



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 846**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00950674 .2**

86 Fecha de presentación : **26.07.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1210374**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

54

Título: **Anticuerpos monoclonales humanos para antígeno prostático específico.**

30

Prioridad: **29.07.1999 US 146285 P**
12.10.1999 US 158759 P
09.03.2000 US 188087 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

73

Titular/es: **MEDAREX, Inc.**
P.O. Box 953, 1545 Route 22 East
Annandale, New Jersey 08801-0953, US

72

Inventor/es: **Deo, Yashwant;**
Graziano, Robert;
Hudson, Debra;
Tino, William, T. y
Holmes, Eric, H.

74

Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 277 846 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales humanos para antígeno prostático específico.

5 **Contexto de la invención**

El cáncer de próstata es un cáncer altamente frecuente y una causa principal de morbilidad y mortalidad entre los hombres. Entre los tratamientos para el cáncer de próstata se incluyen cirugía, hormonas, radiación y quimioterapia. Existe un tratamiento poco efectivo para la enfermedad metastásica de próstata, y por lo tanto la identificación de genes y/o productos de gen que representan marcadores de pronóstico y diagnóstico precisos, así como los objetivos de una terapia resultan muy críticos. El antígeno prostático específico (PSA) es uno de los marcadores de cáncer, cuyos valores son útiles en el diagnóstico clínico y técnica de cáncer de próstata. Sin embargo PSA no puede diferenciar la hiperplasia prostática benigna (BPH) de prostatitis o cáncer de próstata en el rango de 4-10 ng/ml, por lo que se necesita un análisis citológico y/o histológico para confirmar el diagnóstico adecuado. (9).

El antígeno de membrana prostático específico (PSMA) es un aminoácido 750, tipo II glicoproteína transmembrana de aproximadamente 110 kK que tiene 54% homología con el receptor transferrin. PSM^r es una forma de PSMA unida alternativamente que se localiza en el citoplasma. PSMA tiene tres dominios estructurales, que incluye un dominio intracelular de 19 aminoácidos, un dominio de transmembrana de 24 aminoácidos, y un dominio extracelular de 707 aminoácidos. La proteína PSMA demuestra neurocarboxipeptidasa y actividad de hidrolasahidrolasa de ácido fáltico, y por lo tanto puede estar involucrada en la regulación neuroendocrina de crecimiento y diferenciación de próstata (7).

Estudios de expresión de PSMA indican que representa un marcador nuevo que se expresa predominantemente por células epiteliales prostáticas. Además, la expresión de PSMA aumenta en cáncer de próstata, especialmente en carcinomas refractorios (8, 11) de hormonas y metástasis no muy diferenciados. Por consiguiente, PSMA representa un diagnóstico, pronóstico y objetivo terapéutico valioso en el cáncer de próstata. Expresión de bajo nivel de PSMA también se ha observado en tejidos extraprostáticos como el intestino delgado, glándula salival, mucosa duodenal, tubos renales proximales y cerebro (11).

PSMA en el cerebro está incluido en la conversión del neurotransmisor NAAG a HAA y glutamato libre, que puede ser importante en la patogénesis de desórdenes como esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, mal de Alzheimer y esquizofrenia (12). La expresión PSMA también se observa en células endoteliales de vasos capilares en áreas peritumorales y endotumorales de ciertas enfermedades, incluyendo carcinomas de célula renal y carcinomas de colon, pero no en vasos sanguíneos de tejidos normales, lo que sugiere que su expresión podría también estar relacionada con angiogénesis de tumor (11).

WO 97/35616 describe anticuerpos monoclonales que se enlazan con el dominio extracelular de antígeno de membrana prostático específico (PSMA) y métodos para usar tales anticuerpos en diagnóstico y tratamiento de cáncer.

Vaughan, T.J. *et al.*, Nature Biotechnology 16(6); 535-539 (1998) y Brüggemann, M. y Neuberger, M.S., Immunology Today 17(8); 391-397 (1996) describen estrategias para producir anticuerpos en ratones transgénicos.

Curnow, R.T, Cancer Immunology and Immunotherapy 45; 210-215 (1997) describe el uso de CD64 dirigido a inmunoterapia en el tratamiento de cáncer. Curnow empleó los anticuerpos humanizados biespecíficos MDX-447 (Fab humanizado anti-CD64 x Fab humanizado anti-EGFR) y MDX-H210 (Fab humanizado antiCD64 x Fab anti-HER2/neu).

Resumen de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanos aislados que específicamente se enlazan con antígeno de membrana prostático específico (PSMA) con una constante de afinidad de al menos $10^7 M^{-1}$, así como composiciones que contienen un anticuerpo o una combinación de tales anticuerpos. El anticuerpo humano se caracteriza por enlazarse con PSMA con una constante de afinidad de al menos $10^7 M^{-1}$, teniendo la habilidad para transmitir citolisis de una célula que expresa PSMA (*in vitro*) en la presencia de células efectoras humanas (por ejemplo, células polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y células dendríticas) en una concentración de $10 \mu g/ml$ o menos y siendo capaces de transmitir citolisis celular que expresen PSMA por células efectoras humanas en un IC_{50} de 1×10^{-7} o menos *in vitro*. Como consecuencia, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden usarse como agentes de diagnóstico o terapéuticos *in vivo* e *in vitro*.

Anticuerpos humanos aislados de la invención comprenden varios isotipos de anticuerpo, con IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, e IgE. Normalmente, incluyen isotipos IgG1 (por ejemplo, IgG1k) e IgM. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4). En una realización, los anticuerpos humanos son anticuerpos humanos recombinantes. En otra realización, los anticuerpos humanos se producen por hibridoma que incluye una células B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen humano de cadena pesada y un transgen humano de cadena ligera fusionados en una célula inmortalizada. Los anticuerpos pueden producirse por hibridomas aquí referidos como 4A3, 7F12, 8A11, 16F9 Y 8C12.

ES 2 277 846 T3

En otra realización, anticuerpos humanos anti-PSMA de la presente invención se caracterizan por una o más de las siguientes propiedades:

- a) especificidad para el PSMA;
- b) una afinidad de enlace con PSMA con una constante de afinidad de al menos 10^7M^{-1} , preferentemente alrededor de 10^9M^{-1} y más preferentemente, entre 10^{10}M^{-1} y 10^{11}M^{-1} o más.
- c) una constante de asociación (K_{assoc}) con PSMA de la menos 103, más preferentemente sobre 104 y más preferentemente aproximadamente $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.
- d) una constante de disociación (K_{dis}) de PSMA de aproximadamente 10^{-3}s^{-1} , preferentemente alrededor de 10^{-4}s^{-1} , preferentemente, 10^{-5}s^{-1} , y más preferentemente 10^{-6}s^{-1} ;
- e) la habilidad para opsonizar una célula que expresa PSMA; o
- f) la habilidad para inhibir crecimiento y/o transmitir fagocitosis de células que expresan PSMA (por ejemplo, células de tumor) en la presencia de células efectoras humanas en una concentración de aproximadamente $10\ \mu\text{g/ml}$ o menos (por ejemplo, *in vitro*).

Ejemplos de células de tumor que pueden ser dirigidas por los anticuerpos humanos de la invención incluyen, pero no se limitan a células prostáticas, renales y de colon.

- g) Anticuerpos humanos aislados de la invención se enlazan con antígeno PSMA con una constante de afinidad de al menos 10^7M^{-1} , preferentemente alrededor de 10^8M^{-1} , preferentemente sobre 10^9M^{-1} y más preferentemente, entre 10^{10}M^{-1} y 10^{11}M^{-1} o más fuertes y son capaces de inhibir crecimiento y/o transmitir fagocitosis y matar células que expresan PSMA por células efectoras humanas, por ejemplo, células polimorfonucleares (PMNs), monocitos y macrófagos, con un IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-7}\text{M}$ o menos, o en una concentración de aproximadamente $10\ \mu\text{g/ml}$ o menos (por ejemplo, *in vitro*).

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de un anticuerpo monoclonal humano de la invención. Por consiguiente, los vectores de expresión recombinantes pueden incluir ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de la invención, las células huésped pueden transfectarse con tales vectores, y los anticuerpos de la invención pueden hacerse por cultivo de estas células huésped.

Se pueden obtener B-células aisladas de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que son capaces de expresar varios isotipos (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM) de anticuerpos monoclonales humanos que específicamente se enlazan con PSMA. Preferentemente, las células B aisladas obtenidas a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que ha sido inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA y/o células que expresan PSMA. Preferentemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, tiene un genoma que comprende un transgen humano de cadena pesada y un transgen humano de cada ligera. Las células B aisladas son inmortalizadas para proporcionar una fuente (p. ej. un hibridoma) de anticuerpos monoclonales humanos para PSMA.

De este modo, la presente invención también proporciona un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos que específicamente se enlazan con PSMA. En una realización, el hibridoma incluye una célula B que se obtiene a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen humano de cadena pesada y un transgen humano de cada ligera fusionado con una célula inmortalizada. El animal no humano transgénico puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA y/o células que expresan el PSMA para generar hibridomas que producen anticuerpos. Los hibridomas particulares incluyen 4A3, 7F12, 8A11, 16F9 Y 8C12.

En otro aspecto, la invención proporciona un animal no humano transgénico, como un ratón transgénico (también aquí referido con un "HuMab"), que expresa un anticuerpo monoclonal humano como aquí se define que específicamente se enlaza con PSMA, que tiene un genoma que comprende un transgen humano de cadena pesada y un transgen humano de cada ligera. En una realización particular, el animal no humano transgénico, es un ratón transgénico. El animal no humano transgénico puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA y/o células que expresan el PSMA. Preferentemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo, el ratón transgénico, es capaz de producir varios isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para PSMA (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM) sufriendo recombinación V-D-J e intercambio de isotipo. El intercambio de isotipo puede darse por, por ejemplo, intercambio de isotipo clásico o no clásico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales como aquí se definen que específicamente reaccionan con PSMA. El método incluye la inmunización de un animal no humano transgénico, p. ej. un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen humano de cadena pesada y un transgen humano de cada ligera, con una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA y/o células que expresan el PSMA. Posteriormente se obtienen células B (por ejemplo, células B esplénicas) del animal y se fusio-

nan con células mieloma para formar células hibridoma inmortales, células que segregan anticuerpos monoclonales humanos contra PSMA.

5 Anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA aislados de la invención, o antígenos que se enlazan con porciones de los mismo, puede derivarse o unirse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (p. ej. un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo o porción que se enlaza con antígeno puede estar funcionalmente unida (por ejemplo, por unión química, fusión genética, asociación no covalente o similares) a una o más entidades moleculares, como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico). De este modo, en otro aspecto, la presente invención ofrece o muestra una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende al menos 10 una primera especificidad de enlace para PSMA, es decir, un anticuerpo monoclonal humano como aquí se define y una segunda especificidad de enlace para un receptor Fc, por ejemplo un receptor humano Fc γ RI o un receptor humano Fc α .

15 Las moléculas multiespecíficas de la invención también incluyen moléculas trispecíficas, tetraespecíficas y otras moléculas multiespecíficas. En una realización la moléculas multiespecífica incluye una porción de factor anti-mejora (EF), por ejemplo, una molécula que se enlaza con una proteína superficial incluida en la actividad citotóxica. En una realización particular, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención comprenden al menos un anticuerpo, un fragmento del mismo (por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla). En una realización particular, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo completamente humano o una porción del mismo, o un anticuerpo "quimérico" o "humanizado" o una porción del mismo (por ejemplo, tiene una región variable, o al menos una complementariedad que determina una región (CDR), derivada de un anticuerpo no humano (por ejemplo, murina) con una porción remanente (o porciones) que es humana en origen.

25 En una realización, el al menos un anticuerpo o fragmento del mismo de la molécula biespecífica o multiespecífica se enlaza con un receptor Fc, con un receptor humano IgG, pl eje, un receptor Fc-gamma (Fc γ R), como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Y Fc γ RIII (CD16). Un receptor Fc γ preferente es el de receptor de mayor afinidad, Fc γ RI. Sin embargo, otros receptores Fc, como receptores humanos IgA (por ejemplo, Fc α RI) también se pueden tratar. El receptor Fc está preferentemente localizado en la superficie de una célula efectora, por ej., un microcito, macrófago o una célula polimorfonuclear activada. En una realización preferente, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se enlazan con un receptor Fc en un punto que es distinto del punto de enlace de la inmunoglobulina (por ejemplo, IgG o IgA) del receptor. Por lo tanto, el enlace de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no se bloquea por los 30 niveles fisiológicas de inmunoglobulinas.

35 En otro aspecto, la presente invención muestra un anticuerpo humano anti-PSMA, o un fragmento del mismo, conjugado con una molécula terapéutica, por ejemplo, un fármaco citotóxico, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento de la misma, un radioisotopo, o un fármaco anti-cáncer de pequeña molécula.

40 Se pueden proporcionar células efectoras específicas de objetivo que comprende una célula efectora que expresan un receptor Fc, por ejemplo, un macrófago o una célula PMN activada, y una molécula biespecífica o multiespecífica de la invención.

45 En otro aspecto la presente invención proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas y de diagnóstico, que constan de un portador farmacéuticamente aceptable y al menos un anticuerpo monoclonal humano de la invención que específicamente se enlaza con PSMA. En una realización, la composición consta de una combinación de los anticuerpos humanos o porciones de enlace con antígeno de los mismos, preferentemente cada uno de ellos enlazándose con un epítopo distinto. Por ejemplo, una composición farmacéutica que consta de un anticuerpo monoclonal humano que logra matar de modo efectivo las células objetivo en la presencia de células efectoras puede combinarse con otro anticuerpo monoclonal humano que inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA. Por lo tanto, la combinación proporciona múltiples terapias adaptadas para proporcionar el máximo beneficio terapéutico. 50 Las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas que están formadas por una combinación de al menos un anticuerpo monoclonal humano de la invención, y al menos una molécula biespecífica o multiespecífica de la invención, también se incluyen en el ámbito de la invención.

55 Incluso en otro aspecto, la invención proporciona un método *ex vivo* para inhibir la proliferación y/o diferenciación de una célula que expresa PSMA inhibiendo el crecimiento y/o induciendo fagocitosis y/o matando células objetivo por células efectoras humanas, como células polimorfonucleares humanas (PMNs), monocitos o macrófagos, usando un anticuerpo, o un anticuerpo biespecífico o multiespecífico de la invención. En una realización, le método consta del contacto de una célula que expresa PSMA *in vitro* con uno o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos de la invención, o una porción de enlace de antígeno del mismo, en la presencia de una célula efectora humana. El método puede emplearse en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo* (por ejemplo, cultivos que comprenden células que constan de PSMA y células efectoras). Por ejemplo, una muestra que contenga células que expresan PSMA y células efectoras puede cultivarse *in vitro*, y combinarse con un anticuerpo de la invención, o una molécula biespecífica o multiespecífica de la invención. 60

65 Como fines ejemplares, los métodos *in vivo*, el anticuerpo, la porción de enlace de antígeno del mismo (o una molécula biespecífica o multiespecífica de la invención) pueden administrarse a un sujeto humano que sufre de una enfermedad relacionada con PSMA, como cáncer de próstata, riñón o colon, de modo que se produzca inhibición de crecimiento, fagocitosis y/o muerte de células que expresan PSMA. El sujeto puede ser adicionalmente tratado

con un agente que modula, es decir, mejora o inhibe, la expresión o actividad de receptor Fc, un receptor Fc α o un receptor Fc γ , por ejemplo tratando al sujeto con citoquina. Las citoquinas preferentes para la administración durante el tratamiento con la molécula biespecífica o multiespecífica incluyen factor estimulador de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis de tumor (TNF).

Las composiciones de anticuerpos monoclonales humanos aislados de la invención también se pueden administrar en combinación con otras terapias conocidas, por ejemplo, terapias anti-cáncer. Por lo tanto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal humano o molécula biespecífica o multiespecífica como aquí se describe en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades tumorigénicas. Tales enfermedades tumorigénicas incluyen cánceres de próstata, riñón y colon.

Incluso en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar *in vitro* la presencia de antígeno PSMA en una muestra, por ejemplo, para diagnosticar una enfermedad relacionada con PSMA. En una realización, esto se logra contactando una muestra a ser testada, junto con una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano de la invención, o una molécula biespecífica o multiespecífica, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y PSMA. L

La formación compleja posteriormente se detecta (por ejemplo, mediante ELISA) en ambas muestras, y cualquier diferencia estadísticamente relevante para la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de antígeno PSMA en la muestra del test.

Otras características y ventajas se mostrarán más claras con la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de la inserción objetivo de un neo cassette en el Pequeño punto del exón μ .

El Panel A muestra la estructura genómica del locus μ , donde las cajas rellenas representan los exones μ .

El Panel B es un diagrama esquemático del vector de selección de objetivo CmD.

El Panel C muestra el locus μ objetivo del cual el neo cassette se ha insertado en μ .

La Figura 2 es una descripción esquemática de la producción de anticuerpos monoclonales humanos IgG1K (HuMabs) contra PSMA, HER2/neu y CD89 (Fc α R) inmunizando ratones transgénicos.

La Figura 3 muestra una molécula biespecífica humana, 14.1 x 8C12, que se enlaza con CD89(Fc α R) y con PSMA. La molécula contiene un fragmento de anticuerpo anti-CD89 F'ab (derivado del anticuerpo monoclonal humano anti-CD89, 14.1) químicamente unido por enlace de disulfuro a un fragmento de anticuerpo anti-PSMA F'ab (derivado del anticuerpo monoclonal humano anti-PSMA, 8C12).

La Figura 4 muestra la reactividad de anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA con fracciones de membrana de células LNCaP y PC3 adenocarcinoma prostáticas humanas como se controló por ELISA. La absorción de los antecedentes a 405 nm fue 0.05.

La Figura 5 muestra el enlace de anticuerpos humanos anti-PSMA con células de tumor LNCaP y PC3 como se controló por análisis de flujo citométrico. Histograma Verde - enlace con células LNCaP; histograma Rosa - enlace con células PC3; histograma Púrpura - IgG1 humano irrelevante. Panel A, anticuerpo 4A3; Panel B, anticuerpo 7F12; Panel C, anticuerpo 8A11; Panel E, anticuerpo 16F9.

La Figura 6 es un gráfico que muestra el enlace de la molécula 14.1 x 8C12 biespecífica mostrada en la Figura 3 con células LNCaP que expresan PSMA como una concentración de molécula biespecífica de función. El enlace se midió por medio de intensidad fluorescente.

La Figura 7 es un gráfico que muestra el enlace de la molécula 14.1 x 8C12 biespecífica mostrada en la Figura 3 con células U937 que expresan CD89 como una concentración de molécula biespecífica de función. El enlace se midió por medio de intensidad fluorescente.

La Figura 8 muestra inmunoprecipitación de PSMA de lisatos detergentes celulares de LNCaP empleando anticuerpos específicos anti-PSMA humanos. Ruta 1, lisato celular LNCaP; rutas 2 a través de 7, inmunoprecipitación con los siguientes anticuerpos: IgG1 humano irrelevante, 4A3, 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9, respectivamente. Los complejos inmunes se analizaron por electroforesis de gel SDS y Western blotting usando el anticuerpo de murina anti-PSMA 4D8.

La Figura 9 demuestra el efecto de la denaturación por calor de PSMA aislado en enlace de anticuerpo humano anti-PSMA.

La Figura 10 muestra un análisis de enlace competitivo de anticuerpos humanos anti-PSMA, tales y como se midieron por medio de citometría de flujo. El pretratamiento se llevó a cabo con los siguientes anticuerpos: IgG1 humano irrelevante (histograma púrpura sólido); 4A3 (histograma amarillo); 7F12 (histograma verde); 8A11 (histograma azul); 8C12 (histograma rosa); y 16F9 (histograma naranja). Panel A, FITC 4A3; Panel B, FITC 7F12; Panel C, FITC 8A11; y Panel D, FITC 8C12.

La Figura 11 muestra un análisis de enlace competitivo de anticuerpos humanos anti-PSMA contra anticuerpos conformacionales anti-PSMA de murina, tales y como se midieron por medio de citometría de flujo. El pretratamiento se llevó a cabo con los siguientes anticuerpos: IgG1 humano irrelevante (histograma púrpura sólido); 4A3 (histograma amarillo); 7F12 (histograma verde); 8A1 1 (histograma azul); 8C12 (histograma rosa); y 16F9 (histograma naranja). Panel A, FITC IG9; Panel B, FITC 3C6; y Panel C, FITC 4D4.

La Figura 12, Panel A es un gráfico que muestra citotoxicidad celular dependiente de un anticuerpo mediado por monocito (ADCC) de células que expresan PSMA por medio de la molécula biespecífica 14.1 x 8C12 mostrada en la Figura 3 como una concentración de molécula biespecífica de función. Los resultados se midieron como un porcentaje de lisados de células específicas sin usar ningún inhibidor añadido, 50 $\mu\text{g/ml}$ libres de anti-FcR α R (14.1) F(ab')₂ y 50 $\mu\text{g/ml}$ libres de anti-Fc γ RI(H22) F(ab')₂; Panel B es un gráfico que muestra citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediado por monocito (ADCC) de células LNCaP a través de la molécula biespecífica 14A8 x 8C12 y anticuerpo monoclonal 8C12 en un radio efector:objetivo de 100:1; Panel C es un gráfico que muestra citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediado por monocito (ADCC) de células LNCaP a través de la molécula biespecífica 14A x 8C12 en la ausencia de inhibidor o en la presencia de cantidades excesivas de 14A8 F(ab')₂ o (H22) F(ab')₂, y en un radio efector:objetivo de 100:1.

La Figura 13, Panel A es un gráfico que muestra citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediado por neutrófilo (ADCC) de células que expresan PSMA a través de la molécula biespecífica 14A x 8C12 mostrada en la Figura 3 como una concentración de molécula biespecífica de función. Los resultados se midieron como un porcentaje de lisados de células específicas sin usar ningún inhibidor añadido, 25 $\mu\text{g/ml}$ libres de anti-FcR α R (14.1) F(ab')₂ y 25 $\mu\text{g/ml}$ libres de anti-Fc γ RI(H22) F(ab')₂; Panel B es un gráfico que muestra citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediado por neutrófilo (ADCC) de células LNCaP a través de la molécula biespecífica 14A8 x 8C12 o H22 F(ab')₂, y en un radio efector:objetivo de 200:1

La Figura 14, Panel A es un gráfico que muestra citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediado por sangre pura (ADCC) de células que expresan PSMA a través de la molécula biespecífica 14A x 8C12 mostrada en la Figura 3 como una concentración de molécula biespecífica de función. Los resultados se midieron como un porcentaje de lisados de células específicas sin usar ningún inhibidor añadido, 25 $\mu\text{g/ml}$ libres de anti-FcR α R (14.1) F(ab')₂ y 25 $\mu\text{g/ml}$ libres de anti-Fc γ RI(H22) F(ab')₂; Panel B es un gráfico que muestra citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediado por sangre pura (ADCC) de células LNCaP a través de la molécula biespecífica 14A8 x 8C12 en la ausencia de inhibidor o en la presencia de cantidades excesivas de 14A8 F(ab')₂ o H22 F(ab')₂.

La Figura 15 es un gráfico que muestra fagocitosis mediada por la molécula biespecífica (14A x 8C12) de PSMA que expresa (LnCAP) células por macrófagos derivados de monocito (MDM) (círculos). Los resultados se midieron como un porcentaje de fagocitosis tanto en la presencia como en la ausencia de exceso de anticuerpo 14.1 como un inhibidor (cuadros) y anticuerpo H22 como un control (rombos).

La Figura 16 es un gráfico que muestra fagocitosis mediada por la molécula biespecífica (14A x 8C12) y fagocitosis mediada por anticuerpo (8C12) de célula de tumor por macrófagos derivados de monocito (MDM).

La Figura 17 es un gráfico que muestra fagocitosis mediada por la molécula biespecífica (14A x 8C12) de células de tumor LnCAP por macrófagos derivados de monocito (MDM) (círculos). El recuadro es un gráfico que muestra fagocitosis mediada por la molécula biespecífica 14A x 8C12 (1 $\mu\text{g/ml}$) en la presencia de cantidades excesivas de 14A8 F(ab')₂ o H22 F(ab')₂.

Descripción detallada de la invención

La invención presente proporciona terapias basadas en anticuerpos nuevos para el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades caracterizadas por la expresión, particularmente por la sobre-expresión, de antígeno de membrana prostático específico (aquí referido como "PSMA") y/o moléculas relacionadas. Las terapias de la invención emplean anticuerpos monoclonales humanos aislados, o porciones de enlace de antígenos de los mismo, que se enlazan con un epítipo presente en PSMA. En una realización, los anticuerpos humanos se producen en un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, capaz de producir isotipos múltiples de anticuerpos monoclonales humanos (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sufriendo recombinación V-D-J y cambio de isotipo. Por consiguiente, varios aspectos de la invención incluyen anticuerpos y preparaciones farmacéuticas de los mismos, así como animales transgénicos no humanos, y células B e hibridomas para hacer tales anticuerpos monoclonales. La invención también engloba métodos para usar los anticuerpos de la invención para detectar una célula que expresa PSMA o un receptor de factor de crecimiento reactivo cruzado o relacionado, o para inhibir el crecimiento, diferenciación y/o capacidad de movimiento espontáneo de una células que expresa PSMA, *in vitro*.

Con el fin de que la presente invención se comprenda más fácilmente, primero se definen. Se establecen términos adicionales a lo largo de la descripción detallada.

