Organización CSA Ltda

BT

OL
LG-F

ndustria y Comercio

UPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

INVENTARIO

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 07-96538

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS MONOCLONAEES QUE CARECEN DE RESIDUOS FUCOSILO CONTRA ANTIGENO MEMBRANAL ESPECIFICO DE PROSTATA (PSMA)

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** MEDAREX, INC.

DOMICILIO NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-096538--00000-0000
Fecha: 2007-09-18 16:56:11 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 427

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

18/09/2007

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **MEDAREX, INC.**
sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 707 State Road,
Princeton,
New Jersey 08540,
Estados Unidos de América

Domicilio: Princeton,
New Jersey,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número ____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Josephine M. CARDARELLI**
126 Leslie Drive,
San Carlos,
California 94070,
Estados Unidos de América

2. **David B. PASSMORE**
98 Church St. Apt. #6,
Mountain View,
California 94041,
Estados Unidos de América

3. **Jenny ALBANESE**
829 Kiowa Drive,
South Lake Tahoe,
California 96150,
Estados Unidos de América

4. **Lei ZHU**
10037 NE 23rd Street,
Bellevue,
Washington 98004,
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/005853 Fecha: 17 de febrero de 2006
Publicación Internacional No. WO 2006/089231 A3 Fecha: 24 de agosto de 2006

6 Título (54)

ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE CARECEN DE RESIDUOS FUCOSILO CONTRA ANTIGENO MEMBRANAL ESPECIFICO DE PROSTATA (PSMA)

7 Clasificación Internacional (51) C07K 016/030

8 Prioridad SI☒ NO☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	18 de febrero de 2005	60/654,266
US	9 de marzo de 2005	60/660,431

9 Comprobante de pago No.: 07 – 72,885 **Fecha:** 10 de septiembre de 2007

10

Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 482.000.oo.
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

FBH

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/089231 A3
   Descripción:
   Páginas 90 en el idioma original
   Páginas 177 en español
   Reivindicaciones: Número (s) 42
   Figuras: Número (s)

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.

4. ☒ Extracto de publicación.

SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 August 2006 (24.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/089231 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/30 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/005853

(22) International Filing Date:
17 February 2006 (17.02.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/654,266 18 February 2005 (18.02.2005) US
60/660,431 9 March 2005 (09.03.2005) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **MEDAREX, INC.** [US/US]; 707 State Road, Princeton, New Jersey 08540 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **CARDARELLI, Josephine, M.** [US/US]; 126 Leslie Drive, San Carlos, California 94070 (US). **PASSMORE, David, B.** [US/US]; 98 Church St., Apt. #6, Mountain View, California 94041 (US). **ALBANESE, Jenny** [DE/US]; 829 Kiowa Drive, South Lake Tahoe, California 96150 (US). **ZHU, Lei** [US/US]; 10037 NE 23rd Street, Bellevue, Washington 98004 (US).

(74) Agents: **DECONTI, Giulio, A.** et al.; Lahive & Cockfield, LLP, 28 State Street, Boston, Massachusetts 02109 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
7 December 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA) LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

(57) **Abstract:** The invention pertains to anti-PSMA antibodies that lack fucosyl residues. The antibodies of the invention exhibit increased antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity as compared to the fucosylated form of the antibodies. The invention also provides host cells that express the anti-PSMA antibodies that lack fucosyl residues, wherein the host cells are deficient for a fucosyl transferase. Methods of using the antibodies to inhibit the growth of PSMA+ cells, such as tumor cells, are also provided.

WO 2006/089231 A3

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA) LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

Background of the Invention

Prostate cancer is a leading cause of morbidity and mortality among men. Treatments for prostate cancer include surgery, hormones, radiation, and chemotherapy. There is little effective treatment for metastatic prostate disease. Therefore, the identification of genes and/or gene products that represent diagnostic and prognostic markers, as well as targets for therapy, is critical. Prostate specific antigen (PSA) is one such cancer marker which is useful in the clinical diagnosis and staging of prostate cancer. However, PSA cannot differentiate benign prostatic hyperplasia (BPH) from prostatitis or prostate cancer in the range of 4-10 ng/ml, thus, necessitating a cytologic and/or histologic assessment to confirm the proper diagnosis (Barren, R.J. *et al.* (1998) Prostate 36:181-188).

Prostate specific membrane antigen (PSMA) is a 750 amino acid, type II transmembrane glycoprotein of approximately 110 kD that has 54% homology to the transferrin receptor. PSMA has 3 structural domains, including a 19 amino acid intracellular domain, a 24 amino acid transmembrane domain, and a 707 amino acid extracellular domain. The PSMA protein displays neurocarboxypeptidase and folate hydrolase activity and is reported to be involved in the neuroendocrine regulation of prostate growth and differentiation (Heston, W.D. (1996) Urologe-Ausgabe A. 35:400-407). PSM' is an alternatively spliced form of PSMA which is localized in the cytoplasm.

PSMA is predominantly expressed by prostatic epithelial cells. The expression of PSMA is increased in prostate cancer, especially in poorly differentiated, metastatic, and hormone refractory carcinomas (Gregorakis, A.K. *et al.* (1998) Seminars in Urologic Oncology 16:2-12; Silver, D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85). Low level expression of PSMA is observed in extraprostatic tissues such as the small bowel, salivary gland, duodenal mucosa, proximal renal tubules, and brain (Silver, D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85). PSMA is also expressed in endothelial cells of capillary vessels in peritumoral and endotumoral areas of certain malignancies, including renal cell carcinomas, and colon carcinomas, but not in blood vessels from normal tissues. In addition, PSMA is reported to be related to tumor angiogenesis (Silver, D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85).

Antibodies against the extracellular domain of PSMA have been described (see *e.g.*, Liu, H. *et al.* (1997) Cancer Res. 57:3629-3634; Murphy, G.P. *et al.* (1998) J. Urol. 160:2396-2401; Wang, S. *et al.* (2001) Int. J. Cancer 92:871-876; Kato, K. *et al.* (2003) Int. J. Urol. 10:439-444; US Patent No. 6,150,508 and US Patent No. 6,107,090). More recently, human and humanized antibodies that bind PSMA have been described (see *e.g.*, Bander, N.H. *et al.* (2003) Semin. Oncol. 30:667-676; PCT Publication WO 02/098897; PCT Publication WO 01/09192; PCT Publication WO 03/064606; PCT Publication WO 03/034903; and US Application No. 2004/0033229). Such antibodies have been used for imaging of prostate cancer cells (see *e.g.*, Yao, D. *et al.* (2002) Semin. Urol. Oncol. 20:211-218; Bander, N.H. *et al.* (2003) J. Urol. 170:1717-1721). Anti-PSMA antibodies also have been used for therapeutic intervention in treatment of prostate cancer, typically as a conjugate with a chemotherapeutic agent or radioactive isotope (see *e.g.*, Nanus, D.M. *et al.* (2003) J. Urol. 170:S84-89; Milowsky, M.I. *et al.* (2004) J. Clin. Oncol. 22:2522-2531; Henry, M.D. *et al.* (2004) Cancer Res. 64:7995-8001).

Improved therapeutic antibodies against PSMA that are effective for treating and/or preventing diseases involving PSMA expression, particularly antibodies that have cytotoxic effects without the need to be conjugated to a chemotherapeutic agent or radioactive isotope, are desired.

Summary of the Invention

The present invention provides isolated defucosylated antibodies (*i.e.*, antibodies lacking fucose residues) that bind to human PSMA and exhibit enhanced antibody directed cellular cytotoxic (ADCC) killing of PSMA-expressing cells, as compared to the non-defucosylated form of the antibody (*i.e.*, antibodies containing fucose residues). Also provided are methods for treating a variety of diseases involving PSMA expression using the antibodies and compositions of the invention.

The defucosylated antibodies of the present invention bind to PSMA and inhibit the growth of cells expressing PSMA by enhancing antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in the presence of human effector cells (*e.g.*, monocytes or mononuclear cells), as compared to the fucosylated form of the antibody. Accordingly, the antibodies of the present invention provide an improved means for treating disorders characterized by expression of PSMA.

Accordingly, in one aspect, the invention pertains to an isolated anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) antibody, which lacks fucose residues. Preferably, the antibody enhances antibody dependent cellular cytotoxicity of cells expressing cell surface PSMA, as compared to a form of the antibody that contains fucose residues. In preferred embodiments, the antibody that lacks fucose residues has an EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells of 0.05 μg/ml or less, or 0.04 μg/ml or less, or 0.03 μg/ml or less, or 0.02 μg/ml or of approximately 0.018 μg/ml or less. In other preferred embodiments, the antibody that lacks fucose residues has an EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells that is at least 3-fold lower (or at least 4-fold lower, or at least 5-fold lower or at least 6-fold lower) than the EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells of the form of the antibody that contains fucose residues.

Preferably, the defucosylated antibody of the invention is a monoclonal antibody. In one aspect, the invention pertains to a humanized or chimeric monoclonal antibody. Preferably, the humanized or chimeric antibody is prepared from a mouse anti-PSMA antibody selected from the group consisting of: 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 and J591. In another aspect, the invention pertains to a human monoclonal antibody.

In a preferred embodiment, the human monoclonal antibody comprises a human heavy chain variable region and a human light chain variable region, wherein:

(a) the human heavy chain variable region comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-9; and

(b) the human light chain variable region comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10-18.

In various embodiments, the following heavy and light chain combinations are preferred: the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10;

the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11;

the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12;

the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13;

the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14;

the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15;

the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16;

the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17;

the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18.

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-27;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28-36;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-45;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 46-54;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 55-63; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 64-72.

In various embodiments, the following heavy chain and light chain CDR1, CDR2 and CDR3 combinations are preferred:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 19;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 28;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 37;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 46;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 55; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 64;
or

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 20;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 29;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 38;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 47;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 56; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 65;
or

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 21;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 30;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 39;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 48;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 57; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 66;
or

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 22;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 31;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 40;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 49;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 58; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 67;
or

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 23;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 32;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 41;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 50;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 59; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 68;
or
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 24;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 33;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 42;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 51;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 60; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 69;
or
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 25;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 34;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 43;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 52;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 61; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 70;
or
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 26;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 35;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 44;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 53;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 62; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 71;
or
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 27;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 36;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 45;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 54;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 63; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 72.

In another aspect, the invention provides a defucosylated human anti-PSMA antibody which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 5-51 or V_H 3-30.3 gene. The invention also provides a defucosylated human anti-PSMA antibody which comprises a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L6, 04/014 or L18 gene. The invention still further provides a defucosylated human anti-PSMA antibody which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 5-51 or V_H 3-30.3 gene and a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L6, 04/014 or L18 gene.

In another aspect, the invention pertains to a chimeric chicken comprising immunoglobulin heavy and light chain genes encoding an anti-PSMA antibody such that the anti-PSMA antibody is expressed in eggs of the chimeric chicken, wherein the anti-PSMA antibody expressed in the eggs of the chimeric chicken lacks fucose residues. Preferably, the immunoglobulin heavy and light chain genes are human immunoglobulin heavy and light chain genes.

In another aspect, the invention pertains to a host cell comprising immunoglobulin heavy and light chain genes encoding an anti-PSMA antibody, wherein said host cell lacks a fucosyltransferase such that the anti-PSMA antibody expressed by said host cell lacks fucose residues. Preferably, the immunoglobulin heavy and light chain genes are human immunoglobulin heavy and light chain genes. Preferably, the fucosyltransferase is FUT8. Preferably, the host cell is a CHO cell.

