias reguladoras y los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N^{os} 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, por lo general el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferentes incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección en G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas de la expresión "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con calcio-fosfato, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque resulta teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procarionotas o eucariotas, lo más preferente es la expresión de anticuerpos en células eucariotas y lo más preferentemente en células hospedadoras de mamífero, porque es más probable que tales células eucariotas, y en concreto las células de mamíferos, ensamblen y secreten un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo que las células procarionotas. La expresión procarionota de genes de anticuerpos ha sido descrita como ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, MA y Wood, CR (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células hospedadoras de mamífero preferentes para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y Sharp PA (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En concreto, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferente es el sistema de expresión del gen GS descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamíferos, los anticuerpos son producidos por cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de purificación de proteínas.

35 Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Los anticuerpos de la invención pueden someterse a ensayo para verificar la unión a PSMA mediante, por ejemplo, citometría de flujo. En resumen, se recogen células frescas LNCaP de matraces de cultivo de tejidos y se prepara una única suspensión de células. Las suspensiones de células LNCaP sea tiñen con el anticuerpo primario directamente o después de la fijación con paraformaldehído al 1% en PBS. Se resuspenden aproximadamente un millón de células en PBS que contiene BSA al 0,5% y 50-200 µg/ml de anticuerpo primario y se incuban en hielo durante 30 minutos. Las células se lavan dos veces con PBS que contiene BSA al 0,1%, NaN₃ al 0,01%, se resuspenden en 100 µl de anti-IgG humana de cabra conjugada con FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, IL) diluida 1:100, y se incuban en hielo durante otros 30 minutos. Las células se lavan de nuevo dos veces, se resuspenden en 0,5 ml de tampón de lavado y se analizan para verificar la tinción fluorescente en un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, San José, CA).

De manera alternativa, los anticuerpos de la invención pueden someterse a ensayo para verificar la unión a PSMA mediante ELISA convencional. En resumen, se recubren placas de microtitulación con PSMA purificada a 0,25 µg/ml en PBS, y a continuación se bloquean con suero de albúmina bovina al 5% en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma procedente de ratones inmunizados con PSMA) a cada pocillo y se incuban durante 1 a 2 horas a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween y a continuación se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico para Fc de cabra anti-IgG humana) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas se desarrollan con el sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a una OD de 405-650. Preferentemente, para las fusiones se utilizarán los ratones que desarrollen los títulos más altos.

También puede utilizarse un ensayo ELISA como se ha descrito anteriormente para cribar los hibridomas que muestran reactividad positiva con inmunógeno PSMA. Los hibridomas que se unen con alta avidéz a PSMA se subclonan y se caracterizan adicionalmente. Puede elegirse un clon de cada hibridoma, que conserve la reactividad de las células parentales (mediante ELISA), para generar un banco de células de 5 a 10 viales almacenados a -140°C, y para la purificación de anticuerpos.

Para purificar los anticuerpos anti-PSMA, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de agitación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). Puede comprobarse la IgG

eluida mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar su pureza. La solución tampón puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por OD₂₈₀ utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Pueden tomarse alícuotas de los anticuerpos monoclonales y almacenarse a -80°C.

5 Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-PSMA seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse utilizando reactivos disponibles en el mercado (Pierce, Rockford, IL). Pueden realizarse estudios de competición que utilicen anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados utilizando placas de ELISA recubiertas con PSMA como se ha descrito anteriormente. Puede detectarse la unión de AcMo biotinilado con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina. De manera alternativa, pueden realizarse estudios de competición utilizando el anticuerpo radiomarcado y pueden detectarse los anticuerpos de competición no marcados en un análisis de Scatchard, como se describe adicionalmente en los Ejemplos que se presentan más adelante.

15 Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ensayos ELISA de isotipo utilizando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo concreto. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, pueden recubrirse pocillos de placas de microtitulación con 1 µg/ml de inmunoglobulina anti-humana durante toda la noche a 4°C. Después del bloqueo con BSA al 1%, se hacen reaccionar las placas con 1 µg/ml o menos de los anticuerpos monoclonales de ensayo o los controles de isotipo purificado, a temperatura ambiente durante una a dos horas. A continuación pueden hacerse reaccionar los pocillos con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas de IgG1 humana o IgM humana. Las placas se desarrollan y se analizan como se ha descrito anteriormente.

25 Las IgG humanas anti-PSMA pueden someterse a ensayos adicionales para verificar la reactividad con el antígeno PSMA mediante transferencia de Western. En resumen, la PSMA puede prepararse y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfirieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternera fetal al 10%, y se sondan con los anticuerpos monoclonales que se someterán a ensayo. Puede detectarse la unión de IgG humana utilizando anti-IgG humana marcada con fosfatas alcalina y desarrollarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

30 Inmunconjugados

En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo anti-PSMA, o un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en el presente documento "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, que mate) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucil tioepa, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

50 Otros ejemplos preferentes de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. En el mercado está disponible un ejemplo de un conjugado de anticuerpo calicheamicina (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención utilizando la tecnología de conectores disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de conector que se han utilizado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y conectores que contienen péptidos. Puede elegirse un conector que sea, por ejemplo, susceptible a la escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosomal o susceptible a la escisión por proteasas, tales como proteasas preferentemente expresadas en tejido tumoral, tales como las catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

60 Para una análisis adicional de los tipos de citotoxinas, conectores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véanse también Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

65

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radioactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo¹³¹, yodo¹²⁵, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para la preparación de radioinmunoconjugados están establecidos en la técnica. Ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles en el mercado, incluyendo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y pueden utilizarse métodos similares para preparar radioinmunoconjugados que utilizan los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpo de la invención puede utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a los agentes químicos terapéuticos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina, exotoxina A de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como interferón γ o factor de necrosis tumoral, o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con los anticuerpos son bien conocidas, véanse, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-PSMA, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o partes de unión a antígeno del mismo, puede derivatizarse o unirse a más de una de otras moléculas funcionales, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se una a por lo menos dos moléculas diana o sitios de unión diferentes. El anticuerpo de la invención puede, de hecho, derivatizarse o unirse a más de una otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unan a más de dos moléculas diana y/o sitios de unión diferentes; tales moléculas multiespecíficas también pretenden ser abarcadas por la expresión "molécula biespecífica" tal como se utiliza en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede unirse funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más de otras moléculas aglutinantes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que de como resultado una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para PSMA y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. En una forma de realización concreta de la invención, el segundo epítipo diana es un receptor de Fc, por ejemplo, Fc γ RI humano (CD64) o un receptor de Fc α humano (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse a células efectoras que expresan Fc γ R o Fc α R (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs)), y a células diana que expresan PSMA. Estas moléculas biespecíficas dirigen las células que expresan PSMA contra la célula efectora y desencadenan las actividades de las células efectoras mediadas por el receptor de Fc, tales como la fagocitosis de células que expresan PSMA, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), la liberación de citocinas, o la generación de anión superóxido.

En una forma de realización de la invención en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir adicionalmente una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-PSMA. En una forma de realización, la tercera especificidad de unión es una parte anti factor de potenciación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y de ese modo aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula diana. La "parte anti factor de potenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y de ese modo da como resultado una potenciación del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o un antígeno de la célula diana. La "parte anti factor de potenciación" puede unirse a un receptor de Fc o un antígeno de la célula diana. De manera alternativa, la parte anti factor de potenciación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las especificidades de unión primera y segunda. Por ejemplo, la parte anti factor de potenciación puede obligar a una célula T citotóxica (por ejemplo, mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que da como resultado un aumento de la respuesta inmunitaria contra la célula diana).

En una forma de realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como especificidad de unión por lo menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', F (ab')₂, Fv, o Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser dímero de la cadena ligera o de la cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción monocatenaria como se describe la

5 patente de Estados Unidos N° 4.946.778 de Ladner *et al.*, cuyo contenido se incorpora expresamente por referencia.

En una forma de realización, la especificidad de unión para un receptor de Fcγ es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no es bloqueada por la inmunoglobulina G humana (IgG). Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de la cadena γ localizados en el

10 cromosoma 1. Estos genes codifican para un total de doce isoformas de receptores solubles o transmembrana que se agrupan en tres clases de receptores de Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). En una forma de realización preferente, el receptor de Fcγ es un FcγRI humano de alta afinidad. El FcγRI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra una alta afinidad por la IgG monomérica ($10^8 - 10^9 M^{-1}$).

15 La producción y la caracterización de determinados anticuerpos monoclonales anti-Fcγ preferentes son descritos por Fanger *et al.* en la publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de Estados Unidos N° 4.954.617, cuya descripción se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión a Fcγ del receptor y, por tanto, su unión no queda bloqueada sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-FcγRI específicos útiles

20 en la presente invención son AcMo 22, AcMo 32, AcMo 44, AcMo 62 y AcMo 197. El hibridoma que produce el AcMo 32 está disponible en la American Type Culture Collection, número de acceso de la ATCC HB9469. En otras formas de realización, el anticuerpo del receptor anti-Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y la caracterización del anticuerpo H22 se describen en Graziano, RF *et al.* (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 y en la publicación PCT WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpos H22 fue depositada en

25 la American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

En todavía otras formas de realización preferentes, la especificidad de unión para un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, por ejemplo, un receptor de Fc-alfa (FcαRI (CD89)), cuya unión preferentemente no es bloqueada por la inmunoglobulina A humana (IgA). La expresión

30 "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen α (FcαRI) localizado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembrana empalmadas de manera alternativa de 55 a 110 kDa. FcαRI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en las poblaciones de células efectoras. FcαRI tiene afinidad media ($\approx 5 \times 10^7 M^{-1}$) por IgA1 e IgA2, que aumenta tras la exposición a citocinas tales como el G-CSF o GM-CSF (Morton, HC *et al.* (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de FcαRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a FcαRI fuera del dominio de unión a ligando de IgA (Monteiro, RC *et al.* (1992) J. Immunol 148: 1764).

40 FcαRI y FcγRI son los receptores de activación preferentes para su uso en las moléculas biespecíficas de la invención, ya que (1) se expresan principalmente en las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, monocitos, PMNs, macrófagos y células dendríticas, (2) se expresan a niveles altos (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula), (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis), (4) intervienen en la presentación potenciada de antígenos de los antígenos, que incluyen los antígenos propios, dirigidos contra ellos.

45 Aunque resultan preferentes los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales humanizados, quiméricos y murinos.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-PSMA, utilizando métodos conocidos en la

50 técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y a continuación conjugarse una a la otra. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede utilizarse una variedad agentes de acoplamiento o de entrecruzamiento para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen la proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzónico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véanse, por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. N° 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) Science 229:81-83), y Glennie *et al.* (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferentes son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

60 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse uniendo el sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo C-terminal de las dos cadenas pesadas. En una forma de realización especialmente preferente, la región bisagra se modifica para contener un número impar de restos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

65

De manera alternativa, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es especialmente útil cuando la molécula biespecífica es un AcMo x AcMo, AcMo x Fab, Fab x F(ab')₂ o un ligando x proteína de fusión Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender por lo menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la patente de Estados Unidos número 5.260.203; patente de Estados Unidos número 5.455.030; patente de Estados Unidos número 4.881.175; patente de Estados Unidos número 5.132.405; patente de Estados Unidos número 5.091.513; patente de Estados Unidos número 5.476.786; patente de Estados Unidos número 5.013.653; patente de Estados Unidos número 5.258.498; y patente de Estados Unidos número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia de Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de los complejos proteína-anticuerpo de especial interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden detectarse utilizando, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo o anticuerpo unido a enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. De manera alternativa, los complejos pueden detectarse utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986, que se incorpora en el presente documento por referencia). El isótopo radioactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o por autorradiografía.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene un o una combinación de anticuerpos monoclonales, o parte(s) de unión al antígeno del mismo, de la presente invención, formulados junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más) anticuerpos o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas diferentes de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se unen a epítomos diferentes en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-PSMA de la presente invención combinado con por lo menos otro agente anti-inflamatorio o inmunosupresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en terapia de combinación se describen en mayor detalle más adelante en la sección acerca de los usos de los anticuerpos de la invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el excipiente es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, inmunoconjugado, o molécula biespecífica, pueden recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no produce efectos toxicológicos no deseados (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxilo alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos aromáticos y alifáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir también un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes oleosolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares, y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido

cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

5 Ejemplos de excipientes acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, utilizando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y utilizando tensioactivos.

10 Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse mediante procedimientos de esterilización, *supra*, e incluyendo de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabén, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares. Además, puede
15 conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable incluyendo de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse a las composiciones compuestos activos complementarios.

25 Por lo general, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El excipiente puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo,
30 utilizando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y utilizando tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como cloruro de sodio, sorbitol o manitol. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

35 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de
40 soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferentes son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo .

45 La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del sujeto a tratar, y del modo concreto de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación unitaria será generalmente la cantidad de composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento
50 de ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, lo más preferentemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único embolado, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como
60 dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico necesario. La memoria descriptiva para las formas de dosificación unitarias de la invención vienen impuestas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico concreto a lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la preparación de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de la
65 sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosis varían desde aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del hospedador. Por ejemplo las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1 a 10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar supone la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferentes para un anticuerpo anti-PSMA de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa, suministrándose el anticuerpo utilizando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, y a continuación cada tres meses, (ii) cada tres semanas, (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra habitualmente en múltiples ocasiones. El intervalo entre las dosificaciones unitarias puede ser, por ejemplo, semanal, mensual, cada tres o meses o anual. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo en el paciente los niveles en sangre del anticuerpo contra el antígeno diana. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1.000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.

De manera alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se necesita una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la mayor vida media, seguidos de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, a veces se necesita una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se termina o reduce la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede variarse con el fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente concreto, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones concretas de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto concreto que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y la historia médica previa del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-PSMA de la invención da como resultado preferentemente una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y la duración de períodos libres de los síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o la incapacidad debida a las dolencias de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores PSMA⁺, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento del tumor por lo menos aproximadamente un 20%, más preferentemente por lo menos aproximadamente un 40%, incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente un 60%, y aún más preferentemente por lo menos aproximadamente un 80% con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento del tumor puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. De manera alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para la inhibición, tal inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos para el facultativo experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de bien mejorar los síntomas en un sujeto. Una persona capacitada en la técnica será capaz de determinar tales cantidades en base a tales factores como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición concreta o la vía de administración seleccionada.

Una composición de la presente invención puede administrarse a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como comprenderá el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferentes para los anticuerpos de la invención incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a modos de administración que no sean la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección y la infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

De manera alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse por vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o a través de las mucosas, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

- 5 Los compuestos activos pueden prepararse con excipientes que protegerán el compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son patentada o generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

15 Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con los dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una forma de realización preferente, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos descritos en las patentes de Estados Unidos N^{os} 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ó 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la patente de Estados Unidos N^o 4.487.603, en la que se describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamento a una velocidad controlada; la patente de Estados Unidos N^o 4.486.194, en la que se describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de Estados Unidos N^o 4.447.233, en la que se describe una bomba de infusión de medicamentos para administrar el medicamento a una velocidad de infusión precisa; la patente de Estados Unidos N^o 4.447.224, en la que se describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente de Estados Unidos N^o 4.439.196, en la que se describe un sistema osmótico de administración de fármacos que tiene compartimientos de cámaras múltiples, y la patente de Estados Unidos N^o 4.475.196, en la que se describe un sistema osmótico de administración de fármacos. Estas patentes se incorporan en el presente documento por referencia. Muchos otros implantes, sistemas de administración, y módulos de este tipo son conocidos para los expertos en la materia.

30 En determinadas formas de realización, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para garantizar una adecuada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), éstos pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que son transportados selectivamente a las células u órganos específicos, potenciando así la liberación selectiva del fármaco (véase, por ejemplo, Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Ejemplos de restos de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais *et al.* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de la proteína surfactante A (Briscoe *et al.* (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 Schreier *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269:9090), véanse también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Usos y métodos de la invención

45 Los anticuerpos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y el tratamiento de trastornos que implican la expresión de PSMA. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y para diagnosticar una variedad de trastornos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se pretende incluir animales no humanos y humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, cerdos, pollos, aves, anfibios y reptiles. Los sujetos preferentes incluyen a los pacientes humanos que tienen trastornos asociados con la expresión de PSMA. Cuando se administran anticuerpos contra PSMA junto con otro agente, los dos pueden administrarse en cualquier orden o simultáneamente.

55 Las vías de administración adecuadas de las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo o inmunoconjugado) de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y del peso del sujeto y la concentración y/o la formulación de la composición de anticuerpos.

65 En una forma de realización, los anticuerpos de la invención pueden someterse a ensayo inicialmente para verificar la actividad de unión asociada con el uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden someterse a ensayo utilizando ensayos ELISA y de citometría de flujo. Además, puede someterse a ensayo la actividad de estas moléculas en el desencadenamiento de por lo menos una actividad de célula efectora mediada por efector, que incluye la inhibición del crecimiento de y/o la destrucción de las células que expresan

PSMA. Los protocolos para someter a ensayo la ADCC mediada por células efectoras se describen en los Ejemplos que se presentan más adelante.

A. Métodos de detección

5 En una forma de realización, los anticuerpos de la invención puede utilizarse para detectar niveles de PSMA, o niveles de células que contienen PSMA en la superficie de su membrana, niveles que a continuación pueden vincularse a determinados síntomas de la enfermedad.

10 En una forma de realización concreta, la invención proporciona métodos para detectar la presencia de PSMA en una muestra, o medir la cantidad de PSMA en la superficie de las células, que comprenden poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo, o una partes de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PSMA, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o la parte del mismo y la PSMA. A continuación, se detecta la formación de un complejo, en la que una diferencia en la formación del complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de PSMA en la muestra. Por ejemplo, puede realizarse métodos convencionales de detección, bien conocidos en la técnica, tales como los ensayos ELISA y de citometría de flujo, utilizando las composiciones de la invención.