El término “antígeno de membrana prostático específico”, “PSMA”, o “antígeno PSMA” aquí se emplean de manera intercambiable, e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especies de PSMA humano. En una realización preferente, el enlace de un anticuerpo de la invención con el antígeno PSMA inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA (por ejemplo, una célula tumoral). En otra realización preferente, el enlace de un anticuerpo de la invención con el antígeno PSMA logra fagocitosis celular efectora y/o mata las células que expresan PSMA.

Como aquí se emplea, el término “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que consta al menos de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por medio de enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada consta de una región variable de cadena pesada (aquí abreviado como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está formada por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera consta de una región variable de cadena ligera (aquí abreviado como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera consta de un único dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden además estar subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), distribuidas en intervalos con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de esquema o marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, colocados de terminal amino a terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden transmitir el enlace de la inmunoglobulina con tejidos huéspedes o factores, incluyendo varias células del sistema inmunológico (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema complemento clásico.

El término “porción de enlace antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”), como aquí se emplea, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantienen la habilidad para enlazarse específicamente con un antígeno (por ejemplo, PSMA). Se ha demostrado que la función de enlace antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de enlace englobados en el término “porción de enlace antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios VL, VH, CI y CHI; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que consta de dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd consistente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv consistente en los dominios VL y VH de un solo brazo del anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, a pesare de los dos dominios de fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlace sintético que les permite estar hechos como una simple cadena de proteínas en la cual el par de regiones VL y VH que forman moléculas monovalentes (conocidas como cadena ligera Fv (scFv); ver, 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 de cadena sencilla también pretenden estar incluidos en el término “porción de enlace antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen a través de técnicas convencionales conocidas por expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para su utilidad del mismo modo que anticuerpos intactos.

El término “molécula biespecífica” pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, un péptido o complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades diferentes de enlace que se enlazan con, o interactúan con (a) un antígeno de superficie celular y (b) un receptor Fc sobre la superficie de una célula efectora. El término “molécula multiespecífica” o “molécula heteroespecífica” pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, un péptido o complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades diferentes de enlace que se enlazan con, o interactúan con (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor Fc sobre la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. Como consecuencia, la invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas, y otras moléculas multiespecíficas que se dirigen a los antígenos de superficie celular, como PSMA, y a receptores Fc sobre células efectoras. El término “anticuerpos biespecíficos” además incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlace que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos puntos de enlace de antígeno (ver por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121:1123).

Como aquí se emplea, el término “heteroanticuerpos” se refiere a dos o más anticuerpos, fragmentos de enlace de anticuerpos (por ejemplo, Fab), derivados de los mismos, o regiones de enlace de antígeno unidas, al menos dos de los cuales tienen especificidades diferentes. Estas especificidades diferentes incluyen una especificidad de enlace para un receptor Fc sobre una célula efectora, y una especificidad de enlace para un antígeno o epítipo sobre una célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral.

El término “anticuerpo humano”, como aquí se emplea, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea de gérmenes humanos. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea de gérmenes humanos (por ejemplo, mutaciones introducidas al azar o mutagénesis específicas de un punto *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como aquí es empleado, no pretende

ES 2 277 846 T3

incluir anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea de gérmenes de otra especie mamífera, como un ratón, han sido injertadas en secuencias de marco humano.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” como aquí se emplean en referencia a la preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencillas. Una composición de anticuerpo monoclonal manifiesta una sola especificidad y afinidad de enlace para un epítoto particular. Como consecuencia, el término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que manifiestan una única especificidad de enlace que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea de gérmenes humanos. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera fusionados con una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante”, como aquí se emplea, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o se aíslan por medios recombinantes, como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humanos (descritos con más detalle en la Sección I, a continuación); anticuerpos expresados que usan un vector de expresión recombinante transfectedo a una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinantes y combinatorios, o anticuerpos que se preparan, expresan, crean o se aíslan por otros medios que incluye empalmar secuencias de gen de inmunoglobulina humano con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea de gérmenes humanos. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales anticuerpos humanos recombinantes están sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se emplea un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras se derivan y se relacionan con las secuencias de la línea de gérmenes humanos VH y VL, naturalmente no existen dentro del repertorio de línea de gérmenes de anticuerpo humano *in vivo*.

Como aquí se emplea, un “anticuerpo heterólogo” se define en relación con organismo no humano transgénico que produce tal anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácido o una secuencia de ácido nucleico codificadora correspondiente a la que se encuentra en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico, y generalmente de una especie diferente a la del animal no humano transgénico.

Como aquí se emplea, un “anticuerpo heterohíbrido” se refiere a un anticuerpo que tiene una cadena ligera y una cadena pesada de orígenes distintos. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada a una cadena ligera de murina es un anticuerpo heterohíbrido. Ejemplos de anticuerpos heterohíbridos incluyen anticuerpos quiméricos y humanizados, que se describirán a continuación.

Un “anticuerpo aislado”, como aquí se emplea, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que específicamente se enlaza con PSMA está sustancialmente libre de anticuerpos que específicamente se enlazan con antígenos diferentes a PSMA). Un anticuerpo aislado que específicamente se enlaza con un epítoto, isoforma o variante de PSMA humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies PSMA). Además, un anticuerpo aislado puede estar lo suficientemente libre de otro material celular y/o sustancia química. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales “aislados” con diferentes especificidades se combinan en una composición bien definida.

Como aquí se emplea, “enlace específico” se refiere a un enlace de anticuerpo con un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se enlaza con una afinidad de al menos aproximadamente $10^7 M^{-1}$, y se enlaza con un antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces superior a su afinidad para enlazarse con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, casein) diferente al antígeno predeterminado o un antígeno muy relacionado. Las locuciones “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” aquí se emplean de manera intercambiable con el término “un anticuerpo que se enlaza específicamente con un antígeno”.

Como aquí se emplea, el término “alta afinidad” para un anticuerpo IgG se refiere a una afinidad de enlace de al menos aproximadamente $10^7 M^{-1}$, preferentemente al menos alrededor de $10^9 M^{-1}$, preferentemente al menos alrededor de $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ o más, por ejemplo, $10^{13} M^{-1}$ o más. Sin embargo, el enlace de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpo.

Por ejemplo, enlace de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a la afinidad de enlace de al menos aproximadamente $1 \times 10^7 M^{-1}$.

El término “ K_{assoc} ”, como aquí se emplea, pretende referirse a la constante de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

El término “ K_{dis} ”, como aquí se emplea, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

ES 2 277 846 T3

Como aquí se emplea, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG) que se codifica por genes de región constante de cadena pesada.

5 Como aquí se emplea “intercambio de isotipo” se refiere al fenómeno por el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase Ig a otras de las clases Ig.

10 Como aquí se emplea, “isotipo no cambiado” se refiere a la clase isotípica de cadena pesada que es introducida cuando no tiene lugar el cambio de isotipo; el gen CH que codifica el gen funcionalmente recolocado VDJ. El cambio de isotipo clásico tiene lugar por hechos de recombinación que incluyen al menos una región de secuencia de cambio en el transgen. Cambio de isotipo no clásico puede darse, por ejemplo, por recombinación homóloga entre σ_{μ} humano y Σ_{μ} humano (eliminación asociada δ). Mecanismos de intercambio alternativos y no clásicos, como una recombinación intertransgen y/o intracromosomal, entre otras, pueden darse y efectuar intercambio de isotipo.

15 Como aquí se emplea, el término “secuencia de intercambio” se refiere a esas secuencias de ADN responsables de la recombinación de cambio. Un “donante de intercambio”, normalmente una región de intercambio μ , será 5' (es decir, hacia arriba), de una región de constructo que se borrará durante la recombinación de intercambio. La región del “receptor de intercambio” estará entre la región del constructo que se va a borrar y la región constante de sustitución (por ejemplo, γ , ϵ , etc). Como no hay un punto específico donde la recombinación ocurra siempre, la secuencia genética final normalmente no se podrá predecir desde el constructo.

20 Como aquí se emplea, “patrón de glicosilación” se define como el patrón de unidades de carbohidrato que están unidos a una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina. Un patrón de glicosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse por ser sustancialmente similar a los patrones de glicosilación que se dan naturalmente en anticuerpos producidos por las especies del animal transgénico no humano, cuando un experto en la técnica reconocería el patrón de glicosilación del anticuerpo heterólogo por ser más similar a dicho patrón de glicosilación en la especie de animal transgénico no humano que en la especie a partir de la cual los genes CH del transgen se derivaron.

30 El término “que ocurre naturalmente” como aquí se emplea aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que pueden aislarse de una fuente en la naturaleza y que no han sido modificados intencionalmente por en el hombre en un laboratorio. En este caso se puede decir que dicha secuencia ocurre naturalmente.

35 El término “desordenado” o “configuración de línea de gérmenes” como aquí se emplea en referencia a un segmento V se refiere a la configuración donde el segmento v no está recombinado para que inmediatamente sea un segmento adyacente a D o J.

40 El término “molécula de ácido nucleico”, como aquí se emplea, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de trenzado sencillo o de doble trenzado, pero preferentemente es ADN de doble trenzado.

45 El término “molécula de ácido nucleico aislada”, como aquí se emplea en referencia a los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos (por ejemplo, VH, VL, CDR3) que se enlazan con PSMA, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la cual las secuencias nucleótidas que codifican el anticuerpo o parte del anticuerpo están libres de otras secuencias nucleótidas que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos que se enlazan con antígenos diferentes a PSMA, que otras secuencias pueden naturalmente flanquear el ácido nucleico en ADN genómico humano.

50 Para ácidos nucleicos, el término “homología sustancial” indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean o comparan óptimamente, resultan idénticos, con las apropiadas inserciones o eliminaciones nucleótidas, en al menos aproximadamente 80% de los nucleótidos, normalmente al menos sobre 90% a 95%, y más preferentemente al menos aproximadamente 98% a 99.5% de los nucleótidos. De modo alternativo, la homología sustancial existe cuando los segmentos se hibridarán bajo condiciones selectivas de hibridación, con el complemento del trenzado.

60 La identidad porcentual entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % homología = # de posiciones idénticas/total # de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación de identidad porcentual entre las dos secuencias puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos a continuación.

65 La identidad porcentual entre dos secuencias nucleótidas puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La identidad porcentual entre dos secuencias nucleótidas o de aminoácido también puede determinarse usando un algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17), usando una tabla de residuo de peso PAM120, una pena de longitud de hueco de 12 y una pena de hueco de 4. Además, la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácido puede determinarse usando el algoritmo

ES 2 277 846 T3

Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970))8 que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

5 Las secuencias de ácido nucleico y proteína de la presente invención pueden además usarse como una “secuencia de consulta” para llevar a cabo una búsqueda contra las bases de datos públicas, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden llevar a cabo usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas nucleótidas BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, resultado = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias nucleótidas homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, resultado = 500, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul, *et al.* (1997) *Nucleic Acids. Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

20 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente pura o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está “aislado” o “resulta sustancialmente puro” cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas, por medio de técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino ISDS, ribeteado CsCl, cromatografía de columna, electroforesis de gel de agarosa y otros métodos bien conocidos en la técnica. Ver, F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

25 Las composiciones de la presente invención, aunque a menudo en una secuencia nativa (excepto para puntos de restricción modificada y similares), de cADN, genómicos o mezclas pueden mutarse de los mismos de acuerdo con técnicas estándar para proporcionar secuencias de genes. Para codificar secuencias, estas mutaciones pueden afectar la secuencia de aminoácido como se desea. En particular, secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de cambios V, D, J nativo, constantes y otras secuencias aquí descritas también se tienen en consideración (cuando “derivado” indica que una secuencia es idéntica o modificada de otra secuencia).

30 Un ácido nucleico está “operativamente unido” cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o procesador está operativamente unido con una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de transcripción, unidos operativamente significa que las secuencias de ADN que están siendo enlazadas están contiguas y, cuando se necesita unir dos proteínas que codifican regiones, contiguas y en un marco de lectura. Para secuencias de intercambio, unidos operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar recombinación de intercambio.

40 El término “vector”, como aquí se emplea, pretende referirse a la molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra ácido nucleico al cual se le ha enlazado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un circuito circular de ADN de doble trenzado en el cual segmentos adicionales de ADN pueden estar ligados. Otro tipo de vector es un vector viral, donde segmentos adicionales de ADN pueden estar ligados en el genoma viral. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped dentro de la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacteriales que tienen un origen bacteria de réplica y mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores mamíferos no episomales) pueden estar integrados dentro del genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están operativamente enlazados. Tales vectores aquí son referidos como “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante tienen a menudo la forma de plásmidos. En la presente descripción, “plásmido” y “vector” pueden usarse intercambiamente ya que el plásmido es la forma más común de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, como vectores virales (por ejemplo, virus defectuosos de réplica, adenovirus y virus asociados a adeno), que realizan funciones similares.

55 El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), como aquí se emplea, pretende referirse a una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula en objeto particular sino también a la progenie de tal célula.

60 Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones venideras debido a las influencias ambientales o de mutación, tal progenie puede que no sea, de hecho, idéntica a la célula matriz, pero aún así se incluirían en el ámbito del término “célula huésped” como aquí se emplea.

En las siguientes subsecciones se explican con detalle varios aspectos de la invención.

65 I. Producción de Anticuerpos Humanos para PSMA

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la invención pueden producirse por una variedad de técnicas, incluyendo metodología convencional de anticuerpo monoclonal, por ejemplo, la técnica estándar de hibridización celular somática de Kohler y Milstein, *Nature* 256:495 (1995). A pesar de que se prefieren los procedimientos de hibridización

celular somática, en principio, otras técnicas para producir anticuerpo monoclonal también pueden emplearse, por ejemplo, transformación oncogénica o viral de linfocitos B.

5 El sistema animal preferente para la preparación de hibridomas en el sistema de murina. La producción de hibridoma en el ratón es un proceso muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Las parejas de fusión (p. ej. células mieloma de murina) y procesos de fusión son también conocidos.

10 En una realización preferente, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PSMA pueden generarse usando ratones transgénicos que transportan partes del sistema inmunológico humanos más que del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos, referidos aquí como ratones "HuMab", contienen un miniloci de gen de inmunoglobulina humano que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada humana no concertadas (μ y γ) y cadena ligera κ , junto con mutaciones objetivo que inactivan los puntos de la cadena endógenos μ y κ (Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474):856-859). Como consecuencia, los ratones muestran expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena ligera y pesada introducidos sufren intercambio de clase y mutación somática para generar elevada afinidad humana monoclonal IgGk (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; reconsiderado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546). La preparación de ratones HuMab se describe con todo detalle en la Sección II a continuación y en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6595; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5:647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. 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; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474):856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Ver más en Patentes Números 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 para Lonberg y Kay, y GenPharm Internatioanal; Patente U.S N°. 5,545,807 para Suranti *et al.*; Publicaciones Internacionales Números. WO/98/24884, publicada el 11 de Junio de 1998; WO 94/25585, publicada el 10 de Noviembre de 1994; WO 93/1227, publicada el 24 de Junio de 1993; WO 92/22645, publicada el 23 de Diciembre de 1992; WO 92/03918, publicada el 19 de Marzo de 1992. De modo alternativo, los ratones transgénicos descritos en el Ejemplo 2, pueden emplearse para generar anticuerpos humanos anti-PSMA.

Inmunizaciones HuMab

35 Para generar anticuerpos monoclonales humanos para PSMA, los ratones HuMab pueden inmunizarse con preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA y/o células que expresan PSMA, como se ha descrito por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474):856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851 y WO 98/24884. Preferentemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida (5-20 μ g) de antígeno PSMA (p. ej. células purificadas LNCaP que expresan PSMA) pueden emplearse para inmunizar los ratones HuMab intraperitonealmente. En el caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA no resulte en anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan PSMA, pr. ej., una línea celular tumoral, para provocar respuestas inmunes.

45 La experiencia acumulativa con varios antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMab responden mejor cuando se les inmuniza intraperitonealmente (IP) de manera inicial con antígeno en completo adyuvante de Freund, seguido cada semana de otras inmunizaciones IP (hasta un total de 6) con antígeno en completo adyuvante de Freund. La respuesta inmune puede controlarse tras el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrados retroorbitales. El plasma puede analizarse por ELISA (como se describirá a continuación), y ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-PSMA pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden ser estimulados con antígeno 3 días antes del sacrificio y retirada del bazo. Se espera que se puedan realizar 2-3 fusiones para cada antígeno. Se inmunizarán varios ratones para cada antígeno. Por ejemplo, pueden inmunizarse un total de doce ratones HuMab de las cadenas HCO7 y HCO12.

Generación de Hibridomas que producen Anticuerpos Monoclonales Humanos para PSMA

55 Los esplenocitos de ratones pueden aislarse y fusionarse con PEG para una línea celular de mieloma de ratón en base a los protocolos estándar (8, 13). Los hibridomas resultantes son posteriormente analizados para la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Por ejemplo, suspensiones celulares sencillas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se fusionan con uno-sexto el número de P3X63-Ag8.653 células de mieloma de ratón no segregadoras (ATCC, CRL 1580) con 50% PEG. Las células se colocan en placas en aproximadamente 5×10^5 en placas microtítulo de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en un medio selectivo que contiene 20% de Suero Clon Fetal, 18% de medio acondicionado "653", 5% origen (GEN), 4 mM L-glutamina, 1 mM- L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 5 mM HEPES, 0.005 mM 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml penicilina, 50 mg/ml estreptomina, 50 mg/ml gentamicina y IX HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de dos semanas, las células se cultivan en un medio en el cual el HAT se sustituye por HT. Los pozos individuales se analizan posteriormente por ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti-PSMA humanos. Una vez que ocurre el crecimiento extensivo de hibridoma, el medio se observa normalmente después de 10-14 días. El anticuerpo que segrega hibridomas se vuelven a poner en placas, se vuelven a analizar, y si aún son positivos para IgG humano, los anticuerpos monoclonales

ES 2 277 846 T3

anti-PSMA, puede subclonados al menos dos veces por dilución limitadora. Los subclones estables son posteriormente cultivados *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para caracterización.

Caracterización de Enlace de Anticuerpos Monoclonales Humanos para PSMA

5 Para caracterizar el enlace de anticuerpos monoclonales humanos para PSMA, el suero de ratones inmunizados puede testarse, por ejemplo, por ELISA. En resumen, las placas de microtítulo se cubren con PSMA purificado a 0.25 $\mu\text{g/ml}$ en PBS, después se bloquean con 5% de albúmina de suero bovino en PBS. Las diluciones de plasma de ratones inmunizados con PSMA se añaden a cada pozo y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavan con
10 PBS/Tween y después se incuban con un IgG de cabra anti-humano reagente policlonal específico Fc conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas se desarrollan con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a OD de 405-650. Preferentemente, los ratones que desarrollan los títulos más altos se usarán para fusiones.

15 Una prueba ELISA como se ha descrito anteriormente también puede ser empleada para analizar hibridomas que muestran reactividad positiva con inmunogen PSMA. Los hibridomas que se enlazan con alto grado de afinidad con PSMA serán subclonados y posteriormente caracterizados. Un clon de cada hibridoma, que mantiene la reactividad de la células matrices (por ELISA), puede elegirse para hacer un banco de 5-10 células viales almacenado a 140°C, y para purificación de anticuerpos.

20 Para purificar anticuerpos humanos anti-PSMA, hibridomas seleccionados pueden crecer en frascos centrifugadores de dos litros para purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa. (Pharmacia, Piscataway, NJ). IgG por elusión puede comprobarse por electroforesis de gel y cromatografía líquida de elevada actuación puede asegurar pureza. La solución búfer puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por OD280 usando coeficiente de extinción 1.43.
25 Los anticuerpos monoclonales pueden alicuarse y almacenarse a -80°C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA seleccionados se enlazan con epítopes únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reagentes comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Estudios de competición que usan anticuerpos monoclonales no etiquetados y anticuerpos monoclonales biotinilados pueden
30 actuar usando placas ELISA cubiertas de PSMA como se ha descrito anteriormente. El enlace mAb biotinilado puede detectarse con una prueba de fosfatasa alcalina strep-avidin.

Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, pueden llevarse a cabo ELISAs de isotipo. Pozos de placas de microtítulo puede cubrirse con 10 $\mu\text{g/ml}$ de Ig anti-humano durante la noche a 4°C. Después del bloqueo con 5%
35 BSA, las placas vuelven a reaccionar con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, los pozos pueden reaccionar con IgG humano o pruebas conjugadas de fosfatasa alcalina específicas de IgM humano. Las placas se desarrollan y analizan como se ha descrito anteriormente.

40 Con el fin de demostrar el enlace de anticuerpos monoclonales con células vivas que expresan PSMA, puede emplearse citometría de flujo. En resumen, las líneas celulares que expresan PSMA (cultivadas bajo condiciones estándar de crecimiento) se mezclan con varias concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene 0.1% Tween 80 y 20% suero de ratón, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después del lavado, las células reaccionan con anticuerpo
45 Ig anti-humano etiquetado con Fluoresceína bajo las mismas condiciones que el tinte primario de anticuerpo. Las muestras pueden analizarse por medio de instrumento FACScan usando propiedades de siembra lateral y luz para salir en células sencillas. Un ensayo alternativo que usa microscopia fluorescente puede usar (en adición a este o en su lugar) ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse por microscopia fluorescente. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede hacer disminuir la sensibilidad dependiendo de la densidad del antígeno.

50 IgGs humanos anti-PSMA pueden además testarse para radioactividad con PSMAantígeno por medio de Western blotting. En resumen, extractos celulares de células que expresan PSMA pueden prepararse y someterse a sulfato dodecil sódico (SDS) electroforesis de gel poliacrilamida. Después de electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 20% de suero de ratón, y se explorarán con los anticuerpos monoclonales a ser testados. El enlace IgG humano puede detectarse usando fosfatasa alcalina IgG anti-humano y desarrollado con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Actividades Fagocíticas y de Eliminación Celular de Anticuerpos Monoclonales Humanos para PSMA

60 Además de enlazar específicamente con PSMA, los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA pueden testarse para su actividad para conseguir fagocitosis y eliminación de células que expresan PSMA. El test de actividad de anticuerpo monoclonal *in vitro* proporcionará un análisis inicial anterior al test de modelo *in vivo*. En resumen, las células polimorfonucleares (PMN), o otras células efectoras, procedentes de donantes sanos pueden purificarse por centrifugación de densidad Ficoll Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. PMNs lavadas pueden estar suspendidas en RPMI suplementado con 10% de suero de carnero fetal inactivado por calor y mezclado con
65 células etiquetadas ^{51}Cr que expresan PSMA, en varios radios de células efectoras con células tumorales (-células efectoras:células tumorales). IgGs anti PSMA humanos purificados pueden añadirse posteriormente en varias concentraciones. IgG humano irrelevante puede emplearse como un control negativo. Las pruebas pueden llevarse a cabo

ES 2 277 846 T3

durante 0-120 minutos a 37°C. Las muestras pueden probarse para citolisis midiendo el escape de ⁵¹Cr en el cultivo sobrenadante. Monoclonal anti-PSMA también puede testarse en combinaciones entre sí para determinar si la citolisis aumenta con múltiples anticuerpos monoclonales.

- 5 Anticuerpos monoclonales humanos que enlazan con PSMA también pueden testarse en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones) para determinar su eficacia en mediar fagocitosis y eliminación de células que expresan PSMA, por ejemplo, células tumorales. Estos anticuerpos pueden seleccionarse, por ejemplo, en base a los siguientes criterios, que no pretenden ser exclusivos:
- 10 1) Enlace con células vivas que expresan PSMA;
 - 2) Alta afinidad de enlace con PSMA;
 - 15 3) Enlace a un único epítipo en PSMA (para eliminar la posibilidad de que los anticuerpos monoclonales con actividades complementarias cuando se usan en combinación puedan competir para enlace del mismo epítipo);
 - 4) Oponización de células que expresan PSMA;
 - 20 5) Mediación de inhibición de crecimiento, fagocitosis y/o eliminación de células que expresan PSMA en la presencia de células efectoras humanas.

Anticuerpos monoclonales humanos preferentes de la invención cumplen uno o más, y preferentemente todos estos criterios. En una realización particular, los anticuerpos monoclonales humanos se usan en combinación, por ejemplo, como composición farmacéutica que consta de dos o más anticuerpos monoclonales anti-PSMA o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA que tienen actividades diferentes pero complementarias pueden combinarse en una única terapia para lograr un efecto diagnóstico o terapéutico deseado. Una muestra de esto podría ser una composición que contiene un anticuerpo humano monoclonal anti-PSMA que logra la eliminación altamente efectiva de células en la presencia de células efectoras, en combinación con otro anticuerpo monoclonal humano anti-PSMA que inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA.

II. Producción de Animales Transgénicos No Humanos Que Generan Anticuerpos Monoclonales Humanos Anti-PSMA

Incluso en otro aspecto, la invención proporciona animales transgénicos no humanos, por ejemplo, ratones transgénicos, que son capaces de expresar anticuerpos monoclonales humanos que específicamente se enlazan con PSMA, preferentemente con alta afinidad. En una realización preferente, los animales transgénicos no humanos, por ejemplo, los ratones transgénicos (ratones HuMab), tienen un genoma que comprende una trangen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera.

En una realización, los animales transgénicos no humanos, por ejemplo, los ratones transgénicos, se han inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA y/o células que expresan PSMA. Preferentemente, los animales transgénicos no humanos, por ejemplo, los ratones transgénicos, son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para PSMA (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sufriendo recombinación V-D-J e intercambio de isotipo. El intercambio de isotipo se da, por ejemplo, por intercambio de isotipo clásico o no clásico.