In another aspect, the invention provides a method of inhibiting growth of $PSMA^+$ cells. The method involves contacting the cells with a defucosylated anti-PSMA antibody under conditions sufficient to induce antibody-dependent cellular cytoxicity (ADCC) of said cells. The cells can be, for example, tumor cells. Preferably, the anti-PSMA antibody is a human antibody.

The invention also provides a method of inhibiting growth of tumor cells in a subject, wherein the tumor cells or vascular endothelial cells proximate to the tumor cells express PSMA. The method involves administering to the subject a

defucosylated anti-PSMA antibody in an amount effective to inhibit growth of the tumor cells in the subject. Preferably, the anti-PSMA antibody is a human antibody. In preferred embodiments, the tumor cells are prostate carcinoma tumor cells.

Other features and advantages of the instant invention will be apparent from the following detailed description and examples which should not be construed as limiting. The contents of all references, Genbank entries, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable region of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11 and 16F9 (SEQ ID NOs: 1-5, respectively) with the human germline V_H 5-51 amino acid sequence (SEQ ID NO: 73).

Figure 2 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 4A3, 7F12 and 8C12 (SEQ ID NOs: 10-12, respectively) with the human germline V_k L6 amino acid sequence (SEQ ID NO: 74).

Figure 3 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 8A11 and 16F9 (SEQ ID NOs: 13 and 14, respectively) with the human germline V_k 04/014 amino acid sequence (SEQ ID NO: 75).

Figure 4A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 78) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 9) of the heavy chain variable region of the 1C3 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 27), CDR2 (SEQ ID NO: 36) and CDR3 (SEQ ID NO: 45) regions are delineated and the V, D and J germline derivations are indicated.

Figure 4B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 82) and amino acid sequence (SEQ ID NO:18) of the light chain variable region of the 1C3 human

monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 54), CDR2 (SEQ ID NO: 63) and CDR3 (SEQ ID NO: 72) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 5A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 79) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 6) of the heavy chain variable region of the 2A10 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 33) and CDR3 (SEQ ID NO: 42) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 5B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 83) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 15) of the light chain variable region of the 2A10 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 51), CDR2 (SEQ ID NO: 60) and CDR3 (SEQ ID NO: 69) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 6A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 80) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 7) of the heavy chain variable region of the 2C6 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 34) and CDR3 (SEQ ID NO: 43) regions are delineated and the V, D, and J germline derivations are indicated.

Figure 6B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 84) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 16) of the light chain variable region of the 2C6 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 52), CDR2 (SEQ ID NO: 61) and CDR3 (SEQ ID NO: 70) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 7A shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 81) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 8) of the heavy chain variable region of the 2F5 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO:26), CDR2 (SEQ ID NO: 35) and CDR3 (SEQ ID NO: 44) regions are delineated and the V, D, and J germline derivations are indicated.

Figure 7B shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 85) and amino acid sequence (SEQ ID NO: 17) of the light chain variable region of the 2F5 human monoclonal antibody. The CDR1 (SEQ ID NO: 53), CDR2 (SEQ ID NO: 62) and CDR3 (SEQ ID NO: 71) regions are delineated and the V and J germline derivations are indicated.

Figure 8 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable region of 2A10, 2C6 and 2F5 (SEQ ID NOs: 6-8, respectively) with the human germline V_H 5-51 amino acid sequence (SEQ ID NO: 73).

Figure 9 shows the alignment of the amino acid sequence of the heavy chain variable region of 1C3 (SEQ ID NO: 9) with the human germline V_H 3-30.3 amino acid sequence (SEQ ID NO: 76) and the JH6b germline (SEQ ID NO: 86).

Figure 10 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 2C6 (SEQ ID NO: 16) with the human germline V_k L6 amino acid sequence (SEQ ID NO: 74) and the JK3 germline (SEQ ID NO: 87).

Figure 11 shows the alignment of the amino acid sequence of the light chain variable region of 1C3, 2A10 and 2F5 (SEQ ID NOs: 18, 15 and 17, respectively) with the human germline V_k L18 amino acid sequence (SEQ ID NO: 77) and the JK4 germline (SEQ ID NO: 88).

Figure 12 is a diagram of the Ov7.5 and Ov15 expression vectors. Positions of the 5' and 3' regulatory sequences of Ov are indicated. Included in the 3' end of the vector is a cassette with both EGFP and puromycin (Puro) driven by a promoter (Cx) that functions in all cell types to facilitate isolation of stably transfected lines of cES cells and the identification of the cES cell contribution to the chimeras. Details of the MAb cassette are illustrated in the lower part of the diagram. The thin black line represents intron sequences or non-translated sequences derived from the human L and H chains (although intron sequences are not present in the Ov15Mab7F12 construct). SiG_{VL}: sequence for signal peptide of the L chain, VL: sequence for V gene of the L chain, C_K: sequence for constant region of the Kappa L chain, IRES:

internal ribosomal entry sequence, SiG_{VH}: sequence for signal peptide of the H chain, VH: sequence for V gene of the H chain, C_{H1}, H, C_{H2} and C_{H3}: coding sequences of the C_H1, Hinge, C_H2 and C_H3 domains of the gamma1 H chain.

Figures 13A-13B are summaries of the oligosaccharide structures of the 7F12 anti-PSMA antibody expressed in chicken eggs, as determined by MALDI TOF mass spectrometry. The dark circles represent mannose; the light circles represent hexose (mannose or galactose) and the dark squares represent N-acetyl glucosamine. The vertical line indicates that the last hexose could be connected to any one of the mannose or N-acetyl glucosamine residues along the line.

Figures 14A-14B are graphs showing the results of ADCC assays with CHO cell-expressed 7F12 ("7F12") and chicken-expressed 7F12, as compared to an isotype control The results are expressed as % lysis. Figure 14A shows results using IL-2 stimulated effector cells. Figure 14B shows results using fresh human peripheral blood effector cells.

Figure 15 is a bar graph showing the results of experiments in which ADCC activity of CHO cell-expressed 7F12 ("7F12") and chicken-expressed 7F12, as compared to an isotype control, was blocked by anti-CD16 antibody.

Figures 16A-16C are graphs showing the results of ADCC assays with defucosylated 2A10 mAb ("defucose") as compared to fucosylated 2A10 mAb ("parental") and an isotype control. Figures 16A and 16B represent two independent experiments using LNCaP-C42b target cells and IL-2 stimulated effector cells. Figure 16C represents an experiment using LNCaP-C42b target cells and fresh human peripheral blood effector cells.

Figure 17 is a bar graph of ADCC assay results for defucosylated 2A10 mAb ("defucose") as compared to fucosylated 2A10 mAb ("parental") and an isotype control or no antibody control, in which ADCC activity was blocked with an anti-CD16 antibody.

Detailed Description of the Invention

The present invention provides antibody compositions and improved antibody-based therapies for treating and diagnosing a variety of disorders associated with PSMA expression and/or PSMA expressing cells. The antibodies of the invention lack fucosyl residues on the antibody carbohydrate chains. Furthermore, the antibodies exhibit enhanced antibody directed cellular cytotoxic (ADCC) killing of PSMA+ cells.

In particular embodiments, the antibodies of the present invention are humanized or fully human antibodies and are particularly useful for the therapeutic treatment in humans of disorders associated with PSMA expressing cells. Methods of using anti-PSMA antibodies lacking fucosyl residues for therapeutic treatment (*e.g.*, to treat and/or prevent diseases associated with expression of PSMA) are also encompassed by the invention.

In order that the present invention may be more readily understood, certain terms will be defined as follows. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

The terms "prostate specific membrane antigen" and "PSMA" are used interchangeably herein, and include any variants, isoforms and species homologs of human PSMA that are naturally expressed by cells and that retain binding to the antibodies 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 described herein. The complete amino acid sequence of human PSMA protein has the Genbank accession number NP_004467. The complete cDNA sequence encoding the human PSMA protein has the Genbank accession number NM_004476.

As used herein, the terms "antibody that lacks fucose residues" and "defucosylated antibody" are used interchangeably and are intended to refer to an antibody in which the carbohydrate portion of the antibody does not contain a fucosyl residue or from which the fucosyl residue has been removed. An antibody that lacks fucose residues can be generated, for example, by expression of the antibody in a cell or expression system that minimizes or does not attach fucosyl residues to the antibody carbohydrate chain, or by chemical modification of the antibody to remove fucosyl residues from the carbohydrate chain (*e.g.*, treatment of the antibody with a fucosidase). As such, the terms "lacks fucose residues" and "defucosylated" are not intended to be limited by the mechanism by which the antibody with altered carbohydrate structure is prepared.

As used herein, the term "antibody expressing fucose residues" and "fucosylated antibody" are used interchangeably and are intended to refer to an antibody in which the carbohydrate portion of the antibody contains fucose.

The term "immune response" refers to the action of, for example, lymphocytes, antigen presenting cells, phagocytic cells, granulocytes, and soluble macromolecules produced by the above cells or the liver (including antibodies, cytokines, and complement) that results in selective damage to, destruction of, or elimination from the human body of invading pathogens, cells or tissues infected with pathogens, cancerous cells, or, in cases of autoimmunity or pathological inflammation, normal human cells or tissues.

As used herein, the term "effector cell" refers to an immune cell which is involved in the effector phase of an immune response, as opposed to the cognitive and activation phases of an immune response. Exemplary immune cells include a cell of a myeloid or lymphoid origin, *e.g.*, lymphocytes (*e.g.*, B cells and T cells including cytolytic T cells (CTLs)), killer cells, natural killer cells, macrophages, monocytes, eosinophils, neutrophils, polymorphonuclear cells, granulocytes, mast cells, and basophils. Some effector cells express specific Fc receptors and carry out specific immune functions. In preferred embodiments, an effector cell is capable of inducing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), *e.g.*, a neutrophil capable of inducing ADCC. For example, monocytes and macrophages, which express FcR are involved in specific killing of target cells and presenting antigens to other components of the immune system, or binding to cells that present antigens. In other embodiments, an effector cell can phagocytose a target antigen or target cell. The expression of a particular FcR on an effector cell can be regulated by humoral factors such as cytokines. For example, expression of FcαRI has been found to be up-regulated by G-CSF or GM-CSF. This enhanced expression increases the effector function of FcαRI-bearing cells against targets. An effector cell can phagocytose or lyse a target antigen or a target cell.

"Target cell" refers to any cell or pathogen whose elimination would be beneficial in a subject (*e.g.*, a human or animal) and that can be targeted by a composition (*e.g.*, antibody) of the invention. For example, the target cell can be a cell expressing or overexpressing PSMA.

The term "antibody-dependent cellular cytotoxicity" or "ADCC" refers to a cell-mediated cytotoxic reaction in which a PSMA+ target cell with bound anti-PSMA antibody is recognized by an effector cell bearing Fc receptors and is subsesquently lysed without requiring the involvement of complement.

As used herein, the term "enhances ADCC" (*e.g.*, referring to cells) is intended to include any measurable increase in cell lysis when contacted with an anti-PSMA antibody lacking fucosyl residues as compared to the cell killing of the same cell in contact with a fucosylated anti-PSMA antibody in the presence of effector cells (for example, at a ratio of target cells:effector cells of 1:50), *e.g.*, an increase in cell lysis by at least about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, or 325%.

The term "antibody" as referred to herein includes whole antibodies and any antigen binding fragment (*i.e.*, "antigen-binding portion") or single chains thereof. An "antibody" refers to a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds, or an antigen binding portion thereof. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, C_{H1}, C_{H2} and C_{H3}. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, C_L. The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (*e.g.*, effector cells) and the first component (Clq) of the classical complement system.