20 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona adicionalmente métodos para detectar la presencia de PSMA (por ejemplo, PSMA humana) en una muestra, o medir la cantidad de PSMA, que comprenden poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo de la invención, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PSMA, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o la parte del mismo y la PSMA. A continuación, se detecta la formación de un complejo, en la que una diferencia en la formación del complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de PSMA en la muestra.

25 Las composiciones de la invención también puede utilizarse para dirigirse contra las células que expresan PSMA, por ejemplo para marcar tales células. Para tal uso, el agente de unión puede estar unido a una molécula que puede ser detectada. De esta manera, la invención proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan PSMA. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático.

B. Inhibición del crecimiento de células PSMA⁺

35 Los anticuerpos pueden utilizarse para inhibir el crecimiento de células que expresan PSMA que, a su vez, pueden vincularse a la prevención o la mejora de determinados síntomas de la enfermedad asociados con la expresión de PSMA. Las diferencias en la expresión de PSMA durante un estado patológico en comparación con un estado no patológico pueden determinarse poniendo en contacto una muestra de ensayo de un sujeto que padece la enfermedad y una muestra de control con el anticuerpo anti-PSMA en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y la PSMA. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la PSMA se detecta y se compara en la muestra y en el control.

40 Por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse para inducir, *in vivo* o *in vitro*, una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento de y/o destruir una célula que expresa PSMA; intervenir en la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa PSMA en presencia de células efectoras humanas; inhibir la excreción de PSMA soluble. Como se analiza en el presente documento, los anticuerpos de la invención muestran actividad ADCC potenciada en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo.

50 Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células PSMA⁺ que comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-PSMA en condiciones suficientes para inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de dichas células. Las células pueden ser, por ejemplo, células tumorales. En una forma de realización preferente, el anticuerpo anti-PSMA es un anticuerpo humano.

55 En una forma de realización, los anticuerpos, o las partes de unión de los mismos, de la presente invención puede utilizarse para modular los niveles de PSMA en las células diana, tal como cubriendo y eliminando los receptores en la superficie celular. También pueden utilizarse mezclas de anticuerpos anti-receptor de Fc con este propósito.

60 También pueden utilizarse como agentes terapéuticos células efectoras específicas de diana, por ejemplo, las células efectoras unidas a las composiciones de la invención. Las células efectoras para el direccionamiento pueden ser los leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, linfocitos citotóxicos naturales y otras células que contienen receptores para IgA o IgG. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse a partir del sujeto a tratar. Las células efectoras específicas de diana, puede administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de 10^8 - 10^9 pero variará dependiendo de la finalidad terapéutica. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral que expresa

PSMA, y para ocasionar la destrucción celular mediante, por ejemplo, la fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

5 La terapia con células efectoras específicas de diana puede realizarse conjuntamente con otras técnicas de eliminación de las células diana. Por ejemplo, la terapia antitumoral utilizando las composiciones de la invención y/o las células efectoras provistas de estas composiciones puede utilizarse conjuntamente con la quimioterapia. Además, puede utilizarse la inmunoterapia de combinación para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de las células tumorales.

10 *C. Uso de inmunoconjugados y terapia de combinación*

En una forma de realización, los inmunoconjugados de la invención pueden utilizarse para dirigir los compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) contra las células que tienen moléculas de superficie celular PSMA uniendo tales compuestos al anticuerpo. De esta manera, la invención también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* las células que expresan PSMA (por ejemplo, con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático). De manera alternativa, los inmunoconjugados puede utilizarse para destruir las células que tienen receptores de superficie celular PSMA dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas contra PSMA, tal como contra las células tumorales que expresan PSMA para eliminar de ese modo la célula tumoral.

En otras formas de realización, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o la actividad de Fcy o de los receptores de Fcy, por ejemplo, tratando al sujeto con una citocina. Las citocinas preferentes para la administración durante el tratamiento incluyen el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), y el factor de necrosis tumoral (TNF).

En otra forma de realización, se puede administrar adicionalmente a los pacientes tratados con las composiciones de anticuerpos de la invención (antes de, simultáneamente con, o después de la administración de un anticuerpo de la invención) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos. El anticuerpo puede estar unido al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse independientemente del agente. En este último caso (la administración independiente), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede administrarse conjuntamente con otros tratamientos conocidos, por ejemplo, una terapia anti-cáncer, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina cisplatina, carmustina, clorambucil, y ciclofosfamida hidroxilada que, por sí mismos, sólo son eficaces a niveles que son tóxicos o subtóxicos para el paciente. La cisplatina se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La administración conjunta de los anticuerpos anti-PSMA, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerígenos que operan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico sobre las células tumorales humanas. Tal administración conjunta puede resolver los problemas debidos al desarrollo de resistencia a los fármacos o de un cambio de la antigenicidad de las células tumorales que hace que no reaccionen con el anticuerpo.

45 *D. Tratamiento del cáncer*

Se ha demostrado que la PSMA se expresa en las células tumorales, tales como células tumorales de carcinoma de próstata, y también se ha demostrado que se expresa en las células endoteliales vasculares próximas a las células cancerosas, tales como células cancerosas uroteliales, células cancerosas de colon, células cancerosas del recto, células cancerosas pulmonares, células cancerosas de mama y células cancerosas de adenocarcinoma metastásico del hígado (véase la patente de Estados Unidos N° 6.136.311). Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para tratar el cáncer al inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan PSMA o al inhibir el crecimiento de las células endoteliales vasculares próximas a las células tumorales. De esta manera, en otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor son PSMA⁺, en las que se administra un anticuerpo anti-PSMA de la invención al sujeto de manera que se inhiba el crecimiento del tumor. Para los sujetos humanos, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo humano o humanizado. En una forma de realización preferente, las células tumorales son células de tumor de próstata. En otras formas de realización, las células tumorales son de cánceres tales como el de colon, renal, rectal, urotelial, de mama, de vejiga, de hígado, de páncreas o melanoma.

Los métodos de tratamiento de la invención implican administrar a un sujeto una composición de anticuerpos de la presente invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno. La composición de anticuerpos pueden administrarse en solitario o con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico (conjugado con o administrados con el anticuerpo), que actúa conjuntamente con o sinérgicamente con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir la enfermedad asociada con Expresión de PSMA.

Los métodos de tratamiento de la invención también implican administrar a un sujeto un anticuerpo anti-PSMA en combinación con otro agente, tal como un agente antitumoral, que actúa conjuntamente con o sinérgicamente con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir la enfermedad asociada con la expresión de PSMA. Como se muestra en el presente documento, el uso del anticuerpo anti-PSMA 7F12 en combinación con Taxotere® (docetaxel) dio como resultado la inhibición del crecimiento del tumor en un modelo animal y curó a los animales de la caquexia relacionada con el tumor (véase el Ejemplo 8). Sin pretender estar limitado por el mecanismo, se cree que el uso de un agente antitumoral provoca daños en la masa tumoral, permitiendo así una mejor penetración del anticuerpo, las células efectoras o un componente efector alternativo, lo que conduce a una citotoxicidad más eficaz. En una forma de realización, el uso de un agente antitumoral provoca daños en la masa tumoral, permitiendo así que las células efectoras accedan al tumor, lo que conduce a una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) de las células tumorales más eficaz. En otra forma de realización, el uso de un agente antitumoral, por ejemplo, un inhibidor de microtúbulos, hace que las células tumorales sean intrínsecamente más susceptibles a la destrucción mediada por anti-PSMA. En una forma de realización de la invención, el efecto sinérgico o aditivo obtenido por la administración de un anticuerpo anti-PSMA y un agente antitumoral es independiente de, es decir, no causado por, la inversión de la polaridad apical del antígeno PSMA respecto a la membrana plasmática basolateral.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-PSMA" incluye cualquier anticuerpo que se una específicamente al antígeno de membrana específico de la próstata humano. Ejemplos de tales anticuerpos incluyen los anticuerpos descritos en el presente documento, los anticuerpos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 10/059989 y la publicación PCT N° WO 03064606A3, o los anticuerpos que se describen en la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/660431. El contenido completo de cada una de las solicitudes anteriores se incorpora en el presente documento por referencia.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente antitumoral" incluye cualquier agente que pueda utilizarse para destruir o ayudar a destruir (por ejemplo, total o parcialmente) un tumor. En una forma de realización, el agente antitumoral es capaz de provocar daños en la masa tumoral, permitiendo de ese modo que las células efectoras accedan al tumor más fácilmente, lo que conduce a una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) de las células tumorales más eficaz. La expresión "agente antitumoral" incluye agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la angiogénesis, agentes bloqueadores de los microtúbulos, agentes inmunomoduladores, intercaladores/entrecruzadores de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, reguladores de la transcripción de ADN-ARN, inhibidores enzimáticos, y reguladores de genes.

La expresión "agente quimioterapéutico" incluye cualquier agente que pueda utilizarse para tratar el cáncer, por ejemplo, el cáncer de próstata. Los agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas, antibióticos antitumorales y hormonas esteroides. Ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, ácido todo-trans-retinoico, Aminoglutetimida, Azacitidina, Azatioprina, Bleomicina (Blenoxane), Busulfán (Myleran), Carboplatina, Carboplatino (Paraplatin), Carmustina (BCNU), Capecitabina, CCNU (Lomustina), Clorambucil (Leukeran), 2-Clorodeoxiadenosina (2-CDA; Cladribina, Leustatin), Cis-platino (Platinol), Cisplatina (cis-DDP), Cisplatina sulfato de bleomicina, Clorambucil, Ciclofosfamida (Cytosan CTX), Ciclofosfamida hidroxurea, Citarabina (Ara-C, arabinósido de citosina), Daunorrubicina (Cerubidina), Dacarbazina (DTIC; dimetil triazeno imidazol carboxamida), Dactinomicina (actinomicina D), Daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), Dietilestilbestrol, Docetaxel (Taxotere), Doxilfluridina, Doxorubicina (Adriamicina), Epirubicina, Etinil estradiol, Etopósido (VP-16, VePesid), Fluorouracilo (5-FU; Floxuridina, fluorodesoxiuridina; FUDr), Fludarabina (Fludara), Flutamida, Fluoximesterona, Gemcitabina (Gemzar), Herceptin (Trastuzumab; anticuerpo monoclonal anti-HER2), Hidroxurea (Hydrea), caproato de Hidroxiprogesterona, Idarubicina, Ifofosfamida (Ifex), Interferón alfa, Irinotecan (CPT-11), L-Asparaginasa, Leuprolida, Mecloretamina, acetato de Medroxiprogesterona, acetato de Megestrol, Melfalán (Alkeran), Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), Metotrexato (MTX; ametopterina), Mitomicina (mitomicina C), Mitotano (o,p'-DDD), Mitoxantrona (Novantrona), Oxaliplatina, Paclitaxel (Taxol), Pemetrexed, Pentostatina (2-desoxicoformicina), Plicamicina (mitramicina), Prednisona, Procarbazina (Matulane, N-metilhidrazina, MIH), Rituxan (Rituximab), Semustina (Metil-CCNU), Estreptozocina, Taxol, Tamoxifeno, Tenipósido, Tertipósido, propionato de testosterona, Tioguanina (6-tioguanina; TG), Tiotepa, Tomudex (Taltitrexed), Topotecan (Hicamtina; (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4']), Treosulfan (Ovastat), Valrubicina, Vinblastina (VLB; Velban), Vincristina (Oncovin), Vindesina y Vinorelbina (Navelbina).

La expresión "agente bloqueador de los microtúbulos" incluye cualquier agente que sea capaz de alterar la organización y la dinámica normal de los microtúbulos. Ejemplos de agentes bloqueadores de los microtúbulos incluyen, pero no se limitan a, taxanos (Taxol® (Paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina (Oncovin), Vindesina (Eldisina, Fildesina), Vinorelbina (Navelbina)), 2-metoxiestradiol (2ME2), estramustina, epotilonas, Colchicina, Dolastatina 15, Nocodazol, Podofilotoxina, Rizoxina.

Las expresiones "inhibidor de la angiogénesis" y "agente antiangiogénico" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento e incluyen cualquier agente que es capaz de prevenir o inhibir la formación de vasos sanguíneos. Ejemplos específicos de inhibidores de la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, Angiostatina K1-3, Arresten, aaAT, Canstatina, DL- α -difluorometil-ornitina, Endostatina, Fumagilina, Genisteína, Minociclina, Estaurosporina, (\pm)-Talidomida, y Tumstatina.

- La expresión "agente inmunomodulador" incluye a cualquier agente que module, por ejemplo, estimule una respuesta inmunitaria. Ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen anticuerpos, tales como anticuerpos anti-PD1 y anticuerpos anti-CTLA-4, en solitarios o en combinación, que se describen, entre otros, en la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/679.466, presentada el 05/09/2005; en la publicación PCT WO 01/14424, en la solicitud provisional de Estados Unidos 60/738.434, presentada el 11/21/2005, y en la solicitud provisional de Estados Unidos _____, presentada el 12/08/2005 (número de expediente del mandatario MEDX-0124US2 ó 04280/1203401-US1), cuyos contenidos completos se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.
- Los agentes inmunomoduladores adicionales que pueden utilizarse en los métodos de la presente invención incluyen anticuerpos que bloquean una señal coestimuladora, (por ejemplo, CD28 o ICOS), anticuerpos que activan una señal inhibitoria mediante CTLA4, y/o anticuerpos contra otros marcadores de células inmunitarias (por ejemplo, CD40, ligando de CD40, o citocinas), proteínas de fusión (por ejemplo, CTLA4-Fc, el PD-1-Fc), y fármacos inmunosupresores (por ejemplo, rapamicina, ciclosporina A o FK506). Otros ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen oligodesoxirribonucleótido fosforotiolato (1018 ISS), GVAX (una vacuna génica GM-CSF), interleucinas (por ejemplo, interleucina -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 (CYT 99 07), -8, -9, -10, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29 y -30), por ejemplo, anticuerpos contra interleucina recombinante, por ejemplo, IL-2, por ejemplo, Aldesleukina, por ejemplo, interleucinas recombinantes (por ejemplo, interleucina-21 recombinante (rIL-21)), por ejemplo, IL-11, por ejemplo, oprelvekina, por ejemplo, antagonistas de receptores de interleucinas, por ejemplo, antagonista del receptor de IL-1, por ejemplo, anakinra, glucocerebrosidasa, por ejemplo, Imiglucerasa, factor activador de los macrófagos, péptidos de macrófagos, factor de células B, y factor de células T.
- Ejemplos de intercaladores/entrecruzadores de ADN incluyen, pero no se limitan a, Bleomicina, Carboplatina, Carmustina, Clorambucil, Ciclofosfamida, dicloruro de cis-diamino-platino(II) (Cisplatina), Melfalán, Mitoxantrona, y Oxaliplatina.
- Ejemplos de inhibidores de la síntesis de ADN incluyen, pero no se limitan a, (±)-Ametopterina (Metotrexato), 1,4-dióxido de 3-amino-1,2,4-benzotriazina, Aminopterina, Citosina β-D-arabinofuranósido, 5-fluoro-5'-desoxiuridina, 5-fluorouracilo, Ganciclovir, Hidroxiurea, y Mitomicina C.
- Ejemplos de reguladores de la transcripción del ADN-ARN incluyen, pero no se limitan a, Actinomicina D, Daunorrubicina, Doxorrubicina, Homoharringtonina, e Idarubicina.
- Ejemplos de inhibidores de enzimas incluyen, pero no se limitan a, S(+)-Camptotecina, Curcumina, (-)-Deguelin, 5,6 - Diclorobenzimidazol 1- β-D-ribofuranosido, Etopósido, Formestano, Fostriecina, Hispidina, ácido 2-imino-1-imidazolidinacético (Ciclocreatina), Mevinolina, Tricostatina A, Tirpofostina AG 34, y Tirpofostina AG 879.
- Ejemplos de reguladores de genes incluyen, pero no se limitan a, 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-azacitidina, Colecalciferol (vitamina D3), 4-hidroxitamoxifén, melatonina, Mifepristona, Raloxifeno, todo-trans-retinal (aldehído de la vitamina A), ácido retinoico, todo-trans (ácido de la vitamina A), ácido 9-cis-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, retinol (vitamina A), tamoxifeno, y troglitazona.
- Los métodos de la invención también implica administrar a un sujeto un inmunoconjugado (que comprende un anticuerpo anti-PSMA, o parte de unión a antígeno del mismo, unido a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radiactivo) en combinación con un agente antitumoral, que actúa conjuntamente con o sinérgicamente con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir la enfermedad asociada con la expresión de PSMA.
- Los métodos de la invención implican adicionalmente administrar a un sujeto una molécula biespecífica (que comprende un anticuerpo anti-PSMA, o parte de unión a antígeno del mismo, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente que el anticuerpo) en combinación con un agente antitumoral, que actúa conjuntamente con o sinérgicamente con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir la enfermedad asociada con la expresión de PSMA. El agente antitumoral puede administrarse en cualquier dosis terapéuticamente eficaz conocida en la técnica o como se describe en el presente documento (véanse las composiciones farmacéuticas).
- El anticuerpo anti-PSMA puede administrarse en combinación con un único agente antitumoral. El anticuerpo anti-PSMA también puede administrarse en combinación con dos o más agentes antitumorales.
- El anticuerpo anti-PSMA y el agente antitumoral pueden administrarse simultáneamente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PSMA y el agente antitumoral pueden administrarse conjuntamente en una única formulación farmacéutica. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PSMA y el agente antitumoral pueden administrarse al mismo tiempo como dos o más formulaciones farmacéuticas independientes.
- El anticuerpo anti-PSMA y el agente antitumoral pueden administrarse también en diferentes momentos. Por ejemplo, el agente o los agentes antitumorales pueden administrarse antes de la administración del anticuerpo

anti-PSMA (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 24 ó 48 horas antes de la administración del anticuerpo anti-PSMA). De manera alternativa, el anticuerpo anti-PSMA puede administrarse antes de la administración del agente o de los agentes antitumorales (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 24 ó 48 horas antes de la administración del agente o de los agentes antitumorales). En una forma de realización, el anticuerpo anti-PSMA puede administrarse en combinación con un agente antitumoral de acuerdo con el programa de dosificación del definido en el presente documento en la Tabla 1.