El diseño de un animal transgénico no humano que responde a estimulación de antígeno externo con un repertorio de anticuerpo heterólogo, requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos estén contenidos dentro de la función del animal transgénico correctamente a lo largo del trayecto del desarrollo de célula B. En una realización preferente, la correcta función de una transgene de cadena pesada heteróloga incluye el intercambio de isotipo.

Como consecuencia, los transgenes de la invención están contruidos para que produzcan intercambio de isotipo y uno o más de los siguientes: (1) alto nivel y expresión específica de tipo de célula, (2) recolocación de gen funcional, (3) activación de y respuesta para exclusión alélica, (4) expresión de un suficiente repertorio primario, (5) transducción de señal, (6) hipermutación somática, y (7) dominación del lugar de anticuerpo transgen durante la respuesta inmune.

No todos los criterios precedentes necesitan cumplirse. Por ejemplo, en aquellas realizaciones donde los punto de inmunoglobulina endógena del animal transgénico se perturban funcionalmente, el transgen no necesita activar la exclusión alélica. Además, en aquellas realizaciones donde el transgen comprende un gen de inmunoglobulina de cadena ligera y/o de cadena pesada funcionalmente recolocado, el segundo criterio de recolocación de gen funcional no es necesario, al menos para aquel transgen que ya está recolocado. Para más información sobre inmunología molecular, ver, *Fundamental Immunology*, 2a edición (1989), Paul William E., ed., Raven Press, N.Y.

En ciertas realizaciones, los animales transgénicos no humanos usados para generar anticuerpos monoclonales humanos de la invención contienen transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina heterólogos recolocados, no recolocados o una combinación de recolocados y no recolocados en la línea de gérmenes del animal transgénico. Cada uno de los genes de la cadena pesada consta de al menos un gen C_H. Además, el transgen de la cadena pesada puede contener secuencias e intercambio de isotipo funcional, que son capaces de soportar el intercambio de isotipo de un transgen heterólogo que codifica múltiples genes C_H en las células B del animal transgénico. Tales secuencias de

intercambio puede ser aquellas que se dan de manera natural en el lugar de inmunoglobulina de línea de gérmenes de la especie que sirve como fuente de los genes C_H del transgen, o tales secuencias de intercambio que pueden derivarse de aquellas que se dan en las especies que reciben el constructo de transgen (el animal transgénico). Por ejemplo, un constructo de transgen humano que se usa para producir un ratón transgénico puede producir una frecuencia más alta de eventos de intercambio de isotipo si se incorporan secuencias de intercambio similares a aquellas que se dan de manera natural en la cadena pesada del ratón, ya que presuntamente las secuencias de intercambio del ratón se optimizan para funcionar con el sistema de enzima de recombinasa de intercambio de ratón, mientras que las secuencias de intercambio humanas no actúan de este modo. Tales secuencias pueden aislarse y clonarse por medio de métodos convencionales de donación, o pueden sintetizarse *de novo* a partir de oligonucleótidos sintéticos montados unos sobre otros diseñados basándose en la información de secuencia publicada en relación a las secuencias de región de intercambio de inmunoglobulina (Milis *et al.*, Nucl. Acids Res. 15:7305-7316 (1991); Sideras *et al.* Intl. Immunol. 1:631-642 (1989).

Para cada uno de los anteriores animales transgénicos, se encuentran transgenes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada heterólogos funcionalmente recolocados en una fracción significativa de las células B del animal transgénico (al menos 10 por ciento).

Los transgenes empleados para generar los animales transgénicos de la invención incluyen un transgen de cadena pesada que comprende ADN que codifica al menos un segmento de gen variable, un segmento de gen de diversidad, un segmento de gen de unión y al menos un segmento de gen de región constante. El transgen de cadena pesada de inmunoglobulina consta de ADN que codifica al menos un segmento de gen variable, un segmento de gen de unión y al menos un segmento de gen de región constante. Los segmentos de gen que codifican los segmentos de gen de cadena pesada y ligera son heterólogos para el animal transgénico no humano en el sentido de que se deriva de, o corresponden con, ADN que codifica segmentos de gen de cadena pesada y ligera de una especie que no consiste en el animal transgénico no humano. En un aspecto de la invención, el transgen está construido de tal forma que los segmentos de gen individual están no recolocados, es decir, no recolocados para codificar una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina funcional. Tales transgenes no recolocados apoyan la recombinación de los segmentos V, D y J (recolocación funcional) y preferentemente incorporación de soporte de todos o una porción de un segmento de región D en la cadena pesada de inmunoglobulina recolocada resultante en el animal transgénico no humano expuesto al antígeno PSMA.

En una realización alternativa, los transgenes comprenden "minilugares". Tales transgenes normalmente constan de una porción sustancial de segmentos C, D y J así como un subconjunto de los segmentos de gen V. En tales constructos de gen, las varias secuencias reguladoras, por ejemplo, regiones promotoras, aumentadoras, de intercambio de clase y secuencias ensambladoras-aceptantes para procesos de ARN, señales de recombinación y similares, comprenden secuencias correspondientes derivadas del ADN heterólogo. Tales secuencias reguladoras pueden incorporarse en el transgen de la misma o de una especie relacionada del animal transgénico no humano empleado en la invención. Por ejemplo, segmentos de gen de inmunoglobulina pueden combinarse en un transgen con una secuencia aumentadora de inmunoglobulina de roedor para uso en un ratón transgénico. De manera alternativa, las secuencias sintéticas reguladoras pueden incorporarse en el transgen, donde tales secuencias sintéticas reguladoras no son homólogas para una secuencia funcional de ADN que se conoce pro darse de manera natural en los genomas de los mamíferos. Las secuencias reguladoras sintéticas están diseñadas de acuerdo con las reglas del consenso, como, por ejemplo, aquellas que especifican las secuencias permisibles de un punto ensamblador-aceptante o un motivo promotor/aumentador. Por ejemplo, un minilugar consta de una porción de lugar de inmunoglobulina genómica que tiene al menos una eliminación interna (es decir, no en una terminal de una porción) de una porción de ADN no esencial (por ejemplo, secuencia interpromotor, intrón o porción de la misma) en comparación con el lugar Ig de línea germinal que se da de manera natural.

En una realización preferente de la invención, el animal transgénico empleado para generar anticuerpos humanos para PSMA contiene al menos una, normalmente 2-10, y algunas veces 25-50 o más copias del transgen descrito en el Ejemplo 12 de WO 98/24884 (p. ejl, pHCl o pHCl2) generados con un animal que contiene una única copia de un transgen de cadena ligera descrito en Ejemplos 5, 6, 8 y 14 de WO 98/24884, y las crías engendradas con el animal eliminado J_H descrito en el ejemplo 10 de WO 98/24884. Los animales se engendran para homocigosidad para cada uno de estos tres rasgos. Tales animales tienen el siguiente genotipo: una sola copia (por conjunto haploide de cromosomas) de un mino- punto no recolocado de cadena pesada humana (descrito en el Ejemplo 12 de WO 98/24884), una copia sencilla (por conjunto haploide de cromosomas) de un constructo de cadena ligera K humana no recolocada (descrito en el Ejemplo 14 de WO 98/24884), y una eliminación de cada uno de los puntos de cadena pesada de ratón endógena que retira todos los segmentos J_H funcionales (como se describió en el Ejemplo 10 de WO 98/24884). Tales animales son engendrados con ratones que son homocigos para los constructos de cadena ligera y pesada humana. Los animales resultantes se inyectan con antígenos y se usan para la producción de anticuerpos monoclonales humanos contra estos antígenos.

Células B aisladas procedentes de tal animal son monoespecíficas en relación con las cadenas pesada y ligera humana porque contienen una sola copia de cada gen. Además, serán monoespecíficas en relación con las cadenas pesadas humanas o de ratones porque ambas copias de cadena pesada de ratón endógeno no son funcionales por efecto de la eliminación que abarca la región J_H introducida como se ha descrito en los Ejemplos 9 y 12 de WO 98/24884. Además, una fracción sustancial de las células B será monoespecífica con relación a las cadenas ligeras humanas o de ratones porque la expresión de la única copia del gen de cadena ligera K humano recolocado excluirá alélicamente e

ES 2 277 846 T3

isotópicamente la recolocación de los genes de cadena lambda y k de ratón endógeno en una fracción significativa de células B.

5 El ratón transgénico de la realización preferente mostrará producción de inmunoglobulina con un repertorio significativo, idealmente sustancialmente similar a aquel del ratón nativo. Por lo tanto, por ejemplo, en realizaciones donde los genes endógenos Ig se han desactivado, los niveles totales de inmunoglobulina oscilarán entre 0.1 a 10 mg/ml de suero, preferentemente entre 0.5 y 5 mg/ml, idealmente al menos alrededor de 10 mg/ml. Cuando un transgen es capaz de efectuar un cambio a IgG de IgM se ha introducido en el ratón transgénico, el radio de ratón adulto de suero IgG a IgM es preferentemente alrededor de 10:1. El radio de IgG a IgM será mucho menos en el ratón inmaduro. En general, mayor que 10%, preferentemente 40 a 80% de células B del bazo y nódulo linfático expresan exclusivamente proteína IgG humana.

15 El repertorio idealmente será aproximado al mostrado en un ratón no transgénico, normalmente al menos 10% de alto, preferentemente de 25 a 50% o más. Generalmente, al menos alrededor de cien inmunoglobulinas diferentes (idealmente Ig), preferentemente 10^4 a 10^6 o más, serán producidas, dependiendo principalmente del número de regiones diferentes V, J y D introducidas en el genoma del ratón. Estas inmunoglobulinas normalmente reconocerán aproximadamente la mitad o más de las proteínas altamente antigénicas, por ejemplo, proteína A staphylococcus. Normalmente, las inmunoglobulinas mostrarán una afinidad para antígenos preseleccionados de al menos aproximadamente $10^7 M^{-1}$, preferentemente al menos alrededor de $10^9 M^{-1}$, más preferentemente al menos alrededor de $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ o más, por ejemplo, hasta $10^{13} M^{-1}$ o más.

25 En algunas realizaciones, puede ser preferible generar ratones con repertorios predeterminados para limitar la selección de genes V representados en el anticuerpo en respuesta a un tipo de antígeno predeterminado. Un transgen de cadena pesada que tienen un repertorio predeterminado puede comprender, por ejemplo, genes humanos VH que se emplean preferentemente en respuestas de anticuerpo para el tipo de antígeno predeterminado en humanos. De manera alternativa, algunos genes VH pueden excluirse de un repertorio definido por varias razones (por ejemplo, tener pocas posibilidades para codificar regiones V de alta afinidad para el antígeno predeterminado; tener una baja propensión a sufrir mutación somática y afinamiento de afinidad; o son inmunogénicos a ciertos humanos). Por lo tanto, antes de recolocar un transgen que contiene varios segmentos de gen de cadena pesada y ligera, tales segmentos de gen pueden identificarse fácilmente, por ejemplo, por hibridización o secuencias de ADN, por provenir de especies de organismos diferentes al del animal transgénico.

35 Los ratones transgénicos de la presente invención pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA y/o células que expresan PSMA como se ha descrito previamente. Los ratones producirán células B que sufren intercambio de clase a través de recombinación de intercambio de transgen (cis-intercambio) y expresan inmunoglobulinas reactivas con PSMA. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos de secuencia humana, donde los polipéptidos de cadena ligera y pesada se codifican por secuencias de transgen humano, que pueden incluir secuencias derivadas por mutación somática y uniones recombinatorias con región V, así como secuencias codificadas de la línea de gérmenes; estas inmunoglobulinas de secuencia humana pueden referirse por ser sustancialmente idénticas a una secuencia polipéptida codificada por un segmento de gen V_L o V_H y un segmento humano J_L o J_H , a pesar de que otras secuencias que no son de línea de gérmenes pueden estar presentes como resultado de la mutación somática y de las uniones de recombinación diferencial V-J y V-D-J. Con respecto a tales anticuerpos de secuencia humana, las regiones variables de cada cadena son normalmente 80 por ciento codificado por línea de germen humano V, J y en el caso de cadena pesada segmentos de gen D; con frecuencia, al menos 85 por ciento de las regiones variables se codifican por secuencias de línea de germen humanas presentes en el transgen; a menudo 90 o 85 por ciento o más de las secuencias de región variable se codifican por secuencias de línea de germen humana presente en el transgen. Sin embargo, debido a que las secuencias de línea no germinal se introducen por mutación somática y unión VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humana normalmente tendrán algunas secuencias de región variable (y con menos frecuencia secuencias de región constante) que no se codifican por segmentos de gen humanos V, D o J como se encontró en el transgen humano en la línea de gérmenes de los ratones. Normalmente, tales secuencias de línea sin gérmenes (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o cerca de CDRs, o en regiones donde la mutaciones somáticas tienden a agruparse.

55 Los anticuerpos de secuencia humana que se enlazan con el antígeno predeterminado pueden resultar del intercambio de isotipo, de tal modo que se producen los anticuerpos humanos que comprenden una cadena y de secuencia humana ($\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$, o $\gamma 3$) y una cadena ligera de secuencia humana (como K). Tales anticuerpos de secuencia humana de intercambio de isotipo a menudo contienen una o más mutaciones somáticas, normalmente en la región variable y a menudo en o dentro de los 10 residuos de CDR como resultado de maduración de afinidad y selección de células B por antígeno, normalmente tras el segundo reto de antígeno. Estos anticuerpos de secuencia humana de alta afinidad pueden tener afinidades de enlace de al menos $1 \times 10^9 M^{-1}$, normalmente al menos $5 \times 10^9 M^{-1}$, normalmente más de $1 \times 10^{10} M^{-1}$, y algunas veces $5 \times 10^{10} M^{-1}$ a $1 \times 10^{10} M^{-1}$ o más.

65 Otro aspecto de la invención pertenece a las células B pertenecientes a tales ratones que pueden emplearse para generar hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales humanos que se enlazan con elevada afinidad (por ejemplo, más de $2 \times 10^9 M^{-1}$) a PSMA. Por lo tanto, en otra realización de la invención, estos hibridomas se emplean para generar una composición que consta de una inmunoglobulina que tiene una constante de afinidad (K_a) de al menos $2 \times 10^9 M^{-1}$ para enlazarse con PSMA, donde dicha inmunoglobulina comprende:

Una cadena ligera de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipéptida que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipéptida codificada por un segmento de gen humano V_L y un segmento humano J_L , y (2) una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia polipéptida que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipéptida codificada por un segmento de gen humano C_L ; y una

5 cadena pesada de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipéptida que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipéptida codificada por un segmento de gen humano V_H , opcionalmente una región D, y un segmento humano J_H , y (2) una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia polipéptida que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipéptida codificada por un segmento de gen humano C_H .

10 El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos contra PSMA se facilita por un método para expandir el repertorio de segmentos de gen de región variable humanos en un ratón transgénico que tiene un genoma que consta de un transgen de inmunoglobulina humano integrado, y dicho método comprende la introducción en el genoma un transgen de gen V que tiene segmentos de gen de región V que no están presente en dicho transgen de inmunoglobulina humano integrado. Con frecuencia, el transgen de región V es un cromosoma artificial de levadura que consta de una

15 porción de un segmento de gen humano V_H o V_L (V_K), como se puede dar de manera natural en un genoma humano o puede ensamblarse de manera separada mediante métodos de recombinación, que pueden incluir segmentos de gen V omitidos o que no funcionan. Con frecuencia al menos cinco o más segmentos de gen funcional V están contenidos en YAC. En esta variación, es posible hacer un ratón transgénico producido por el método de expansión del repertorio V, donde el ratón expresa una cadena de inmunoglobulina que consta de una secuencia de región variable codificada por un segmento de gen de región V presente en el transgen de región V y una región C codificada en el transgen humano Ig. Por medio del método de expansión del repertorio V, pueden generarse ratones transgénicos que tienen

20 al menos 5 genes V distintos; del mismo modo hay ratones que contienen al menos aproximadamente 24 genes V o más. Algunos segmentos de gen V pueden ser no funcionales (por ejemplo, pseudogenes o similares); estos segmentos pueden retenerse o pueden eliminarse o borrarse de modo selectivo por métodos recombinantes disponibles para el técnico especializado, en el caso de que se desee.

Una vez que se ha construido la línea germinal del ratón para contener un YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V expandido, sustancialmente no presente en el transgen humano Ig que contiene los segmentos de gen J y C, el rasgo puede propagarse y engendrarse en otros contextos genéticos, incluyendo contextos donde el YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V expandido se engendra en una línea germinal de ratón que tiene un transgen Ig humano diferente. YACs múltiples funcionales que tienen un repertorio de segmento V expandido pueden engendrarse en una línea germinal para trabajar con un transgen humano Ig (o múltiples transgenes Ig humanos). A

30 pesar de que aquí se refieren como transgenes YAC, tales transgenes cuando se integran dentro del genoma pueden sustancialmente carecer de las secuencias de levadura, como las secuencias necesarias para réplica autónoma en levadura; tales secuencias pueden opcionalmente retirarse por construcción genética (por ejemplo, digestión de restricción y electroforesis de gel de campo pulsado u otros métodos adecuados) después de que la réplica en levadura no sea más necesaria (por ejemplo, antes de la introducción en un ratón célula ES o ratón procigoto). Métodos de propagación el rasgo de expresión de inmunoglobulina se secuencia humana, incluyen engendrar un ratón transgénico que tiene el transgen humano Ig, y opcionalmente que también tienen YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V expandido. Ambos segmentos de gen V_H y V_L pueden estar presentes en el YAC. El ratón transgénico puede engendrar en cualquier contexto y ambiente deseado por el médico o profesional, incluyendo contextos que albergan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes Ig humanos y/o transgenes que codifican otras proteínas de linfocito humanas. La invención también proporciona inmunoglobulina de secuencia de alta afinidad producida por un ratón

40 transgénico que tiene un repertorio de región V expandido de transgen YAC. A pesar de que todo lo anterior describe una realización preferente del animal transgénico de la invención, también se contemplan otras realizaciones que se han clasificada en las siguientes cuatro categorías:

I. Animales transgénicos que tienen un transgen de inmunoglobulina pesada no recolocado y de cadena ligera

50 recolocado.

II. Animales transgénicos que tienen un transgen de inmunoglobulina pesada no recolocado y de cadena ligera no recolocado.

55 III. Animales transgénicos que tienen un transgen de inmunoglobulina pesada recolocado y de cadena ligera no recolocado; y

60 IV. Animales transgénicos que tienen transgenes de inmunoglobulina pesada recolocados y de cadena ligera recolocados.

De estas categorías de animales transgénicos, el orden preferido de preferencia es el siguiente $II > I > III > IV$ donde los genes de cadena ligera endógenos (o al menos el gen K) han sido eliminados por recombinación homóloga (u otro método) y $I > II > III > IV$ donde los genes de cadena ligera endógenos no han sido eliminados y deben estar dominados por exclusión alélica.

65

III. Moléculas Biespecíficas/Multiespecíficas que se enlazan con PSMA

También en otra realización de la invención, anticuerpos monoclonales humanos con PSMA, o porciones de enlace de antígeno de los mismos, pueden derivarse o unirse con otra molécula convencional, por ejemplo, otro péptido o proteína (p. ej, un fragmento Fab') para generar una molécula biespecífica o multispecífica que se enlaza con múltiples puntos de enlace o epítopes objetivo. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de enlace de antígeno de la invención puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, por enlace químico, fusión genética, asociación no covalente o similares) a una o más moléculas de enlace, como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o también enlace mimético.

Como consecuencia, la presente invención incluye moléculas biespecíficas o multispecíficas que constan al menos de una primera especificidad de enlace para PSMA y una segunda especificidad de enlace para un segundo epítipo objetivo. En una realización particular de la invención, el segundo epítipo objetivo es un receptor Fc, por ejemplo, Fc γ RI humano (CD64) o un receptor humano Fc α (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas y multispecíficas capaces de enlazarse con tanto Fc γ RI, como Fc α R y Fc ϵ R que expresan células efectoras (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs)), y con células objetivo que expresan PSMA. Estas moléculas biespecíficas y multispecíficas se dirigen a PSMA que expresa células para células efectoras y, al igual que los anticuerpos monoclonales humanos de la invención, provocan actividades de células efectoras mediadas por Fc receptor, como fagocitosis de un PSMA que expresa células, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (DAC), liberación de citoquina, o generación de anión superóxido.

Moléculas biespecíficas o multispecíficas de la invención pueden además incluir una tercera especificidad de enlace, además de una especificidad de enlace anti-Fc y una especificidad de enlace anti-PSMA. En una realización, la tercera especificidad de enlace es una porción de factor anti-aumento (EF), por ejemplo, una molécula que se enlaza con una proteína de superficie incluida en actividad citotóxica y por ello aumenta la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción de factor anti-aumento" puede ser un anticuerpo, un fragmento funcional de anticuerpo o un ligando que se enlaza con una molécula concreta, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y como consecuencia resulta un aumento del efecto de los determinantes de enlace para el receptor Fc o antígeno de célula objetivo. La "porción de factor anti-aumento" puede enlazarse con el receptor Fc o antígeno de célula objetivo. De modo alternativo, la porción de factor anti-aumento puede enlazarse con una entidad que es diferente de la entidad con la cual la primera y segunda especificidad se enlazan. Por ejemplo, la porción de factor anti-aumento puede enlazarse con una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunes que resulte den una aumentada respuesta inmune contra la célula objetivo).

En una realización, las moléculas biespecíficas o multispecíficas de la invención constan de al menos un anticuerpo como una especificidad de enlace o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o una cadena sencilla Fv. El anticuerpo puede también tener un dímero de cadena ligera o pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo como un Fv o un constructo de cadena sencilla como se describió en Ladner *et al.*, U.S Patente N° 4,496,778 publicada el 7 de Agosto de 1990, cuyos contenidos expresamente se incorporan como referencia.

En una realización las moléculas biespecíficas y multispecíficas constan de una especificidad de enlace para un Fc γ R o un Fc α R presentes en la superficie de una célula efectora, y una segunda especificidad de enlace para un antígeno de célula objetivo, por ejemplo, PSMA.

En una realización, la especificidad de enlace para un receptor Fc es proporcionado por un anticuerpo monoclonal humano, cuyo enlace no está bloqueado por inmunoglobulina G humana (IgG). Como aquí se emplea, el término "receptor IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena y localizado en cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de transmembrana o solución soluble que están agrupadas en tres clases de receptor Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). En una realización preferente, el receptor Fc γ tiene una alta afinidad humana Fc γ RI. El Fc γ RI humano es una molécula kDa 72, que muestra alta afinidad para IgG monomérico (10⁸-10⁹M⁻¹).

La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferentes están descritas por Fanger *et al.*, en solicitud de PCT WO 88/00052 y en Patente U.S N° 4,954,617. Estos anticuerpos se enlazan con un epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII en un punto que es distinto del punto del enlace Fc γ del receptor y que por lo tanto, su bloqueo no está sustancialmente bloqueado por niveles fisiológicos de IgG. Anticuerpos específicos anti-Fc γ RI útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb, 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está disponible en la Colección de Cultivos de Tipo Americano. Adquisición ATCC N° HB9469. Anti-Fc γ RI mAb 22, fragmentos F(ab')₂ de mAb 22, y pueden obtenerse de Medarex, Inc. (Annandale, N. J). En otra realización, el anticuerpo receptor anti-Fc γ es una forma humanizada de anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graciano, R. F. *et al.* (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 y PCT/US93/10384. El anticuerpo H22 que produce línea celular se depositó en la Colección de Cultivos de Tipo Americano el 4 de Noviembre de 1992 bajo la designación HA022CL1 y tiene el N° de adquisición CRL 11177.

Incluso en otra realización preferente, la especificidad de enlace para un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo que se enlaza con un receptor humano IgA, por ejemplo, un receptor Fc-alpha (Fc α RI (CD89)), cuyo enlace preferentemente no se bloquea por inmunoglobulina humana A (IgA). El término "receptor IgA" pretende incluir el producto de gen de un gen a (Fc α RI) localizado en cromosoma 19. Este gen es conocido por codificar varias

isoformas de transmembrana ensambladas alternativamente de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) es constitutivamente expresado en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinofílicos y neutrofílicos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc α RI tiene afinidad de medio ($\approx 5 \times 10^{17} \text{M}^{-1}$) para ambos IgA1 e IgA2, que aumenta tras la exposición a citoquinas como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440. Cuatro anticuerpos monoclonales específicos Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 y A77 que se enlazan con Fc α RI fuera del dominio de enlace del dominio IgA han sido descritos en Monteiro, R.C *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1764).

Fc α RI y Fc γ RI son receptores de provocación preferentes para uso en la invención debido a que (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMNs, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan en niveles elevados (por ejemplo, 5,000-100,000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) median la presentación de antígeno aumentado de antígenos, incluyendo auto-antígenos y dirigidos a ellos.

En otra realización, moléculas biespecíficas y multispecíficas de la invención además comprenden una especificidad de enlace que reconoce, por ejemplo, se enlaza con, una célula objetivo, por ejemplo, PSMA. En una realización preferente, la especificidad de enlace es proporcionada por un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención.

Un “anticuerpo específico de célula efectora” como aquí se emplease refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se enlaza con el receptor Fc de células efectoras. Anticuerpos preferentes para uso en la invención en cuestión se enlazan con el receptor Fc de células efectoras en un punto que no está enlazado por inmunoglobulina endógena.