The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antibody portion"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, PSMA). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-

length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L, V_H, C_L and C_{H1} domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the V_H and C_{H1} domains; (iv) a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a V_H domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); *see e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

The term "recombinant human antibody", as used herein, includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (*e.g.*, a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom (described further below), (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, *e.g.*, from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and

related to human germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

The terms "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used herein refer to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope.

The term "human antibody", as used herein, is intended to refer to antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from human germline immunoglobulin sequences. The human antibodies of the invention may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (*e.g.*, mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*).

The term "human monoclonal antibody" refers to antibodies displaying a single binding specificity which have variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In one embodiment, the human monoclonal antibodies are produced by a hybridoma which includes a B cell obtained from a transgenic nonhuman animal, *e.g.*, a transgenic mouse, having a genome comprising a human heavy chain transgene and a light chain transgene fused to an immortalized cell. The term "human monoclonal antibody", as used herein, also includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (*e.g.*, a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom (described further below), (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, *e.g.*, from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the

amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

An "isolated antibody," as used herein, is intended to refer to an antibody which is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (*e.g.*, an isolated antibody that specifically binds to PSMA is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than PSMA). An isolated antibody that specifically binds to an epitope, isoform or variant of human PSMA may, however, have cross-reactivity to other related antigens, *e.g.*, from other species (*e.g.*, PSMA species homologs). Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals. In one embodiment of the invention, a combination of "isolated" monoclonal antibodies having different specificities are combined in a well defined composition.

The term "humanized antibody" is intended to refer to antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences. Additional framework region modifications may be made within the human framework sequences.

The term "chimeric antibody" is intended to refer to antibodies in which the variable region sequences are derived from one species and the constant region sequences are derived from another species, such as an antibody in which the variable region sequences are derived from a mouse antibody and the constant region sequences are derived from a human antibody.

The term "epitope" means a protein determinant capable of specific binding to, or specific binding by, an antibody. Epitopes usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. Conformational and nonconformational epitopes are distinguished in that the binding to the former but not the latter is lost in the presence of denaturing solvents.

As used herein, "specific binding" refers to antibody binding to a predetermined antigen. Typically, the antibody binds with a dissociation constant (K_D) of 10^{-7} M or less, and binds to the predetermined antigen with a K_D that is at least two-fold less than its K_D for binding to a non-specific antigen (*e.g.*, BSA, casein)

other than the predetermined antigen or a closely-related antigen. The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen".

As used herein, "isotype" refers to the antibody class (*e.g.*, IgM or IgGl) that is encoded by heavy chain constant region genes.

The term "vector," as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The term "recombinant host cell" (or simply "host cell"), as used herein, is intended to refer to a cell into which a recombinant expression vector has been introduced. It should be understood that such terms are intended to refer not only to the particular subject cell but to the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein. Recombinant host cells include, for example, CHO cells, transfectomas, and lymphocytic cells.

As used herein, the term "subject" includes any human or nonhuman animal. The term "nonhuman animal" includes all vertebrates, *e.g.*, mammals and non-mammals, such as nonhuman primates, sheep, dogs, cats, horses, cows, chickens, amphibians, reptiles, etc.

The terms "transgenic, nonhuman animal" refers to a nonhuman animal having a genome comprising one or more human heavy and/or light chain transgenes or transchromosomes (either integrated or non-integrated into the animal's natural genomic DNA) and which is capable of expressing fully human antibodies. For example, a transgenic mouse can have a human light chain transgene and either a human heavy chain transgene or human heavy chain transchromosome, such that the mouse produces human anti-PSMA antibodies when immunized with PSMA antigen and/or cells expressing PSMA. The human heavy chain transgene can be integrated into the chromosomal DNA of the mouse, as is the case for transgenic, *e.g.*, HuMAb mice, or the human heavy chain transgene can be maintained extrachromosomally, as is the case for transchromosomal (*e.g.*, KM) mice as described in WO 02/43478. Such transgenic and transchromosomal mice are capable of producing multiple isotypes of human monoclonal antibodies to PSMA (*e.g.*, IgG, IgA and/or IgE) by undergoing V-D-J recombination and isotype switching.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections.

Anti-PSMA Antibodies Lacking Fucose Residues and Having Enhanced ADCC Activity

The present invention relates to a defucosylated anti-PSMA antibody with enhanced antibody directed cellular cytotoxicity (ADCC) against cells expressing PSMA as compared to the fucosylated form of the antibody. In a preferred embodiment, a defucosylated antibody of the invention enhances ADCC of LnCaP prostate carcinoma cells (ATCC CRL-1740) *in vitro* compared to the fucosylated form of the antibody, for example under conditions of an antibody concentration of 0.1 μg/ml and a target cell to effector cell ratio of 1:100. Preferably, the effector cells used are IL-2 stimulated effector cells from human peripheral blood (*e.g.*, 1 x 10^6 human peripheral blood mononuclear cells are incubated with 10U/ml of human IL-2

overnight at 37° C). The defucosylated form of the antibody preferably is compared to a fucosylated form that is obtained from expression in mammalian host cells, such as CHO cells.

In preferred embodiments, the defucosylated form of the antibody has an EC_{50} for ADCC activity of 0.05 μg/ml or less, more preferably 0.04 μg/ml or less, even more preferably 0.03 μg/ml or less, even more preferably 0.02 μg/ml or less, and even more preferably an EC_{50} of approximately 0.018 μg/ml. In other preferred embodiments, the defucosylated form of the antibody has an EC_{50} for ADCC activity of 0.01 μg/ml or less, more preferably 0.009 μg/ml or less, even more preferably 0.008 μg/ml or less, even more preferably 0.007 μg/ml or less, even more preferably 0.005 μg/ml or less and even more preferably an EC_{50} of approximately 0.002 μg/ml. Preferably, the EC_{50} for ADCC activity is determined using the assay described in Example 4 and using IL-2 stimulated effector cells or using the assay described in Example 4 and using fresh human peripheral blood effector cells.

In other preferred embodiments, the defucosylated form of the antibody has an EC_{50} for ADCC activity that is at least 3-fold less than the EC_{50} of the fucosylated form of the antibody (*e.g.*, a CHO cell-expressed form of the antibody), more preferably at least 4-fold less than the EC_{50} of the fucosylated form of the antibody, even more preferably at least 5-fold less than the EC_{50} of the fucosylated form of the antibody, even more preferably at least 6-fold less than the EC_{50} of the fucosylated form of the antibody, even more preferably at least 7-fold less than the EC_{50} of the fucosylated form of the antibody, even more preferably at least 8-fold less than the EC_{50} of the fucosylated form of the antibody, even more preferably at least 9-fold less than the EC_{50} of the fucosylated form of the antibody and even more preferably at least 10-fold less than the EC_{50} of the fucosylated form of the antibody. Again, preferably, the EC_{50} for ADCC activity is determined using the assay described in Example 4 and using IL-2 stimulated effector cells or using the assay described in Example 4 and using fresh human peripheral blood effector cells. Typically, the ratio of EC50 (fucosylated): EC50 (defucosylated) was found to be greater using the fresh human peripheral blood effector cells, although the maximum percent lysis was found to be less using the fresh peripheral blood effector cells.

The increased ADCC activity of a defucosylated antibody of the invention can be quantitated, for example, as an increase in percent cell lysis, as compared to the

fucosylated form of the antibody, when ADCC activity is measured under the same conditions for the defucosylated and fucosylated forms (*e.g.*, same antibody concentrations and same target to effector cell ratios). Additionally or alternatively, the increased ADCC activity of a defucosylated antibody of the invention can be quantitated, for example, as an increased potency as measured by a decrease in the EC_{50} value for the defucosylated form, as compared to the fucosylated form. This can be quantitated by the ratio of the EC_{50} for the fucosylated form to the defucosylated form.

Examples of PSMA+ cell lines that can be used in the ADCC assays of the invention and against which a defucosylated antibody of the invention exhibits enhanced ADCC activity, as compared to the fucosylated form of the antibody, include LnCaP cells, 22Rv1 cells and/or PCa2b cells. The enhanced ADCC effect by defucosylated anti-PSMA antibodies may result in ADCC activity on PSMA+ cells at antibody concentrations where ADCC would not be observed with the fucosylated form of the antibody.

Defucosylation of Anti-PSMA Antibodies

Anti-PSMA antibodies (*e.g.*, murine, chimeric, humanized and human antibodies) are known in the art, and may be used in the present invention. The anti-PSMA antibody of the present invention is modified such that the antibody is lacking in fucosyl residues. An antibody can be made that is lacking in fucosyl residues by one of a variety of methods. For example, the antibody can expressed, using recombinant DNA technology, in a cell with an altered glycosylation mechanism such that addition of fucosyl residues to carbohydrate chains is inhibited. Additionally or alternatively, an antibody can be defucosylated through chemical removal of the fucosyl residue.

Still further, in a preferred embodiment, the antibody can be expressed in a chimeric chicken expression system, such that the antibody is produced in the eggs of the chimeric chicken. Preparation of chimeric chickens that express anti-PSMA antibody in the eggs of the chicken are described in detail in Example 1 and the lack of fucose residues on such chicken egg-expressed anti-PSMA antibodies is demonstrated in Example 3. Chimeric chickens suitable for use in expressing proteins in the eggs of the chicken are described in PCT Publication WO 2004/015123. Accordingly, in another aspect, the invention pertains to a chimeric chicken

comprising immunoglobulin heavy and light chain genes encoding an anti-PSMA antibody such that the anti-PSMA antibody is expressed in eggs of the chimeric chicken, wherein the anti-PSMA antibody expressed in the eggs of the chimeric chicken lacks fucose residues. Preferably, the immunoglobulin heavy and light chain genes are human immunoglobulin heavy and light chain genes.

In another embodiment, the antibody is expressed in a cell that is lacking in a fucosyltransferase enzyme such that the cell line produces proteins lacking fucose in their carbohydrates (see Examples 5 and 6). For example, the cell lines Ms704, Ms705, and Ms709 lack the fucosyltransferase gene, FUT8 (alpha (1,6) fucosyltransferase), such that antibodies expressed in the Ms704, Ms705, and Ms709 cell lines lack fucose on their carbohydrates. The Ms704, Ms705, and Ms709 $FUT8^{-/-}$ cell lines were created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors (see U.S. Patent Publication No. 20040110704 by Yamane *et al.* and Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). As another example, EP 1,176,195 by Hanai *et al.* describes a cell line with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation by reducing or eliminating the alpha 1,6 bond-related enzyme. Hanai *et al.* also describe cell lines which naturally have a low enzyme activity for adding fucose to the N-acetylglucosamine that binds to the Fc region of the antibody or does not have the enzyme activity, for example the rat myeloma cell line YB2/0 (ATCC CRL 1662). PCT Publication WO 03/035835 by Presta describes a variant CHO cell line, Lec13 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (see also Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). PCT Publication WO 99/54342 by Umana *et al.* describes cell lines engineered to express glycoprotein-modifying glycosyl transferases (*e.g.*, beta(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies expressed in the engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNac structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (see also Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

In another embodiment, an anti-PSMA antibody is expressed and the fucosyl residue(s) is cleaved using a fucosidase enzyme. For example, the fucosidase alpha-L-fucosidase removes fucosyl residues from antibodies (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Additionally, in other embodiments, other forms of glycosylation of an antibody are also modified. For example, an aglycoslated antibody can be made (*i.e.*, the antibody lacks glycosylation). Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. Such an approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,714,350 and 6,350,861 by Co *et al.*

Characterization of Absence of Fucosyl Residues on Anti-PSMA Antibodies

Antibodies of the invention lack fucosyl residues, for example in the Fc portion carbohydrate chain. Antibodies can be tested for the absence of fucosyl residues using standard techniques known in the art, such as APTS capillary electrophoresis laser induced fluorescence. Briefly, the N-linked oligosaccharides of the purified anti-PSMA antibody can be released by adding the peptide N-glycanase (Prozyme) and incubating overnight. The carbohydrates are resuspended and derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS) under mild reductive amination conditions in which desialylation and loss of fucosyl residues is minimized. The reaction adducts are analyzed by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence detector (Beckman Coulter). An absence of fucose can be observed by a shift in the electrophoresis compared to the same antibody containing fucose. Another technique for testing the absence of fucose on anti-PSMA antibodies is a monosaccharide analysis using HPLC. Other techniques for analyzing the carbohydrate content and structure for the antibody include MS profiling of expressed carbohydrates (glycomics), direct MALDI-TOF analysis of released intact glycans (to provide the mass of classes of carbohydrates), low CID MSMS spectra (to provide structure composition of the glycans), high CID MSMS spectra and MSn spectra (to provide information about the connectivity of the glycans) and sequential exoglycosidase digestion (to provide structure connectivity information of the glycans). Methodologies for examining the carbohydrate content of antibodies are described in detail in Example 3.