Kits

También dentro del alcance de la invención se encuentran kits que comprenden un anticuerpo de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener adicionalmente uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunoestimulador, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno PSMA distinto del primer anticuerpo). Los kits incluyen por lo general una etiqueta que indica el uso previsto de los contenidos del kit. El término "etiqueta" incluye cualquier escritura, o material grabado suministrado en o con el kit, o que acompaña al kit de otro modo.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra PSMA

Antígeno

Los protocolos de inmunización utilizaron como antígeno células de la línea celular de cáncer de próstata LNCaP que expresa PSMA (ATCC CRL-1740).

Ratones transgénicos HuMAb

Se prepararon anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra PSMA utilizando la cepa HCo12 de ratones transgénicos HuMAb, que expresa genes de anticuerpos humanos. En estas cepas de ratón, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha alterado homocigóticamente como se describe en Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha alterado homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Además, esta cepa de ratón porta un transgen de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, y un transgen de la cadena pesada humana, HCo12, como se describe en el Ejemplo 2 de la publicación PCT WO 01/09187.

Inmunizaciones HuMAb:

Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra PSMA, los ratones HuMAb se inmunizaron con células LNCaP que expresan PSMA como antígeno. Los esquemas generales de inmunización para los ratones HuMAb se describen en Lonberg, N. *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían de 6 a 16 semanas de edad en la primera infusión de antígeno. Se utilizaron de 5 a 10×10^6 células para inmunizar a los ratones HuMAb por vía intraperitoneal (IP), por vía subcutánea (Sc) o mediante inyección en la almohadilla plantar.

Los ratones transgénicos se inmunizaron dos veces con antígeno en adyuvante completo de Freund o adyuvante de Ribí IP, seguido de 3 a 21 días IP (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund o adyuvante de Ribí. La respuesta inmunitaria fue monitorizada mediante sangrados retroorbitales. El plasma se cribó mediante ELISA (como se describe más adelante), y para las fusiones se utilizaron los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-PSMA. Se reforzó a los ratones por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y la extracción del bazo. Por lo general, se realizaron de 10 a 35 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varias decenas de ratones para cada antígeno.

Selección de ratones HuMAb que producen anticuerpos anti-PSMA:

Para seleccionar los ratones HuMAb que producían los anticuerpos que se unen PSMA, se cribaron sueros de los ratones inmunizados para verificar la unión a la línea celular de cáncer de próstata LNCaP que expresa PSMA, pero no a una línea de células de cáncer de próstata negativa de mediante citometría de flujo. En resumen, se evaluó la unión de los anticuerpos anti-PSMA incubando las células LNCaP con el anticuerpo anti-PSMA a una concentración de 20 µg/ml. Se lavaron las células y se detectó la unión con un anticuerpo anti-IgG humana marcado con FITC. Se realizaron análisis de citometría de flujo utilizando una citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los anticuerpos que se unían a las células LNCaP que expresaban PSMA pero no a las células de cáncer de próstata que no expresaban PSMA se sometieron a ensayo adicionalmente para verificar la unión a PSMA mediante ELISA, como describen Fishwild, D. *et al.* (1996). En resumen, se recubrieron placas de microtitulación con PSMA

purificada a 1-2 µg/ml en PBS, se incubaron 100 µl/pocillo a 4°C durante toda la noche, a continuación se bloquearon con 200 µl/pocillo de suero fetal bovino al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron a cada pocillo diluciones de los sueros de ratones inmunizados con PSMA y se incubaron durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y a continuación se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron mediante espectrofotómetro a una OD de 415-495. Para las fusiones se utilizaron los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti-PSMA. Las fusiones se realizaron como se describe más adelante y los sobrenadantes de hibridomas se sometieron a ensayo para verificar la actividad anti-PSMA mediante ELISA.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra PSMA:

Los esplenocitos de ratón, aislados de los ratones HuMAb, se fusionaron con PEG a una línea de células de mieloma de ratón en base a los protocolos convencionales. A continuación, se cribaron los hibridomas resultantes para verificar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Se fusionaron suspensiones de células individuales de esplenocitos de ratones inmunizados a una cuarta parte del número de células de mieloma no secretor de ratón SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50% (Sigma). Las células se sembraron en placas a aproximadamente 1×10^5 /pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de incubación durante aproximadamente dos semanas en medio selectivo que contenía suero fetal bovino al 10%, medio condicionado P388D1 al 10% (ATCC, CRL TIB-63), origen al 3-5% (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alta glucosa, L-glutamina y piruvato sódico) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina y 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Después de 1 a 2 semanas, se cultivaron las células en un medio en el que el HAT se sustituyó con HT. A continuación se cribaron los pocillos individuales mediante ELISA (descrito anteriormente) para la determinación de anticuerpos IgG monoclonales anti-PSMA humana. Una vez producido el crecimiento extenso de los hibridomas, se monitorizó el medio habitualmente después de 10 a 14 días. Los hibridomas que secretaban anticuerpos se volvieron a sembrar en placas, se cribaron de nuevo y, si todavía eran positivos para la IgG humana, se subclonaron los anticuerpos monoclonales anti-PSMA por lo menos dos veces por dilución limitante. La continuación, los subclones estables se cultivaron *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en el medio de cultivo de tejido para su posterior caracterización.

Los clones de hibridomas 1C3, 2A10, 2F5, 2C6, se seleccionaron para su posterior análisis.

Ejemplo 2: Caracterización estructural de los anticuerpos monoclonales humanos 1C3, 2A10, 2F5 y 2C6

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 1C3, 2A10, 2F5 y 2C6 se obtuvieron a partir de los hibridomas 1C3, 2A10, 2F5, y 2C6, respectivamente, utilizando técnicas convencionales de PCR y se secuenciaron utilizando técnicas convencionales de secuenciación de ADN.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1C3 se muestran en la Figura 1A y en la SEC ID N°: 33 y 1, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1C3 se muestran en la Figura 1B y en la SEC ID N°: 37 y 5, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 1C3 con las secuencias conocidas de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de 1C3 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana VH 3-30.3, un segmento indeterminado D, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6b. En la Figura 5 se muestra la alineación de la secuencia de VH de 1C3 con la secuencia de la línea germinal VH 3-30.3. Un análisis más detallado de la secuencia VH de 1C3 utilizando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada, como se muestra en las Figuras 1A y 5, y en las SEC ID N°s: 9, 13 y 17, respectivamente .

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 1C3 con las secuencias conocidas de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera de 1C3 utiliza un segmento VL de la línea germinal humana VK L18 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 4. La alineación de la secuencia de VL de 1C3 con la secuencia de la línea germinal VK L18 se muestra en la Figura 7. Un análisis más detallado de la secuencia de VL de 1C3 utilizando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestra en las Figuras 1B y 7, y en las SEC ID N°s: 21, 25 y 29, respectivamente .

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2A10 se muestran en la Figura 2A y en la SEC ID N°: 34 y 2, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2A10 se muestran en la Figura 2B y en la SEC ID N°: 38 y 6, respectivamente.

5 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 2A10 con las secuencias conocidas de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de 2A10 utiliza un segmento VH de la línea germinal humana VH 5-51, un segmento D de la línea germinal humana 7-27, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 2. En la Figura 6 se muestra la alineación de la secuencia de VH de 2A10 con la secuencia de la línea germinal VH 5-51. Un análisis más detallado de la secuencia de VH de 2A10 utilizando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada, como se muestra en las Figuras 2A y 6, y en las SEC ID N^{os}: 10, 14 y 18, respectivamente .

10 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 2A10 con las secuencias conocidas de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera de 2A10 utiliza un segmento VL de la línea germinal humana VKL18 y un segmento JK de la línea germinal humana JK4. En la Figura 7 se muestra la alineación de la secuencia de VL de 2A10 con la secuencia de la línea germinal VK L18. Un análisis más detallado de la secuencia de VL de 2A10 utilizando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera, como se muestra en las Figuras 2B y 7, y en las SEC ID N^{os}: 22, 26 y 30, respectivamente .

20 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2F5 se muestran en la Figura 3A y en la SEC ID N^o: 35 y 3, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2F5 se muestran en la Figura 3B y en la SEC ID N^o: 39 y 7, respectivamente.

25 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 2F5 con las secuencias conocidas de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de 2F5 utiliza un segmento VH de la línea germinal humana VH 5-51, un segmento D de la línea germinal humana 7-27, y un Segmento JH de la línea germinal humana JH 2. En la Figura 6 se muestra la alineación de la secuencia de VH de 2F5 con la secuencia de la línea germinal VH 5-51. Un análisis más detallado de la secuencia de VH de 2F5 utilizando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada, como se muestra en las Figuras 3A y 6, y en las SEC ID N^{os}: 11, 15 y 19, respectivamente .

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 2F5 con las secuencias conocidas de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera 2F5 utiliza un segmento LV de la línea germinal humana VK L18 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 4. En la Figura 7 se muestra la alineación de la secuencia de VL de 2F5 con la secuencia de la línea germinal VK L18. Un análisis más detallado de la secuencia VL de 2F5 utilizando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera, como se muestra en las Figuras 3B y 7, y en las SEC ID N^{os}: 23, 27 y 31, respectivamente .

40 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2C6 se muestran en la Figura 4A y en la SEC ID N^o: 36 y 4, respectivamente.

45 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2C6 se muestran en la Figura 4B y en la SEC ID N^o: 40 y 8, respectivamente.

50 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de 2C6 con las secuencias conocidas de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de 2C6 utiliza un segmento VH de la línea germinal humana VH 5-51, un segmento D de la línea germinal humana 6-13, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 4b. En la Figura 6 se muestra la alineación de la secuencia de VH de 2C6 con la secuencia de la línea germinal VH 5-51. Un análisis más detallado de la secuencia de VH de 2C6 utilizando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada, como se muestra en las Figuras 4A y 6, y en las SEC ID N^{os}: 12, 16 y 20, respectivamente .

55 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 2C6 con las secuencias conocidas de la cadena ligera de la inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera de 2C6 utiliza un segmento VL de la línea germinal humana VK L6 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 3. En la Figura 8 se muestra la alineación de la secuencia de VL de 2C6 con la secuencia de la línea germinal VK L6. Un análisis más detallado de la secuencia VL de 2C6 utilizando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera, como se muestra en las Figuras 4B y 8, y en las SEC ID N^{os}: 24, 28 y 32, respectivamente.

60

Ejemplo 3: Caracterización de especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA

En este ejemplo, se examinó la especificidad de unión mediante citometría de flujo en una línea celular de cáncer de próstata que expresa PSMA y mediante ELISA utilizando PSMA purificada.

5

Especificidad de unión mediante citometría de flujo

Se utilizó la línea celular de cáncer de próstata LNCaP que expresa PSMA para determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA mediante citometría de flujo. Se evaluó la unión de los monoclonales humanos 2F5, 2A10, y 2C6 anti-PSMA incubando las células LNCaP con los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA a diferentes concentraciones. Se lavaron las células y se detectó la unión con un anticuerpo anti-IgG humana marcado con FITC. Se realizaron análisis de citometría de flujo utilizando una citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal humano anti-PSMA 7F12 (como se describe en la publicación PCT WO 03/064606) y como control negativo se utilizó un anticuerpo de control del isotipo no específico de PSMA. Los resultados se representan en la Figura 9. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA 2F5, 2A10 y 2C6 se unían específicamente a las células LNCaP que expresaban PSMA.

Especificidad de unión mediante ELISA

20

Se realizó una comparación de los anticuerpos anti-PSMA respecto a la unión a PSMA inmunopurificado mediante ELISA convencional para examinar la especificidad de unión para PSMA.

Se inmunopurificó PSMA a partir de células LNCaP y se sometió a ensayo para verificar la unión contra los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA 1C3, 2A10, 2F5 y 2C6. Se realizaron procedimientos ELISA convencionales. Se añadieron anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA a una concentración de 5 µg/ml y se redujo gradualmente la titulación en diluciones seriadas 1:2. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico de cadena kappa) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal humano anti-PSMA 7F12 y como control negativo se utilizó un testigo. Los resultados se muestran en la Figura 10. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA 2A10 y 2F5 se unían con alta especificidad a PSMA. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA 1C3 y 2C6 mostraron una unión detectable pero sólo de bajo nivel a PSMA en un ensayo de ELISA, lo que sugiere que estos anticuerpos se unen a un epítipo con impedimento estérico en un ensayo de ELISA.

Ejemplo 4: Análisis de Scatchard de la afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-PSMA

Se sometió a ensayo la afinidad de unión del anticuerpo 2A10 para la línea celular de cáncer de próstata LNCaP que expresa PSMA utilizando un análisis de Scatchard.

Se obtuvieron células LNCaP de la ATCC (CRL-1740) y se cultivaron en medio RPMI que contenía suero fetal bovino al 10% (FBS). Las células se tripsinizaron y se lavaron una vez en tampón de unión basado en Tris 24 mM pH 7,2, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, glucosa 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1mM, BSA al 0,1%) y se ajustaron las células a 2x10⁶ células/ml en tampón de unión. Se recubrieron placas Millipore (MAFB NOB) con leche descremada en polvo al 1% en agua y se almacenaron a 4°C durante toda la noche. Las placas se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de unión. Se añadieron cincuenta microlitros de tampón en solitario a los pocillos de control de unión máxima (unión total). Se añadieron veinticinco microlitros de tampón en solitario a los pocillos de control (unión no específica). Se añadió a todos los pocillos una concentración variable de anticuerpo ¹²⁵I-anti-PSMA en un volumen de 25 µl. Se añadieron concentraciones variables de anticuerpo sin marcar en una cantidad 100 veces superior en un volumen de 25 µl para controlar los pocillos y se añadieron a todos los pocillos 25 µl de células LNCaP (2 x 10⁶ células/ml) en tampón de unión. Las placas se incubaron durante 2 horas a 200 rpm en un agitador a 4°C. A la finalización de la incubación, las placas Millipore se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de lavado frío (Tris 24 mM pH 7,2, NaCl 500 mM, KCl 2,7 mM, glucosa 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1mM, BSA al 0,1%). Se retiraron los filtros y se contaron en un contador gamma. Se realizó la evaluación de la unión en equilibrio utilizando los parámetros de unión a un solo sitio con el software Prism (San Diego, CA).

55

Utilizando el ensayo de unión de Scatchard anterior, la K_D del anticuerpo 2A10 para las células LNCaP fue de aproximadamente 0,8 nM.

Ejemplo 5: Ensayo de unión de competición por el epítipo

60

Se comparó el anticuerpo monoclonal anti-PSMA 2A10 con un anticuerpo anti-PSMA conocido, el 7F12 (descrito en la publicación PCT WO 03/064606) para examinar si los dos anticuerpos se unían a la misma región del epítipo utilizando un ensayo de competición.

Se obtuvieron células LNCaP de la ATCC (CRL-1740) y se cultivaron en medio RPMI que contenía suero fetal

65

bovino al 10% (FBS). Las células se tripsinizaron y se lavaron una vez en tampón de unión basado en Tris (Tris 24 mM pH 7,2, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, glucosa 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1mM, BSA al 0,1%) y se ajustaron las células a 2x10⁶ células/ml en tampón de unión. Se recubrieron placas Millipore (MAFB NOB) con leche descremada en polvo al 1% en agua y se almacenaron a 4°C durante toda la noche. Las placas se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de unión. Se añadieron a los pocillos veinticinco microlitros de tampón en solitario (unión no específica). Se añadió a todos los pocillos una concentración fija de anticuerpo ¹²⁵I-anti-PSMA en un volumen de 25 µl. Se añadieron a los pocillos concentraciones variables de anticuerpo sin marcar en un volumen de 25 µl y 25 µl de células LNCaP (2 x 10⁶ células/ml) en tampón de unión. Se incubaron las placas durante 2 horas a 200 rpm en un agitador a 4°C. A la finalización de la incubación, las placas Millipore se lavaron tres veces con 0,2 ml de tampón de lavado frío (Tris 24 mM pH 7,2, NaCl 500 mM, KCl 2,7 mM, glucosa 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1mM, BSA al 0,1%). Se retiraron los filtros y se contaron en un contador gamma. Se realizó la evaluación de la unión en equilibrio utilizando los parámetros de unión a un solo sitio con el software Prism (San Diego, CA). Como control negativo se utilizó un anticuerpo de control del isotipo. Los resultados de la unión de competición contra ¹²⁵I-2A10 se muestran en la Figura 11A y la unión de competición contra ¹²⁵I-7F12 se muestran en la Figura 11B. Los resultados muestran que la adición de anticuerpo 7F12 no marcado inhibe la unión de 2A10 marcado a las células LNCaP y la adición de anticuerpo 2A10 no marcado inhibe la unión de 7F12 marcado a las células LNCaP. Esto demuestra que los anticuerpos anti-PSMA 2A10 y 7F12 se unen al mismo epítipo o a un epítipo muy similar en PSMA.

Ejemplo 6: Internalización del anticuerpo monoclonal anti-PSMA

Los HuMAbs anti-PSMA se sometieron a ensayo para verificar la capacidad de internalización en las células de cáncer de próstata que expresan PSMA utilizando un ensayo de internalización Hum-Zap. El Hum-Zap somete a ensayo la internalización de un anticuerpo primario humano a través de la unión de un anticuerpo secundario con afinidad por la IgG humana conjugada con la toxina saporina.