Como aquí se emplea, el término “célula efectora” se refiere a una célula inmune que está incluida en la fase efectiva de una respuesta inmune, en oposición a la fase cognitiva y a la fase de activación de una respuesta inmune. Células inmunes ejemplares incluyen una célula de un origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (p. ej células B y células T que incluyen células T citolíticas (CTLs)), células eliminadoras, células eliminadoras naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores específicos Fc y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En realizaciones preferentes, una célula efectora es capaz de provocar ADCC. Por ejemplo, monocitos, macrófagos, que expresan FcR están involucrados en la eliminación específica de células objetivo y presentan antígenos a otros componentes del sistema inmune, o el enlace con células que están presentes en antígenos. En otras realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo, célula objetivo o microorganismo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede regularse mediante factores humorales como citoquinas. Por ejemplo, la expresión de Fc γ RI ha resultado estar regulada por gamma interferon (IFN- γ). Esta expresión mejorada aumenta la actividad citotóxica de células que soportan Fc γ RI contra objetivos. Una célula efectora fagocitar o lisar un antígeno objetivo o una célula objetivo.

“Célula objetivo” puede significar cualquier célula no deseable en un sujeto (por ejemplo, un humano o un animal) puede ser alcanzada por una composición (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, una molécula biespecífica o multispecífica) de la invención. En realizaciones preferentes, la célula objetivo es una célula que expresa o sobreexpresa PSMA. Las células que expresan PSMA normalmente incluyen células tumorales, como células tumorales de próstata, renal y colon.

Anticuerpos monoclonales humanos de ratón quimérico (es decir, anticuerpos quiméricos) puede producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en el campo. Por ejemplo, un gen que codifica la región constante Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal de murina (u otra especie) se digiere con enzimas de restricción para retirar la región que codifica la murina Fc, y la región equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana es sustituido. (Ver Robinson *et al.*, Publicación de Patente Internacional PCT/US86/02269; Akira, *et al.*, Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison *et al.*, Solicitud de Patente Europea 173,494; Neuberger *et al.*, Solicitud Internacional WO 86/01533; Cabilly *et al.*, Patente U.S N° 4,816,567; Cabilly *et al.*, Solicitud de Patente Europea 125,023; Better *et al.* (1988 *Science* 240:1041-1043); Liu *et al.* (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura *et al.* 1987, *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; y Shaw *et al.*, 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559).

El anticuerpo quimérico puede además estar humanizado sustituyendo secuencias de la región variable Fv que no están directamente incluidas en enlace antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables de Fv humanas. Los estudios generales de anticuerpos quiméricos humanizados están proporcionados por Morrison, S. L., 1985, *Science* 229:1202-1207 y por Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214. Tales métodos incluyen el aislamiento, la manipulación y la expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican todas o partes de las regiones variables de Fv inmunoglobulina de al menos una de la cadena pesada o ligera. Fuentes de tal ácido nucleico son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y, por ejemplo, pueden obtenerse a partir de 7E3, un anticuerpo anti-GPIIb/IIIa que produce hibridoma. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo quimérico, o un fragmento del mismo, puede clonarse posteriormente en un vector de expresión adecuado. Anticuerpos humanizados apropiados puede producirse de manera alternativa por sustitución CDR Patente U.S 5,225,539; Jones *et al.* 1986 *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* 1988 *Science* 239:1534; y Beidler *et al.* 1988 *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Todos los CDRs de un anticuerpo particular humano pueden sustituirse con al menos una parte de un CDR no humano o solamente algunos de los CDRs pueden sustituirse por CDRs no humanos. Sólo es necesario sustituir el número de CDRs necesarios para enlazar el anticuerpo humanizado con el receptor Fc.

Un anticuerpo puede humanizarse mediante cualquier método, que sea capaz de sustituir al menos una parte de un CDR de un anticuerpo humano con un CDR derivado de un anticuerpo no humano. Winter describe un método que puede emplearse para preparar los anticuerpos humanizados de la presente invención (Solicitud de Patente en Reino Unido GB 2188638A, presentada el 26 de Marzo de 1987), cuyos contenidos se incorporan expresamente como referencia. Los CDRs humanos pueden sustituirse por CDRs no humanos usando mutagénesis dirigida al punto oligonucleotídico como se describe en la Solicitud Internacional WO 94/10332 titulada *Humanized Antibodies to Fc Receptor for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes* que aquí se añade como referencia.

También se encuentran dentro del ámbito de la invención los anticuerpos quiméricos y humanizados en los cuales los aminoácidos han sido sustituidos, eliminados o añadidos. En particular, anticuerpos humanizados preferentes tienen sustituciones de aminoácidos en la región del marco, para mejorar el enlace con el antígeno. Por ejemplo en un anticuerpo humanizado que tiene CDRs de ratón, los aminoácidos situados en la región de marco humano pueden sustituirse con los aminoácidos situados en las posiciones correspondientes en el anticuerpo del ratón. Tales sustituciones se conocen por mejorar el enlace de anticuerpos humanizados con el antígeno en algunos casos. Anticuerpos a los cuales se han añadido, eliminado o sustituido aminoácidos aquí son referidos como anticuerpos modificados o anticuerpos alterados.

El término anticuerpo modificado también pretende incluir anticuerpos, como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos humanizados que han sido modificados, por ejemplo, eliminando, añadiendo o sustituyendo porciones de anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede modificarse eliminando la región constante y sustituyéndola por una región constante que aumentará la media vida, por ejemplo, media vida de suero, estabilidad o afinidad del anticuerpo. Cualquier modificación está dentro del ámbito de la invención siempre y cuando la molécula biespecífica y multiespecífica tenga al menos una región de enlace específico para un Fc γ R y provoque al menos una función efectora.

Moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención pueden hacerse mediante técnicas químicas (ver, por ejemplo, D. M. Kranz *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807), técnicas "polydoma" (ver Patente U.S 4,474,893, a Reading) o técnicas de ADN recombinante.

En particular, moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención puede prepararse conjugando las especificidades del enlace constituyente, por ejemplo, las especificidades de enlace anti-FcR y anti-PSMA, empleando métodos conocidos en la técnica y descritos en los ejemplos aquí proporcionados. Por ejemplo, cada especificidad de enlace de la molécula biespecífica o multiespecífica puede generarse de manera separada o luego conjugarse una con otra. Cuando las especificidades de enlace son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de enlace o de unión cruzada puede usarse para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de unión cruzada incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-thioacetato (SATA), 5, 5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenedimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometilo) ciclohaxano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver, 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 aquellos descritos por Paulus (Berhring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132); Brennan *et al.* (Science (1985) 229:81-83), y Glennie *et al.* (J. Immunol. (1987) 139:2367-2375). Agentes de conjugación preferentes son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de enlace son anticuerpos (por ejemplo, dos anticuerpos humanizados) pueden conjugarse por medio de enlace sulfidrilo de las regiones bisagra de la terminal C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferente, la región bisagra se modifica de tal modo que contenga un número impar de residuos de sulfidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

De modo alternativo, ambas especificidades de enlace pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y acumularse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil donde la molécula biespecífica y multiespecífica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab proteína fusión. Una molécula biespecífica o multiespecífica de la invención, por ejemplo, una molécula biespecífica puede ser una molécula de cadena sencilla, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla, una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de enlace, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de enlace. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser moléculas de cadena sencilla o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Métodos para preparar moléculas biespecíficas y multiespecíficas se describen por ejemplo en Patente U.S Número 5,260,203; Patente U.S Número 5,455,030; Patente U.S Número 4,881,175; Patente U.S Número 5,132,405; Patente U.S Número 5,091,513; Patente U.S Número 5,476,786; Patente U.S Número 5,013,653; Patente U.S Número 5,258,498; y Patente U.S Número 5,482,858.

El enlace de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas a sus objetivos específicos puede confirmarse por el ensayo inmunosorbente de enlace de enzima (ELISA), un ensayo radioinmune (RIA), análisis FACSS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento) o un Ensayo Western Biot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reagente etiquetado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de anticuerpo FcR pueden detectarse empleando por ejemplo, un anticuerpo de enlace a enzima o fragmento de anticuerpo que reconoce y específicamente se enlaza con los complejos de anticuerpo FcR. De modo alternativo, los complejos pueden detectarse usando una amplia variedad de inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede etiquetarse radioactivamente y usarse en un en-

sayo radioinmune (RIA) (ver, por ejemplo, Weintrub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986. El isotipo radioactivo puede detectarse por medio del uso de un contador y o un contador de escintilación o por autoradiografía.

5 IV. *Conjugados de Anticuerpo/Inmunotoxinas*

En otro aspecto, la presente invención caracteriza un anticuerpo monoclonal humano anti-PSMA, o un fragmento del mismo, conjugado con una molécula terapéutica, como una citotoxina, un fármaco o un radioisotopo. Cuando se
 10 conjugua con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo son referidos como “inmunotoxinas”. Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, que las elimine). Entre los ejemplos se incluyen el taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colcicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi diona antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Entre los agentes terapéuticos se incluyen, aunque no se limitan
 15 a, antimetabolitos (p. ej. Metotrexata, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cistaplantina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej. dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-
 20 mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con un radioisotopo, por ejemplo, yodina radioactiva, para generar radio fármacos citotóxicos para tratar un desorden relacionado con PSMA, como cáncer.

Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden emplearse para modificar una respuesta biológica dada, y
 25 la molécula de fármaco no se construirá como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la molécula farmacéutica puede ser una proteína o un polipéptido que expresa una actividad biológica deseada. Tales proteínas incluyen, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, como abrina, ricina A, pseudomas exotoxina, o toxina difteria; una proteína como un factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de respuesta biológica como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 (“IL-1”), interleuquina-2 (“IL-
 30 2”), interleuquina-6 (“IL-6”), factor de estimulación de colonia de macrófago granulocito (“GM-CSF”), factor de estimulación de colonia de granulocito (“G-CSF”), u otros factores de crecimiento.

Técnicas para conjugar tales moléculas terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas, ver, por ejemplo, Arnon
 35 *et al.*, “Monoclonal Antidies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al* (eds.) pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies for Drug Delivery”, in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson *et al.* (eds), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Citotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And
 40 Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, “The Preparation And Citotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunolo. Rev.*, 62:119-58 (1982).

V. *Composiciones Farmacéuticas*

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o porciones de enlace de antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización preferente, la composición incluye una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos
 50 humanos aislados o porciones de enlace de antígeno de los mismos de la invención. Preferentemente, cada uno de los anticuerpos o porciones de enlace de antígeno de los mismos de la composición se enlazan con un epítope distinto y preseleccionado de PSMA.

En una realización, anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA que tienen actividades complementarias de emplean en combinación de, por ejemplo, una composición farmacéutica que consta de dos o más anticuerpos mono-
 55 clonales humanos anti-PSMA. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano que logra una eliminación altamente objetiva de células objetivo en la presencia de células efectoras puede combinarse con otro anticuerpo monoclonal humano que inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA.

En otra realización, la composición consta de una combinación de moléculas biespecíficas y multiespecíficas de
 60 la invención (por ejemplo, que contiene al menos una especificidad de enlace con un receptor Fc y al menos una especificidad de enlace para PSMA).

Composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, en combinación con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente
 65 invención con al menos un agente anti-tumoral u otra terapia convencional.

Como aquí se emplea, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, cubrientes, agente antibacterial y antihongos, agentes isotónicos y agentes retardantes de absorción, y similares que

sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, por ejemplo, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica puede estar cubierto de un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden desactivar el compuestos y por lo tanto modificar la acción del portador farmacéuticamente aceptable.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto matriz y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (ver, por ejemplo, Berge, S.M., *et al* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Sales de adición ácida incluyen aquellas derivada de ácidos inorgánicos no tóxicos, como ácido hidrocioruro, nítrico, fosfórico, sulfúrico, hidrobromico, hidroioódico, fosforoso y similares, así como ácidos orgánicos no tóxicos como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanicos sustituidos por fenilo, ácidos hidroxí alcanicos, ácidos aromáticos, alifáticos y ácidos sulfónicos aromáticos y similares. Sales de adición básica incluyen aquellas derivadas de metales alcali-notérricos como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, como N,N'-dibenziletilediamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolaina, etilenediamina, procaína y similares.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como será apreciado por el profesional de la técnica, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados que se deseen obtener. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de envío microencapsulado. Polímeros biodegradables y biocompatibles pueden emplearse, como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoesteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentadas o son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención por ciertas rutas de administración, puede ser necesario cubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material que prevenga su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un portador adecuado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones de búfer de salina y acuosa. Liposomas incluyen emulsiones CGF agua-en-aceite así como liposomas convencionales (Strejan *et al.* 81984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o polvos polvos en dispersión y estériles para la preparación extemporáneo de soluciones inyectables estériles o en dispersión. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla por lo tanto el uso de las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar compuestos suplementarios activos en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura adecuada para alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, glicol propileno, y glicol polietileno líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de una capa o baño, como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerida en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes. En muchos casos, resultará preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol) y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestarat y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un apropiado disolvente con un o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido de la microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son el secado por aspiración y el secado por congelación (liofilización) que produce unos polvos del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional de una solución previamente esterilizada y filtrada del mismo.

Los sistemas de dosis se ajustan con el fin de obtener la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo alimenticio dividiéndolo en varias dosis durante un periodo de tiempo o la dosis puede reducirse proporcionalmente o aumentarse según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajosos formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosis para facilitar la administración y uniformidad de la posología. La forma de unidad de dosis aquí se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéuticamente requerido. La especificación de las formas de unidad de dosis de la invención está dictada por y directamente depende de (a) las únicas características del compuesto activo y el efecto terapéutico

ES 2 277 846 T3

particular que se intenta lograr, y (b) las limitaciones inherentes en el estado de la técnica de los compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua; como ácido ascórbico, hidrócloruro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, como palmitato ascorbilo, hidroxianisola butilada (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelatantes de metal, como ácido cítrico, ácido etilenediamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención aquellas que son adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden estar convenientemente presentadas en forma de única dosis y pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosis variará dependiendo del sujeto a tratar, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosis normalmente será aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, en el 100% de los casos, esta cantidad variará entre 0.1 por ciento hasta 99 por ciento de ingrediente activo, preferentemente de 0.1 por ciento a 70 por ciento, más preferentemente de 1 por ciento a 30 por ciento.

Formulaciones de la presente invención que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen supositorios vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas y formulaciones en spray que contienen tales portadores como son conocidos en la técnica por ser apropiados. Las formas de dosis para la administración tópica y transdérmica de composiciones de esta invención incluyen polvos, sprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, búfer, o propelantes que resulten necesarios.

Las locuciones “administración parenteral” y “administrado parenteralmente” como aquí se emplean se refieren a los modos de administración diferentes a la administración por tubo o tópica, normalmente por inyección e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

Ejemplos de portadores adecuados acuosos y no acuosos que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (por ejemplo, glicerol, glicol propileno, glicol polietileno, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como aceite de oliva, y esterios orgánicos inyectables, como oleato etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de una capa o baño, como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerida en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse bien por procesos de esterilización, sobre todo, y por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antihongos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, y similares. También puede resultar deseoso incluir agentes isotónicos como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como fármacos, a humanos o animales, pueden darse solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0.01 a 99.5% (más preferentemente, 0.1 a 90%) de ingrediente activo en combinación de un portador farmacéuticamente aceptable.

En relación a la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden emplearse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosis farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para una particular paciente, composición y modo de administración, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales empleados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general y el historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en el campo médico.

Un médico o veterinario que tenga una habilidad ordinaria en la técnica puede fácilmente determinar y prescribir la cantidad efectiva de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica en niveles inferiores a los

necesarios con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado y gradualmente aumentar la dosis hasta que se logra el efecto deseado. En general, una dosis adecuada diaria de la composición de la invención tendrá la cantidad de compuesto que es la dosis efectiva más baja para producir un efecto terapéutico. Tal dosis efectiva dependerá generalmente de los factores anteriormente descritos. Es preferible que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, preferentemente que se administre en un punto próximo al punto objetivo. Si se desea, la dosis efectiva diaria de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas de modo separado en intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosis de unidad. Mientras que es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferente, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, como los dispositivos descritos en Números de Patente U.S.: 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Ejemplos de implantes bien conocidos y módulos útiles en la presente invención incluyen: Patente U.S N° 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a un ritmo controlado; Patente U.S N° 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente U.S N° 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicación para enviar la medicación a un ritmo de infusión precisa; Patente U.S N° 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para el continuo envío de fármaco; Patente U.S N° 4,439,196, que describe un sistema de envío de fármaco osmótico que tiene compartimentos multi-cámara; y Patente U.S N° 4,475,196, que describe un sistema de envío de fármaco osmótico.

Muchos otros implantes, sistemas de envío y módulos son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos de la invención crucen la barrera sangre-cerebro, pueden formularse, si se desea, en liposomas. Para métodos de producción de liposomas, ver, por ejemplo, Patentes U.S 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden constar de una o más moléculas que se transportan de manera selectiva a células u órganos específicos, aumentando de este modo el envío de fármaco objetivo (ver, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Moléculas objetivo ejemplares incluyen folato y biotina (ver, por ejemplo, Patente U.S 5,416,016 a Low *et al.*), manosidas (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 A proteína surfactante (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), una especie diferente que puede comprender las formulaciones de la invención así como componentes de las moléculas inventadas; p 120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); ver también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:1233; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:243. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en otra realización preferentes, los liposomas incluyen una molécula de selección de objetivo. En otra realización aún más preferente, los compuestos terapéuticos en los liposomas se envían por inyección de bolo alimenticio a un punto próximo al turno o infección. La composición deber ser fluida con el fin de que se pueda emplear con una jeringuilla con facilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenaje y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Una "dosis terapéuticamente efectiva" preferentemente inhibe el crecimiento del tumor al menos alrededor del 20%, más preferentemente alrededor del 40%, incluso más preferentemente al menos alrededor del 60%, y aún más preferentemente alrededor del 80% relativo a los sujetos no tratados. La habilidad de un compuesto para inhibir cáncer puede evaluarse en un sistema predictivo de modelo de animales de eficacia en tumores humanos. De manera alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la habilidad del compuesto para inhibir, tal inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o sino aminorar los síntomas en un sujeto. Un profesional de la técnica podría determinar tales cantidades en base a factores tales como tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o ruta de administración seleccionada.

La composición puede ser estéril y fluida hasta tal punto que la composición pueda transmitirse por jeringuilla. Además de agua, el portador puede ser una solución salina de búfer isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, glicol propileno, y glicol polietileno líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de una capa o baño, como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerida en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestato de aluminio o gelatina.

Cuando el compuesto activo se encuentra adecuadamente protegido, como se ha descrito previamente, el compuesto puede administrarse oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

VI. Usos y Métodos de la Invención

Las composiciones (p. ej. anticuerpos monoclonales humanos para PSMA y derivados/conjugados de los mismos) de la presente invención tienen utilidades terapéuticas y diagnósticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar una serie de desórdenes. Como aquí se emplea, el término “sujeto” pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales humanos preferentes incluyen un paciente humano que tenga un desorden caracterizado por la expresión, normalmente expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión) de PSMA. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar a un sujeto con un desorden tumorigénico, por ejemplo, un desorden caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan PSMA incluyendo, por ejemplo, células de tumor de próstata, colon, renal (riñón). El término “animales no humanos” de la invención incluye todos los vertebrados, mamíferos y no mamíferos, como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención pueden testarse inicialmente para actividad de enlace asociada con uso terapéutico y diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden testarse empleando ELISA y los ensayos citométricos de flujo descritos en los Ejemplos previos. Además, se puede probar la actividad de estas moléculas al provocar al menos una actividad celular efectora mediada por una efectora, incluyendo histólisis de células que expresan PSMA. Los protocolos para probar fagocitosis mediada por célula efectora se describen en los Ejemplos a continuación.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención tienen una utilidad adicional en terapia y diagnóstico de enfermedades relacionadas con PSMA. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos, las moléculas multiespecíficas y biespecíficas pueden usarse por ejemplo, para obtener *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: opsonizar una célula que expresa PSMA; lograr fagocitosis o histólisis de una célula que expresa PSMA en la presencia de células efectoras humanas; o inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA.

En una realización particular, los anticuerpos humanos y derivados de los mismos se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una serie de enfermedades relacionadas con PSMA.

Ejemplos de enfermedades relacionadas con PSMA incluyen una variedad de cánceres, como cáncer de próstata, riñón y colon.

Métodos de administración de las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención son conocidos en la técnica. Dosis adecuadas de las moléculas empleadas dependerán de la edad y peso del sujeto y del fármaco particular empleado. Las moléculas pueden estar unidas a radionuclides como ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, etc., tal y como se describió en Goldenberg, D.M *et al.* (1981) *Cancer Res.* 41: 4354-4360, y en EP 0635 99. Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también pueden estar unidos con agentes anti-infecciosos.

Las células efectoras específicas de objetivo, por ejemplo, células efectoras enlazadas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención puede también emplearse como agentes terapéuticos. Células efectoras para la dirección pueden ser leucocitos humanos como macrófagos, neutrófilos y monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células eliminadoras naturales y otras células que soportan receptor IgG o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse del sujeto a ser tratado. Las células efectoras específicas de objetivo pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede estar en el orden de 10⁸-10⁹ pero variará en función del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficientes para obtener la localización en la célula objetivo, por ejemplo, una célula que expresa PSMA, y para efectuar la eliminación celular, por ejemplo, fagocitosis. Las rutas de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas de objetivo pueden llevarse a cabo junto con otras técnicas de retirada de células objetivo. Por ejemplo, la terapia anti-tumor que emplea esta composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención y/o células efectoras armadas con estas composiciones pueden emplearse junto con la quimioterapia. De manera adicional, la inmunoterapia de combinación puede emplearse para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de célula tumoral. Por ejemplo, anticuerpos anti-PSMA enlazado con anti-Fc-gammaRI o anti-CD3 pueden emplearse junto con agentes de enlace específicos de receptor IgG o IgA. Moléculas multiespecíficas y biespecífica de la invención también pueden emplearse para modular niveles FcγR o FcαR en células efectoras, tapando y eliminando los receptores en la superficie celular. Las mezclas de receptores anti-Fc también pueden usarse con este propósito.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención que tienen puntos de enlace complementarios, como porciones de IgG1, -2, o -3 o IgM que se enlazan de manera complementaria, también pueden usarse en la presencia de complementos. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células objetivo con un agente de enlace de la invención y células efectoras apropiadas pueden complementarse por la adición de complemento o suero que contenga complemento. La fagocitosis de células objetivo cubiertas por agente de enlace de la invención puede mejorarse por el enlace de proteínas

complementarias. En otra realización las células objetivo cubiertas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención pueden también desintegrarse por complemento.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también pueden administrarse junto con un complemento. Por consiguiente, dentro del ámbito o alcance de la invención se encuentran composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas en el sentido en el que el complemento está localizado en cercana proximidad con los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas de la invención y el complemento o suero puede administrarse por separado.

También se encuentran dentro del ámbito de la invención los kits que comprenden las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede además contener al menos un reagente adicional, como un complemento, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo humano que tenga una actividad complementaria que se enlace con un epítipo en antígeno PSMA distinto al del primer anticuerpo humano).

En otras realizaciones, el sujeto puede ser adicionalmente tratado con un agente que modula, por ejemplo que aumenta o inhibe, la expresión de actividad de receptores Fc γ R o Fc α R, por ejemplo, tratando al sujeto con citoquina. Citoquinas preferentes para la administración durante el tratamiento con moléculas multiespecíficas incluyen factor de estimulación de colonia de granulocito (G-CSF), factor de estimulación de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), y factor de necrosis tumoral (TNF).

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también se pueden emplear para células objetivos que expresan Fc γ R o PSMA, por ejemplo para etiquetar tales células. Para tal uso, el agente de enlace puede unirse a una molécula que puede detectarse. Por lo tanto, la invención proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* célula que expresan receptores Fc, tales como Fc γ R o PSMA. La etiqueta detectable puede ser, por ejemplo, un radioisotopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor de enzima.

En una realización, la invención proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno PSMA en una muestra, o para medir la cantidad de antígeno PSMA, que comprende contactar la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de enlace de antígeno del mismo, que específicamente se enlaza con PSMA, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y PSMA. La formación de un complejo se detecta posteriormente, donde una formación de complejo de diferencia entre la muestra comparada con la muestra control indica la presencia de antígeno PSMA en la muestra.

También en otra realización, la invención proporciona un método para detectar la presencia o cuantificar la cantidad de células que expresan Fc *in vivo* o *in vitro*. El método comprende (i) administrar al sujeto una composición (por ejemplo, una molécula multi- o biespecífica) de la invención o un fragmento del mismo, junto con un marcador detectable; (ii) exponer el sujeto a medios para detectar dicho marcador detectable para identificar áreas que contienen células que expresan Fc. La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que no deben considerarse como limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de ratones objetivo Cmu para la producción de anticuerpos humanos anti-PSMA

Construcción de un vector objetivo CMD

El plásmido pICEmu contiene un fragmento EcoRI/XhoI del punto de cadena pesada Ig de murina, abarcando el gen mu, que se obtuvo a partir de una biblioteca bacteriófaga lambda (Marcu *et al.* Cell 22: 187, 1980). Este fragmento genómico fue subclonado en los puntos XhoI/EcoRI del plásmido pICEMI9H (Marsh *et al.* Gene 32, 481-485, 1984). Las secuencias de cadena pesada incluidas en pICEmu se extienden hacia abajo del punto EcoRI situado justo a 3' del aumentador intrónico mu, con el punto XhoI situado aproximadamente 1 kb en dirección inferior del último exón de membrana del gen mu; sin embargo, una gran parte de la región de repetición de intercambio se ha borrado por el paso en *E. Coli*.