Characterization of Antibody Dependent Cell Killing of PSMA+ Cells

Defucosylated anti-PSMA antibodies can be tested for their ability to mediate phagocytosis and killing of cells expressing PSMA. In one embodiment, a defucosylated anti-PSMA antibody enhances killing of cells expressing PSMA in comparison to the same antibody containing fucose when compared at the same concentration. In another embodiment, a defucosylated anti-PSMA antibody induces killing of cells expressing PSMA where the same antibody containing fucose does not induce cell killing at the same concentration.

The ADCC activity of a monoclonal antibody can be tested in established *in vitro* assays. As an example, a chromium release ADCC assay may be used. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), or other effector cells, from healthy donors can be purified by Ficoll Hypaque density centrifugation, followed by lysis of contaminating erythrocytes. Washed PBMCs can be suspended in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and mixed with ^{51}Cr labeled cells expressing PSMA, at various ratios of effector cells to tumor cells (effector cells:tumor cells). Anti-PSMA antibody can then be added at various concentrations. An isotype matched antibody can be used as a negative control. Assays can be carried out for 4-18 hours at 37° C. Samples can be assayed for cytolysis by measuring ^{51}Cr release into the culture supernatant. Anti-PSMA monoclonal can also be tested in combinations with each other to determine whether cytolysis is enhanced with multiple monoclonal antibodies.

An alternative assay that can be used to test for anti-PSMA antibody ability to mediate phagocytosis and killing of cells expressing PSMA is a time resolved fluorometry assay. Briefly, PSMA expressing cells are loaded with an acetoxymethyl ester of fluorescence enhancing ligand (BATDA), which penetrates cell membranes. Inside the cell, the ester bonds are hydrolized and the compound can no longer pass the cell membrane. Anti-PSMA antibody can then be added at various concentrations. Following cytolysis, an europeum solution (Perkin Elmer) is added and any free ligand binds the europeum to form a highly fluorescent and stable chelate (EuTDA) that can be read on a microplate reader (Perkin Elmer). The measured signal correlates with the amount of lysed cells.

Preferred ADCC assays for examining the ADCC activity of the anti-PSMA antibodies of the invention are described in detail in Example 4.

Anti-PSMA antibodies also can be tested in an *in vivo* model (*e.g.*, in mice) to determine their efficacy in mediating phagocytosis and killing of cells expressing PSMA, *e.g.*, tumor cells. These antibodies can be selected, for example, based on the following criteria, which are not intended to be exclusive:

1) binding to live cells expressing PSMA;

2) high affinity of binding to PSMA;

3) binding to a unique epitope on PSMA (to eliminate the possibility that monoclonal antibodies with complimentary activities when used in combination would compete for binding to the same epitope);

4) internalization by cells expressing PSMA;

5) mediation of *in vitro* of growth inhibition, phagocytosis and/or killing of cells expressing PSMA in the presence of human effector cells.

Preferred monoclonal antibodies of the invention meet one or more of these criteria. In a particular embodiment, the monoclonal antibodies are used in combination, *e.g.*, as a pharmaceutical composition comprising two or more anti-PSMA monoclonal antibodies or fragments thereof. For example, anti-PSMA monoclonal antibodies having different, but complementary activities can be combined in a single therapy to achieve a desired therapeutic or diagnostic effect. An illustration of this would be a composition containing an anti-PSMA monoclonal antibody that mediates highly effective killing of target cells in the presence of effector cells, combined with another anti-PSMA monoclonal antibody that inhibits the growth of cells expressing PSMA.

Characterization of Binding to PSMA

Antibodies of the invention can be tested for binding to PSMA by, for example, standard assays known in the art, such as ELISA, FACS analysis and/or Biacore analysis. In a typical ELISA assay, briefly, microtiter plates are coated with purified PSMA at 0.25 μg/ml in PBS, and then blocked with 5% bovine serum albumin in PBS. Dilutions of antibody are added to each well and incubated for 1-2 hours at 37°C. The plates are washed with PBS/Tween and then incubated with secondary reagent (*e.g.*, for human antibodies or a goat-anti-human IgG Fc-specific polyclonal reagent) conjugated to alkaline phosphatase for 1 hour at 37°C. After

washing, the plates are developed with pNPP substrate (1 mg/ml), and analyzed at OD of 405-650.

In order to demonstrate binding of monoclonal antibodies to live cells expressing the PSMA, flow cytometry can be used. In a typical (but non-limiting) example of a flow cytometry protocol, cell lines expressing PSMA (grown under standard growth conditions) are mixed with various concentrations of monoclonal antibodies in PBS containing 0.1% BSA and 20% mouse serum, and incubated at 37°C for 1 hour. After washing, the cells are reacted with Fluorescein-labeled secondary antibody (*e.g.*, anti-human IgG antibody) under the same conditions as the primary antibody staining. The samples can be analyzed by a FACScan instrument using light and side scatter properties to gate on single cells. An alternative assay using fluorescence microscopy may be used (in addition to or instead of) the flow cytometry assay. Cells can be stained exactly as described above and examined by fluorescence microscopy. This method allows visualization of individual cells, but may have diminished sensitivity depending on the density of the antigen.

Anti-PSMA antibodies can be further tested for reactivity with PSMA antigen by Western blotting. For example, cell extracts from cells expressing PSMA can be prepared and subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, the separated antigens are transferred to nitrocellulose membranes, blocked with 20% mouse serum, and probed with the monoclonal antibodies to be tested. Antibody binding can be detected using anti-species specific secondary antibody linked to alkaline phosphatase and developed with BCIP/NBT substrate tablets (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Other techniques for evaluating the binding ability of antibodies towards PSMA are known in the art, including RIAs and Biacore analysis. Suitable assays to determine PSMA binding are described in detail in Example 4.

Chimeric or Humanized Anti-PSMA Antibodies

In certain embodiments, a defucosylated anti-PSMA antibody of the invention is a chimeric or humanized antibody. Such antibodies can be prepared using mouse anti-PSMA antibodies that are available in the art and established procedures for converting a mouse antibody to a chimeric or humanized antibody. Non-limiting examples of such mouse anti-PSMA antibodies include the 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-

1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 and J591 monoclonal antibodies. Hybridomas secreting 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6 or 4C8B9 have been publicly deposited and are described in US Patent No. 6,159,508. Hybridomas secreting E99, J415, J533 or J591 have been publicly deposited and are described in US Patent No. 6,107,090. Moreover, humanized anti-PSMA antibodies, including a humanized version of J591, are described in further detail in PCT Publication WO 02/098897. Furthermore, other mouse anti-human PSMA antibodies have been described in the art, such as mAb 107-1A4 (Wang, S. *et al.* (2001) Int. J. Cancer 92:871-876) and mAb 2C9 (Kato, K. *et al.* (2003) Int. J. Urol. 10:439-444).

Human Monoclonal Anti-PSMA Antibodies

Preferred antibodies of the invention include human anti-PSMA monoclonal antibodies. Examples of human anti-PSMA monoclonal antibodies include the 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 antibodies, isolated and structurally characterized as originally described in PCT Publications WO 01/09192 and WO 03/064606 and in U.S. Provisional Application Serial No. 60/654,125, entitled "Human Monoclonal Antibodies to Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)", filed on February 18, 2005, the contents of each of which are expressly incorporated herein by reference. The V_H amino acid sequences of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 are shown in SEQ ID NOs: 1-9, respectively. The V_L amino acid sequences of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 are shown in SEQ ID NOs: 10-18, respectively. Other human anti-PSMA antibodies that can be used in the invention include the antibodies disclosed in PCT Publication WO 03/034903 and US Application No. 2004/0033229.

Given that each of these antibodies can bind to PSMA, the V_H and V_L sequences can be "mixed and matched" to create other anti-PSMA binding molecules of the invention. PSMA binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested using the binding assays well known in the art, such as FACS analysis and ELISA assays. Preferably, when V_H and V_L chains are mixed and matched, a V_H sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_H sequence. Likewise, preferably a V_L sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_L sequence. For example, the V_H sequences of

4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6 and 2F5 are particularly amenable for mixing and matching, since these antibodies use V_H sequences derived from the same germline sequence (V_H 5-51) and thus they exhibit structural similarity. Likewise, the V_L sequences of 4A3, 7F12, 8C12, and 2C6 are particularly amenable for mixing and matching, since these antibodies use V_L sequences derived from the same germline sequence (V_L L6) and thus they exhibit structural similarity. Likewise, the V_L sequences of 8A11 and 16F9 are particularly amenable for mixing and matching, since these antibodies use V_L sequences derived from the same germline sequence (V_L 04/014) and thus they exhibit structural similarity. Likewise, the V_L sequences of 1C3, 2A10 and 2F5 are particularly amenable for mixing and matching, since these antibodies use V_L sequences derived from the same germline sequence (V_L L18) and thus they exhibit structural similarity.

In particular embodiments, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising:

(a) a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-9; and

(b) a light chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10-18;

wherein the antibody specifically binds human PSMA.

Preferred heavy and light chain combinations include:

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12.

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of

SEQ ID NO: 5; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17; or

(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18.

In another aspect, the invention provides defucosylated antibodies that comprise the heavy chain and light chain CDR1s, CDR2s and CDR3s of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3, or combinations thereof. The amino acid sequences of the V_H CDR1s of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 are shown in SEQ ID NOs: 19-27, respectively. The amino acid sequences of the V_H CDR2s of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 are shown in SEQ ID NOs: 28-36, respectively. The amino acid sequences of the V_H CDR3s of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 are shown in SEQ ID NOs: 37-45, respectively. The amino acid sequences of the V_K CDR1s of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 are shown in SEQ ID NOs: 46-54, respectively. The amino acid sequences of the V_K CDR2s of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 are shown in SEQ ID NOs: 55-63, respectively. The amino acid sequences of the V_K CDR3s of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 are shown in SEQ ID NOs: 64-72, respectively. The CDR regions are delineated using the Kabat system (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Given that each of these antibodies can bind to PSMA and that antigen-binding specificity is provided primarily by the CDR1, 2 and 3 regions, the V_H CDR1, 2 and 3 sequences and V_k CDR1, 2 and 3 sequences can be "mixed and matched"

(*i.e.*, CDRs from different antibodies can be mixed and match, although each antibody must contain a V_H CDR1, 2 and 3 and a V_k CDR1, 2 and 3) to create other anti-PSMA binding molecules of the invention. PSMA binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested using binding assays know in the art, for example, FACS analysis and ELISA assays. Preferably, when V_H CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_H sequence is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). Likewise, when V_k CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_k sequence preferably is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). It will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan that novel V_H and V_L sequences can be created by substituting one or more V_H and/or V_L CDR region sequences with structurally similar sequences from the CDR sequences disclosed herein for monoclonal antibodies 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3.