Se sembró la línea celular de cáncer de próstata LNCaP que expresa PSMA a 2.5x10⁴ células/pocillo en pocillos de 100 µl durante toda la noche o al día siguiente durante un período de dos horas. Se añadió a los pocillos cualesquiera de los anticuerpos anti-PSMA 2A10 ó 7F12 a una concentración inicial de 30 nM y se redujo gradualmente la titulación en diluciones seriadas 1:3. Como control negativo se utilizó un anticuerpo de control del isotipo que no era específico para PSMA. Se añadió el Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, IT-22-25) a una concentración de 11 nM y se dejaron incubar las placas durante 48 horas. A continuación se pulsaron las placas con 1,0 µCi de ³H-timidina durante 24 horas, se recogieron y se leyeron en un contador de centelleo Top Count (Packard Instruments). Los resultados se muestran en la Figura 12. El anticuerpo anti-PSMA 2A10 mostró una disminución dependiente de la concentración de anticuerpo en la incorporación de ³H-timidina en las células de cáncer de próstata LNCaP que expresan PSMA. Estos datos demuestran que el anticuerpo anti-PSMA 2A10 se internaliza en una línea celular de cáncer de próstata.

Ejemplo 7: Termoestabilidad de los anticuerpos monoclonales anti-PSMA mediante calorimetría diferencial de barrido

Se comparó la estabilidad térmica de los anticuerpos monoclonales anti-PSMA 2A10 con el anticuerpo 7F12 utilizando análisis calorimétrico de la temperatura de fusión del anticuerpo.

Se llevaron a cabo mediciones calorimétricas de las temperaturas de fusión TM en una plataforma de microcalorímetro diferencial de barrido VP-Capillary DSC que se combina con un muestreador automático (MicroCal LLC, Northampton, MA, Estados Unidos). El volumen de la celda para muestras es 0,144 ml. Los datos de desnaturalización sobre las formas glicosiladas y desglucosiladas de los anticuerpos se obtuvieron calentando las muestras, a una concentración de 2.3 µM, de 30 a 95°C a una velocidad de 1°C/min. Las muestras de proteínas estuvieron presentes en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4. Se utilizó el mismo tampón en la celda de referencia para obtener la capacidad calorífica molar en comparación. Los termogramas se corrigieron con respecto a los datos iniciales y los datos normalizados se analizaron en base a un modelo en 2 etapas, utilizando el software Origin v7.0. El clon 2A10 tiene mayor termoestabilidad, con una T_m de 71, 43°C, en comparación con los 63,05°C obtenidos por el clon 7F12.

Ejemplo 8: Tratamiento de los xenoinjertos de tumores *in vivo* con una combinación de Taxotere® y el anticuerpo 7F12

Se sometió a ensayo la eficacia antitumoral del anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con Taxotere® (docetaxel) en xenoinjertos de carcinoma de próstata humano LNCaP que crecían en ratones macho CB17.SCID.

Se obtuvieron células de cáncer de próstata LNCaP que expresaban altos niveles de PSMA de la ATCC (Cat# CRL-1740) y se expandieron *in vitro* siguiendo las instrucciones de la ATCC. Se implantaron en ratones machos CB17.SCID de 8 semanas de edad de Taconic, subcutáneamente en el flanco derecho, 2,5 x10⁶ células LNCaP en 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratón. Los ratones se pesaron y se midieron para verificar el volumen del tumor utilizando un calibrador electrónico dos veces por semana a partir de las tres semanas después de la implantación. El volumen de los tumores individuales se calculó como la altura x anchura x longitud. Los ratones con tumores

vascularizados (determinado por la aparición de los tumores) de 180 mm³ se distribuyeron aleatoriamente en los grupos de tratamiento y se les administraron dosis según el peso corporal individual en el Día 0. Se monitorizó a los ratones para verificar el crecimiento del tumor aproximadamente 60 días después de la administración de la dosis y se les sacrificó al final del estudio. Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron el punto final del tumor (1.500 mm³). En la Tabla 1 se resume la información de administración. Se les administró Taxotere® a Q3Dx3 por vía intravenosa (iv) a través de la vena de la cola. Se les administraron el anticuerpo de control de isotipo Rituxan® y el anticuerpo 7F12 anti-PSMA por vía intraperitoneal (ip) Q3Dx5, seguido con Q7Dx6.

Tabla 1: Información de administración

Tratamiento	N por grupo	Dosis iv de Taxotere® (mg/kg)	Dosis ip de anticuerpo (mg/kg)	Esquema de dosificación
PBS	10			Día 0,3,7,10,14,21, 28, 35, 42, 49, 56
Taxotere® 2	10	2	0	Día 0, 3, 7
Taxotere® 4	10	4	0	Día 0, 3, 7
Anticuerpo de Isotipo Rituxan®	10	0	30	Día 0, 3,7,10,14,21, 28, 35, 42, 49, 56
Anticuerpo 7F12	10	0	30	Día 0,3,7,10,14,21, 28, 35, 42, 49, 56
Taxotere® 2+ anticuerpo 7F12	10	2	30	Día 0, 3, 7 para Taxotere Día 0, 3, 7, 10, 14,21,28,35,42, 49, 56
Taxotere 2 + Isotipo Rituxan®	10	2	30	Día 0, 3, 7 para Taxotere Día 0, 3, 7, 10, 14,21,28,35,42, 49, 56
Taxotere 4+ anticuerpo 7F12	10	4	30	Día 0, 3, 7 para Taxotere Día 0, 3, 7, 10, 14,21,28,35,42, 49, 56
Taxotere 4 + Isotipo Rituxan®	10	4	30	Día 0, 3, 7 para Taxotere Día 0, 3, 7, 10, 14,21,28,35,42, 49, 56

Los resultados de los experimentos anteriores se representan en las Figuras 13-16. Como se muestra en las Figuras 13A -13B y las Figuras 14A-14B, 30 mg/kg del anticuerpo 7F12 anti-PSMA en solitario disminuía moderadamente el crecimiento de tumores LNCaP. Taxotere® mostró una eficacia de crecimiento antitumoral dependiente de dosis a las dos dosis sometidas a ensayo (es decir, 2 y 4 mg/kg). La terapia de combinación de 30 mg/kg del anticuerpo 7F12 anti-PSMA y 4 mg/kg de Taxotere® mostró una eficacia superior que cada tratamiento en solitario y dio como resultado la inhibición casi completa del crecimiento del tumor LNCaP (véanse las Figuras 13A-13B y las Figuras 15A-15B). Como se muestra en las Figuras 13C-13D y en las Figuras 15C-15D, este régimen de combinación también curaba a los ratones de la caquexia relacionada con el tumor LNCaP. La terapia de combinación de 30 mg/kg del anticuerpo 7F12 anti-PSMA y 2 mg/kg de Taxotere® también mostró una eficacia superior que cada tratamiento en solitario (véanse las Figuras 13A-13D y las Figuras 16A-16D). Los datos anteriores demuestran un efecto aditivo y posiblemente sinérgico del anticuerpo 7F12 anti-PSMA en combinación con la quimioterapia con Taxotere® en el tratamiento de tumores, tales como los tumores de próstata.

Ejemplo 8: Evaluación de la destrucción celular de un anticuerpo anti-PSMA conjugado con toxina en las líneas celulares de cáncer de próstata

En este ejemplo, se sometieron a ensayo anticuerpos monoclonales anti-PSMA conjugados con una toxina para verificar la capacidad de destruir las líneas celulares de cáncer de próstata PSMA⁺ en un ensayo de proliferación celular.

El anticuerpo 2A10 anti-PSMA HuMAb se conjugó con una toxina mediante un conector, tal como un conector peptidil, hidrazona o disulfuro. Ejemplos de compuestos con toxina que pueden conjugarse con los anticuerpos de la presente invención se describen en la solicitud presentada con número de expediente del mandatario 04280/100M629US3, presentada el 26 de septiembre de 2005. La línea celular de cáncer de próstata LNCaP que expresa PSMA se sembró a 2.5x10⁴ células/pocillo en pocillos de 100 µl durante 3 horas. Se añadió a los pocillos un anticuerpo anti-PSMA conjugado con toxina a una concentración inicial de 30 nM y se redujo gradualmente la titulación en diluciones seriadas 1:3. Como control negativo se utilizó un anticuerpo de control del isotipo que no era específico para PSMA. Se dejaron incubar las placas durante 72 horas, con un lavado a las 3 horas o un lavado continuo. A continuación, se pulsaron las placas con 1,0 µCi de ³H-timidina durante 24 horas, se recogieron y se leyeron en un contador de centelleo Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Los resultados se muestran en la Figura 17A (tres horas de lavado) y 17B (lavado continuo). Los anticuerpos 2A10 anti-PSMA mostraron una disminución dependiente de la concentración de anticuerpo unido a toxina en la incorporación de ³H-timidina en las células de cáncer de próstata LNCaP que expresaban PSMA. Los valores de EC₅₀ para los anticuerpos 2A10 anti-PSMA fue 0,157 nM para el ensayo de lavado y 0,0643 nM para el ensayo de lavado continuo. Estos datos demuestran que los anti-PSMA son citotóxicos para las células del cáncer de próstata cuando se conjugan con una toxina.

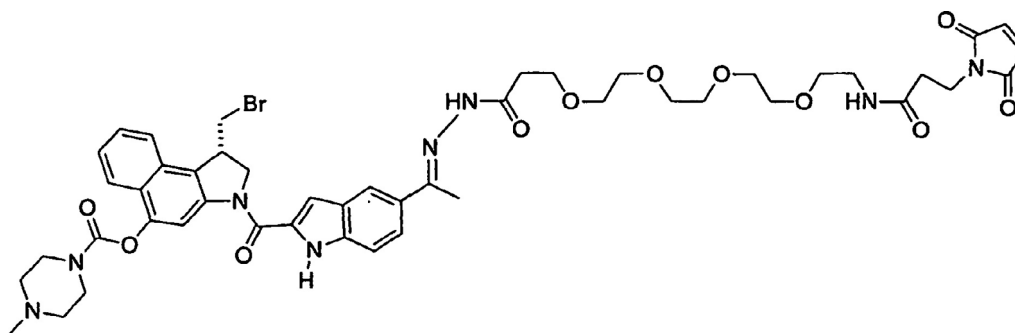
Ejemplo 9: Estudios *in vivo*

En este ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-PSMA conjugados con una toxina se sometieron a ensayo para verificar la capacidad para destruir líneas celulares de cáncer de próstata PSMA⁺ *in vivo*.

A. Tratamiento *in vivo* de xenoinjertos de tumores

5 El HuMAb 2A10 anti-PSMA y un anticuerpo de control del isotipo se sometieron a intercambio de tampón en tampón fosfato 0,1 M pH 8,0 que contenía NaCl 50 mM y DTPA 2 mM, y se concentró a 6mg/ml. A continuación, ambos anticuerpos se tiolaron mediante incubación con un exceso molar de 25 veces de 2-iminotiolano durante una hora a temperatura ambiente, seguido de desalado en tampón fosfato 0,1 M pH 6,0 que contenía NaCl 50 mM y tampón DTPA 2 mM utilizando una columna Sephadex G-25. A continuación, los anticuerpos tiolados se mantuvieron en hielo, mientras se determina el número de grupos tiol introducidos. Esto se logró haciendo reaccionar una muestra de anticuerpo tiolado con ditiodipiridina (DTDP). Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de proteína en las muestras, y a continuación se incubó un alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A su lado se incubaron muestras testigo de tampón en solitario más DTDP. Se midió la absorbancia a 324 nm y se cuantificó el número de tioles presentes por anticuerpo utilizando un coeficiente de extinción para tiopiridina de 19800M^{-1} . En el caso de los anticuerpos anti-PSMA se introdujeron 5,3 tioles por anticuerpo, y en el caso del control del isotipo, 6,0.

20 A continuación se incubaron los anticuerpos tiolados con un exceso molar de 3 veces del Compuesto A en comparación con la concentración molar de grupos tiol.



Compuesto A

25 Se añadió una solución madre 5 mM en DMSO del Compuesto A a los anticuerpos tiolados junto con suficiente DMSO para llevar la concentración final de DMSO al 10% (v/v). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 3 horas el pH de la mezcla de incubación se elevó a 7,0 utilizando trietanolamina. A continuación, se purificaron los conjugados anticuerpo-Compuesto A mediante cromatografía por exclusión de tamaño en una columna Sephacryl S200 equilibrada previamente con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,2) que contenía NaCl 50 mM y DMSO al 5% (v/v). Se recogieron y agruparon las fracciones que contenían el conjugado monomérico. A continuación, se concentraron los conjugados purificados resultantes en una celda con agitación bajo nitrógeno, utilizando una membrana con un tamaño de poro de 10kDa. Se determinaron las concentraciones y las relaciones de sustitución (número de moléculas de fármaco unidas por molécula de anticuerpo) de los conjugados utilizando la absorbancia a 280 nm y 340 nm, por referencia a los coeficientes de extinción del anticuerpo y del Compuesto A en cada longitud de onda como se había medido previamente. Ejemplos de otros compuestos con toxina que pueden conjugarse con los anticuerpos de la presente invención se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente con número de expediente del mandatario 04280/100M629US3, presentada el 30 26 de septiembre de 2005.

35 Se sometió a ensayo la eficacia antitumoral de los anti-PSMA (clon 2A10) conjugados con el Compuesto A en LNCaP, que son xenoinjertos de carcinoma de próstata humano, que crecen en ratones macho CB17.SCID (disponibles en Taconic, Germantown, NY). Se obtuvieron células de cáncer de próstata LNCaP que expresaban altos niveles de PSMA de la ATCC (Cat# CRL-1740) y se expandieron *in vitro* siguiendo las instrucciones de la ATCC. Se implantaron en ratones machos CB17.SCID de 8 semanas de edad de Taconic, subcutáneamente en el flanco derecho, $2,5 \times 10^6$ células LNCaP en 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratón. Los ratones se pesaron y se midieron para verificar el tumor tridimensionalmente utilizando un calibrador electrónico dos veces por semana, comenzando tres semanas después de la implantación. El volumen de los tumores individuales se calculó como la altura x anchura x longitud. Los ratones con tumores vascularizados (determinado por la aparición de los tumores) de tamaños adecuados se distribuyeron aleatoriamente en los grupos de tratamiento y se les administraron dosis según el peso corporal individual en el Día 0. Se monitorizó a los ratones para verificar el crecimiento del tumor 45 aproximadamente 60 días después de la administración de la dosis y se les sacrificó al final del estudio. Los ratones

fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron el punto final del tumor (1.500 mm³). En la Tabla 2 se resume el diseño de este estudio de xenoinjerto.

Tabla 2. Resumen del estudio de xenoinjerto LNCaP

Tratamiento	Dosis (µmoles/kg de citotóxicos)	N por grupo	Vía de administración	Volumen medio de tumor en el día-1 (mm ³)
Vehículo	-	3	ip	100
Conjugado anticuerpo de isotipo-Compuesto A	0,3	3	ip	100
Conjugado 2A10-Compuesto A	0,3	3	ip	100

Como se muestra en la figura 18, 0,3 µmoles/kg (referente a los moles de la citotoxina Compuesto A) del conjugado 2A10-Compuesto A indujo la completa regresión de los tres pequeños tumores LNCaP establecidos.

B. Estudio de respuesta a la dosis

El anti-PSMA (2A10) se sometió a intercambio en tampón fosfato 0,1 M pH 8,0 que contenía NaCl 50 mM y DTPA 2 mM, y se concentró a 5,6 mg/ml. A continuación se tioló el anticuerpo mediante incubación con un exceso molar de 7,5 veces de 2-iminotiolano durante una hora a temperatura ambiente, seguido de desalado en tampón HEPES 50 mM pH 6,0 que contenía glicina 5 mM, DTPA 2 mM y glicerol al 3% (v/v) utilizando una columna Sephadex G-25. El anticuerpo tiolado se mantuvo en hielo, mientras se determinaba el número de grupos tiol introducidos. Esto se logró haciendo reaccionar una muestra de anticuerpo tiolado con ditiodipiridina (DTDP). Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de proteína en las muestras, y a continuación se incubó un alcuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A su lado se incubaron muestras testigo de tampón en solitario más DTDP. Se midió la absorbancia a 324 nm y se cuantificó el número de tioles presentes por anticuerpo utilizando un coeficiente de extinción para tiopiridina de 19800 M⁻¹.

A continuación se incubó el anticuerpo tiolado con un exceso molar de 2 veces del Compuesto A en comparación con la concentración molar de grupos tiol. Se añadió Compuesto A, solución madre 5 mM en DMSO al 10% (v/v)/etilenglicol dimetil éter al 90% (v/v), al anticuerpo tiolado junto con suficiente etilenglicol dimetil éter para llevar la concentración final al 5% (v/v). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas se purificó el conjugado anticuerpo-Compuesto A mediante cromatografía de intercambio iónico. se aplicó la mezcla de reacción a una columna SP-Sefarosa previamente equilibrada en tampón A (HEPES 50mM, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 6,0) La columna se lavó con tampón A, a continuación con tampón A al 95%, tampón B al 5% (HEPES 50mM, NaCl 1M, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 7,2) y a continuación se eluyó el conjugado anticuerpo-Compuesto A con tampón B al 10%, tampón A al 90%. Se recogieron y agruparon las fracciones que contenían el conjugado monomérico y se ajustó el pH a 7,2 añadiendo monoetanolamina. A continuación, se dializó el conjugado purificado resultante en HEPES 50 mM y NaCl 100 mM, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 7,2 y a continuación se concentró en una celda con agitación bajo nitrógeno, utilizando una membrana con un tamaño de poro de 10 kDa. Las concentraciones y las relaciones de sustitución (número de moléculas de fármaco unidas por molécula de anticuerpo) del conjugado se determinó utilizando la absorbancia a 280 nm y 340 nm, por referencia a los coeficientes de extinción del anticuerpo y del Compuesto A en cada longitud de onda como se había medido previamente. El conjugado de control del isotipo (anti-CD70 2H5) se preparó utilizando el mismo método, excepto que la elución del conjugado de la columna de intercambio iónico se logró con tampón B al 15%, tampón A al 85%.