El vector objetivo se construyó del siguiente modo (ver Figura 1). Un fragmento de 1.3 kb HindIII/SmaI se cortó de pICEmu y se subclonó en HindIII/SmaI pBluescript digerido (Stratagene, La Jolla, CA). Este fragmento pICEmu se extiende del punto HindIII situado aproximadamente a 1 kb 5' de CmuI al punto SmaI localizado en CmuI. El plásmido resultante se digirió con SmaI/SpeI y se insertó el fragmento aproximadamente de 4 kb SmaI/XbaI de pICEmu, que se extiende del punto SmaI en CmuI 3' al punto XbaI localizado justo debajo del último exón Cmu. El plásmido resultante, pTARI, se alineó en el punto SmaI, y se insertó un nuevo cassette de expresión. Este cassette consiste en el nuevo gen bajo control transcripcional del promotor de la quinasa fosfoglicerato del ratón (pgk) (fragmento XbaI/TagI; Boer *et al.* (1990) Biochemical Genetics 28: 299-308). Este cassette se obtuvo del plásmido pKJ1 (descrito por Tybulewicz *et al.* (1991) Cell 65:1153-1163) del cual se cortó el nuevo cassette como un fragmento EcoRI/HindIII

y se subclonó en EcoRI/HindIII pGEM-7Zf (+) para generar pGEM-7(KJ1). El nuevo cassette se cortó de pGEM-7 (KJ1) por digestión EcoRI/SalI, en la orientación opuesta de la secuencia genómica Cmu. El plásmido resultante, se alineó con Not I, y un cassette de quinasa timidina de virus de herpes (tk) se insertó para permitir el enriquecimiento de clones ES que permiten recombinantes homólogos, como lo describió Mansour *et al.*, (1988) Nature 336: 348-352.

5 Este cassette consiste en las secuencias de codificación del gen tk catalogado por el promotor pgk del ratón y punto de poliadenilación, como lo describió Tybulewicz *et al.* (1991) Cell 65:1153-1163. El vector resultante de objetivo CMD contiene un total de aproximadamente 5.3 kb de homología con el punto de cadena pesada y se designa para generar un gen mu mutante que se ha insertado en un nuevo cassette de expresión en el único punto SmaI del primer exón Cmu. El vector objetivo se alineó con PvuI, que corta en las secuencias de plásmido, antes de la electroporación en

10 células ES.

Generación y Análisis de células ES objetivo

Células AB-1 (McMahon. A. P. y Bradley, A., (1990) Cell 62: 1073-1085) crecieron en capas alimentadoras de células SNL76/7 mitóticamente inactivas (*ibid.*) esencialmente como se describen (Robertson, E. J. (1987) en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach* (E. J. Robertson, ed) Oxford: IRL Press, p. 71-112). El vector de objetivo CMD alineado se electroporó en células AB-1 mediante métodos descritos por Hasty *et al.* (Hasty, P. R. *et al.* (1991) Nature 350:243-246). Las células electroporadas se colocaron en platos de 100 mm en una densidad de 1-2 x 10⁶ células/plato. Después de 24 horas, se añadieron G418 (200 microgramos/ml de componente activo) y FIAU (5 x 10⁻⁷M) al medio, y se permitieron que los clones resistentes al fármaco se desarrollaran durante 8-9 días. Los clones se recogieron, tripsinizaron, dividieron en dos porciones y se expandieron. La mitad de las células derivadas de cada clon se congelaron y la otra mitad se analizó para recombinación homóloga entre las secuencias del vector y el objetivo.

El análisis de ADN se llevó a cabo mediante la hibridización Southern blot. El ADN se aisló de los clones como se describió en Laird *et al.* (Laird, P. W. *et al.*, (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4293). El ADN genómico aislado se digirió con SpeI y se investigó con un fragmento 915 bp SacI, sonda A (ver Figura 1) que hibridiza con una secuencia entre el mejorador intrónico mu y la región de intercambio mu. La sonda A detecta un fragmento de 9.9 kb del punto de tipo salvaje, y una banda de diagnóstico de 7.6 kb de un lugar mu que se ha recombinado homológamente con el vector objetivo CMD (el nuevo cassette de expresión contiene un punto SpeI). De los clones resistentes 1132 G418 y FIAU analizados por el análisis Southern Blot, 3 mostraron la banda SpeI de 7.6 kb indicativa de recombinación homóloga en el lugar mu. Estos 3 clones se digirieron además con las enzimas BglII, BstXI, y EcoRI para verificar que el vector se integró homológamente con el gen mu. Cuando se hibridizó con sonda A, las pruebas de Southern blot de ADN de tipo salvaje digeridas con BglII, BstXI, y EcoRI, producen fragmentos de 15.7, 7.3, y 12.5 kb, respectivamente, mientras la presencia de un alelo de mu objetivo indicado por fragmentos de 7.7, 6.6, y 14.3, respectivamente. Los 3 clones positivos detectados por la asimilación SpeI mostró el esperado diagnóstico de fragmentos de restricción de BglII, BstXI, y EcoRI de inserción del nuevo cassette en el exón Cmu1.

Generación de ratones que soportan el gen mutado mu

Los tres clones objetivo ES, designados con los números 264, 272, y 408, se fundieron e inyectaron en blastocitos C57BL/6J como se describe en Bradley (Bradley, A. (1987) en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*. (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 113-151). Blastocitos inyectados se transfirieron a los úteros de hembras pseudoembarazadas para generar ratones quiméricos que representan una mezcla de células derivadas de las células ES de entrada y blastocitos huéspedes. El alcance de la contribución de células ES a la quimera puede calcularse visualmente por la cantidad de coloración de capa de agutí, derivada de la línea celular ES, en el fondo negro C57BL/6J. Los clones 272 y 408 sólo produjeron un bajo porcentaje de quimeras (es decir, bajo porcentaje de pigmentación agutí) pero el clon 264 produjo un alto porcentaje de quimeras macho. Estas quimeras se reprodujeron con hembras C57BL/6J y se generaron crías agutí, indicativo de la transmisión de línea germinal del genoma celular ES. El análisis para el gen objetivo mu se llevó a cabo mediante análisis de Southern Blot de ADN asimilado de BglII de biopsias de la cola (como se ha descrito anteriormente para análisis de ADN de células ES). Aproximadamente el 50% de las crías de agutí mostraron una banda BglII de hibridización de 7.7 kb además de la banda de tipo salvaje de 15.7, demostrando transmisión de línea germinal del gen objetivo mu.

Análisis de ratones transgénicos para inactivación funcional del gen mu

Para determinar si la inserción del nuevo cassette en Cmu1 ha inactivado el gen de cadena pesada Ig, una quimera de clon 264 se reprodujo con un homocigoto de ratón para la mutación JHD, que inactiva la expresión de cadena pesada como resultado de la eliminación de segmentos de gen JH (Chen *et al.*, (1993) *Immunol.* 5: 647-656). Se generaron cuatro crías de agutí. Se obtuvo suero de estos animales a la edad de 1 mes y se llevó a cabo el ensayo ELISA para comprobar la presencia de murina IgM. Dos de las cuatro crías carecían completamente de IgM (ver Tabla 1). El genotipo de los cuatro animales por análisis de Southern blot de ADN de biopsias de cola por asimilación BglII e hibridización con sonda A (ver Figura 1), y por asimilación StuI e hibridización con un fragmento 475 bp EcoRI/StuI (*ibid*) demostraron que los animales que no expresan suero IgM son aquellos en los cuales un alelo de la posición de cadena pesada lleva la mutación JHD, el otro alelo la mutación CmuI. Los heterocigotos de ratón para la mutación JHD muestran niveles de tipo salvaje de suero Ig. Estos datos demuestran que la mutación CmuI inactiva la expresión del gen mu.

TABLA 1

Ratón	Suero IgM (microgramos/ml)	Genotipo cadena IgH
42	< 0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	< 0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6 F1	153	+/+
JHD	< 0.002	JHD/JHD

La Tabla 1 muestra los niveles de suero IgM, detectados por ELISA, para ratones que transportan las mutaciones CMD y JHD (CMD/JHD), para ratones heterocigotos para mutación JHD (+/JHD), para ratones de tipo salvaje (129Sv x C57BL/6J)F1 (+/+), para ratones deficientes de células B homocigotos para la mutación JHD (JHD/JHD).

Ejemplo 2

Generación de ratones transgénicos HCO12 para la producción de anticuerpos humanos anti-PSMA

El transgen de cadena pesada humana HCO12

El transgen HCO12 se generó por coinyección del añadido de 80 kb de pHC2 (Taylor *et al.*, 1994, Int. Immunol., 6: 579-591) y el añadido de 25 kb de pVx6. El plásmido pVx6 se construyó como se describe a continuación.

Un fragmento de ADN HindIII/SalI de 8.5 k, que consta de gen (DP-14) de línea germinal humana VH1-18 junto con aproximadamente 2.5 kb de 5', y 5 kb de 3' secuencia genómica flanqueante se subclonó en vector de plásmido pSP72 (Promega, Madison, WI) para generar el plásmido p343.7.16. Un fragmento de 7 kb de BamHI/HindIII ADN, que comprende el gen (DP-73) de línea germinal humana VH5-51 junto con aproximadamente 5 kb de 5', y 1 kb de 3' secuencia genómica flanqueante se subclonó en vector de clonación de plásmido pGP1f basado en pSP72 (Taylor *et al.* 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295), para generar el plásmido p251f. Un nuevo vector de clonación derivado de pGP1f, pGP1 k se asimiló con EcoRV/BamHI, y se ligó con fragmento de 10 kb EcoRV/BamHI ADN, que comprende el gen (DP47) de línea germinal humana VH3-23 junto con aproximadamente 4 kb de 5', y 5 kb de 3' secuencia genómica flanqueante. El plásmido resultante, p112.2RR.7, se asimiló con BamHI/SalI y se ligó con 7kb de añadido purificado BamHI/SalI de p251f. El plásmido resultante, pVx4, se asimiló con XhoI y se ligó con 8.5 kb de añadido purificado XhoI/SalI de p343.7.16.

Se obtuvo un clon con el gen VH 1-18 en la misma orientación que los otros dos genes V. Este clon, designado pVx6, fue posteriormente asimilado con NotI y se coinyectó el añadido de 26 kb purificado- junto con el añadido purificado de 80 kb NotI de pHC2 en un radio molar de 1:1-en el pronúcleo de embriones de un día y medio (C57BL/6J x DBA/2J)F2 como lo describió Hogan *et al.* Manipulating the Mous Embryo, A Laboratory Manual, 2nd edition, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY). Se establecieron tres líneas independientes de ratones transgénicos que comprenden secuencias de Vx6 y HC2 que se desarrollaron de los embriones inyectados. Estas líneas se designaron (HCO12)14881, (HCO12)15083, y (HCO12)15087. Cada una de estas tres líneas se reprodujeron posteriormente con ratones que comprenden la mutación CMD descrita en el Ejemplo 1, la mutación JKD (Chen *et al.* 1993, EMBO J. 12:811-820), y el transgen (KCo5)9272 (Fishwild *et al.* 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851). Los ratones resultantes expresan transgenes de cadena ligera kappa y pesada de inmunoglobulina humana en un homocigoto de contexto para disrupción de las posiciones de cadena ligera kappa y pesada de ratón endógeno.

Ejemplo 3

Producción de Anticuerpos Monoclonales Humanos y Biespecíficos contra PSMA

Anticuerpos Monoclonales Humanos anti-PSMA se generaron inmunizando variedades HCO7 Y HCO12 de ratones HuMAb con antígeno PSMA purificado de células LNCaP que expresan PSMA y/o preparaciones de membrana cruda de células LNCaP.

Los ratones HuMAb HCO7 se generaron inicialmente inmunizados con antígenos emulsionados en Adyuvante de Freund Completo. En inmunizaciones posteriores, los antígenos se mezclaron con de Freund Incompleto. Finalmente,

ES 2 277 846 T3

se llevó a cabo la administración intravenosa del antígeno previa a la esplenectomía con antígeno purificado y no adyuvante. Los ratones se inmunizaron cada 2-3 semanas. Después de la tercera y posteriores inmunizaciones, se determinó el título anti-PSMA humano IgG mediante ELISA (como se ha descrito anteriormente). A los ratones que desarrollaron una respuesta IgG anti-PSMA se les administró antígeno purificado durante tres o cuatro días antes de la esplenectomía. Los bazo de los ratones que respondieron se cultivaron y dispersaron en células sencillas.

Para producir hibridomas que producen anticuerpos anti-PSMA, esplenocitos de plasma que contiene anticuerpos anti-PSMA, se fusionaron con células P3X63-Ag8.653 (depositadas con el ATCC bajo la denominación ATCC CRL 1580 células de mieloma de ratón no segregadoras) y PEG. Después de que los hibridomas crecieran (tras aproximadamente 10-14 días) cada pozo que contenía hibridomas se analizó para la producción de IgG humano usando un ELISA IgG anti-humano.

Los hibridomas positivos se analizaron y seleccionaron en base a las siguientes propiedades:

(1) producción de anticuerpos humanos IgG1k, (2) enlace con PSMA purificado, y (3) enlace con PSMA que expresa células tumorales. El análisis de secuencia de ADN confirmó que los anticuerpos anti-PSMA se codificaron mediante reorganizaciones V(D)J de los transgenes de inmunoglobulina humanos.

En resumen se empleó un ensayo basado en ELISA de fase sólida para el análisis de anticuerpos humanos anti-PSMA. PSMA purificado de inmunofinidad de células LNCaP se cubrió en placas de microtítulo de 96 pozos Maxi-Sorp (Nunc, Rochester, NY) y se incubó durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron posteriormente con PBS-0.2% Tween-20 y se bloqueó con albúmina de suero bovino en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes del anti-PSMA que producían hibridomas (50 μ l) o anticuerpo purificado (1-5 μ g/ml en PBS) se añadieron a los pozos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron posteriormente con PBS/Tween como se ha indicado previamente y se incubaron con 50 μ l de IgG de conejo anti-humano conjugado con HRP (1:5000; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante una hora a temperatura ambiente. Después del lavado, 100 μ l de ABTS (150 mg 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico en 500 ml de 0.1 M ácido cítrico, pH 4.35)/H₂O₂ (10 μ l 30% H₂O₂ por 10 ml de solución ABTS) cromógeno/solución de sustrato se añadió a cada pozo y las muestras se leyeron con un lector microplaca en una longitud de onda de 405 nm.

Los hibridomas que produjeron IgG humano que se enlazaron con PSMA mediante ELISA se caracterizaron además por ELISA y citometría de flujo para isotipo, enlazándose con células tumorales que expresaban PSMA, y que carecían de enlace con células negativas de PSMA, como se ha descrito anteriormente. Los hibridomas con sobrenadantes que mostraban estas propiedades se subclonaron, y sus anticuerpos además se caracterizaron tras la purificación.

Los anticuerpos monoclonales se aislaron de un bioreactor Cellmax (Cellco, Laguna Hills, CA) usando un medio HyQ-CCM1 que contenían 1 a 5% de Fetalcolone (Hyclone, Logan UT) y se purificó por cromatografía en una columna de Proteína G-agarosa según las explicaciones del fabricante (KPL, Gaithersburg, MD).

Los anticuerpos monoclonales purificados se dializaron exhaustivamente contra 0.3 M búfer carbonato de sodio, pH 9.5, para etiquetar con isotiocianato de fluorescencia (FITC). Se preparó una solución FITC de reserva para disolver 1 mg de FITC sólido en 1 ml de DMSO. El FITC de reserva se añadió en forma de gotas con mezcla constante en una cantidad para proporcionar 50 μ g de FITC por mg de proteína de anticuerpo. Tras la adición de FITC, la solución se incubó en la oscuridad durante 1-3 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos etiquetados con FITC se aislaron por filtración de gel en una columna Sephadex G-10 equilibrada en PBS.

Varios hibridomas que se analizaron produjeron anticuerpos humanos IgGk que específicamente se enlazaron con PSMA como se comprobó por ELISA y citometría de flujo (p. ej, 4A3, 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9). Los anticuerpos monoclonales purificados del sobrenadante 8C12 de hibridoma que mostraron enlace significativo con PSMA como el detectado por ELISA se caracterizaron por tener una afinidad de enlace específica de $\geq 10^{-9}$.

Las moléculas biespecíficas designadas 14.1 x 8C12 (mostradas en la Figura 3) y 14A8 x 8C12 se formularon por conjugación química de los fragmentos Fab'2 del anticuerpo anti-humano CD89 14.1 o un subclon del anticuerpo 14.1, designado 14A8, respectivamente, y el anticuerpos anti-PSMA, 8C12, a través de enlace de disulfuro empleando procedimientos estándar de enlace cruzado.

Ejemplo 4

60 *Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Humanos Contra PSMA*

I. Enlace de anticuerpos humanos anti-PSMA de células tumorales

Los anticuerpos monoclonales purificado de sobrenadantes de hibridoma que mostraron enlace significativo con PSMA como el detectado por ELISA (por ejemplo, 4A3, 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9) fueron además examinados para comprobar la habilidad de enlace con células tumorales que expresan altos niveles de PSMA.

Las características de enlace de anticuerpos específicos humanos anti-PSMA se estudiaron por fase sólido ELISA usando fracción de membrana de plasma derivada de células LNCaP y PC3. Para preparar fracciones de membrana celular de células LNCaP y PC3, las células se desecharon de los platos de plástico, se lavaron cuidadosamente en PBS, se resuspendieron en 10 volúmenes de agua deionizada, y se homogenizaron por tres golpes con un homogenizador Dounce. La fracción de membrana se aisló por centrifugación a 15,000 x g durante 45 minutos y la bola se resuspendió en PBS. La concentración de proteína de la bola de membrana se determinó empleando el kit Pierce (Rockford, IL) BSA.

Las fracciones de membrana LNCaP y PC3 se diluyeron en serie en placas de 96 pozos y se secaron al aire. Las placas se bloquearon con 5% BSA, y se trataron con 5 µg/ml anticuerpo humano anti-PSMA en PBS durante 1 hora, antes de la detección usando procedimientos estándar de ELISA como se ha descrito anteriormente. Los resultados presentados en la Figura 4 muestran resultados para los anticuerpos monoclonales humanos independientes. Estos anticuerpos demuestran elevada especificidad para membranas celulares LNCaP en una variedad de concentraciones de antígeno, mientras existen pocos o ningún anticuerpos que se enlace más allá de las membranas celulares PC3.

Además, el anticuerpo humano anti-PSMA que se enlaza con células tumorales vivas LNCaP y PC3 se estudiaron por citometría de flujo. En resumen, las células tumorales se cultivaron de manera fresca del cultivo de tejido y se preparó una suspensión de célula sencilla. Aproximadamente se suspendieron 1 millón de células en PBS que contenía 0.5% BSA y se incubó con 50-200 µg/ml de anticuerpo humano anti-PSMA etiquetado FITC durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía 0.1% PBSA, 0.01% NaN₃, y se analizó para tinte fluorescente en un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA) con software de adquisición CellQuest. Como se muestra en la Figura 5, los anticuerpos humanos anti-PSMA 4A3, 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9 demostraron fuerte enlace específico con células vivas LNCaP que expresan PSMA. Sin embargo, se observó un tinte negativo con células PC3, o cuando un isotipo coincidió se usó un anticuerpo humano irrelevante con LNCaP.

Molécula biespecífica 14.1 x 8C12 también fue examinada para comprobar la habilidad para enlazarse con células LNCaP que expresan PSMA (Figura 6) y células U937 que expresan CD89 (Figura 7) empleando ensayos similares. Como se muestra en la Figura 6 y 7, la molécula biespecífica se enlaza tanto con células LNCaP como con células U937 en un modo dependiente de la dosis.

II. Especificidad de enlace de anticuerpos humanos anti-PSMA

La especificidad de enlace de anticuerpos humanos anti-PSMA 4A3, 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9 también se estudió por inmunoprecipitación de lisados de proteína de células LNCaP. En resumen, se preparó un lisado de detergente de células LNCaP añadiendo PBS que contenía 1% NP-40 a células LNCaP, incubando durante 1 hora, seguido de centrifugación para retirar el material particulado. El lisado se preacclaró añadiendo 150 µg de IgG1 humano irrelevante por mililitro de lisado, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de la adición de 150 µl de bolas de Proteína G-Sepharosa empaquetada por mililitro de lisado. La fracción sobrenadante fue utilizada tras la centrifugación para eliminar las bolas.

Las partes alícuotas (100 µl) del lisado celular LNCaP preacclarado se mezclaron con 5 µg de un anticuerpo individual humano anti-PSMA y se incubaron durante la noche a 4°C. Los granos se lavaron cuidadosamente con PBS, y a continuación se añadió búfer de muestra SDS. Los complejos inmunes de enlace se sometieron a la electroforesis de gel de poliacrilamida SDS y se transfirieron a membranas PVDF mediante el análisis de Western blot. Las membranas se bloquearon durante la noche en TBS/5% leche no grasa y se incubaron con el anticuerpo 4D8 específico epítipo de secuencia de PSMA lineal de murina, 5 µg/ml en TBS, durante 1 hora. Los borrones se lavaron 5 veces con TBS que contenía 0.5% Tween-20 (TBS-T) y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugado con HRP (1:5000). Después de 5 lavados con TBS-T los borrones se desarrollaron usando el kit de sustrato quimiluminiscente LumiGLO (KPL, Gaithersburg, MD) y se visualizaron por exposición a película de rayos x.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Las identidades de PSMA y PSM', una variante alternativo que carece de los primeros 57 aminoácidos de la terminal N, se indican mediante las flechas. La ruta 1 muestra la reactividad el Western blot de PSMA y PSM' presentes en el lisado de célula LNCaP. La ruta 2 muestra resultados de la inmunoprecipitación con un isotipo unido (IgG1) con anticuerpo humano irrelevante. Las rutas 3 a la 7 muestran resultados de inmunoprecipitación con anticuerpos 4A3, 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9, respectivamente. En cada caso, se observan las bandas intensas que corresponden a PSMA y PSM' indicando que estos anticuerpos se enlazan con epítopes de proteínas presentes en el dominio extracelular de la proteína, una región que abarca los residuos aminoácidos 44-750.

Se testó el anticuerpo que se enlaza con PSMA nativo y desnaturalizado por calor con el fin de determinar la importancia de la confirmación de proteína en la especificidad de enlace. Una parte alícuota de PSMA purificado de inmunofinidad de células LNCaP (40 µg/ml en PBS) se desnaturalizó por calor hirviéndolo durante 10 minutos, y enfriándolo en hielo. El PSMA desnaturalizado por calor y una parte alícuota idéntica de PSMA no desnaturalizado se diluyeron 1:4 en PBS, se añadieron a los pozos de una placa Maxi-Sorp de 96 pozos (Nunc) y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de cubrirse, las placas se bloquearon con 5% BSA en PBS durante 1 hora, se lavaron en PBS, y se sometieron a un ELISA sándwich usando los anticuerpos humanos anti-PSMA. El anticuerpo monoclonales de murina anti-PSMA 7E11, específico para un epítipo que constaba de los primeros 6 aminoácidos de la terminal N de la proteína, se empleó como un control positivo. Como se muestra en la Figura 9, la denaturalización por calor no tuvo ningún impacto sobre el enlace de anticuerpo 7E11, consistente con su reconocimiento de un epítipo de secuencia

lineal. A diferencia de estos resultados, los anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA 4A3, 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9, todos fuertemente enlazados a PSMA nativo purificado, mientras que la denaturalización de calor de PSMA virtualmente eliminó el enlace de anticuerpo. Estos resultados indican que se precisa una confirmación de proteína nativa para enlace de anticuerpo humano anti-PSMA. De acuerdo con este resultado, los anticuerpos 4A3, 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9 fueron inefectivos en detectar PSMA en un análisis de Western blot.

III. Estudios de competición de enlace de anticuerpo

Los estudios de competición de enlace de anticuerpo se llevaron a cabo empleando análisis de citometría de flujo para determinar si los anticuerpos individuales humanos anti-PSMA estaban unidos a un epítipo similar o distinto en PSMA. En estos experimentos, se comprobó la habilidad de anticuerpos anti-PSMA no etiquetados para bloquear el enlace de anticuerpos anti-PSMA etiquetados FITC para células LNCaP. La intensidad de etiquetaje FITC de células LNCaP se determinó mediante citometría de flujo.

Las partes alícuotas de aproximadamente 1 millón de células LNCaP se pretrataron con 200 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo humano purificado anti-PSMA o anticuerpo IgG1 humano irrelevante en PBS durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron exhaustivamente y además se incubaron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo humano anti-PSMA conjugado con FITC (o en algunos experimentos anticuerpo específico de PSMA de murina conjugado con FITC, por ejemplo, IG9, 3C6 y 4D4) durante 1 hora en hielo. Después del lavado, las células se tiñeron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo en un FACSCalibur con software CellQuest.

Como se muestra en la Figura 10, se observó un fuerte enlace de los anticuerpos humanos anti-PSMA etiquetados FITC en cada caso con células LNCaP pretratadas con IgG1 humano irrelevante. Sin embargo, el pretratamiento con anticuerpos humanos individuales anti-PSMA dio como resultado una sustancial inhibición del posterior enlace de anticuerpo humano anti-PSMA etiquetado FITC en cada caso. Se observó una ligera variación en el alcance de inhibición de enlace con diferentes parejas de anticuerpos. Por ejemplo, 8C12 inhibe de manera efectiva los enlaces 4A3, 8A11 y 8C12, pero tiene un efecto mucho menor sobre 7F12. En conjunto, estos datos sugieren que el comportamiento de enlace competitivo de 7F12 y 16F9 con los otros anticuerpos humanos anti-PSMA es muy similar. En resumen, parece que los anticuerpos humanos individuales anti-PSMA reconocieron ligeramente diferente, pero de forma cercana, epítipos conformacionales distribuidos en PSMA.