Accordingly, in another aspect, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof comprising:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-27;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28-36;

(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-45;

(d) a light chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 46-54;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 55-63; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 64-72;

wherein the antibody specifically binds PSMA.

In a preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 19;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 28;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 37;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 46;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 55; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 64.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 20;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 29;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 38;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 47;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 56; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 65.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 21;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 30;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 39;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 48;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 57; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 66.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 22;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 31;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 40;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 49;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 58; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 67.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 23;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 32;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 41;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 50;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 59; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 68.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 24;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 33;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 42;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 51;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 60; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 69.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 25;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 34;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 43;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 52;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 61; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 70.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 26;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 35;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 44;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 53;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 62; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 71.

In another preferred embodiment, the antibody comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 27;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 36;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 45;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 54;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 63; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 72.

Antibodies Having Particular Germline Sequences

In certain embodiments, a defucosylated antibody of the invention comprises a heavy chain variable region from a particular germline heavy chain immunoglobulin gene and/or a light chain variable region from a particular germline light chain immunoglobulin gene.

For example, in a preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 5-51 gene, wherein the antibody specifically binds to human PSMA. In another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-30.3 gene, wherein the antibody specifically binds PSMA. In another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_k L6 gene, wherein the antibody specifically binds to human PSMA. In another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_k 04/014 gene, wherein the antibody specifically binds to human PSMA. In another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_k L18 gene, wherein the antibody specifically binds to human PSMA.

In yet another preferred embodiment, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody:

(a) comprises a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 5-51 or 3-30.3 gene (which encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 73 and 76, respectively);

(b) comprises a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_k L6, 04/014, or L18 gene (which encode the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs: 74, 75 and 77, respectively); and

(c) specifically binds to human PSMA.

A preferred V_H and V_k germline combination is V_H 5-51 and V_k L6. Examples of antibodies having V_H and V_K of V_H 5-51 and V_k L6, respectively, are the

4A3, 7F12, 8C12 and 2C6 antibodies. Another preferred V_H and V_k germline combination is V_H 5-51 and V_k 04/014. Examples of antibodies having V_H and V_k of V_H 5-51 and Vk.04/014, respectively, are the 8A11 and 16F9 antibodies. Another preferred V_H and V_k germline combination is V_H 5-51 and V_k L18. Examples of antibodies having V_H and V_k of V_H 5-51 and V_k L18, respectively, are the 2A10 and 2F5 antibodies. Another preferred V_H and V_k germline combination is V_H 3-30.3 and V_k L18. An example of an antibody having V_H and V_k of V_H 3-30.3 and V_k L18, respectively, is the 1C3 antibody.

As used herein, a human antibody comprises heavy or light chain variable regions that is "the product of" or "derived from" a particular germline sequence if the variable regions of the antibody are obtained from a system that uses human germline immunoglobulin genes. Such systems include immunizing a transgenic mouse carrying human immunoglobulin genes with the antigen of interest or screening a human immunoglobulin gene library displayed on phage with the antigen of interest. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a human germline immunoglobulin sequence can be identified as such by comparing the amino acid sequence of the human antibody to the amino acid sequences of human germline immunoglobulins (eg., using the Vbase database) and selecting the human germline immunoglobulin sequence that is closest in sequence (*i.e.*, greatest % identity) to the sequence of the human antibody. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a particular human germline immunoglobulin sequence may contain amino acid differences as compared to the germline sequence, due to, for example, naturally-occurring somatic mutations or intentional introduction of site-directed mutation. However, a selected human antibody typically is at least 90% identical in amino acids sequence to an amino acid sequence encoded by a human germline immunoglobulin gene and contains amino acid residues that identify the human antibody as being human when compared to the germline immunoglobulin amino acid sequences of other species (*e.g.*, murine germline sequences). In certain cases, a human antibody may be at least 95%, or even at least 96%, 97%, 98%, or 99% identical in amino acid sequence to the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene. Typically, a human antibody derived from a particular human germline sequence will display no more than 10 amino acid differences from the amino acid sequence encoded by the human germline immunoglobulin gene. In certain cases, the human antibody may display no more than 5, or even no more than

4, 3, 2, or 1 amino acid difference from the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene.

Homologous Antibodies

In yet another embodiment, a defucosylated antibody of the invention comprises heavy and light chain variable regions comprising amino acid sequences that are homologous to the amino acid sequences of the preferred antibodies described herein, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the anti-PSMA antibodies of the invention.

For example, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein:

(a) the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-9;

(b) the light chain variable region comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10-18; and

(c) the antibody specifically binds to human PSMA.

In other embodiments, the V_H and/or V_L amino acid sequences may be 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% homologous to the sequences set forth above. An antibody having V_H and V_L regions having high (*i.e.*, 80% or greater) homology to the V_H and V_L regions of the sequences set forth above, can be obtained by mutagenesis (*e.g.*, site-directed or PCR-mediated mutagenesis) of one or more nucleic acid molecules encoding SEQ ID NOs: 1-18, followed by testing of the encoded altered antibody for retained function (*i.e.*, binding to PSMA) using the binding assays described herein. Nucleic acid molecules encoding SEQ ID NOs: 6-9 and 15-18 can be found in SEQ ID NOs: 78-85. Nucleic acid molecules encoding SEQ ID NOs: 1-5 and 10-14 can be found in PCT Publication WO 03/064606, Figures 17A and 17B.

As used herein, the percent homology between two amino acid sequences is equivalent to the percent identity between the two sequences. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (*i.e.*, % homology = # of identical positions/total # of positions x

100), taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences. The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm, as described in the non-limiting examples below.

The percent identity between two nucleotide sequences can be determined using the GAP program in the GCG software package (available at http://www.gcg.com), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. The percent identity between two nucleotide or amino acid sequences can also determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at http://www.gcg.com), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

The percent identity between two amino acid sequences can be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at http://www.gcg.com), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

Additionally or alternatively, the protein sequences of the present invention can further be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, for example, identify related sequences. Such searches can be performed using the XBLAST program (version 2.0) of Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to the antibody molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped

BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used. See http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Antibodies with Conservative Modifications

In certain embodiments, a defucosylated antibody of the invention comprises a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2 and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, wherein one or more of these CDR sequences comprise specified amino acid sequences based on the preferred antibodies described herein (*e.g.*, 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3), or conservative modifications thereof, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the anti-PSMA antibodies of the invention. Accordingly, the invention provides a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, wherein:

(a) the heavy chain variable region CDR3 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 37-45, and conservative modifications thereof;

(b) the light chain variable region CDR3 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 64-72, and conservative modifications thereof; and

(c) the antibody specifically binds to human PSMA.

In a preferred embodiment, the heavy chain variable region CDR2 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28-36, and conservative modifications thereof; and the light chain variable region CDR2 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 55-63, and conservative modifications thereof. In another preferred embodiment, the heavy chain variable region CDR1 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19-27, and conservative modifications thereof; and the light chain variable region CDR1 sequence comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46-54, and conservative modifications thereof.

As used herein, the term "conservative sequence modifications" is intended to refer to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the binding characteristics of the antibody containing the amino acid sequence. Such conservative modifications include amino acid substitutions, additions and deletions. Modifications can be introduced into an antibody of the invention by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Conservative amino acid substitutions are ones in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, one or more amino acid residues within the CDR regions of an antibody of the invention can be replaced with other amino acid residues from the same side chain family and the altered antibody can be tested for retained function (*i.e.*, the functions set forth in (i) through (iv) above) using the functional assays described herein.

Alternatively, in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of a anti-PSMA antibody coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resulting modified anti-PSMA antibodies can be screened for binding activity.

Antibodies that Bind to the Same Epitope as Anti-PSMA Antibodies of the Invention

In another embodiment, the invention provides defucosylated antibodies that bind to the same epitope as do the various anti-PSMA antibodies of the invention provided herein, such as other human antibodies that bind to the same epitope as the 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3 antibodies described herein. Such additional antibodies can be identified based on their ability to cross-compete (*e.g.*, to competitively inhibit the binding of, in a statistically significant manner) with other antibodies of the invention, such as 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3, in standard PSMA binding assays. The ability of a test antibody to

inhibit the binding of, *e.g.*, 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3, to human PSMA demonstrates that the test antibody can compete with that antibody for binding to human PSMA; such an antibody may, according to non-limiting theory, bind to the same or a related (*e.g.*, a structurally similar or spatially proximal) epitope on human PSMA as the antibody with which it competes. In a preferred embodiment, the defucosylated antibody that binds to the same epitope on human PSMA as 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3 is a human monoclonal antibody. Such human monoclonal antibodies can be prepared and isolated as described in PCT Publications WO 01/09192 and WO 03/064606.

Engineered and Modified Antibodies

A defucosylated antibody of the invention further can be prepared using an antibody having one or more of the V_H and/or V_L sequences disclosed herein as starting material to engineer a modified antibody, which modified antibody may have altered properties from the starting antibody. An antibody can be engineered by modifying one or more amino acid residues within one or both variable regions (*i.e.*, V_H and/or V_L), for example within one or more CDR regions and/or within one or more framework regions. Additionally or alternatively, an antibody can be engineered by modifying residues within the constant region(s), for example to alter the effector function(s) of the antibody.

One type of variable region engineering that can be performed is CDR grafting. Antibodies interact with target antigens predominantly through amino acid residues that are located in the six heavy and light chain complementarity determining regions (CDRs). For this reason, the amino acid sequences within CDRs are more diverse between individual antibodies than sequences outside of CDRs. Because CDR sequences are responsible for most antibody-antigen interactions, it is possible to express recombinant antibodies that mimic the properties of specific naturally occurring antibodies by constructing expression vectors that include CDR sequences from the specific naturally occurring antibody grafted onto framework sequences from a different antibody with different properties (see, *e.g.*, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. See. U.S.A.* 86:10029-10033; U.S. Patent No. 5,225,539

to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.*).

Accordingly, another embodiment of the invention pertains to a defucosylated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-27, SEQ ID NOs: 28-36, and SEQ ID NOs: 37-45, respectively, and a light chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 46-54, SEQ ID NOs: 55-63 and SEQ ID NOs: 64-72, respectively. Thus, such antibodies contain the V_H and V_L CDR sequences of monoclonal antibodies 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3, yet may contain different framework sequences from these antibodies.

Such framework sequences can be obtained from public DNA databases or published references that include germline antibody gene sequences. For example, germline DNA sequences for human heavy and light chain variable region genes can be found in the "VBase" human germline sequence database (available on the Internet at www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), as well as in Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; and Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; the contents of each of which are expressly incorporated herein by reference.

Preferred framework sequences for use in the antibodies of the invention are those that are structurally similar to the framework sequences used by selected antibodies of the invention, *e.g.*, similar to the V_H 5-51 or 3-30.3 sequences (SEQ ID NOs: 73 and 76, respectively) and/or the V_k L6, 04/014 or L18 framework sequence (SEQ ID NOs: 74, 75 and 77, respectively) used by preferred monoclonal antibodies of the invention. The V_H CDR1, 2 and 3 sequences, and the V_K CDR1, 2 and 3 sequences, can be grafted onto framework regions that have the identical sequence as that found in the germline immunoglobulin gene from which the framework sequence derive, or the CDR sequences can be grafted onto framework regions that contain one or more mutations as compared to the germline sequences. For example, it has been

found that in certain instances it is beneficial to mutate residues within the framework regions to maintain or enhance the antigen binding ability of the antibody (see *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al*).