La eficacia y selectividad de los conjugados se determinó utilizando xenoinjertos de carcinoma de próstata humano LNCaP que crecían en ratones macho CB17.SCID como se ha descrito anteriormente. En la tabla 3 se resume el diseño de este estudio xenoinjerto.

Tabla 3. Resumen del estudio de xenoinjerto LNCaP

Tratamiento	Dosis (µmoles/kg de citotoxina)	N por grupo	Vía de administración	Volumen medio de tumor en el Día -1 (mm ³)
Vehículo	-	9	ip	160
Anticuerpo de isotipo-Compuesto A	0,05;0,15;0,30;0,45;0,60;0,90	9	ip	160
2A10-Compuesto A	0,05;0,15;0,30;0,45;0,60;0,90	9	ip	160

Como se muestra en la Tabla 3 y las figuras 19-20, 0,15 µmoles/kg de anti-PSMA-Compuesto A (figura 19) tenían una mayor eficacia antitumoral que 0,90 µmoles/kg del control del isotipo-Compuesto A, lo que indica por lo menos > 6x selectividad (figura 20). 0,90 µmoles/kg de anti-PSMA-Compuesto A sólo mostró toxicidad transitoria (figuras 21-22) y fue inferior a la dosis máxima tolerada. Por lo tanto, se identificó un índice terapéutico 6 veces mayor para

el anti-PSMA-Compuesto A en ratones portadores de tumores LNCaP

C. Eficacia en tumores grandes

5 El anti-PSMA (2A10) se sometió a intercambio en tampón fosfato 0,1 M pH 8,0 que contenía NaCl 50 mM y DTPA 2 mM, y se concentró para 5,6 mg/ml. A continuación, se tioló El anticuerpo mediante incubación con un exceso molar de 9 veces de 2-iminotiolano durante una hora a temperatura ambiente, seguido de desalado en tampón HEPES 50 mM pH 6,0 que contenía glicina 5 mM, DTPA 2 mM y glicerol al 3% (v/v) utilizando una columna Sephadex G-25. El anticuerpo tiolado se mantuvo en hielo, mientras se determinaba el número de grupos tiol introducidos. Esto se logró haciendo reaccionar una muestra de anticuerpo tiolado con ditiodipiridina (DTDP). Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de proteína en las muestras, y a continuación se incubó un alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A su lado se incubaron muestras testigo de tampón en solitario, más DTDP. Se midió la absorbancia a 324nm y se cuantificó el número de tioles presentes por anticuerpo utilizando un coeficiente de extinción para tiopiridina de 19800M⁻¹.

A continuación se incubó el anticuerpo tiolado con un exceso molar de 2 veces del Compuesto A en comparación con la concentración molar de grupos tiol. Se añadió el compuesto A, solución madre 5 mM en DMSO al 10% (v/v)/etilenglicol dimetil éter al 90% (v/v), al anticuerpo tiolado junto con suficiente etilenglicol dimetil éter para llevar la concentración final al 5% (v/v). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas se purificó el conjugado anticuerpo-Compuesto A mediante cromatografía de intercambio iónico. Se aplicó la mezcla de reacción a una columna SP-Sefarosa previamente equilibrada en HEPES 50 mM y glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 6,0 (tampón A). La columna se lavó con tampón A, a continuación, con tampón A al 95%, tampón B al 5% (HEPES 50 mM, NaCl 1M y glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 7,2) y a continuación se eluyó el conjugado anticuerpo-Compuesto A con tampón B al 10%, tampón A al 90%. Se recogieron y agruparon las fracciones que contenían el conjugado monomérico y se ajustó el pH a 7,2 añadiendo monoetanolamina. A continuación, el conjugado purificado resultante se dializó en HEPES 50 mM y NaCl 100 mM, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 7,2 y a continuación se concentró en una celda con agitación bajo nitrógeno, utilizando una membrana con un tamaño de poro de 10 kDa. Las concentraciones y las relaciones de sustitución (número de moléculas de fármaco unidas por molécula de anticuerpo) del conjugado se determinaron utilizando la absorbancia a 280 nm y 340 nm, en referencia a los coeficientes de extinción del anticuerpo y del Compuesto A en cada longitud de onda como se había medido previamente. Se preparó el conjugado de control del isotipo (anti-CD70 2H5) utilizando el mismo método, excepto que la elución del conjugado de la columna de intercambio iónico se logró con tampón B al 15%, tampón A al 85%.

La eficacia y selectividad de los conjugados se determinó utilizando xenoinjertos de carcinoma de próstata humanos LNCaP que crecían en ratones macho CB17.SCID como se ha descrito anteriormente. El diseño de estos estudios de xenoinjertos se resume en las tablas 4 y 5.

40 Tabla 4. Resumen del estudio de xenoinjerto LNCaP

Tratamiento	Dosis (µmoles/kg de citotoxina)	N por grupo	Vía de administración	Volumen medio de tumor en el Día -1 (mm ³)
Vehículo	-	8	iv	240
Anticuerpo de isotipo-Compuesto A	0,15	8	iv	240
2A10-Compuesto A	0,15	8	iv	240

Como se muestra en la Tabla 4 y en la figura 23, una sola dosis baja de 0,15 µmoles/kg de anti-PSMA-Compuesto A inhibió en gran medida el crecimiento de tumores LNCaP grandes establecidos de unos tamaños medios de 240 mm³. Por el contrario, 0,15 µmoles/kg de control del isotipo-Compuesto A tenía una eficacia antitumoral mínima. Como se muestra en la Tabla 5 y en la figura 24, una sola dosis de 0,30 µmoles/kg de anti-PSMA-Compuesto A inducía la regresión e inhibía el crecimiento de tumores LNCaP muy grandes de unos tamaños medios de 430 mm³.

45 Tabla 5. Resumen del estudio de xenoinjerto LNCaP

Tratamiento	Dosis (µmoles/kg de citotoxina)	N por grupo	Vía de administración	Volumen medio de tumor en el Día -1 (mm ³)
Vehículo	-	6	ip	430
2A10-Compuesto A	0,15; 0,30; 0,45	6	ip	430

50

RESUMEN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID Nº:	SECUENCIA	SEC ID Nº:	SECUENCIA
1	a.a. VH 1C3	21	a.a. VKCDR1 IC3
2	a.a. VH 2A10	22	a.a. VKCDR1 2A10
3	a.a. VH 2F5	23	a.a. VKCDR1 2F5
4	a.a. VH 2C6	24	a.a. VKCDR1 2C6
5	a.a. VK 1C3	25	a.a. VKCDR2 1 C3
6	a.a. VK 2A10	26	a.a. VK CDR2 2A10
7	a.a. VK 2F5	27	a.a. VK CDR2 2F5
8	a.a. VK 2C6	28	a.a. VK CDR2 2C6
9	a.a. VH CDR1 1C3	29	a.a. VKCDR3 1 C3
10	a.a. VH CDR1 2A10	30	a.a. VK CDR3 2A10
11	a.a. VH CDR1 2F5	31	a.a. VK CDR3 2F5
12	a.a. VH CDR1 2C6	32	a.a. VK CDR3 2C6
13	a.a. VH CDR2 1C3	33	n.t. VH 1C3
14	a.a. VH CDR2 2A10	34	n.t. VH 2A10
15	a.a. VH CDR2 2F5	35	n.t. VH 2F5
16	a.a. VH CDR2 2C6	36	n.t. VH 2C6
17	a.a. VH CDR3 1C3	37	n.t. VK 1C3
18	a.a. VH CDR3 2A10	38	n.t. VK 2A10
19	a.a. VH CDR3 2F5	39	n.t. VK 2F5
20	a.a. VH CDR3 2C6	40	n.t. VK 2C6
41	a.a. línea germinal VH3-30.3	43	a.a. línea germinal VKL18
42	a.a. línea germinal VH5-51	44	VKL6
45	a.a. línea germinal JH6b	47	a.a. línea germinal JK3
46	a.a. línea germinal JK4	48	a.a. (Gly4-Ser) ₃

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> MEDAREX, INC.
- <120> ANTICUERPO MONOCLONAL HUMANO CONTRA EL ANTÍGENO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE LA PRÓSTATA (PSMA)
- 10 <130> MXI-334PC
- <140>
- 15 <141 >
<150> 60/748,417 <151 > 2005-12-08
- <160> 48
- 20 <170> Patent In Ver. 3.3
- <210> 1
<211> 124
<212> PRT
- 25 <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 386 366 T3

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

5 <210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400>2

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

10 <210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400>3

ES 2 386 366 T3

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

<210> 4
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

10 <210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400>5

ES 2 386 366 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 6
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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

10
 <210> 7
 <211> 109
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400>7

ES 2 386 366 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ile Lys
 100 105

<210>8
 <211> 108
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>8

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

10 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 9

Ser Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 10
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 386 366 T3

<400> 10

Ser Asn Trp Ile Gly
1 5

<210> 11

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Asn Trp Ile Gly
1 5

10 <210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 12

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 13

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 14

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

40

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 16

ES 2 386 366 T3

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Ala Val Pro Trp Gly Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

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

15 <400> 18

Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 20
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

Pro Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Thr Ser Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 21

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 22
 40 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

45 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50

ES 2 386 366 T3

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 24

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 25

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 26

20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

25

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 27

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 28

35

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

40

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 29

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

50

<210> 30

<211> 9

ES 2 386 366 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 31

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

15

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 32

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Phe Thr
1 5 10

25

<210> 33
<211 >372
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30

<220>
<221 > CDS
<222> (1)..(372)

<400> 33

ES 2 386 366 T3

cag	gtg	caa	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	agg	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
gct	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtg	144
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
gca	ggt	ata	tca	tat	gat	gga	aac	aat	aaa	tac	tac	gca	gac	tcc	gtg	192
Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65				70					75				80		
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gct	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	gcc	gtc	ccc	tgg	gga	tcg	agg	tac	tac	tac	tac	ggt	atg	gac	336
Ala	Arg	Ala	Val	Pro	Trp	Gly	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	
			100					105					110			
gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca					372
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120									

<210> 34

<211 >357

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221 > CDS

10 <222> (1)..(357)

<400> 34

ES 2 386 366 T3

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
  1                    5                    10                    15

tct ctg aag atc tcc tgt aag ggt tct gga tac agc ttt acc agt aac 96
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Asn
                20                    25                    30

tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
                35                    40                    45

ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
  50                    55                    60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
  65                    70                    75                    80

ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                    90                    95

gcg agg caa act ggt ttc ctc tgg tcc tcc gat ctc tgg ggc cgt ggc 336
Ala Arg Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu Trp Gly Arg Gly
                100                    105                    110

acc ctg gtc act gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115

```

<210> 35

<211 >357

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221 > CDS

10 <222> (1)..(357)

<400> 35

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
  1                    5                    10                    15

tct ctg aag atc tcc tgt aag ggt tct gga tac agt ttt acc agc aac 96
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Asn
                20                    25                    30

tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
                35                    40                    45

```

ES 2 386 366 T3

```

ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
   50                55                60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
   65                70                75                80

ctg cag tgg aac agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
           85                90                95

gcg aga caa act ggt ttc ctc tgg tcc ttc gat ctc tgg ggc cgt ggc 336
Ala Arg Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
           100                105                110

acc ctg gtc act gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
   115

```

<210> 36

<211 >363

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221 > CDS

10 <222> (1)..(363)

<400> 36

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga tca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
   1                5                10                15

tct ctg aag atc tcc tgt aag ggt tct gga tac agc ttt acc aac tac 96
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
           20                25                30

tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
           35                40                45

ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
   50                55                60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tat 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
   65                70                75                80

ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
           85                90                95

gcg agt ccc ggg tat acc agc agt tgg act tct ttt gac tac tgg ggc 336
Ala Ser Pro Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
           100                105                110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
   115                120

```

15

ES 2 386 366 T3

<210> 37
 <211 >321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221 > CDS
 <222> (1)..(321)

10 <400> 37

```

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1           5           10           15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
           20           25           30

tta gcc tgg tat cag cag aaa tca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

ttt gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Phe Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
           65           70           75           80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aac agt tat cct ctc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
           85           90           95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105
    
```

<210> 38
 <211 >321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>

15

<221 > CDS
 <222> (1)..(321)

20

<400> 38

ES 2 386 366 T3

```

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag gac att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
          20           25           30

tta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

tat gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc aac agc ctg cag cct 240
Tyr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
          65           70           75           80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac ccg ctc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
          85           90           95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 39

<211 >327

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221 > CDS

10 <222> (1) .. (327)

<400> 39

```

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag gac att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
          20           25           30

tta gcc tgg tat cag cag aaa ccg ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

```

ES 2 386 366 T3

```

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                70                75                80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac ccg ctc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
                85                90                95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa atc aaa 327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ile Lys
                100                105

```

<210> 40
 <211 >324
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221 > CDS
 10 <222> (1) .. (324)

<400> 40

```

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1                5                10                15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
                20                25                30

tta gcc tgg tac caa cag aaa oct ggc cag gct ecc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
                35                40                45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
                50                55                60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65                70                75                80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccc cta 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
                85                90                95

ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 324
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
                100                105

```

15 <210> 41
 <211 >98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 41

ES 2 386 366 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

<210> 42
 <211 >98
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42

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

10
 <210> 43
 <211 >95
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 43

ES 2 386 366 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

<210> 44

<211> 94

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 44

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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
 85 90

10 <210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 45

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 1 5 10 15
 Thr Val Ser Ser
 20

<210> 46

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

ES 2 386 366 T3

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5
<400> 47

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

10 <210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector sintético Gly-Ser

<400> 48

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal humano aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), que comprende:
- 5 una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 10,
 una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 14,
 una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 18,
 una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 22,
 10 una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 26 y
 una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 30.
2. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6.
3. Inmunoconjugado que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2, unido a un agente terapéutico.
- 20 4. Inmunoconjugado según la reivindicación 3, en el que el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radiactivo.
5. Molécula biespecífica que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente que dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo.
- 25 6. Composición que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2, el inmunoconjugado según la reivindicación 3 ó 4 o la molécula biespecífica según la reivindicación 5, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 7. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2.
8. Vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.
- 35 9. Célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 8.
10. Ratón transgénico que comprende transgenes de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina humana, en el que el ratón expresa el anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2.
- 40 11. Hibridoma preparado a partir del ratón según la reivindicación 10, en el que el hibridoma produce dicho anticuerpo.
- 45 12. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2 para su uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor expresan PSMA.
13. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en combinación con un agente antitumoral en un método para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor en un sujeto, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor expresan PSMA.
- 50 14. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para su uso según la reivindicación 13, en el que la administración a dicho sujeto de dicho anticuerpo anti-PSMA, o parte de unión a antígeno del mismo, en combinación con dicho agente antitumoral, conduce a un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento de dicho tumor.
- 55 15. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para su uso según la reivindicación 13, en el que dicho agente antitumoral provoca daños en la masa tumoral, conduciendo de ese modo a una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) del tumor más eficaz.
- 60 16. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el tumor es de un cáncer seleccionado de entre de próstata, de colon, renal, rectal, urotelial, de mama, de vejiga, de hígado, de páncreas y melanoma.
- 65 17. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 13, en el que dicho agente antitumoral es un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico o un agente inmunomodulador.

18. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 17, en el que dicho agente quimioterapéutico es Taxotere® (docetaxel), dicho agente antiangiogénico se selecciona de entre angiostatina K1-3, Arresten, aaAT, Canstatina, DL- α -difluorometil-ornitina, Endostatina, Fumagilina, Genisteína, Minociclina, Estaurosporina, Talidomida, y Tumstatina o dicho agente inmunomodulador se selecciona de entre anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-CTLA-4, oligodesoxirribonucleótido fosforotiolato (1018 ISS), vacunas génicas GM-CSF, interleucina-2, interleucina-7 (CYT 99 07), interleucina-12 e interleucina-21.
19. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en combinación con un agente antitumoral en un método para inhibir la caquexia relacionada con el tumor en un sujeto o para estimular la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) de un tumor en un sujeto, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor expresan PSMA.
20. Composición que comprende el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2 y un agente antitumoral para su uso en un método para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor, o para estimular la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) de un tumor.
21. Método *in vitro* para identificar un agente antitumoral capaz de actuar sinérgicamente con el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2, para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor, en el que las células del tumor o las células endoteliales vasculares próximas al tumor expresan PSMA, que comprende:
- poner en contacto una composición indicadora con:
- (a) un agente antitumoral de ensayo en solitario,
 - (b) un anticuerpo anti-PSMA según las reivindicaciones 1 ó 2 en solitario, y
 - (c) un agente antitumoral de ensayo y un anticuerpo anti-PSMA según las reivindicaciones 1 ó 2, y comparar la capacidad de (a) el agente antitumoral de ensayo en solitario y (b) el anticuerpo anti-PSMA en solitario para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor con la capacidad de (c) el agente antitumoral de ensayo y el anticuerpo anti-PSMA para inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor, en el que la inhibición o prevención del crecimiento del tumor por (c) en una cantidad que es mayor que el efecto aditivo de (a) y (b) conducirá a la identificación de un agente antitumoral capaz de actuar sinérgicamente con un anticuerpo anti-PSMA para inhibir o prevenir del crecimiento de un tumor.
22. Método según la reivindicación 21, en el que la composición indicadora es un modelo animal para un tumor.