Los estudios de competición también se llevaron a cabo empleando un panel pequeño de anticuerpos específicos de PSMA de murina, designados IG9, 3C6 y 4D4 que también se dirigieron hacia epítipos conformacionales de proteína para determinar si los anticuerpos humanos anti-PSMA reconocen epítipos en común con los anticuerpos de murina. Como se muestra en la Figura 11, el pretratamiento de células LNCaP con anticuerpos individuales humanos anti-PSMA, seguido del etiquetaje bien con 4D4 murina FITC o con IG9, dio como resultado muy poca inhibición o incluso inhibición nula. Sin embargo, se observó inhibición significativa de enlace 3C6 murina FITC por anticuerpos humanos anti-PSMA 7F12, 8A11, 8C12 y 16F9, indicando que cada uno de los anticuerpos se enlaza con un epítipo similar o distribuido muy cerca como el reconocido por 3C6. La falta de inhibición de anticuerpos conformacionales de murina etiquetados FITC se observó con anticuerpo A3 humano anti-PSMA, sugiriendo que se enlaza con un epítipo distinto de la murina IG9, 3C6 o 4D4.

Ejemplo 5

Actividad de anticuerpos humanos anti-PSMA

I. Inhibición de crecimiento de células tumorales humanas usando anticuerpos humanos anti-PSMA y biespecíficos

Los anticuerpos humanos anti-PSMA y biespecíficos que muestran enlace específico con PSMA, como se ha demostrado anteriormente, pueden examinarse para comprobar la habilidad para inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan PSMA. En resumen, los anticuerpos purificados pueden incubarse con las células tumorales bajo condiciones normales de crecimiento, y la densidad celular puede medirse por tinte cristal violeta.

II. Actividad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) de anticuerpos humanos anti-PSMA y biespecíficos

Las moléculas biespecíficas 14.1 x 8C12 (mostradas en la Figura 3) y 14A8 x 8C12, así como el anticuerpo monoclonal 8C12, se examinaron para comprobar la eliminación ADCC mediado por célula polimorfonuclear de células tumorales que expresan PSMA etiquetado.

En particular, las células mononucleares (monocitos y neutrófilos), así como la sangre pura, se aislaron de donantes sanos y se incubaron con PSMA etiquetado ^{51}Cr que expresaba células tumorales en la presencia de molécula biespecífica 14.1 x 8C12. Después de aproximadamente 4 horas, el sobrenadante de cultivo de los pozos se cosechó y el escape de ^{51}Cr se midió en un contador gamma. El porcentaje de lisado específico se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula: $(\text{CPM experimental} - \text{CPM de fuga de objetivo}) / (\text{lisado detergente CPM} - \text{CPM de fuga de objetivo}) \times 100\%$. Los resultados, mostrados en las Figuras 12A, 13A y 14A, respectivamente, demuestran que 14.1 x 8C12 media el lisado dependiente de dosis de células tumorales por monocitos, neutrófilos y sangre pura, respectivamente, en comparación con el anticuerpo de control.

Las células mononucleares y la sangre pura también se incubaron con células tumorales LNCaP etiquetadas ^{51}Cr en la presencia de la molécula biespecífica 14A8 x 8C12 o el anticuerpo monoclonal 8C12 (Figuras 12B, 12C, 13B y 14B). Las células LNCaP se etiquetaron con $100\ \mu\text{Ci}$ de ^{51}Cr durante 1 hora a 37°C ($5\%\ \text{CO}_2$) antes de la incubación con células mononucleares y sangre pura, junto con varias concentraciones de anticuerpo biespecífico o monoclonal. Tras la incubación de 16 horas, el sobrenadante se cultivó y analizó para comprobar la radioactividad como se ha descrito anteriormente.

ADCC inducido por Monocito

Como se muestra en la Figura 12A, la molécula biespecífica 14.1 x 8C12 logró la eliminación de células tumorales que expresan PSMA por monocitos en una manera dependiente de dosis. La adición de $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de 14.1 Fab' $_2$ completamente bloqueó ADCC de las células tumorales por $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de la molécula biespecífica 14.1 x 8C12, demostrando que la eliminación de la célula objetivo se consiguió exclusivamente por CD89 en las células efectoras. Como se muestra en la Figura 12B, la molécula biespecífica 14A8 x 8C12 y el anticuerpo monoclonal 8C12 también mediaron el lisado dependiente de dosis por monocitos de células tumorales LNCaP. Además la adición de 14A8 F(ab) $'_2$ en exceso completamente inhibió ADCC de las células tumorales por molécula biespecífica 14A8 x 8C12 en comparación con H22 F(ab) $'_2$ (anti-Fc γ RI humanizado), indicando que la eliminación de la célula objetivo se logró por medio de CD89 (ver Figura 12C).

ADCC inducido por Neutrófilo

Como se muestra en la Figura 13A, la molécula biespecífica 14.1 x 8C12 logró la eliminación de células tumorales que expresan PSMA por neutrófilos en una manera dependiente de dosis. La adición de $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de 14.1 Fab' $_2$ bloqueó de manera significativa el ADCC de las células tumorales por la molécula biespecífica, demostrando que la eliminación de la célula objetivo se consiguió específicamente por CD89 en las células efectoras. Como se muestra en la Figura 13B, la molécula biespecífica 14A8 x 8C12 también medió el lisado dependiente de dosis por neutrófilos de células tumorales LNCaP. La adición de 14A8 F(ab) $'_2$ en exceso completamente inhibió ADCC de las células tumorales por 14A8 x 8C12 en comparación con H22 F(ab) $'_2$ (anti-Fc γ RI humanizado), indicando que la eliminación de la célula objetivo se logró por medio de CD89.

ADCC inducido por Sangre Pura

Como se muestra en la Figura 14A, la molécula biespecífica 14.1 x 8C12 logró la eliminación de células tumorales que expresan PSMA por sangre pura en una manera dependiente de dosis. La adición de $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de 14.1 Fab' $_2$ bloqueó de manera significativa el ADCC de las células tumorales por la molécula biespecífica, demostrando que la eliminación de la célula objetivo se consiguió específicamente por el enlace de CD89 con las células efectoras. De manera similar, como se muestra en la Figura 14B, la molécula biespecífica 14A8 x 8C12 también medió el lisado dependiente de dosis por sangre pura de células tumorales LNCaP. La adición de 14A8 F(ab) $'_2$ en exceso completamente inhibió ADCC de las células tumorales por 14A8 x 8C12 en comparación con H22 F(ab) $'_2$ (anti-Fc γ RI humanizado), indicando que la eliminación de la célula objetivo se logró por medio de CD89.

III. Anticuerpos anti-PSMA humanos y moléculas biespecíficas median fagocitosis v eliminación de células tumorales que expresan PSMA en presencia de células efectoras humanas

La molécula biespecífica 14.1 x 8C12 y 14A8 x 8C12, así como el anticuerpo monoclonal 8C12, fueron examinados para comprobar su habilidad para lograr fagocitosis de células tumorales que expresan PSMA etiquetado (células LNCaP) solas, así como la presencia de exceso de anticuerpo 14.1 (anti-Fc α R) Fab' $_2$ o exceso de anticuerpo H22 (anti-Fc γ RI humanizado) Fab' $_2$ como un control.

En resumen, la fagocitosis mediada biespecífica de células LNCaP por macrófagos derivados de monocito (MDM) se examinó por modificación del método descrito por Munn *et al.* (1990) *J. Exp. Med.* 172:231-237. Los monocitos, purificados de leucopacs de fuente adulta (ABI), se diferenciaron en placas de 24 pozos ($1 \times 10^6/\text{ml}$) en medio libre de suero de macrófago (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con $10\%\ \text{FBS}$ y $10\ \text{mg}/\text{ml}$ de M-CSF durante 7-12 días. Las células LNCaP se etiquetaron con el tinte fluorescente rojo lipofílico, PKH 26 (Sigma, St. Louis, MO). Las células LNCaP etiquetadas se añadieron a los pozos que contenían MDM en la ausencia o en la presencia de anticuerpo biespecífico (o anticuerpo control) y se incubaron a 37°C durante 5-24 horas ($5\%\ \text{CO}_2$). Las células MDM y LNCaP no fagocitadas se cubrieron con tripsina, y se tiñeron con mAb anti-CD33 etiquetado FITC (251) y mAb anti-CD14 (AML-2-23) durante 1 hora en hielo (4°C). Las células se lavaron y analizaron por fluorescencia de dos colores usando el FACScan. El porcentaje de fagocitosis se calculó como el número de células objetivo duales positivas (digeridas por MDM) dividido por el número total de células objetivo x 100% .

Como se muestra en la Figura 15, la molécula biespecífica 14.1 x 8C12 logró aumentar fagocitosis específica de células tumorales en un modo dependiente de dosis. La adición de 14.1 Fab' $_2$ bloqueó de manera significativa la fagocitosis de células tumorales por la molécula biespecífica, demostrando de nuevo que la fagocitosis objetivo se logró específicamente por enlace de CD89 con las células efectoras. De modo similar, como se muestra en la Figura 16, la molécula biespecífica 14A8 x 8C12 y el anticuerpo monoclonal 8C12 también lograron fagocitosis de células LNCaP en un modo dependiente de dosis. La Figura 17 muestra que fagocitosis mediada 14A8 x 8C12 de células

ES 2 277 846 T3

tumorales LNCaP se logró por medio de CD89, y se inhibió por la adición de exceso de 14A8 F(ab)₂, en comparación con H22 F(ab)₂ (anti-FcγRI humanizado) (ver recuadro, Figura 17).

5 Los Ejemplos precedentes demuestran la generación de anticuerpos humanos monoclonales y biespecíficos que específicamente reaccionan con alta afinidad con PSMA. Estos anticuerpos y biespecíficos parecen reconocer epítopes de proteína conformacionales nativos presentes en el dominio extracelular de la molécula, más que epítopes definidos por un secuencia lineal de aminoácido. Además, los anticuerpos humanos anti-PSMA y moléculas biespecíficas de los mismos median la eliminación celular y fagocitosis en presencia de células efectoras contra células humanas tumorales que expresan niveles elevados de PSMA. Estos resultados apoyan la conclusión de que los anticuerpos monoclonales
10 totalmente humanos contra PSMA y fragmentos y moléculas biespecíficas de los mismos de la presente invención serán útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con PSMA. G. Kobler y Milstein C. (1975) Cultivos continuos de células fusionadas que segregan anticuerpo de especificidad predefinida. *Nature* 256: 495-497.

15 1. G. L. **Boulianne**, **Hozum N.** y **Shulman M. J.** (1984) Producción de anticuerpo de ratón/humano quimérico funcional. *Nature* 312: 643-646.

20 2. P. T. **Jones**, **Dear P. H.**, **Foote J.**, **Neuberger M.S.**, y **Winter G.** (1989) Sustituir las regiones que determinan la complementariedad en un anticuerpo humano con las de un ratón. *Nature* 321: 522-525.

3. J. D. **Marks et al.** (1991) Evitar Anticuerpos humanos de inmunización de bibliotecas de gen V mostrados en fago. *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

25 4. N. **Lonberg**, et al. 1994. Anticuerpos humanos específicos de antígeno de ratones que comprenden cuatro modificaciones genéticas distintas. *Nature* 368(6474): 856-859.

5. G. **Gafie**, **Howe S. C.**, **Butcher M. C. C. W.**, y **Howard H. C.** (1997). Anticuerpos para antígenos de mayor histocompatibilidad producidos por líneas celulares híbridas. *Nature* 266:550-552.

30 6. **Hesto**, W.D. (1996) *Urologe-Ausgabe A.* 35:400-407.

7. **Gregokaris**, A.K. et al. (1998) Antígeno de membrana específico de próstata: utilidad actual y futura. Seminarios en Oncología Urológica 16:2-12.

35 8. **Barren**, R.J 3rd et al. (1998) Métodos para identificar células prostáticas en semen usando citometría de flujo. *Prostate* 36: 181-188.

40 10. **Murphy**, G.P. (1998) Evaluación actual de la localización de tejido y utilidad de diagnóstico de antígeno de membrana prostático específico. *Cancer* 83:2259-2269.

11. **Silver**, D. A (1997) Expresión de antígeno de membrana prostático específico en tejido humanos normales y dañados. *Clinical Cancer Research* 3: 81-85.

45 12. **O'Keefe**, D.S. et al. (1998) Trazado, organización genómica y análisis promotor del gen antígeno de membrana específico de próstata humana. *Biochim. Biophys. Acta.* 1443:113-127.

50

55

60

65

ES 2 277 846 T3

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano monoclonal humano que se enlaza específicamente con PSMA humano con una constante de afinidad de al menos 10^7M^{-1} , donde el anticuerpo:
- (a) tiene la habilidad para mediar histólisis de una célula que expresa PSMA en la presencia de células efectoras humanas en una concentración de $10\ \mu\text{g/ml}$ o menos *in vitro*; y
- (b) es capaz de mediar histólisis de células que expresan PSMA por medio de células efectoras humanas en un IC_{50} de $1 \times 10^7\text{M}$ o menos *in vitro*.
2. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se enlaza con PSMA humano nativo pero no con PSMA humano desnaturalizado por calor.
3. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se enlaza con PSMA humano con una constante de afinidad de al menos 10^8M^{-1} .
4. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se enlaza con PSMA humano con una constante de afinidad de al menos 10^9M^{-1} .
5. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, donde el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan PSMA por al menos 40%.
6. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, donde el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan PSMA por al menos 60%.
7. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, donde el PSMA es PSMA humano.
8. El anticuerpo humano de la reivindicación 1 que comprende una cadena pesada IgG1 o IgG3.
9. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, donde el anticuerpo tiene al menos una de las características seleccionadas del grupo consistente en:
- a) una constante de asociación (K_{assoc}) de al menos $10^4\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$;
- b) una constante de disociación (K_{dis}) de 10^{-4}S^{-1} o;
- c) la habilidad para opsonizar una célula que expresa PSMA.
10. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, que es un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo de cadena sencilla.
11. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, donde las células que expresa PSMA es una célula tumoral prostática.
12. El anticuerpo humano de la reivindicación 1, producido por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera humana fusionados on una célula inmortalizada.
13. Un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera humana fusionados con una célula inmortalizada, donde el hibridoma produce un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con las reivindicaciones precedentes.
14. El hibridoma de la reivindicación 13 que produce un anticuerpo monoclonal humano codificado por ácidos nucleicos de la cadena pesada humana IgG la cadena ligera humana kappa.
15. Un animal no humano transgénico que expresa un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, donde el animal no humano transgénico tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera humana.
16. Un método de producción de anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:
- Inmunizar un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera humana con PSMA o una célula que expresa PSMA, de tal modo que los anticuerpos se produzcan por células b del animal.

ES 2 277 846 T3

- Aislar células B del animal, y
- Fusionar células B con células mieloma para formar células inmortales, de hibridoma que segregan anticuerpos monoclonales humanos específicos para PSMA.

5 17. Una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo humano de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 12, y una segunda especificidad de enlace para un receptor Fc.

10 18. La molécula biespecífica de la reivindicación 17, donde el receptor Fc es un receptor humano Fc γ R o un receptor humano Fc α R.

19. La molécula biespecífica de la reivindicación 17, que se enlaza con el receptor Fc en un punto que es distinto del punto de enlace de inmunoglobulina del receptor.

15 20. La molécula biespecífica de la reivindicación 17, donde la segunda especificidad de enlace que se enlaza con un receptor Fc es un anticuerpo monoclonal humano.

21. La molécula biespecífica de la reivindicación 17 que es una cadena sencilla o proteína de fusión Fab'.

20 22. Una molécula que consta de un anticuerpo humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una segunda especificidad de enlace para un receptor Fc, y una tercera especificidad de enlace para un antígeno tumoral diferente a PSMA.

25 23. La molécula biespecífica de la reivindicación 22, donde el receptor Fc es un receptor humano Fc γ R o un receptor humano Fc α R.

24. Una composición que comprende un anticuerpo humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 23, y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 25. La composición de la reivindicación 24 que consta de una combinación de dos o más anticuerpos humanos aislados que específicamente se enlazan con PSMA, donde cada uno de dichos anticuerpos se enlaza con un epítipo distinto de PSMA.

26. La composición de la reivindicación 24 que además consta de un agente quimioterapéutico.

35 27. Un método *ex vivo* de inhibición de crecimiento de una célula que expresa PSMA, que comprende el contacto de una célula que expresa PSMA con un anticuerpo humano monoclonal aislado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 23, de tal modo que el crecimiento de la célula quede inhibido.

40 28. Un método *ex vivo* de inducción de citolisis de una célula que expresa PSMA, que comprende el contacto de una célula que expresa PSMA con un anticuerpo humano monoclonal aislado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 23, en la presencia de una célula efectora, de tal modo que la citolisis de la célula que expresa PSMA ocurra.

45 29. El método de la reivindicación 27 o 28, donde el anticuerpo monoclonal humano se conjuga con una especificidad de enlace para un receptor Fc.

50 30. El método de las reivindicaciones 27-29, donde el anticuerpo monoclonal humano se conjuga con una citotoxina.

31. El uso de un anticuerpo monoclonal humano aislado de las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 23 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de cáncer.

55 32. El uso de la reivindicación 31, donde el anticuerpo monoclonal humano se conjuga con una especificidad de enlace para un receptor Fc.

33. El uso de la reivindicación 31 o 32, donde el anticuerpo monoclonal humano se conjuga con una citotoxina.

60 34. El uso de las reivindicaciones 31 a 33, donde el cáncer es cáncer de próstata.

35. Un método para detectar la presencia de antígeno PSMA, o una célula que exprese PSMA, en una muestra que comprende:

65 - contactar la muestra, y una muestra control, con un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y PSMA; y

ES 2 277 846 T3

- detectar la formación de un complejo,
- donde una diferencia en la formación de complejo en comparación con la muestra control indica la presencia de PSMA en la muestra.

5

36. Una inmunotoxina que está formada por un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 23 unida a un agente citotóxico.

10

15

20

25

30

35

40

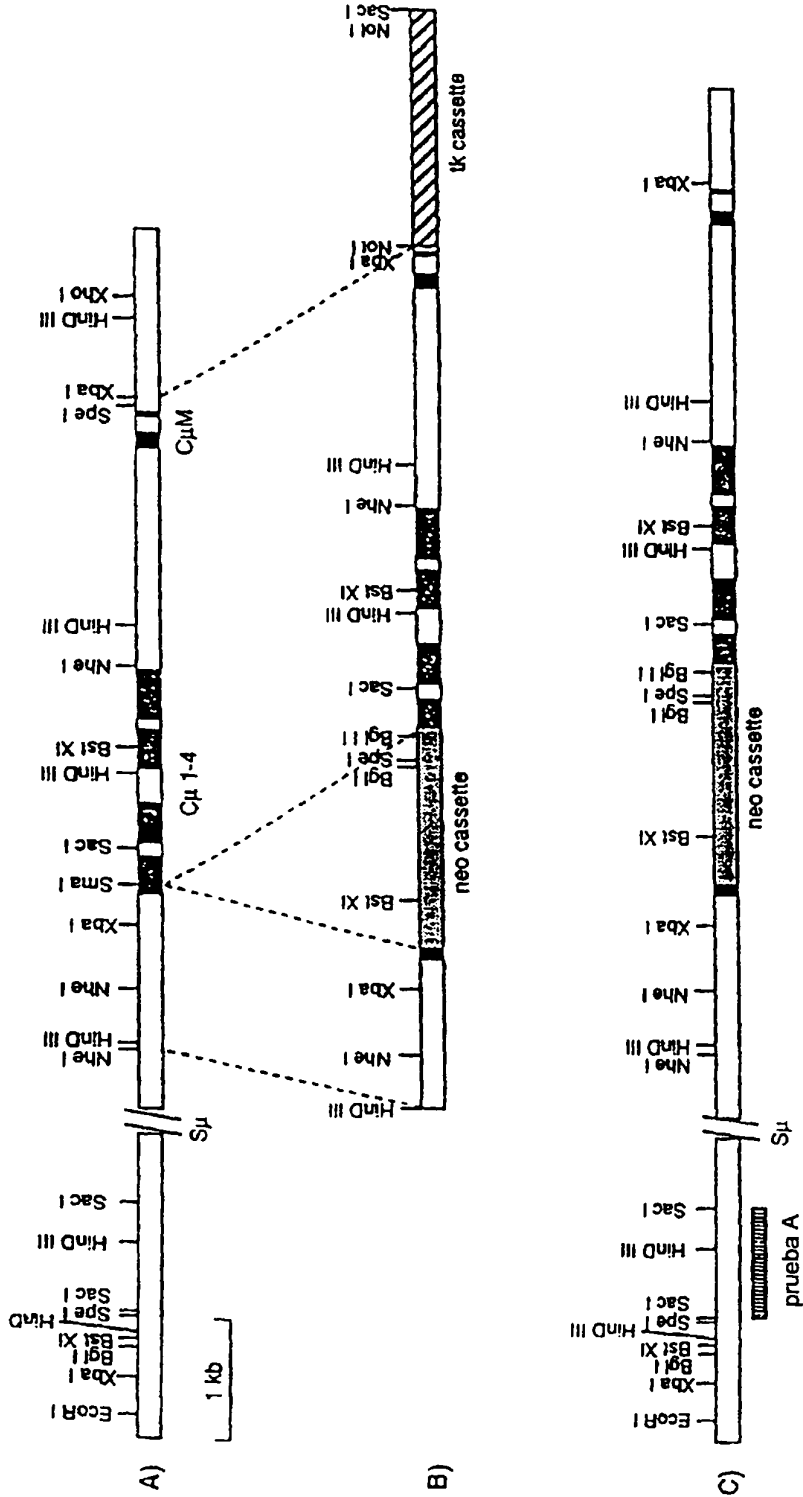
45

50

55

60

65



Tamaños de Fragmento Esperados (kb) usando Sonda A		
Compendio de Restricción	Longitud de fragmento tipo salvaje mutante	
Bgl I	15.7	7.7
Bst XI	7.3	6.6
Spe I	9.9	7.6
Eco RI	12.5	14.3