Another type of variable region modification is to mutate amino acid residues within the V_H and/or V_K CDR1, CDR2 and/or CDR3 regions to thereby improve one or more binding properties (*e.g.*, affinity) of the antibody of interest. Site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis can be performed to introduce the mutation(s) and the effect on antibody binding, or other functional property of interest, can be evaluated in *in vitro* or *in vivo* assays as described herein and provided in the Examples. Preferably conservative modifications (as discussed above) are introduced. The mutations may be amino acid substitutions, additions or deletions, but are preferably substitutions. Moreover, typically no more than one, two, three, four or five residues within a CDR region are altered.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides defucosylated anti-PSMA monoclonal antibodies, or antigen binding portions thereof, comprising a heavy chain variable region comprising: (a) a V_H CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 19-27, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 19-27; (b) a V_H CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 28-36, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 28-36; (c) a V_H CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 37-45, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 37-45; (d) a V_K CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 46-54, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 46-54; (e) a V_K CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 55-63, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino

acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 55-63; and (f) a V_K CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 64-72, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 64-72.

Engineered antibodies of the invention include those in which modifications have been made to framework residues within V_H and/or V_K, *e.g.* to improve the properties of the antibody. Typically such framework modifications are made to decrease the immunogenicity of the antibody. For example, one approach is to "backmutate" one or more framework residues to the corresponding germline sequence. More specifically, an antibody that has undergone somatic mutation may contain framework residues that differ from the germline sequence from which the antibody is derived. Such residues can be identified by comparing the antibody framework sequences to the germline sequences from which the antibody is derived. For example, for 8C12 and 8A11, amino acid residue #13 (within FR1) of V_H is a threonine whereas this residue in the corresponding V_H 5-51 germline sequence is a lysine. To return the framework region sequences to their germline configuration, the somatic mutations can be "backmutated" to the germline sequence by, for example, site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis (*e.g.*, residue 13 of FR1 of the V_H of 8C12 or 8A11 can be "backmutated" from threonine to lysine. Such "backmutated" antibodies are also intended to be encompassed by the invention.

Another type of framework modification involves mutating one or more residues within the framework region, or even within one or more CDR regions, to remove T cell epitopes to thereby reduce the potential immunogenicity of the antibody. This approach is also referred to as "deimmunization" and is described in futher detail in U.S. Patent Publication No. 20030153043 by Carr *et al.*

In addition or alternative to modifications made within the framework or CDR regions, antibodies of the invention may be engineered to include modifications within the Fc region, typically to alter one or more functional properties of the antibody, such as serum half-life, complement fixation, Fc receptor binding, and/or antigen-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, an antibody of the invention may be chemically modified (*e.g.*, one or more chemical moieties can be attached to the antibody) or be modified to alter its glycosylation, again to alter one or more functional properties of the antibody. Each of these embodiments is described in

further detail below. The numbering of residues in the Fc region is that of the EU index of Kabat.

In one embodiment, the hinge region of CH1 is modified such that the number of cysteine residues in the hinge region is altered, *e.g.*, increased or decreased. This approach is described further in U.S. Patent No. 5,677,425 by Bodmer *et al.* The number of cysteine residues in the hinge region of CH1 is altered to, for example, facilitate assembly of the light and heavy chains or to increase or decrease the stability of the antibody.

In another embodiment, the Fc hinge region of an antibody is mutated to decrease the biological half life of the antibody. More specifically, one or more amino acid mutations are introduced into the CH2-CH3 domain interface region of the Fc-hinge fragment such that the antibody has impaired Staphylococcyl protein A (SpA) binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,165,745 by Ward *et al.*

In another embodiment, the antibody is modified to increase its biological half life. Various approaches are possible. For example, one or more of the following mutations can be introduced: T252L, T254S, T256F, as described in U.S. Patent No. 6,277,375 to Ward. Alternatively, to increase the biological half life, the antibody can be altered within the CH1 or CL region to contain a salvage receptor binding epitope taken from two loops of a CH2 domain of an Fc region of an IgG, as described in U.S. Patent Nos. 5,869,046 and 6,121,022 by Presta *et al.*

In yet other embodiments, the Fc region is altered by replacing at least one amino acid residue with a different amino acid residue to alter the effector function(s) of the antibody. For example, one or more amino acids selected from amino acid residues 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has an altered affinity for an effector ligand but retains the antigen-binding ability of the parent antibody. The effector ligand to which affinity is altered can be, for example, an Fc receptor or the C1 component of complement. This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260, both by Winter *et al.*

In another example, one or more amino acids selected from amino acid residues 329, 331 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has altered C1q binding and/or reduced or abolished complement

dependent cytotoxicity (CDC). This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 6,194,551 by Idusogie *et al.*

In another example, one or more amino acid residues within amino acid positions 231 and 239 are altered to thereby alter the ability of the antibody to fix complement. This approach is described further in PCT Publication WO 94/29351 by Bodmer *et al.*

In yet another example, the Fc region is modified to increase the ability of the antibody to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and/or to increase the affinity of the antibody for an Fcγ receptor by modifying one or more amino acids at the following positions: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439. This approach is described further in PCT Publication WO 00/42072 by Presta. Moreover, the binding sites on human IgG1 for FcγR1, FcγRII, FcγRIII and FcRn have been mapped and variants with improved binding have been described (see Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Specific mutations at positions 256, 290, 298, 333, 334 and 339 were shown to improve binding to FcγRIII. Additionally, the following combination mutants were shown to improve FcγRIII binding: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A and S298A/E333A/K334A.

Another modification of the antibodies herein that is contemplated by the invention is pegylation. An antibody can be pegylated to, for example, increase the biological (*e.g.*, serum) half life of the antibody. To pegylate an antibody, the antibody, or fragment thereof, typically is reacted with polyethylene glycol (PEG), such as a reactive ester or aldehyde derivative of PEG, under conditions in which one or more PEG groups become attached to the antibody or antibody fragment. Preferably, the pegylation is carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive PEG molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer). As used herein, the term "polyethylene glycol" is intended to encompass any of the forms of PEG that have been used to derivatize other proteins, such as mono (C1-C10) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain embodiments, the antibody to be pegylated is an aglycosylated

antibody. Methods for pegylating proteins are known in the art and can be applied to the antibodies of the invention. See for example, EP 0 154 316 by Nishimura *et al.* and EP 0 401 384 by Ishikawa *et al.*

Methods of Engineering Antibodies

As discussed above, the defucosylated anti-PSMA antibodies having V_H and V_K sequences disclosed herein can be used to create new anti-PSMA antibodies by modifying the VH and/or V_K sequences, or the constant region(s) attached thereto. Thus, in another aspect of the invention, the structural features of an anti-PSMA antibody of the invention, *e.g.* 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3, are used to create structurally related defucosylated anti-PSMA antibodies that retain at least one functional property of the antibodies of the invention, such as binding to human PSMA. For example, one or more CDR regions of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 or 1C3, or mutations thereof, can be combined recombinantly with known framework regions and/or other CDRs to create additional, recombinantly-engineered, anti-PSMA antibodies of the invention, as discussed above. Other types of modifications include those described in the previous section. The starting material for the engineering method is one or more of the V_H and/or V_K sequences provided herein, or one or more CDR regions thereof. To create the engineered antibody, it is not necessary to actually prepare (*i.e.*, express as a protein) an antibody having one or more of the V_H and/or V_K sequences provided herein, or one or more CDR regions thereof. Rather, the information contained in the sequence(s) is used as the starting material to create a "second generation" sequence(s) derived from the original sequence(s) and then the "second generation" sequence(s) is prepared and expressed as a protein.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides a method for preparing an anti-PSMA antibody comprising:

(a) providing: (i) a heavy chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-27, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28-36 and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-45; and/or (ii) a light chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 46-54, a CDR2

sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 55-63 and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 64-72;

(b) altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and

(c) expressing the altered antibody sequence as a protein.

Standard molecular biology techniques can be used to prepare and express the altered antibody sequence. The altered antibody sequence so prepared can then be made in defucosylated form using the methods disclosed herein to obtain a defucosylated altered anti-PSMA antibody.

The functional properties of the altered antibodies can be assessed using standard assays available in the art and/or described herein, such as those set forth in the Examples (*e.g.*, flow cytometry, binding assays, ADCC assays).

In certain embodiments of the methods of engineering antibodies of the invention, mutations can be introduced randomly or selectively along all or part of an anti-PSMA antibody coding sequence and the resulting modified anti-PSMA antibodies can be screened for binding activity and/or other functional properties as described herein. Mutational methods have been described in the art. For example, PCT Publication WO 02/092780 by Short describes methods for creating and screening antibody mutations using saturation mutagenesis, synthetic ligation assembly, or a combination thereof. Alternatively, PCT Publication WO 03/074679 by Lazar *et al.* describes methods of using computational screening methods to optimize physiochemical properties of antibodies.

Nucleic Acid Molecules Encoding Antibodies of the Invention

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules that encode the antibodies of the invention. The term "nucleic acid molecule", as used herein, is intended to include DNA molecules and RNA molecules. A nucleic acid molecule may be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or in a partially purified or substantially pure form. A nucleic acid is "isolated" or "rendered substantially pure" when purified away from other cellular components or other contaminants, *e.g.*, other cellular nucleic acids or proteins, by standard

techniques, including alkaline/SDS treatment, CsCl banding, column chromatography, agarose gel electrophoresis and others well known in the art. *See*, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. A nucleic acid of the invention can be, for example, DNA or RNA and may or may not contain intronic sequences. In a preferred embodiment, the nucleic acid is a cDNA molecule.

Nucleic acids of the invention can be obtained using standard molecular biology techniques. For antibodies expressed by hybridomas (*e.g.*, hybridomas prepared from transgenic mice carrying human immunoglobulin genes as described further below), cDNAs encoding the light and heavy chains of the antibody made by the hybridoma can be obtained by standard PCR amplification or cDNA cloning techniques. For antibodies obtained from an immunoglobulin gene library (*e.g.*, using phage display techniques), nucleic acid encoding the antibody can be recovered from the library.

Preferred nucleic acids molecules of the invention are those encoding the VH and VL sequences of the 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 and 1C3 monoclonal antibodies. The DNA sequences encoding the VH and VL amino acid sequences of 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9 are published in PCT Publication No. WO 03/064606 (see Figures 17A and 17B), the contents of which is expressly incorporated by reference. The DNA sequence encoding the VH sequence of 1C3 is shown in SEQ ID NO: 78. The DNA sequence encoding the VL sequence of 1C3 is shown in SEQ ID NO: 82. The DNA sequence encoding the VH sequence of 2A10 is shown in SEQ ID NO: 79. The DNA sequence encoding the VL sequence of 2A10 is shown in SEQ ID NO: 83. The DNA sequence encoding the VH sequence of 2C6 is shown in SEQ ID NO: 80. The DNA sequence encoding the VL sequence of 2C6 is shown in SEQ ID NO: 84. The DNA sequence encoding the VH sequence of 2F5 is shown in SEQ ID NO: 81. The DNA sequence encoding the VL sequence of 2C6 is shown in SEQ ID NO: 85.