VK de 1C3 anti-PSMA

Segmento V: L18

Segmento J: JK4

```

      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
1   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
55  GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q Q K S G K A P K L L I F D A S S L
109 CAG CAG AAA TCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TTT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      E S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      -----
      F N S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TTT AAC AGT TAT CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

      ↘ JK4
    
```

Fig. 1B

VH de 2A10 anti-PSMA

Segmento V: 5-51

Segmento D: 7-27

Segmento J: JH2

```

1   E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
   GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                -----
55  K I S C K G S G Y S F T S N W I G W
   AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGT AAC TGG ATC GGC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
   GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                -----
163 D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
   GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217 D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D
   GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A M Y Y C A R Q T G F L W S S D L
   ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGG CAA ACT GGT TTC CTC TGG TCC TCC GAT CTC

                                ↙
                                JH2

325 W G R G T L V T V S S
   TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA

```

Fig. 2A

VK de 2A10 anti-PSMA
 Segmento V: L18
 Segmento J: JK4

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

55 V T I T C R A S Q D I S S A L A W Y
 GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GAC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

CDR2

109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
 CAA CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

CDR2

163 E S G V P S R F S G Y G S G T D F T
 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC TAT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

217 L T I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AAC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

CDR3

271 F N S Y P L T F G G G T K V E I K
 TTT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

Fig. 2B

VH de 2F5 anti-PSMA
 Segmento V: 5-51
 Segmento D: 7-27
 Segmento J: JH2

```

1   E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
   GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                     CDR1
                                     -----
55  K I S C K G S G Y S F T S N W I G W
   AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGT TTT ACC AGC AAC TGG ATC GGC TGG

                                     CDR2
                                     -----
109 V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
   GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                     CDR2
                                     -----
163 D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
   GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217 D K S I S T A Y L Q W N S L K A S D
   GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AAC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                     CDR3
                                     -----
271 T A M Y Y C A R Q T G F L W S F D L
   ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAA ACT GGT TTC CTC TGG TCC TTC GAT CTC
                                     |
                                     └─ JH2

325 W G R G T L V T V S S
   TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA
  
```

Fig. 3A

VK de 25F anti-PSMA

Segmento V: L18

Segmento J: JK4

```

      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
1   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      V T I T C R A S Q D I S S A L A W Y
55  GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GAC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
      Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
109 CAG CAG AAA CCG GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
      E S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
      F N S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TTT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

      ↙ JK4

      I K
325 ATC AAA
    
```