Figura 1

MEDAREX

Figura 2

Desarrollo de HuMAbs

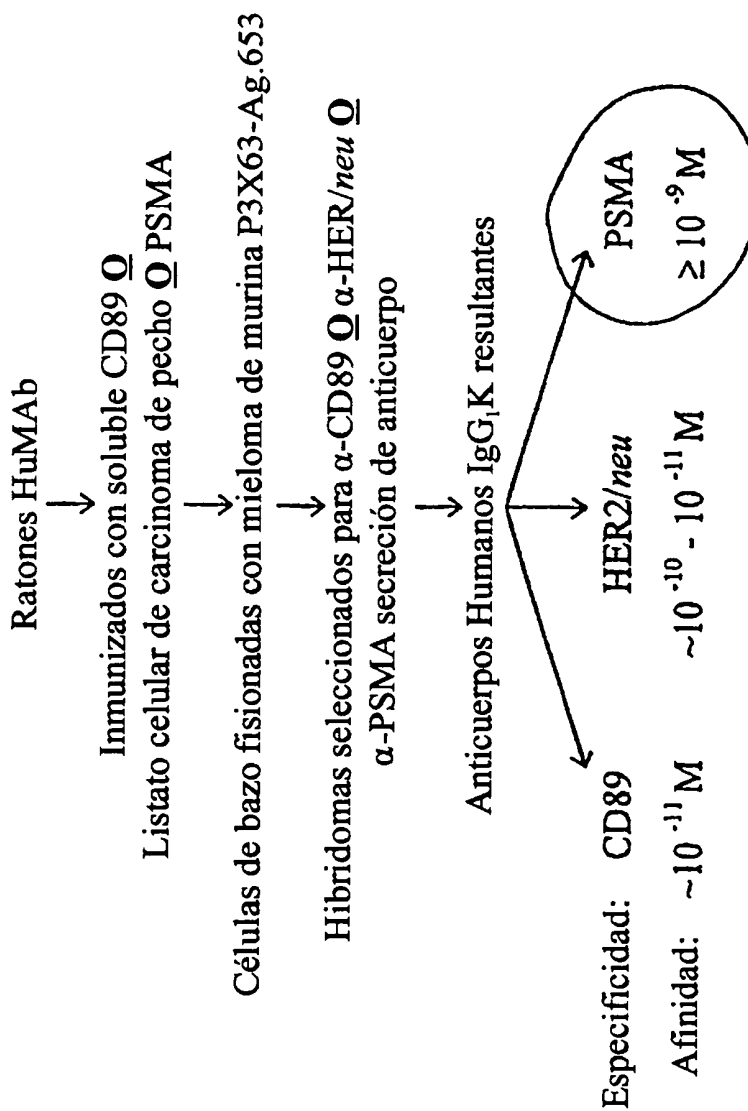
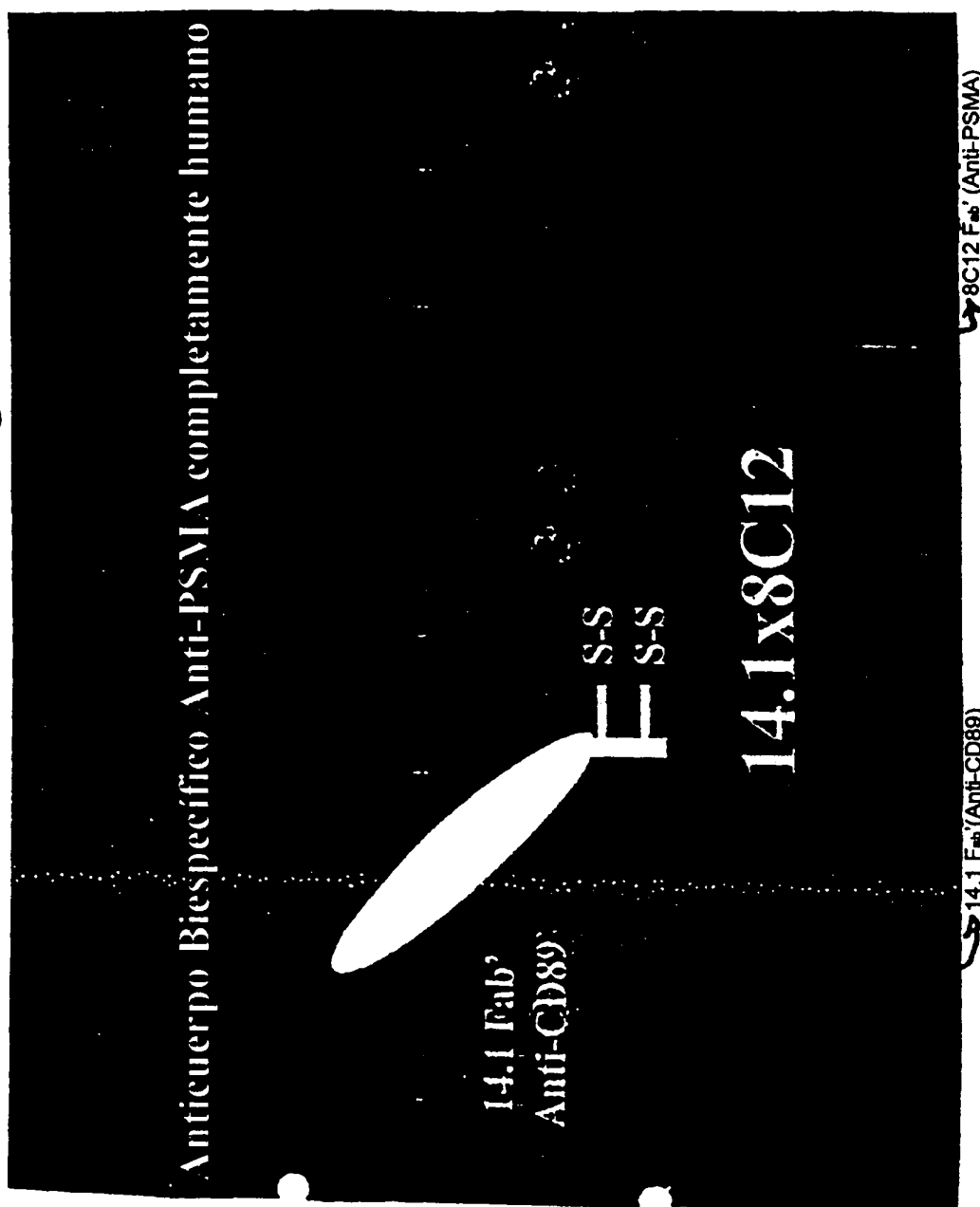