Once DNA fragments encoding VH and VL segments are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes or to a scFv gene. In these manipulations, a VL- or VH-encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The

term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

The isolated DNA encoding the VH region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the VH-encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see *e.g.*, Kabat, E. A., el al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG4 constant region. For a Fab fragment heavy chain gene, the VH-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region.

The isolated DNA encoding the VL region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the VL-encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see *e.g.*, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region, but most preferably is a kappa constant region.

To create a scFv gene, the VH- and VL-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, *e.g.*, encoding the amino acid sequence $(Gly_4\text{-}Ser)_3$ (SEQ ID NO: 89), such that the VH and VL sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the VL and VH regions joined by the flexible linker (see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

The nucleic acid compositions of the present invention, while often in a native sequence (except for modified restriction sites and the like), from either cDNA, genomic or mixtures may be mutated, thereof in accordance with standard

techniques to provide gene sequences. For coding sequences, these mutations, may affect amino acid sequence as desired. In particular, DNA sequences substantially homologous to or derived from native V, D, J, constant, switches and other such sequences described herein are contemplated (where "derived" indicates that a sequence is identical or modified from another sequence).

Production of Monoclonal Antibodies of the Invention

Monoclonal antibodies (mAbs) of the present invention can be produced by a variety of techniques, including conventional monoclonal antibody methodology *e.g.*, the standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Although somatic cell hybridization procedures are preferred, in principle, other techniques for producing monoclonal antibody can be employed *e.g.*, viral or oncogenic transformation of B lymphocytes.

The preferred animal system for preparing hybridomas is the murine system. Hybridoma production in the mouse is a very well-established procedure. Immunization protocols and techniques for isolation of immunized splenocytes for fusion are known in the art. Fusion partners (*e.g.*, murine myeloma cells) and fusion procedures are also known.

In various embodiments, the antibody can be, for example, human antibodies, humanized antibodies or chimeric antibodies.

Chimeric or humanized antibodies of the present invention can be prepared based on the sequence of a murine monoclonal antibody prepared as described above. DNA encoding the heavy and light chain immunoglobulins can be obtained from the murine hybridoma of interest and engineered to contain non-murine (*e.g.*,. human) immunoglobulin sequences using standard molecular biology techniques. For example, to create a chimeric antibody, the murine variable regions can be linked to human constant regions using methods known in the art (see *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567 to Cabilly *et al.*). To create a humanized antibody, the murine CDR regions can be inserted into a human framework using methods known in the art (see *e.g.*, U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.*). A variety of mouse anti-PSMA antibodies are known in the art that can be used to create chimeric or humanized anti-PSMA antibodies, for example, 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9,

2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 and J591. In a preferred embodiment, the antibodies of the invention are human monoclonal antibodies. Such human monoclonal antibodies directed against PSMA can be generated using transgenic or transchromosomic mice carrying parts of the human immune system rather than the mouse system. These transgenic and transchromosomic mice include mice referred to herein as HuMAb mice and KM mice, respectively, and are collectively referred to herein as "human Ig mice."

The HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contains human immunoglobulin gene miniloci that encode unrearranged human heavy (μ and γ) and κ light chain immunoglobulin sequences, together with targeted mutations that inactivate the endogenous μ and κ chain loci (see *e.g.*, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). Accordingly, the mice exhibit reduced expression of mouse IgM or κ, and in response to immunization, the introduced human heavy and light chain transgenes undergo class switching and somatic mutation to generate high affinity human IgGκ monoclonal (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). The preparation and use of HuMab mice, and the genomic modifications carried by such mice, is further described in Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; and Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, the contents of all of which are hereby specifically incorporated by reference in their entirety. See further, U.S. Patent Nos. 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; and 5,770,429; all to Lonberg and Kay; U.S. Patent No. 5,545,807 to Surani *et al.*; PCT Publication Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 and WO 99/45962, all to Lonberg and Kay; and PCT Publication No. WO 01/14424 to Korman *et al.*

In another embodiment, human antibodies of the invention can be raised using a mouse that carries human immunoglobulin sequences on transgenes and

transchomosomes, such as a mouse that carries a human heavy chain transgene and a human light chain transchromosome. Such mice, referred to herein as "KM mice", are described in detail in PCT Publication WO 02/43478 to Ishida *et al.*

Still further, alternative transgenic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise anti-PSMA antibodies of the invention. For example, an alternative transgenic system referred to as the Xenomouse (Abgenix, Inc.) can be used; such mice are described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 and 6,162,963 to Kucherlapati *et al.*

Moreover, alternative transchromosomic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise anti-PSMA antibodies of the invention. For example, mice carrying both a human heavy chain transchromosome and a human light chain tranchromosome, referred to as "TC mice" can be used; such mice are described in Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Furthermore, cows carrying human heavy and light chain transchromosomes have been described in the art (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) and can be used to raise anti-PSMA antibodies of the invention.

Human monoclonal antibodies of the invention can also be prepared using phage display methods for screening libraries of human immunoglobulin genes. Such phage display methods for isolating human antibodies are established in the art. See for example: U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 to Ladner *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,427,908 and 5,580,717 to Dower *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,969,108 and 6,172,197 to McCafferty *et al.*; and U.S. Patent Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 and 6,593,081 to Griffiths *et al.*

Human monoclonal antibodies of the invention can also be prepared using SCID mice into which human immune cells have been reconstituted such that a human antibody response can be generated upon immunization. Such mice are described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,476,996 and 5,698,767 to Wilson *et al.*

Immunization of Human Ig Mice

When human Ig mice are used to raise human antibodies of the invention, such mice can be immunized with a cell line that expresses PSMA (such as LnCaP cells,

ATCC CRL-1740), with a purified or enriched preparation of PSMA antigen (such as LnCaP cell membranes) and/or with recombinant PSMA, or a recombinant PSMA fusion protein, as generally described by Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; and PCT Publication WO 98/24884 and WO 01/14424. Preferably, the mice will be 6-16 weeks of age upon the first infusion. For example, a membrane preparation of LnCaP cells can be used to immunize the human Ig mice intraperitoneally.

Detailed procedures to generate fully human monoclonal antibodies to PSMA are described in PCT Publications WO 01/09192 and WO 03/064606. Cumulative experience with various antigens has shown that the transgenic mice respond when initially immunized intraperitoneally (IP) with antigen in complete Freund's adjuvant, followed by every other week IP immunizations (up to a total of 6) with antigen in incomplete Freund's adjuvant. However, adjuvants other than Freund's are also found to be effective. In addition, whole cells in the absence of adjuvant are found to be highly immunogenic. The immune response can be monitored over the course of the immunization protocol with plasma samples being obtained by retroorbital bleeds. The plasma can be screened by ELISA (as described below), and mice with sufficient titers of anti-PSMA human immunoglobulin can be used for fusions. Mice can be boosted intravenously with antigen 3 days before sacrifice and removal of the spleen. It is expected that 2-3 fusions for each immunization may need to be performed. Between 6 and 24 mice are typically immunized for each antigen. Usually both HCo7 and HCo12 strains are used. In addition, both HCo7 and HCo12 transgene can be bred together into a single mouse having two different human heavy chain transgenes (HCo7/HCo12).

Generation of Hybridomas Producing Human Monoclonal Antibodies of the Invention

To generate hybridomas producing human monoclonal antibodies of the invention, splenocytes and/or lymph node cells from immunized transgenic mice carrying human immunoglobulin genes can be isolated and fused to an appropriate immortalized cell line, such as a mouse myeloma cell line. The resulting hybridomas can be screened for the production of antigen-specific antibodies. For example, single cell suspensions of splenic lymphocytes from immunized mice can be fused to one-

sixth the number of P3X63-Ag8.653 nonsecreting mouse myeloma cells (ATCC, CRL 1580) with 50% PEG. Cells are plated at approximately 2 x 10^5 in flat bottom microtiter plate, followed by a two week incubation in selective medium containing 20% fetal Clone Serum, 18% "653" conditioned media, 5% origen (IGEN), 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 50 mg/ml gentamycin and 1X HAT (Sigma; the HAT is added 24 hours after the fusion). After approximately two weeks, cells can be cultured in medium in which the HAT is replaced with HT. Individual wells can then be screened by ELISA for human monoclonal IgM and IgG antibodies. Once extensive hybridoma growth occurs, medium can be observed usually after 10-14 days. The antibody secreting hybridomas can be replated, screened again, and if still positive for human IgG, the monoclonal antibodies can be subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones can then be cultured *in vitro* to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for characterization.

To purify human monoclonal antibodies, selected hybridomas can be grown in two-liter spinner-flasks for monoclonal antibody purification. Supernatants can be filtered and concentrated before affinity chromatography with protein A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Eluted IgG can be checked by gel electrophoresis and high performance liquid chromatography to ensure purity. The buffer solution can be exchanged into PBS, and the concentration can be determined by OD280 using 1.43 extinction coefficient. The monoclonal antibodies can be aliquoted and stored at -80° C.

Generation of Transfectomas Producing Monoclonal Antibodies of the Invention

Antibodies of the invention also can be produced in a host cell transfectoma using, for example, a combination of well known recombinant DNA techniques and gene transfection methods (*e.g.*, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

For example, to express the antibodies, or antibody fragments thereof, DNAs encoding partial or full-length light and heavy chains, can be obtained by standard molecular biology techniques (*e.g.*, PCR amplification or cDNA cloning using a hybridoma that expresses the antibody of interest) and the DNAs can be inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is

intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vector or, more typically, both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (*e.g.*, ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). The light and heavy chain variable regions of the antibodies described herein can be used to create full-length antibody genes of any antibody isotype by inserting them into expression vectors already encoding heavy chain constant and light chain constant regions of the desired isotype such that the V_H segment is operatively linked to the C_H segment(s) within the vector and the V_K segment is operatively linked to the C_L segment within the vector. Additionally or alternatively, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (*i.e.*, a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of the invention carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, *etc.* Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV),

Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (*e.g.*, the adenovirus major late promoter (AdMLP) and polyoma. Alternatively, nonviral regulatory sequences may be used, such as the ubiquitin promoter or β-globin promoter. Still further, regulatory elements composed of sequences from different sources, such as the SRα promoter system, which contains sequences from the SV40 early promoter and the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors of the invention may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (*e.g.*, origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, all by Axel *et al.*). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr- host cells with methotrexate selection/amplification) and the neo gene (for G418 selection).

For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by standard techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, *e.g.*, electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. Although it is theoretically possible to express the antibodies of the invention in either prokaryotic or eukaryotic host cells, expression of antibodies in eukaryotic cells, and most preferably mammalian host cells, is the most preferred because such eukaryotic cells, and in particular mammalian cells, are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody. Prokaryotic expression of antibody genes has been reported to be ineffective for production of high yields of active antibody (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Preferred host cells for expressing the recombinant antibodies of the invention

include cells which modify the fucosylation of an expressed antibody. For example, the host cell may be a cell that is lacking in a fucosyltransferase enzyme such that the host cell produces proteins lacking fucose in their carbohydrates, or a host cell that expresses glycoprotein-modifying glycosyl transferases such that expressed antibodies in the host cell have increased bisecting GlcNac structures that prevents fucosylation. Other mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr- CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, *e.g.*, as described in R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), NS0 myeloma cells, COS cells and SP2 cells. In particular, for use with NS0 myeloma cells, another preferred expression system is the GS gene expression system disclosed in WO 87/04462, WO 89/01036 and EP 338,841. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

Immunoconjugates

In another aspect, the present invention features a defucosylated anti-PSMA antibody, or a fragment thereof, conjugated to a therapeutic moiety, such as a cytotoxin, a drug (*e.g.*, an immunosuppressant) or a radiotoxin. Such conjugates are referred to herein as "immunoconjugates". Immunoconjugates that include one or more cytotoxins are referred to as "immunotoxins." A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to (*e.g.*, kills) cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents also include, for example, antimetabolites (*e.g.*, methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (*e.g.*, mechlorethamine, thioepa

chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclothosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (*e.g.*, daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (*e.g.*, dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (*e.g.*, vincristine and vinblastine).