Fig. 3B

VH de 2C6 anti-PSMA

Segmento V: 5-51

Segmento D: 6-13

Segmento J: JH4b

```

1   E V Q L V Q S G S E V K K P G E S L
   GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA TCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                     CDR1
                                     ~~~~~
55  K I S C K G S G Y S F T N Y W I G W
   AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GGC TGG

                                     CDR2
                                     ~~~~~
109 V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
   GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                     CDR2
                                     ~~~~~
163 D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
   GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

                                     CDR2
                                     ~~~~~
217 D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D
   GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAT CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                     CDR3
                                     ~~~~~
271 T A M Y Y C A S P G Y T S S W T S F
   ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGT CCC GGG TAT ACC AGC AGT TGG ACT TCT TTT

                                     CDR3
                                     ~~~~~
325 D Y W G Q G T L V T V S S
   GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 4A

VK de 2C6 anti-PSMA
 Segmento V: L6
 Segmento J: JK3

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

55 A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

271 R S N W P L F T F G P G T K V D I K
 CGT AGC AAC TGG CCC CTA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

Fig. 4B

Línea germinal 3-30.3:
 VH de 1C3 : Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R Q

 CDR1

Línea germinal 3-30.3:
 VH de 1C3 : A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T

 CDR2

Línea germinal 3-30.3:
 Línea germinal JH6b
 VH de 1C3 : L Y L Q M N S L R A E D T A V Y C A R

 CDR3
 Y Y Y Y G M D V W G Q G
 A V P W G S R