Figura 3



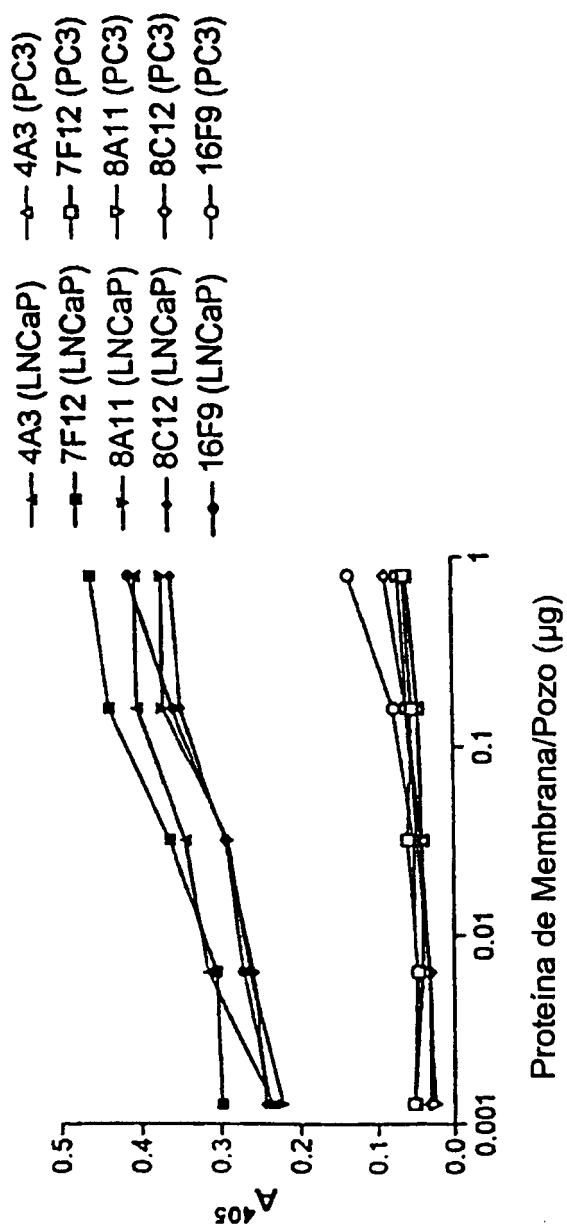


Figura 4

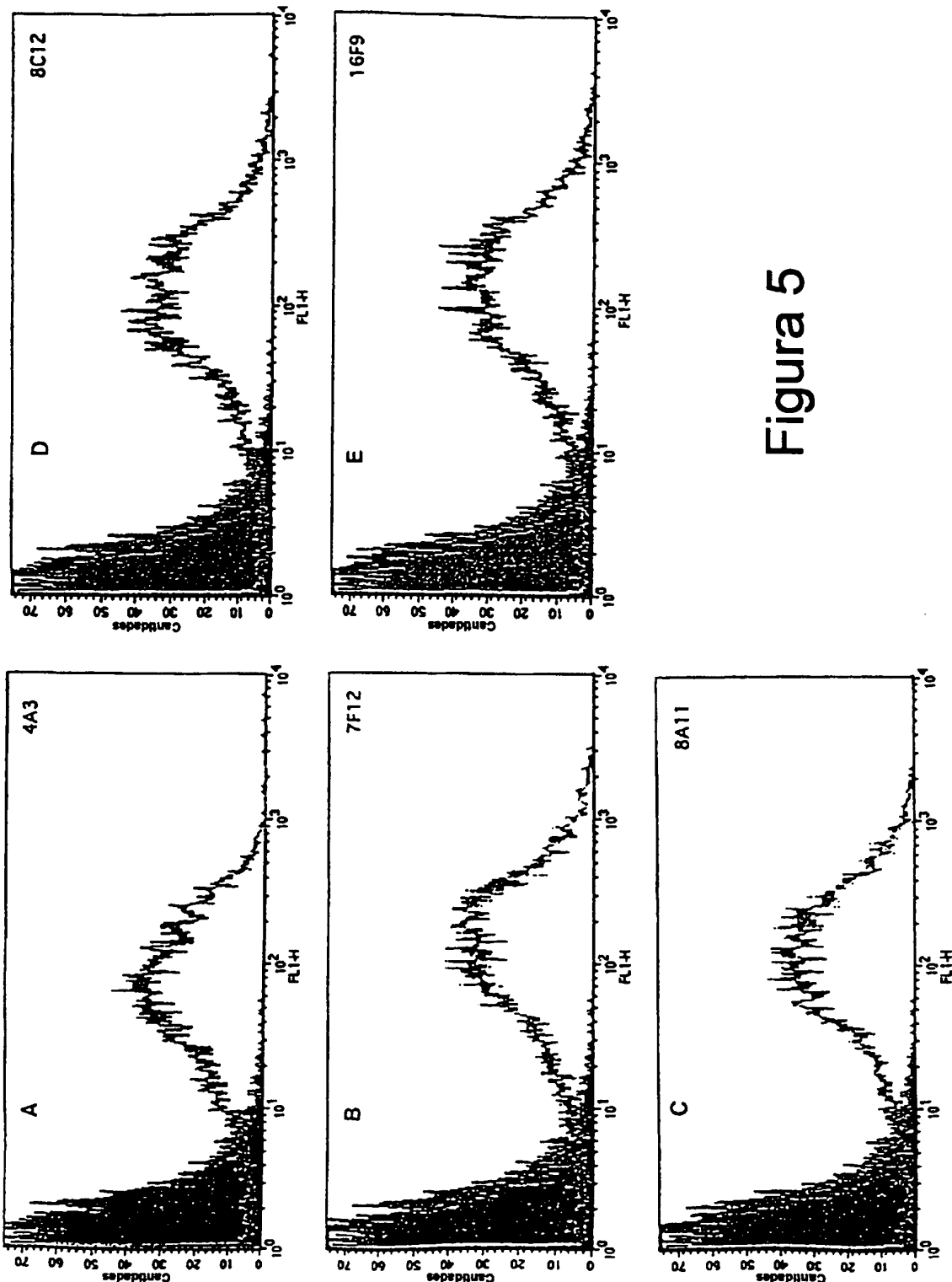


Figura 5

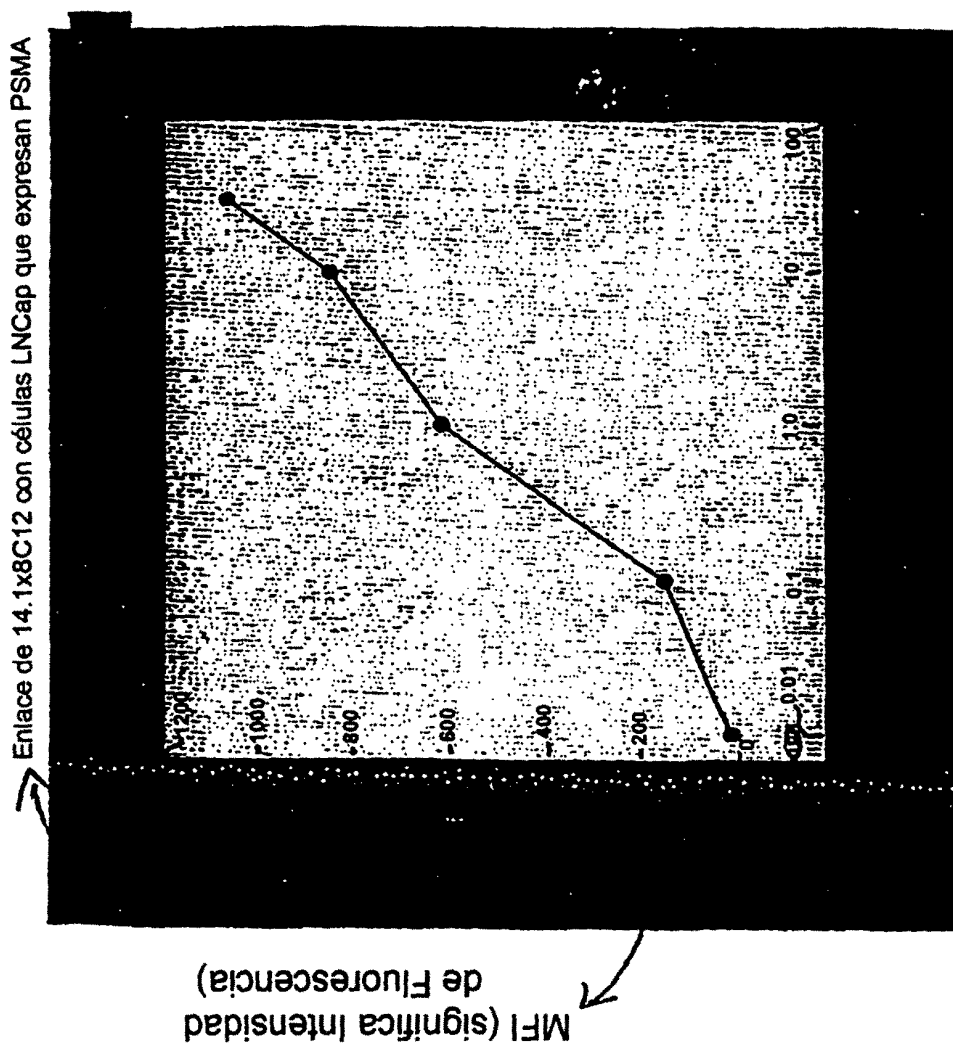


Figura 6

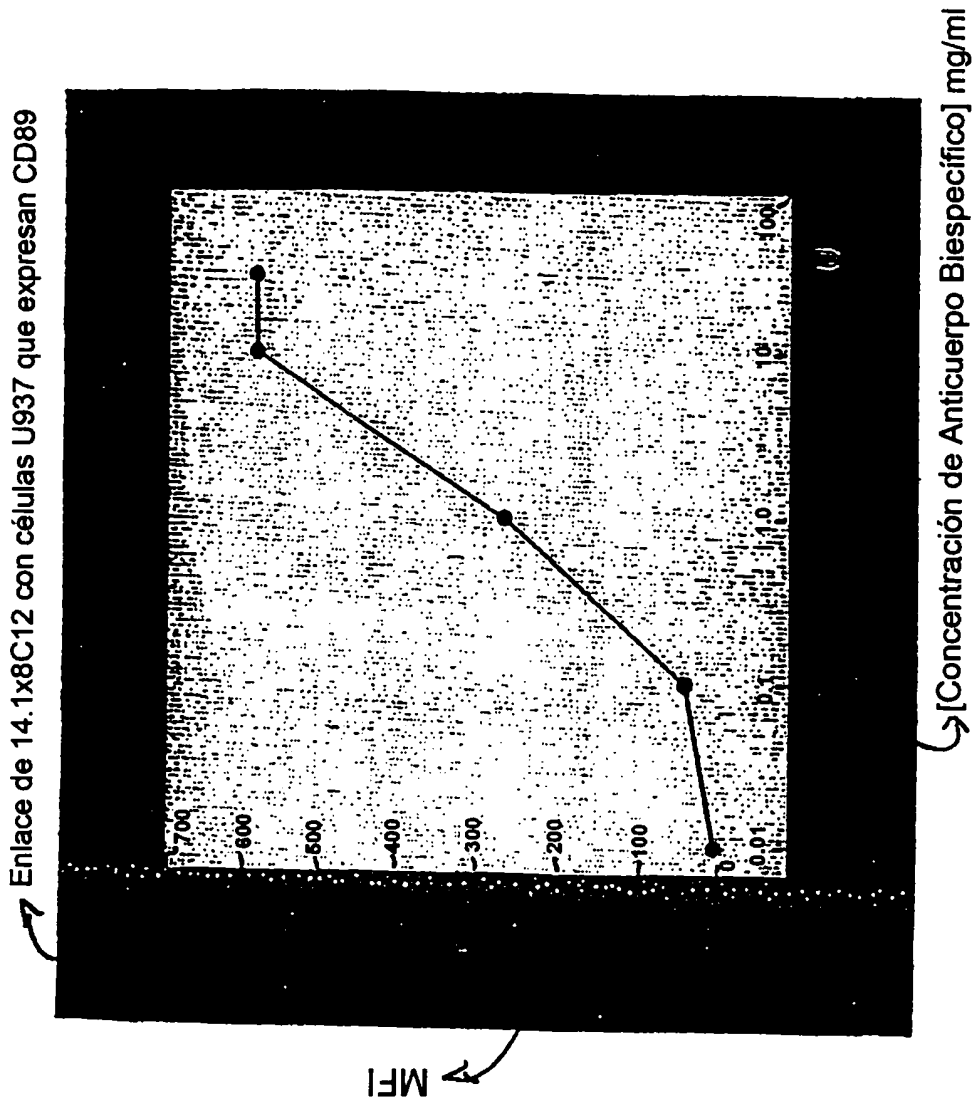


Figura 7

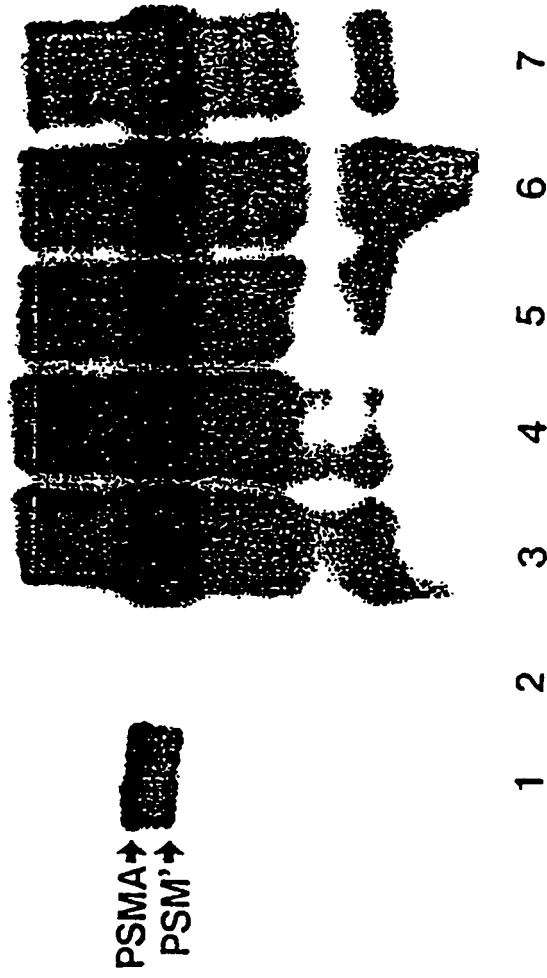


Figura 8

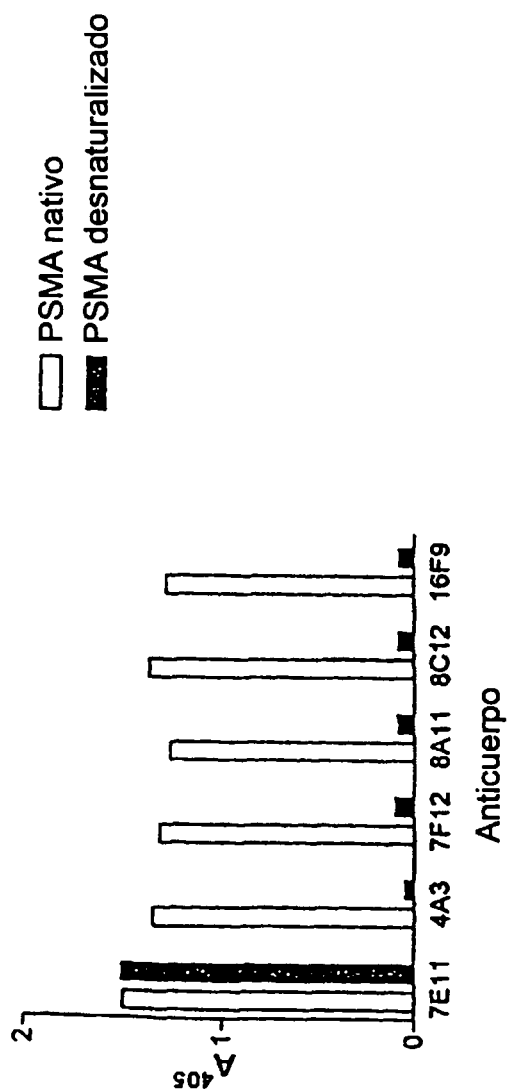


Figura 9

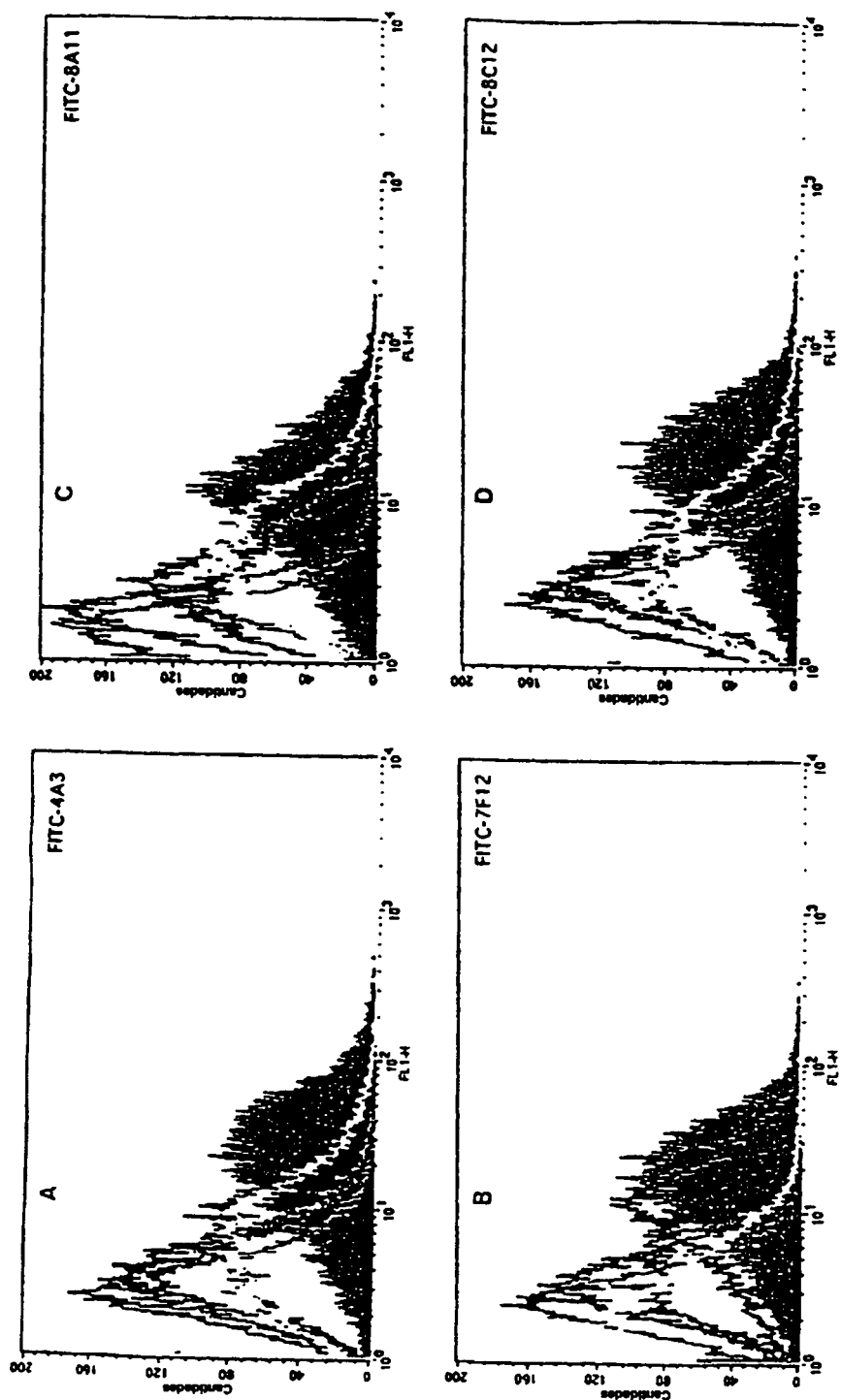


Figura 10

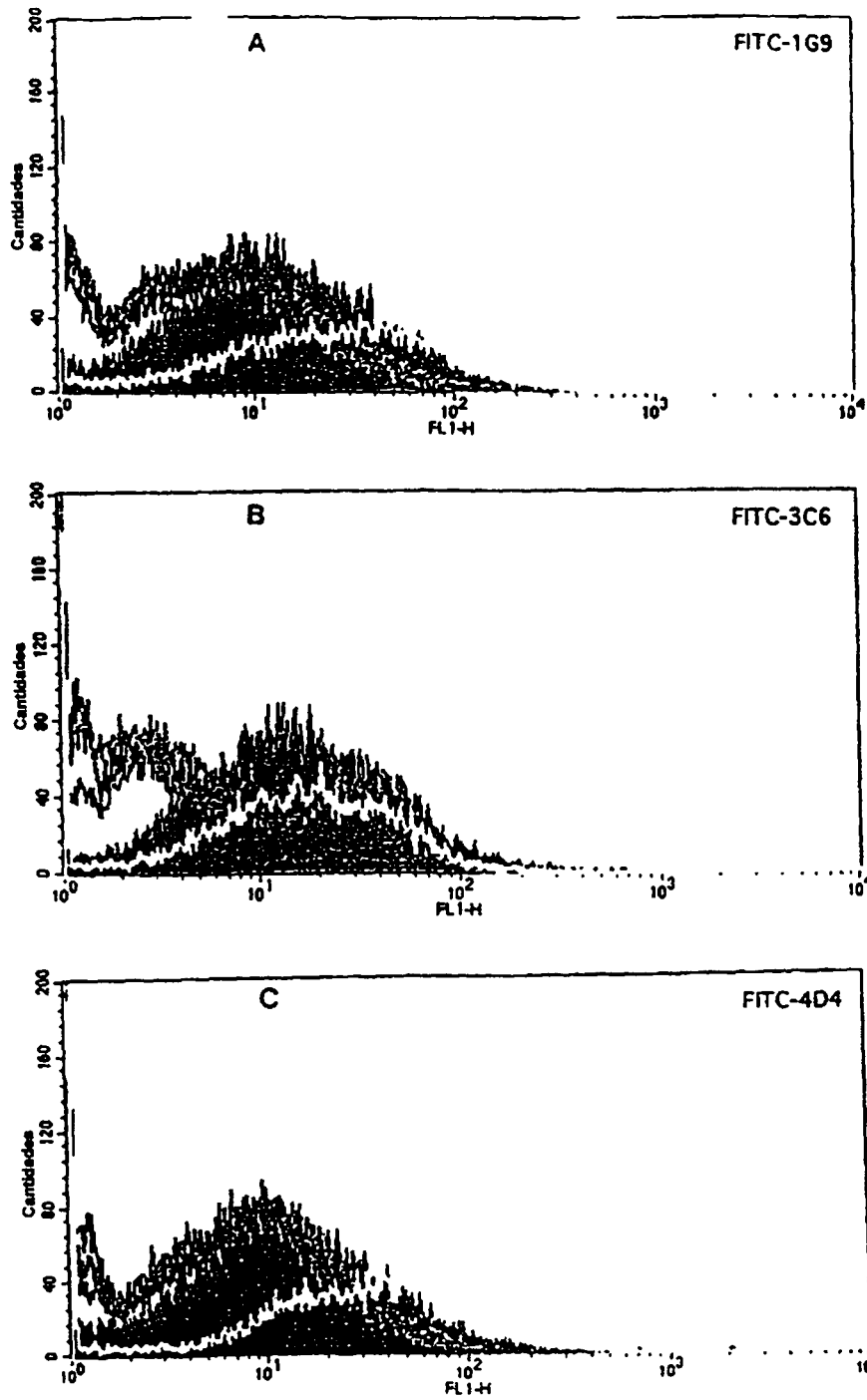


Figura 11

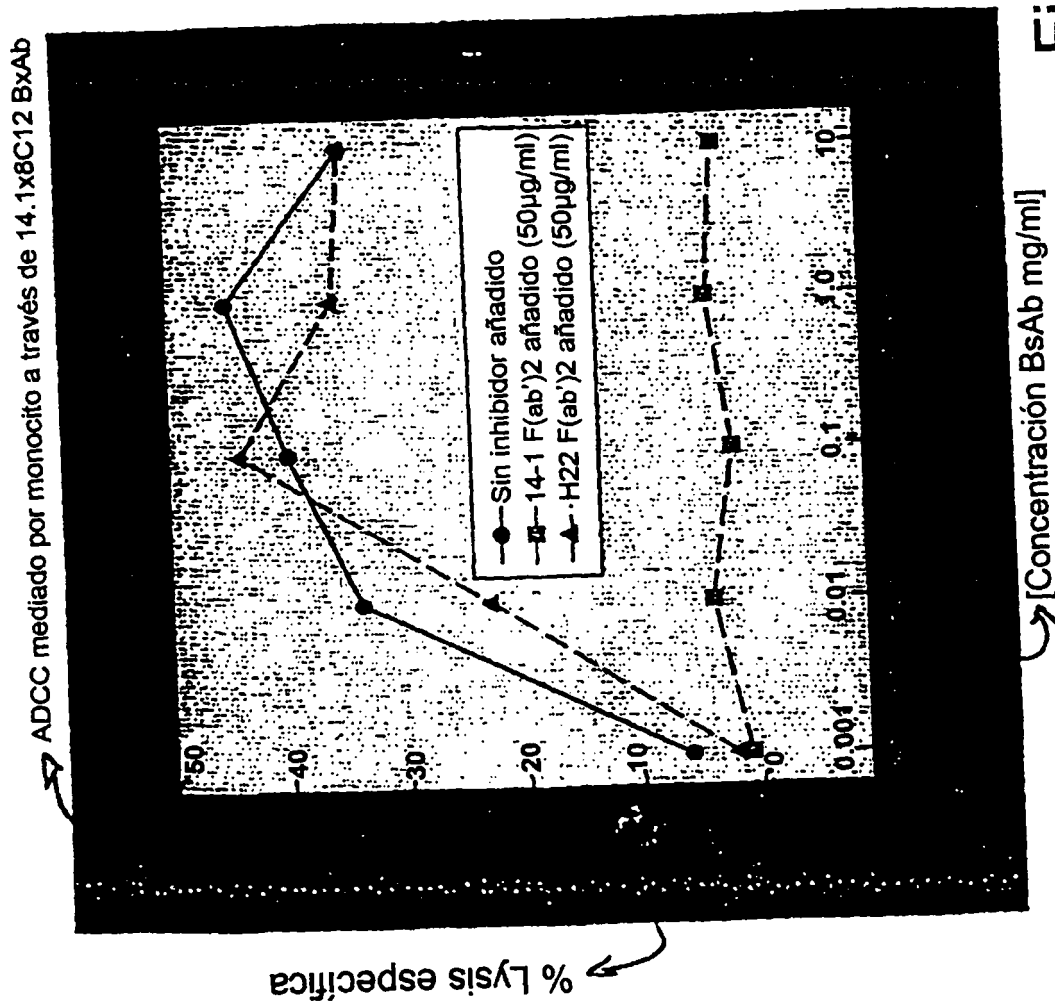


Figura 12A

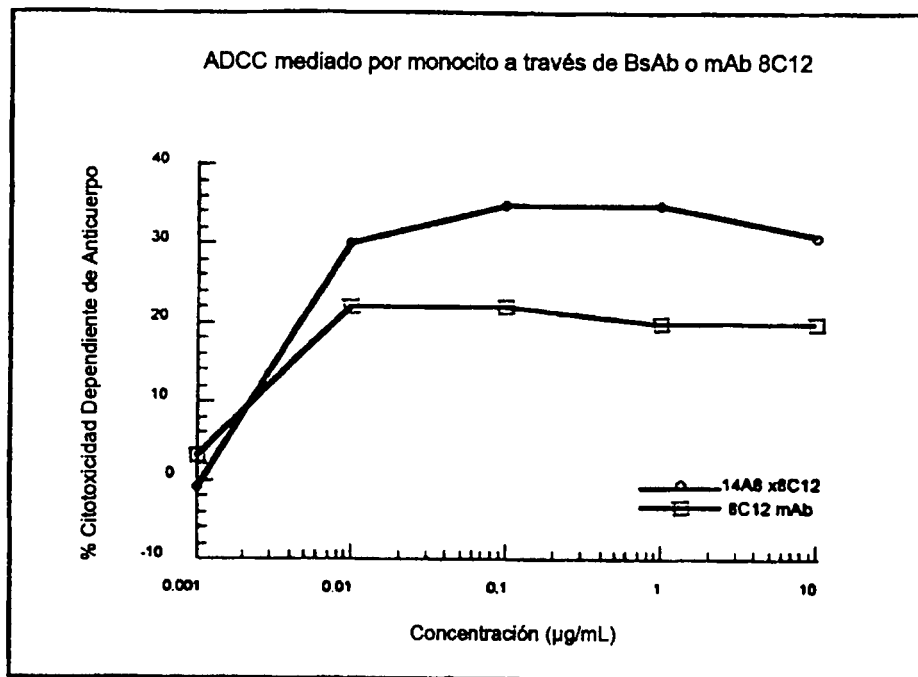


Figura 12B

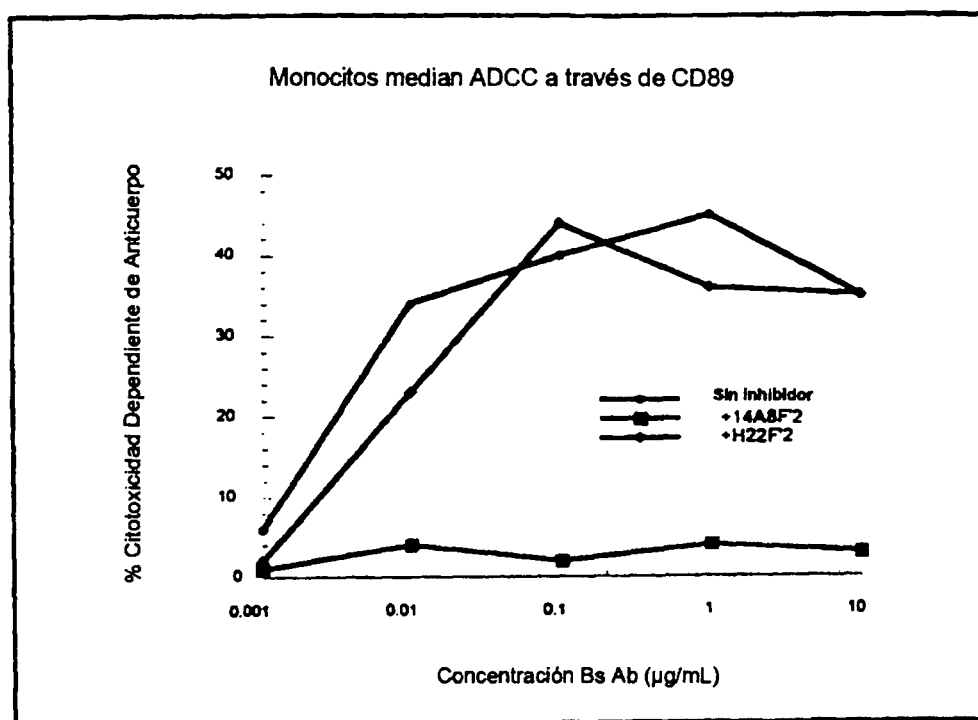
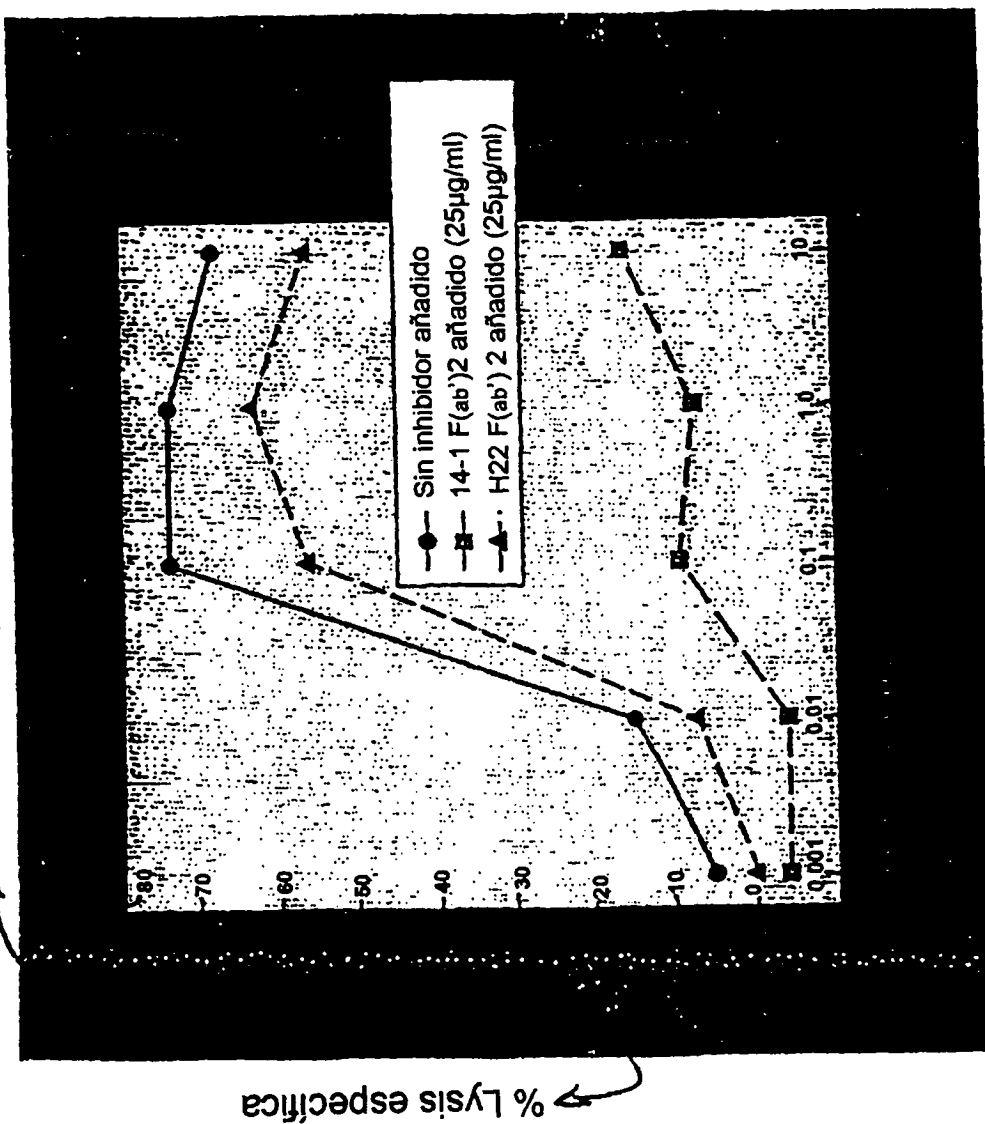


Figura 12C

ADCC mediado por neutrófilo a través de 14.1x8C12 BsAb



[Concentración BsAb mg/ml]

Figura 13A

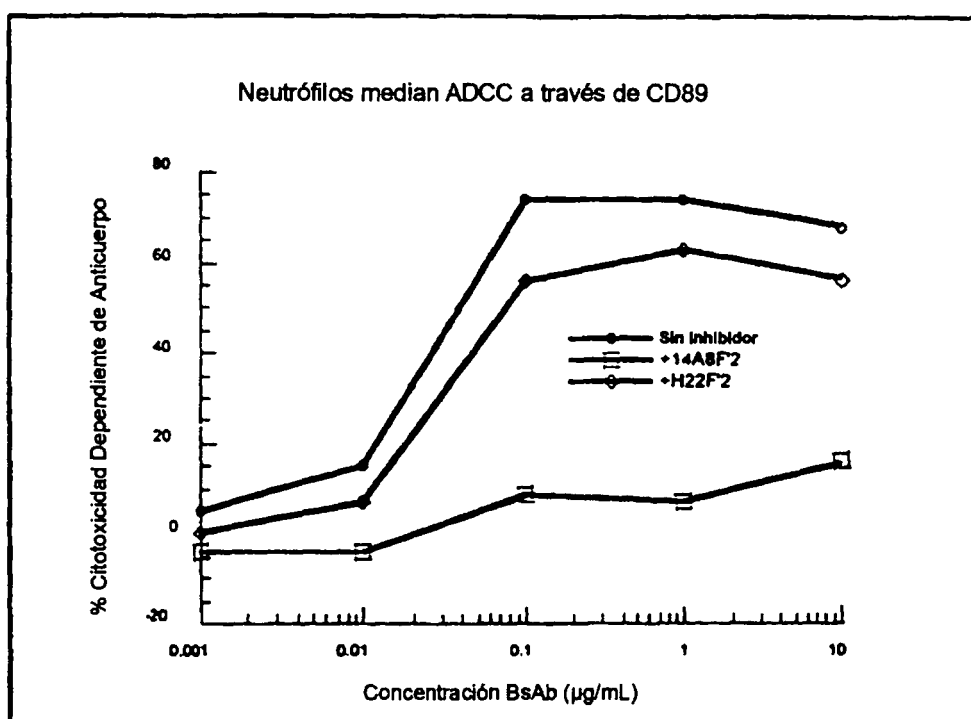


Figura 13B

ADCC mediado por sangre pura a través de 14.1x8C12 BsAb

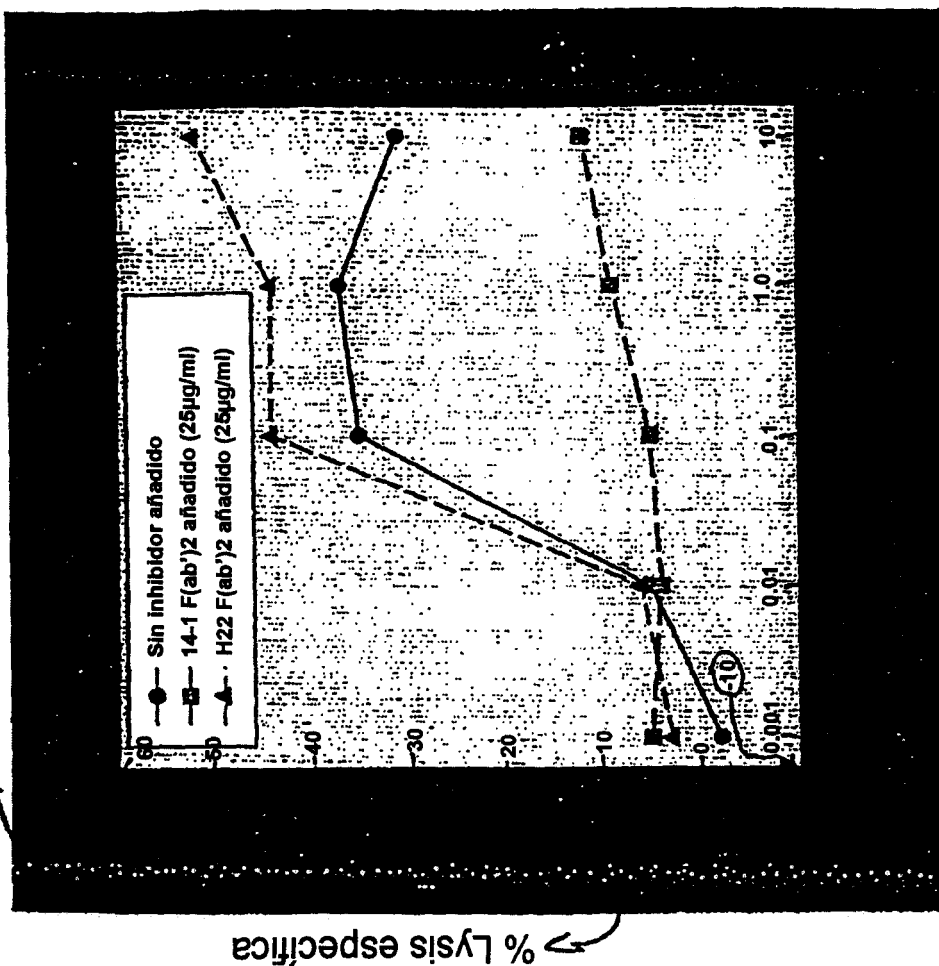


Figura 14A

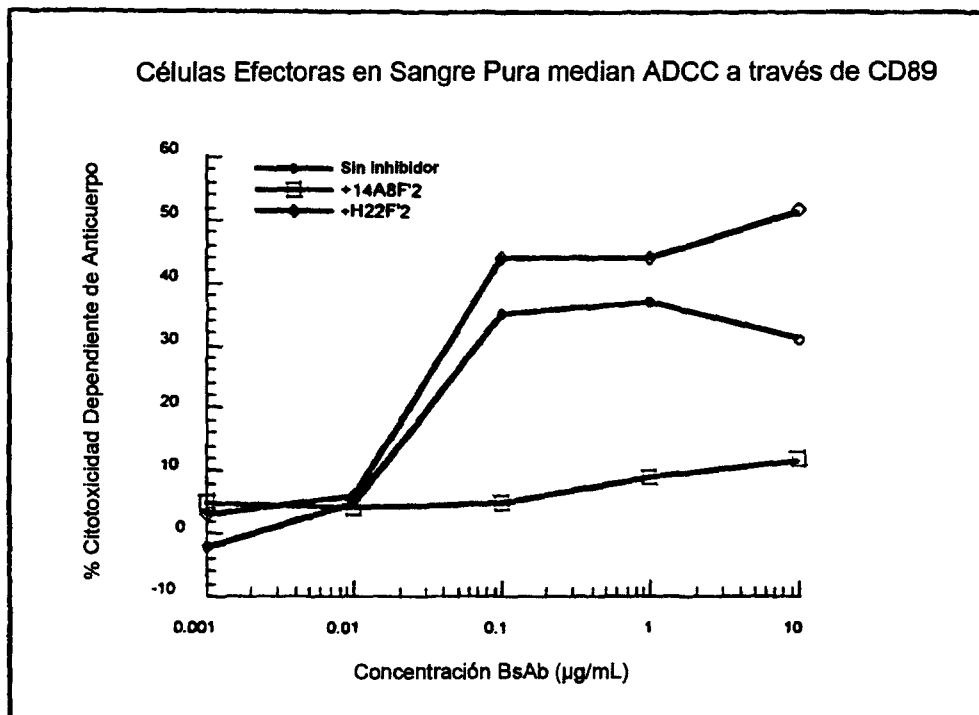


Figura 14B

Ensayo de Fagocitosis (LNcaps como objetivos, macrófagos como efectores)

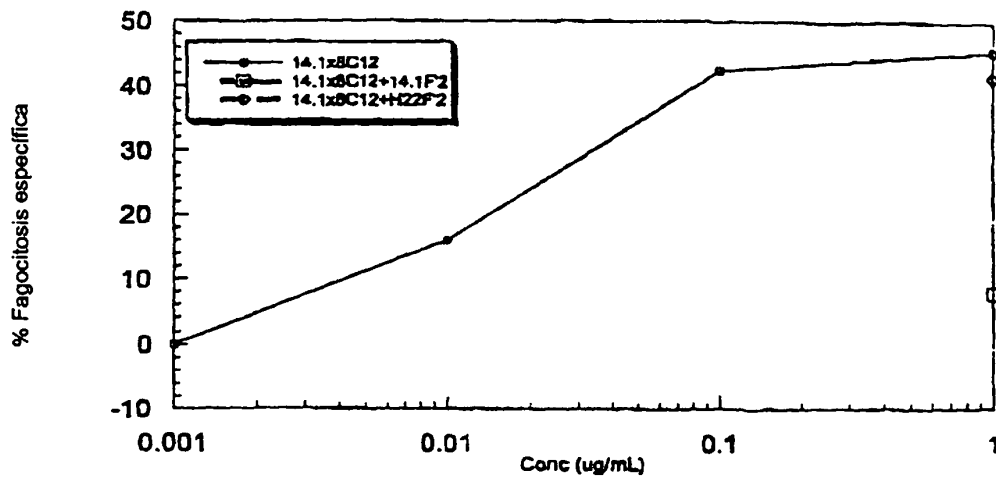


Figura 15

MDM - Media Fagocitosis a través de 14A8 x 8C12 o 8C12 mAb

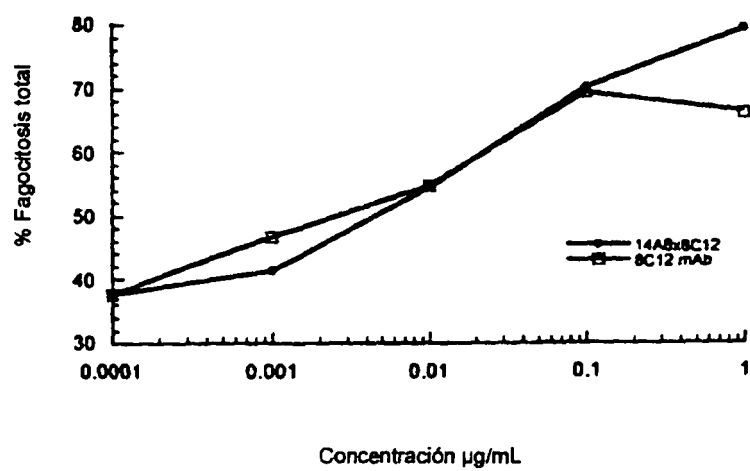


Figura 16

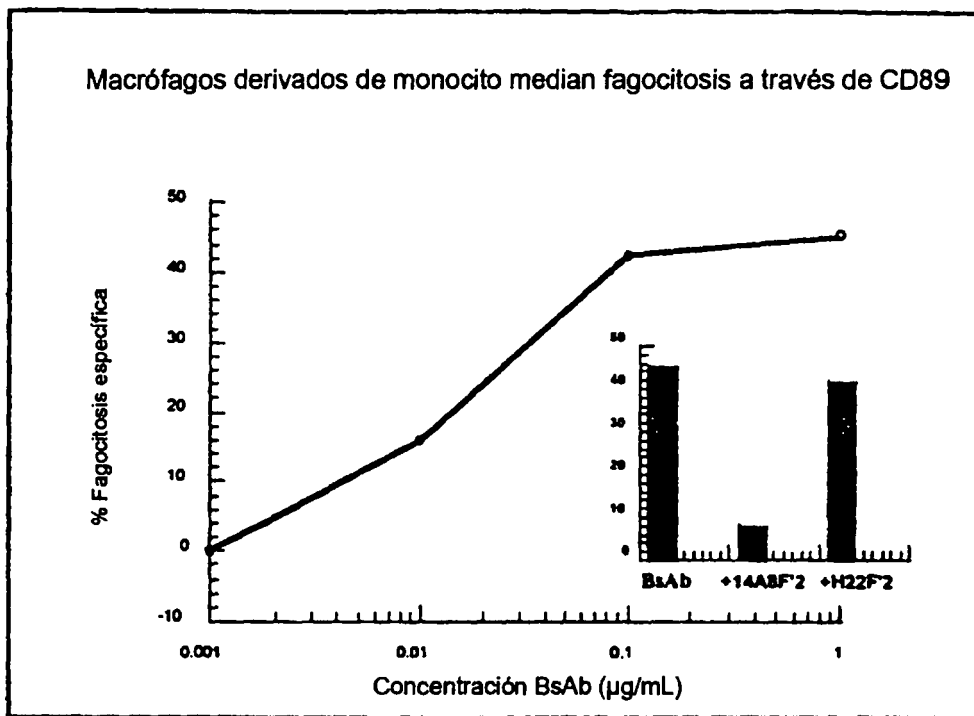


Figura 17