Línea germinal JH6b
 VH de 1C3 : T T V T V S S

 (JH6b)

Fig. 5

Línea germinal 5-51:
 VH de 2A10 : E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G
 VH de 2C6 : - - - - - S - - - - - N - - - - -
 VH de 2F5 : - - - - - - - - - - - N - - - - -

CDR2

Línea germinal 5-51:
 VH de 2A10 : W V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I
 VH de 2C6 : -
 VH de 2F5 : -

CDR3

Línea germinal 5-51:
 VH de 2A10 : S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R
 VH de 2C6 : - - - - - - - - - - - - - - - Q T G F L W S
 VH de 2F5 : - - - - - - - - - - - N - - - - - S P G Y T S S W

CDR3

VH de 2A10 : S D L W G R G T L V T V S S (JH2)
 VH de 2C6 : T S F - - Y - - Q - - - - - (JH4b)
 VH de 2F5 : F - - - - - - - - - - - (JH2)

Fig. 6

Línea germinal L6: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
 VK de 2C6: - - - - - CDR1 - - - - -

 Línea germinal L6: W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
 VK de 2C6: - - - - - CDR2 - - - - -

 Línea germinal L6: T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N W
 Línea germinal JK3: - - - - - CDR3 - - - - - F T F G P G
 VK de 2C6: - - - - - P L - - - - -

 Línea germinal JK3: T K V D I K
 VK de 2C6: - - - - - (JK3)

Fig. 8

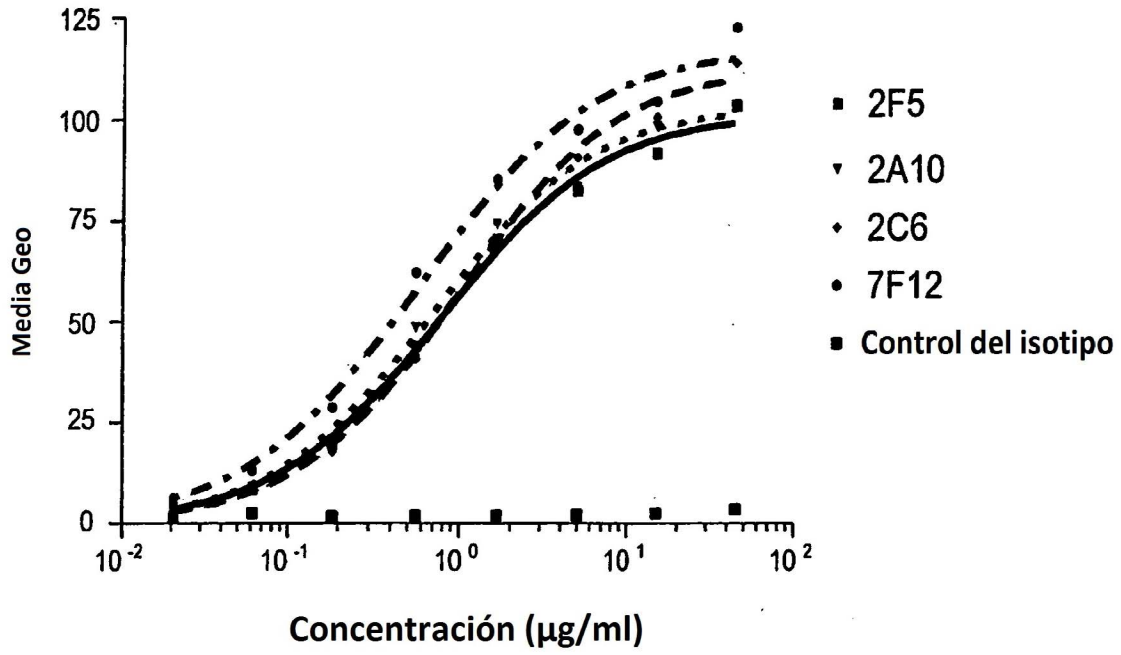


Fig. 9

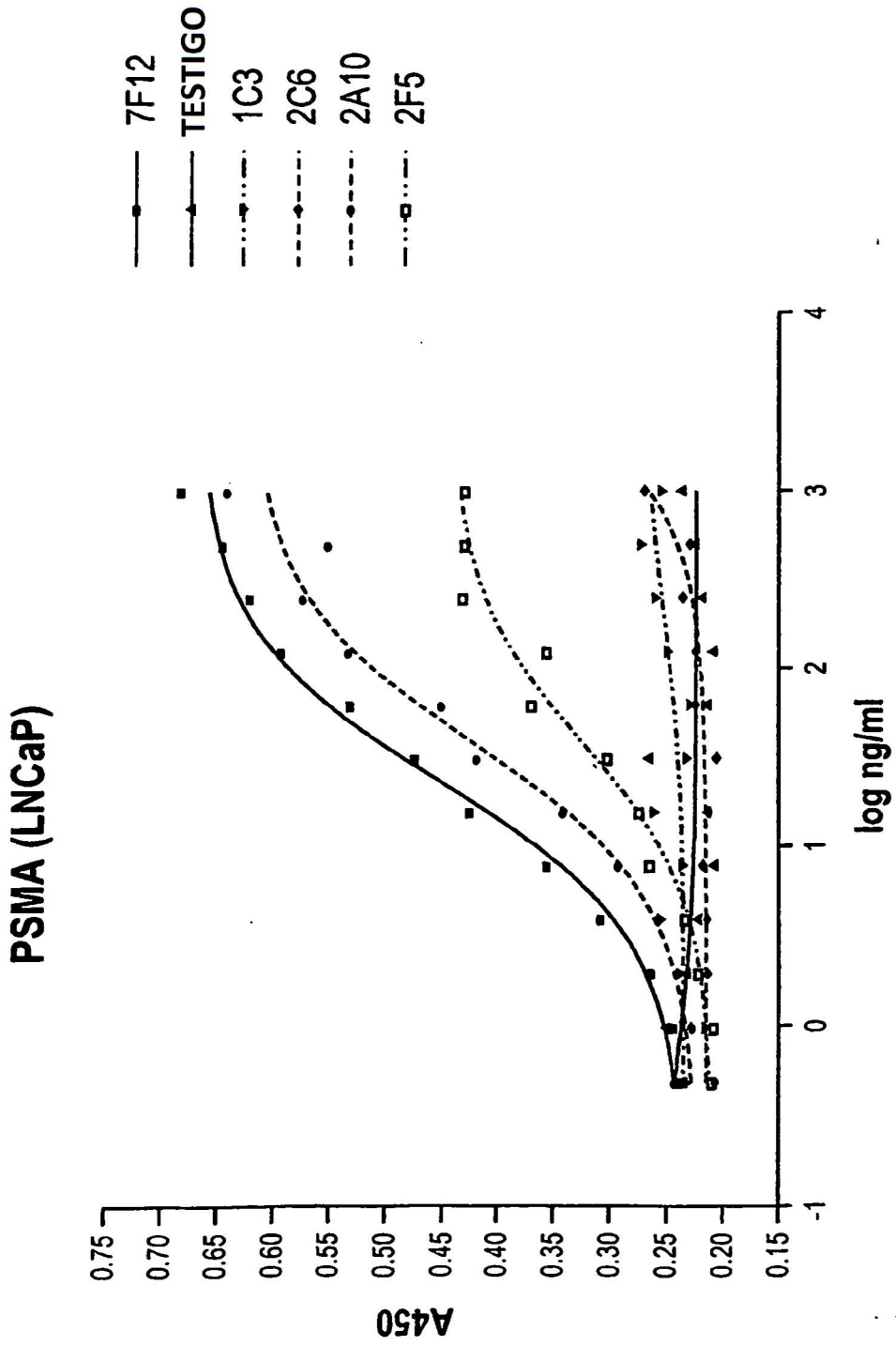


Fig. 10

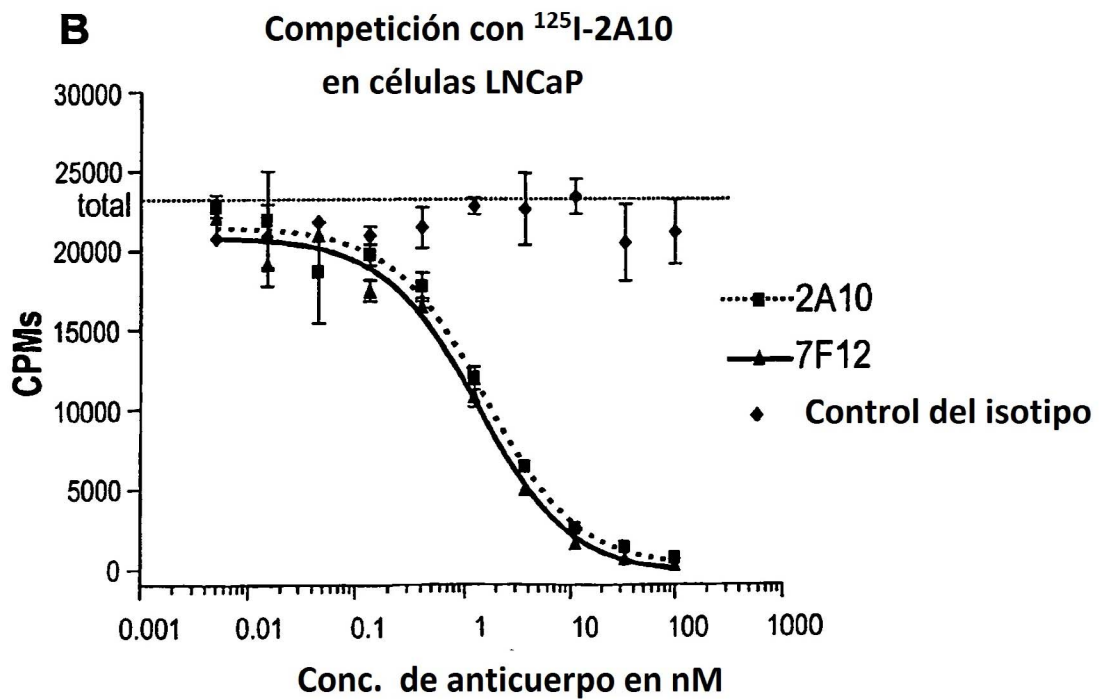
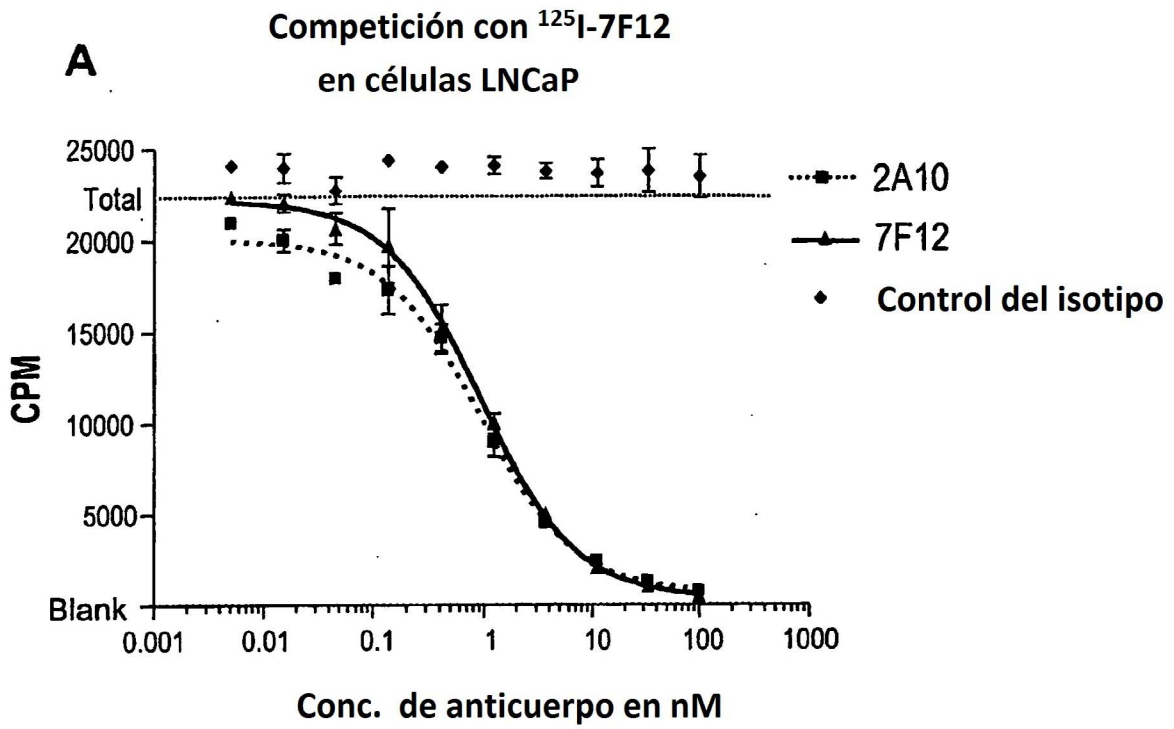


Fig. 11

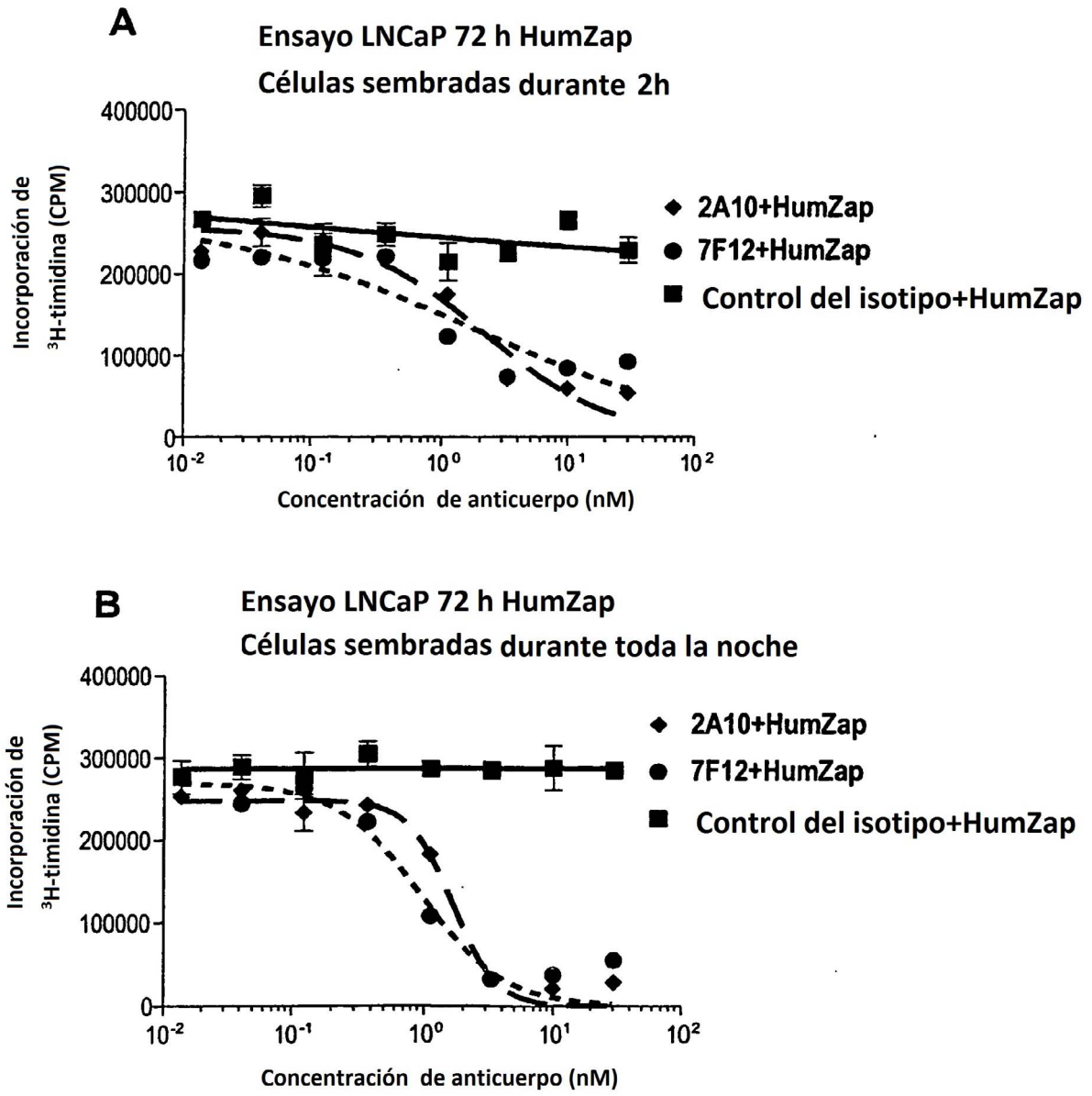


Fig. 12

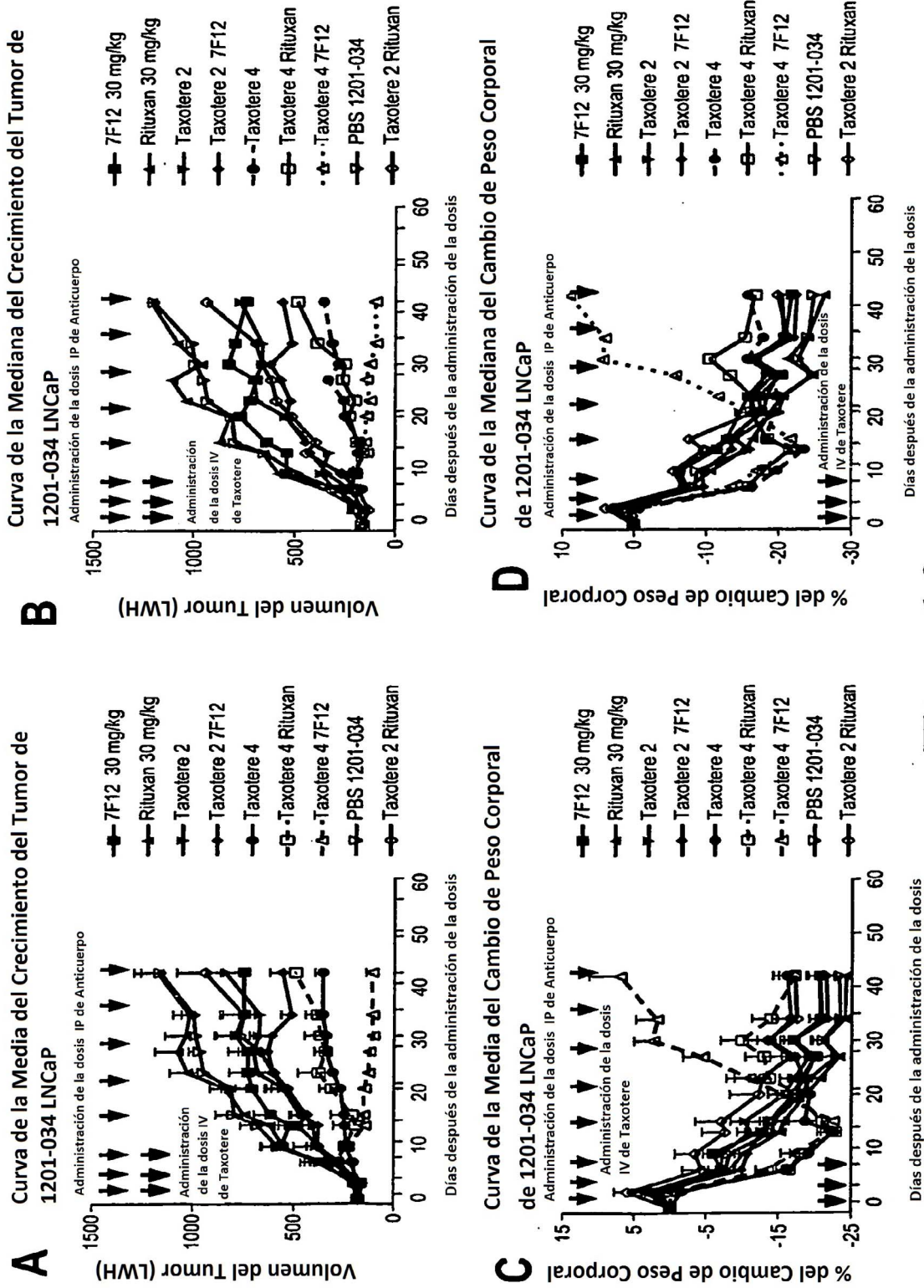


Fig. 13

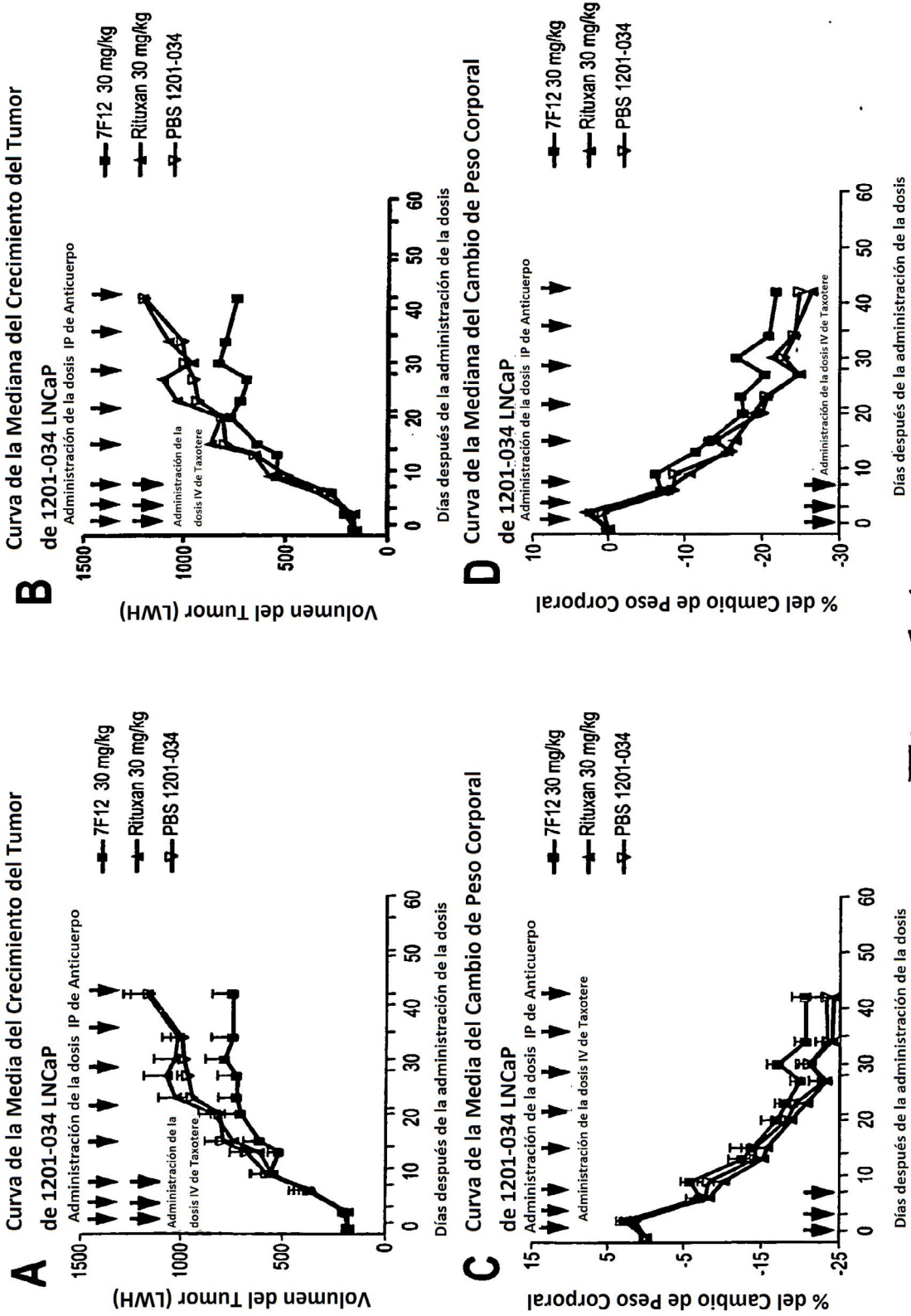


Fig. 14

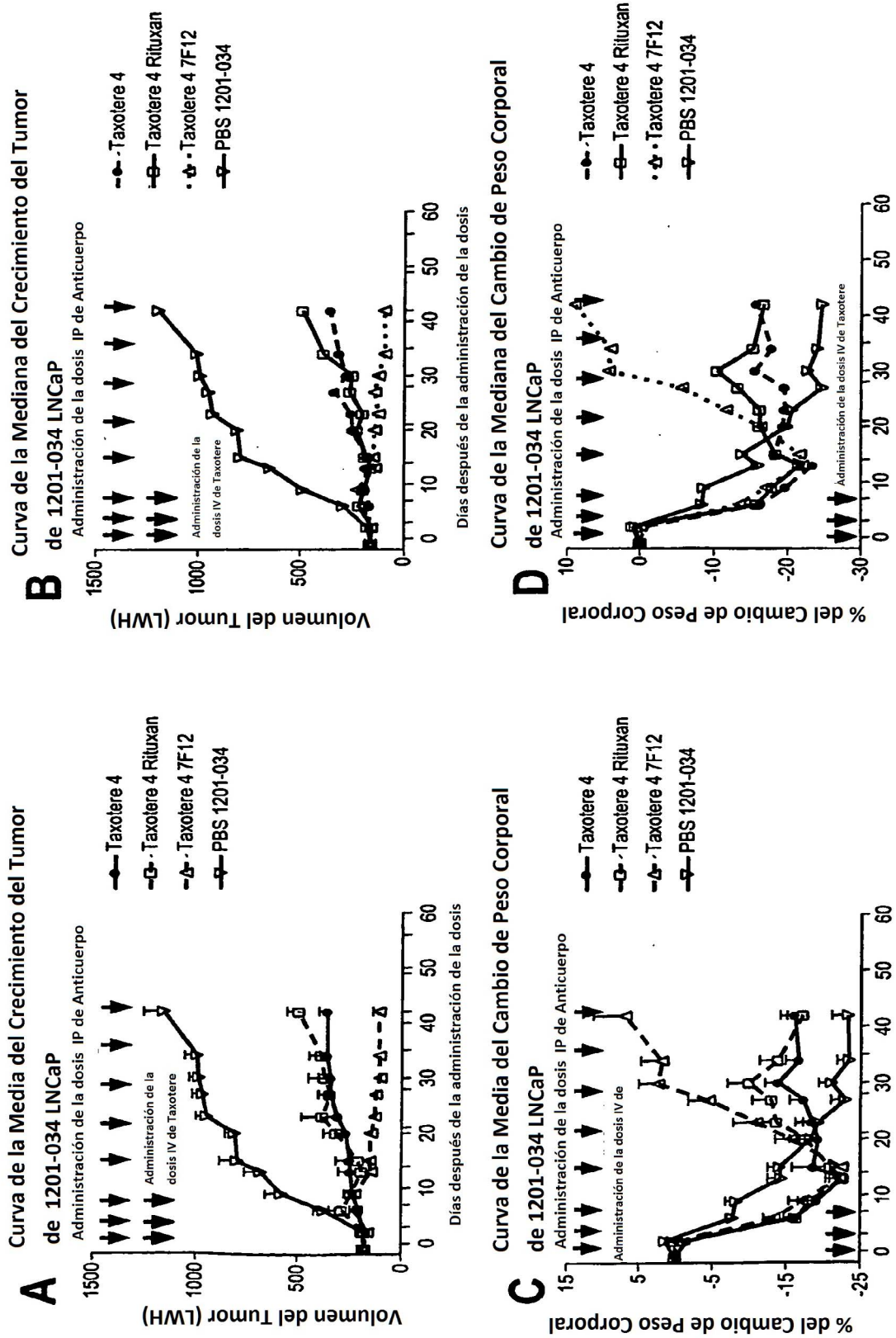


Fig. 15

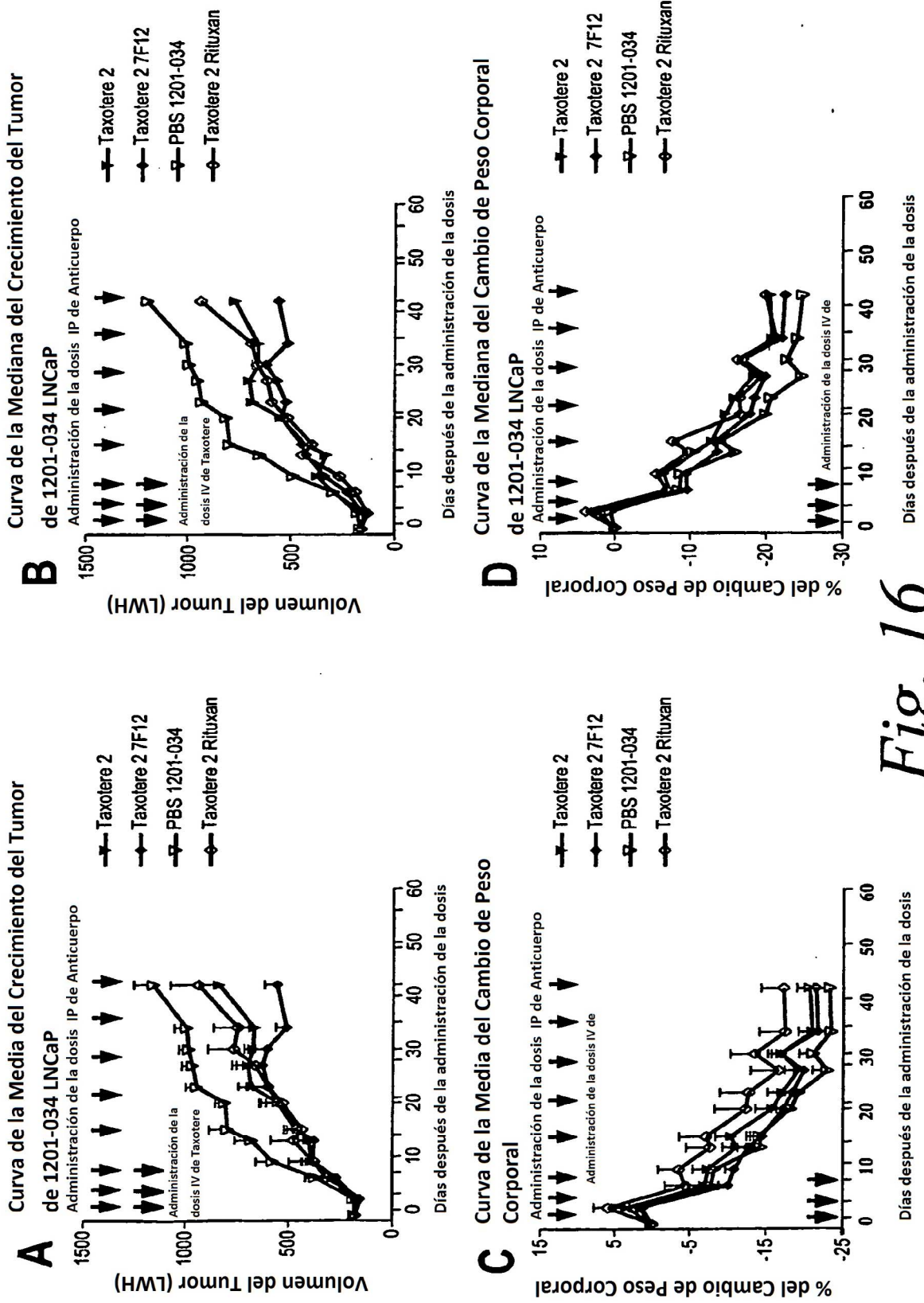


Fig. 16

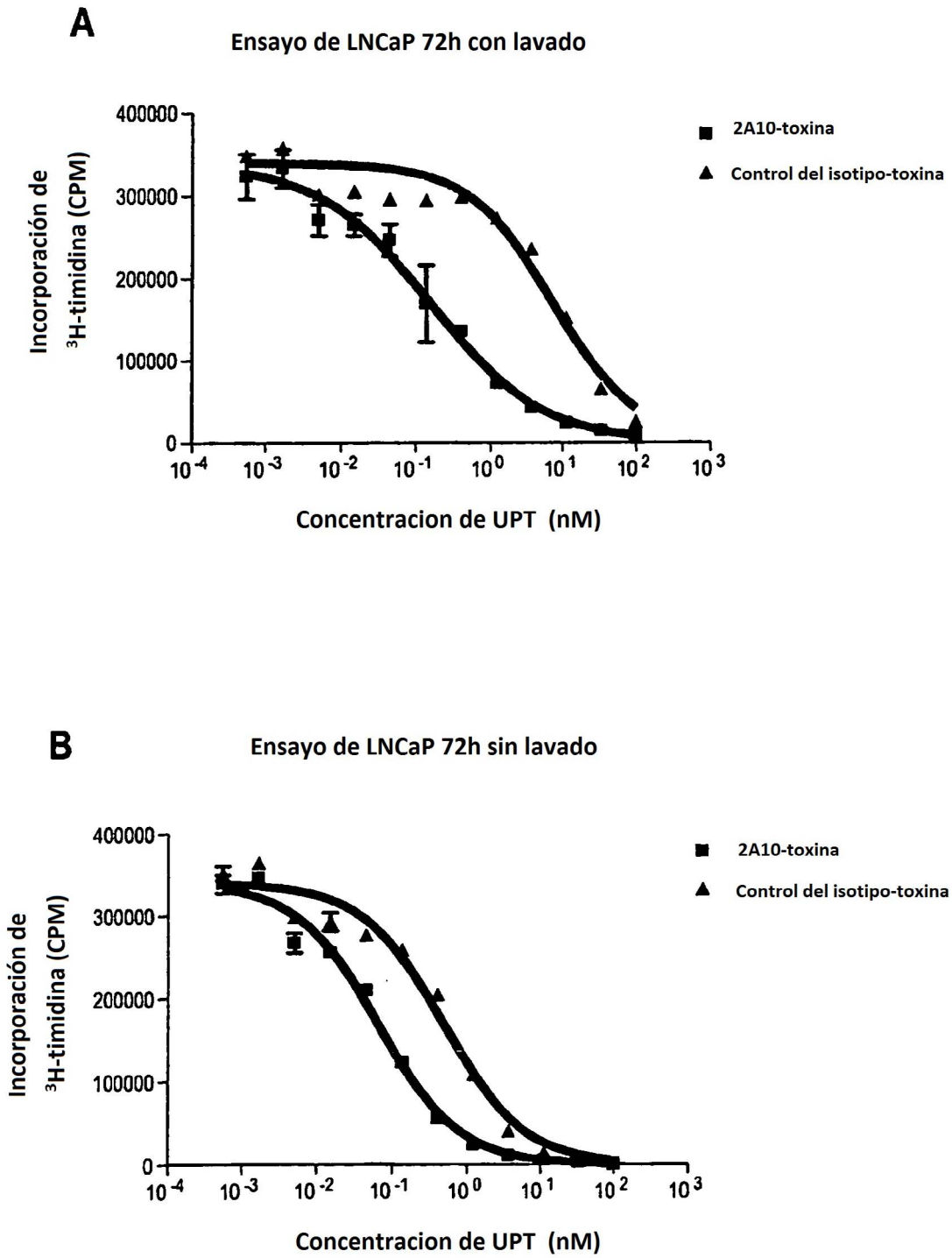


Fig. 17

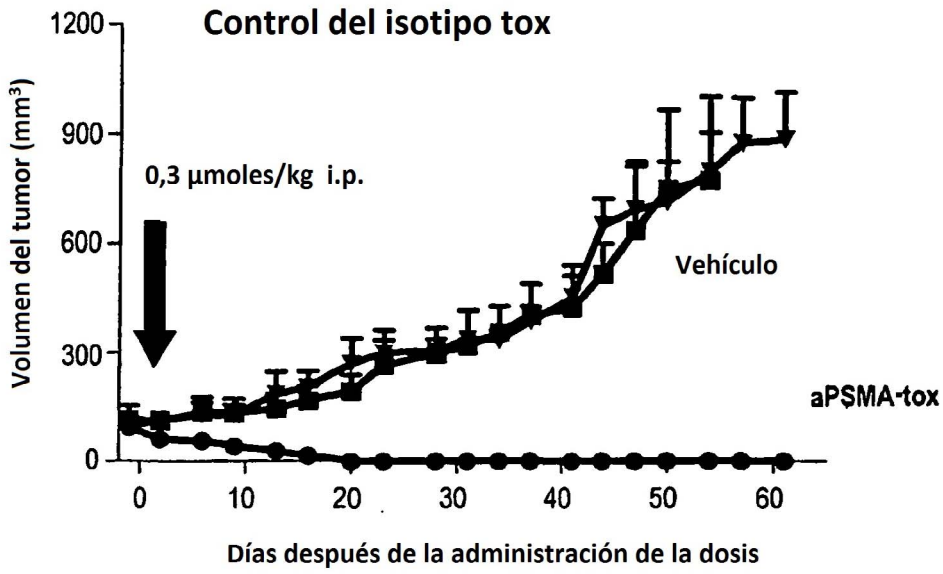


Fig. 18

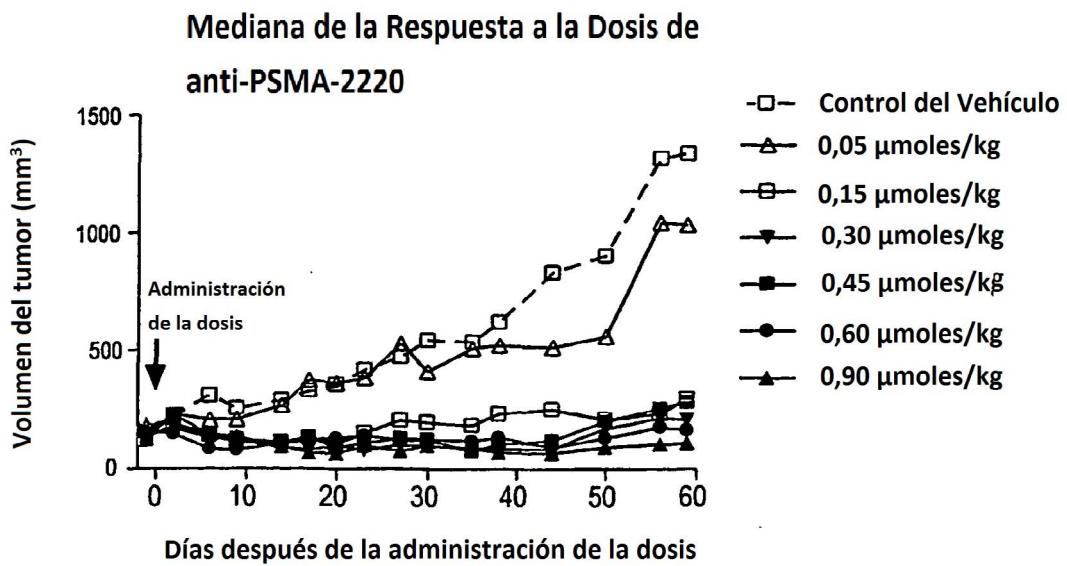


Fig. 19

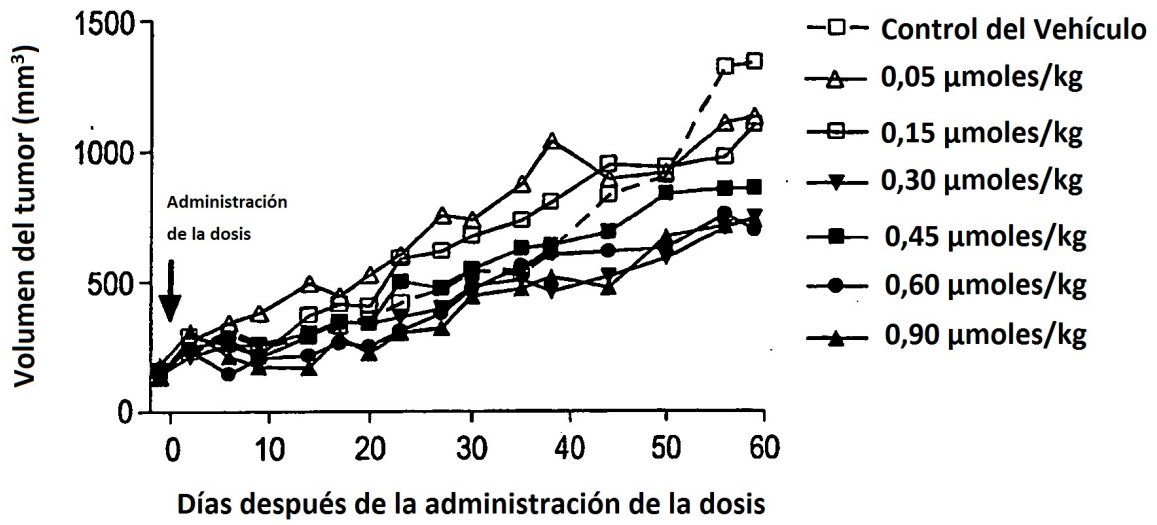


Fig. 20

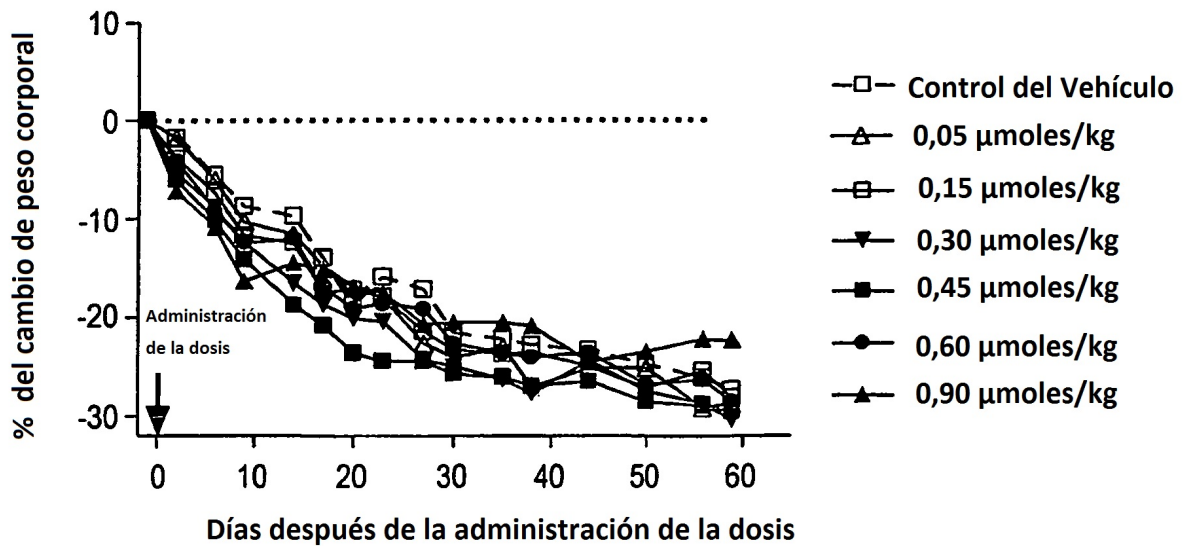


Fig. 21

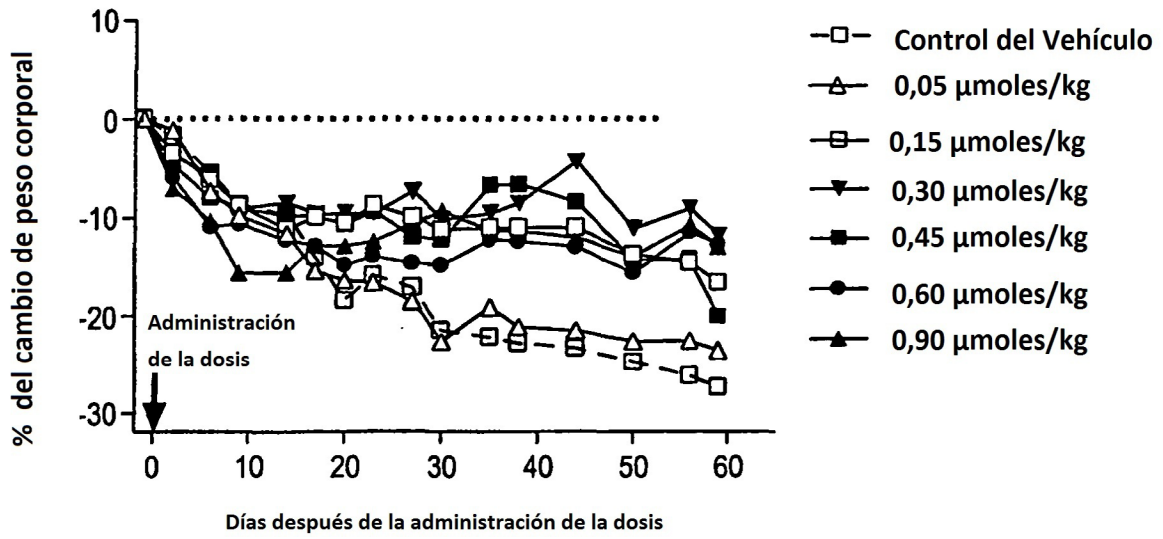


Fig. 22

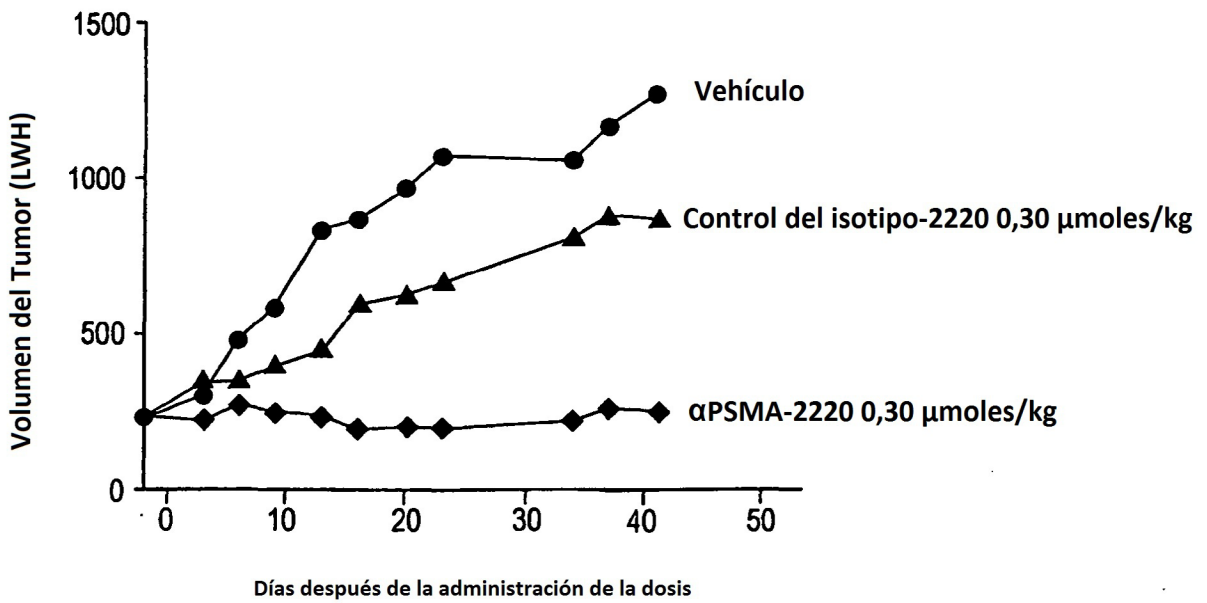


Fig. 23

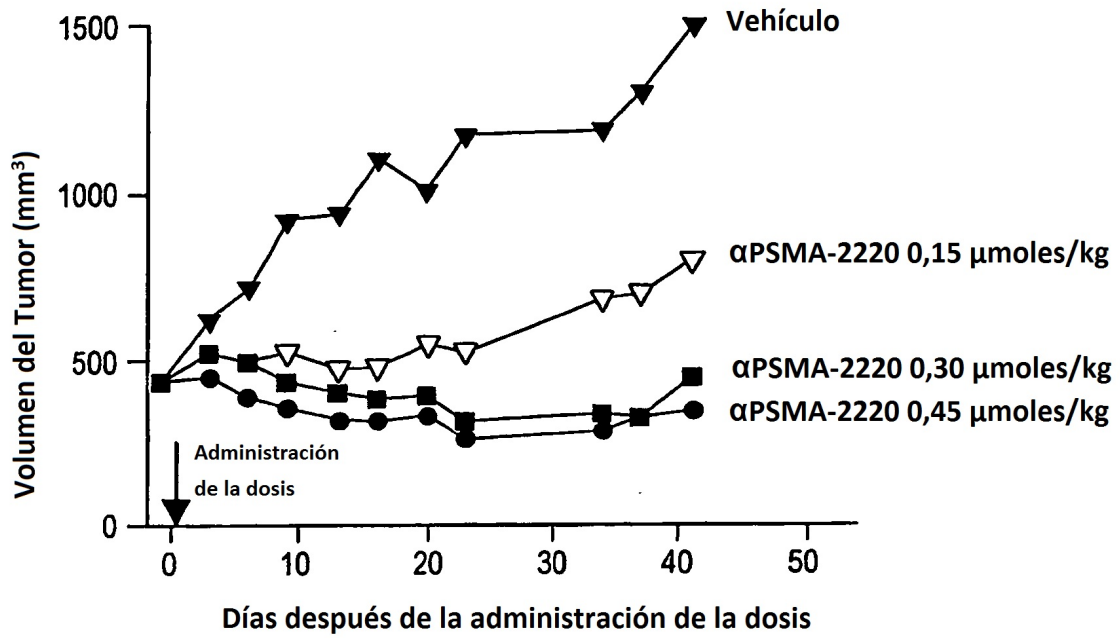


Fig. 24