Other preferred examples of therapeutic cytotoxins that can be conjugated to an antibody of the invention include duocarmycins, calicheamicins, maytansines and auristatins, and derivatives thereof. An example of a calicheamicin antibody conjugate is commercially available (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Cytoxins can be conjugated to antibodies of the invention using linker technology available in the art. Examples of linker types that have been used to conjugate a cytotoxin to an antibody include, but are not limited to, hydrazones, thioethers, esters, disulfides and peptide-containing linkers. A linker can be chosen that is, for example, susceptible to cleavage by low pH within the lysosomal compartment or susceptible to cleavage by proteases, such as proteases preferentially expressed in tumor tissue such as cathepsins (*e.g.*, cathepsins B, C, D).

For further discussion of types of cytotoxins, linkers and methods for conjugating therapeutic agents to antibodies, see also Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Antibodies of the present invention also can be conjugated to a radioactive isotope to generate cytotoxic radiopharmaceuticals, also referred to as radioimmunoconjugates. Examples of radioactive isotopes that can be conjugated to antibodies for use diagnostically or therapeutically include, but are not limited to, iodine^{131}, indium^{111}, yttrium^{90} and lutetium^{177}. Method for preparing radioimmunconjugates are established in the art. Examples of radioimmunoconjugates are commercially available, including Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) and Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), and similar methods can be used to prepare radioimmunoconjugates using the antibodies of the invention.

The antibody conjugates of the invention can be used to modify a given biological response, and the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, an enzymatically active toxin, or active fragment thereof, such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor or interferon-γ; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, *e.g.*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies 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 Cytotoxic 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 Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Pharmaceutical Compositions

In another aspect, the present invention provides a composition, *e.g.*, a pharmaceutical composition, containing one or a combination of monoclonal antibodies, or antigen-binding portion(s) thereof, of the present invention, formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier. Such compositions may include one or a combination of (*e.g.*, two or more different) antibodies, or immunoconjugates of the invention. For example, a pharmaceutical composition of the invention can comprise a combination of antibodies (or immunoconjugates) that bind to different epitopes on the target antigen or that have complementary activities.

Pharmaceutical compositions of the invention also can be administered in combination therapy, *i.e.*, combined with other agents. For example, the combination therapy can include a defucosylated anti-PSMA antibody of the present invention combined with at least one other anti-neoplastic, anti-inflammatory or immunosuppressive agent. Such therapeutic agents include, among others, steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS), *e.g.*, aspirin and other salicylates, such as ibuprofen (Motrin, Advil), naproxen (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenac (Voltaren), piroxicam (Feldene), ketoprofen (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetone (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozin (Daypro), indomethacin (Indocin), and aspirin in high doses. Other examples of therapeutic agents that can be used in combination therapy are described in greater detail below in the section on uses of the antibodies of the invention.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Preferably, the carrier is suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, spinal or epidermal administration (*e.g.*, by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound, *i.e.*, antibody or immunoconjuage, may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.

The pharmaceutical compounds of the invention may include one or more pharmaceutically acceptable salts. A "pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt that retains the desired biological activity of the parent compound and does not impart any undesired toxicological effects (see *e.g.*, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Examples of such salts include acid addition salts and base addition salts. Acid addition salts include those derived from nontoxic inorganic acids, such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phosphorous and the like, as well as from nontoxic organic acids such as aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids and the like. Base addition salts include those derived from alkaline earth metals, such as sodium, potassium, magnesium, calcium and the like, as well as from nontoxic organic amines, such as N,N'-dibenzylethylenediamine, N-methylglucamine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, procaine and the like.

A pharmaceutical composition of the invention also may include a pharmaceutically acceptable anti-oxidant. Examples of pharmaceutically acceptable antioxidants include: (1) water soluble antioxidants, such as ascorbic acid, cysteine hydrochloride, sodium bisulfate, sodium metabisulfite, sodium sulfite and the like; (2) oil-soluble antioxidants, such as ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), lecithin, propyl gallate, alpha-tocopherol, and the like; and (3) metal chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sorbitol, tartaric acid, phosphoric acid, and the like.

Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers that may be employed in the pharmaceutical compositions of the invention include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

These compositions may also contain adjuvants such as preservatives, wetting agents, emulsifying agents and dispersing agents. Prevention of presence of microorganisms may be ensured both by sterilization procedures, *supra*, and by the inclusion of various antibacterial and antifungal agents, for example, paraben, chlorobutanol, phenol sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, such as sugars, sodium chloride, and the like into the compositions. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as aluminum monostearate and gelatin.

Pharmaceutically acceptable carriers include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the pharmaceutical compositions of the invention is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug

concentration. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by sterilization microfiltration. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying (lyophilization) that yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will vary depending upon the subject being treated, and the particular mode of administration. The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will generally be that amount of the composition which produces a therapeutic effect. Generally, out of one hundred per cent, this amount will range from about 0.01 per cent to about ninety-nine percent of active ingredient, preferably from about 0.1 per cent to about 70 per cent, most preferably from about 1 per cent to about 30 per cent of active ingredient in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (*e.g.*, a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for

ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

For administration of the antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example dosages can be 0.3 mg/kg body weight, 1 mg/kg body weight, 3 mg/kg body weight, 5 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg. An exemplary treatment regime entails administration once per week, once every two weeks, once every three weeks, once every four weeks, once a month, once every 3 months or once every three to 6 months. Preferred dosage regimens for a defucosylated anti-PSMA antibody of the invention include 1 mg/kg body weight or 3 mg/kg body weight via intravenous administration, with the antibody being given using one of the following dosing schedules: (i) every four weeks for six dosages, then every three months; (ii) every three weeks; (iii) 3 mg/kg body weight once followed by 1 mg/kg body weight every three weeks.

In some methods, two or more monoclonal antibodies with different binding specificities are administered simultaneously, in which case the dosage of each antibody administered falls within the ranges indicated. Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be, for example, weekly, monthly, every three monthgs or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of antibody to the target antigen in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of about 1-1000 μg /ml and in some methods about 25-300 μg /ml.

Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, human antibodies show the longest half life, followed by humanized antibodies, chimeric antibodies,

and nonhuman antibodies. The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, a relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives. In therapeutic applications, a relatively high dosage at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and preferably until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patient can be administered a prophylactic regime.

Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of the present invention may be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level will depend upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of the particular compositions of the present invention employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors well known in the medical arts.

A "therapeutically effective dosage" of an anti-PSMA antibody of the invention preferably results in a decrease in severity of disease symptoms, an increase in frequency and duration of disease symptom-free periods, or a prevention of impairment or disability due to the disease affliction. For example, for the treatment of cancerous tumors, a "therapeutically effective dosage" preferably inhibits cell growth or tumor growth by at least about 20%, more preferably by at least about 40%, even more preferably by at least about 60%, and still more preferably by at least about 80% relative to untreated subjects. The ability of a compound to inhibit tumor growth can be evaluated in an animal model system predictive of efficacy in human tumors. Alternatively, this property of a composition can be evaluated by examining the ability of the compound to inhibit, such inhibition *in vitro* by assays known to the skilled practitioner. A therapeutically effective amount of a therapeutic compound can decrease tumor size, or otherwise ameliorate symptoms in a subject. One of

ordinary skill in the art would be able to determine such amounts based on such factors as the subject's size, the severity of the subject's symptoms, and the particular composition or route of administration selected.

A composition of the present invention can be administered via one or more routes of administration using one or more of a variety of methods known in the art. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. Preferred routes of administration for antibodies of the invention include intravenous, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, spinal or other parenteral routes of administration, for example by injection or infusion. The phrase "parenteral administration" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion.

Alternatively, a defucosylated antibody of the invention can be administered via a non-parenteral route, such as a topical, epidermal or mucosal route of administration, for example, intranasally, orally, vaginally, rectally, sublingually or topically.

The active compounds can be prepared with carriers that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art. *See, e.g.,* Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Therapeutic compositions can be administered with medical devices known in the art. For example, in a preferred embodiment, a therapeutic composition of the invention can be administered with a needleless hypodermic injection device, such as the devices disclosed in U.S. Patent Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; or 4,596,556. Examples of well-known implants and modules useful in the present invention include: U.S. Patent No. 4,487,603, which discloses an implantable micro-infusion pump for dispensing medication at a controlled rate;

U.S. Patent No. 4,486,194, which discloses a therapeutic device for administering medicants through the skin; U.S. Patent No. 4,447,233, which discloses a medication infusion pump for delivering medication at a precise infusion rate; U.S. Patent No. 4,447,224, which discloses a variable flow implantable infusion apparatus for continuous drug delivery; U.S. Patent No. 4,439,196, which discloses an osmotic drug delivery system having multi-chamber compartments; and U.S. Patent No. 4,475,196, which discloses an osmotic drug delivery system. These patents are incorporated herein by reference. Many other such implants, delivery systems, and modules are known to those skilled in the art.

In certain embodiments, the defucosylated antibodies of the invention can be formulated to ensure proper distribution *in vivo*. For example, the blood-brain barrier (BBB) excludes many highly hydrophilic compounds. To ensure that the therapeutic compounds of the invention cross the BBB (if desired), they can be formulated, for example, in liposomes. For methods of manufacturing liposomes, see, *e.g.*, U.S. Patents 4,522,811; 5,374,548; and 5,399,331. The liposomes may comprise one or more moieties which are selectively transported into specific cells or organs, thus enhance targeted drug delivery (*see, e.g.*, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Exemplary targeting moieties include folate or biotin (see, *e.g.*, U.S. Patent 5,416,016 to Low *et al.*); mannosides (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); antibodies (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); surfactant protein A receptor (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); see also K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Uses and Methods of the Invention

The defucosylated antibodies, antibody compositions and methods of the present invention have numerous *in vitro* and *in vivo* diagnostic and therapeutic utilities involving the diagnosis and treatment of disorders involving expression of PSMA. For example, these molecules can be administered to cells in culture, *e.g. in vitro* or *ex vivo*, or to human subjects, *e.g.*, *in vivo*, to treat, prevent and to diagnose a variety of disorders. As used herein, the term "subject" is intended to include human and non-human animals. Non-human animals includes all vertebrates, *e.g.*, mammals

and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dogs, cats, cows, horses, pigs, chickens, avians, amphibians, and reptiles. Preferred subjects include human patients having disorders associated with PSMA expression. When antibodies to PSMA are administered together with another agent, the two can be administered in either order or simultaneously.

Suitable routes of administering the antibody compositions (*e.g.*, antibody or immunoconjugate) of the invention *in vivo* and *in vitro* are well known in the art and can be selected by those of ordinary skill. For example, the antibody compositions can be administered by injection (*e.g.*, intravenous or subcutaneous). Suitable dosages of the molecules used will depend on the age and weight of the subject and the concentration and/or formulation of the antibody composition.

In one embodiment, the antibodies of the invention can be initially tested for binding activity associated with therapeutic or diagnostic use *in vitro*. For example, compositions of the invention can be tested using ELISA and flow cytometric assays. Moreover, the activity of these molecules in triggering at least one effector-mediated effector cell activity, including inhibiting the growth of and/or killing of cells expressing PSMA can be assayed. Protocols for assaying for effector cell-mediated ADCC are described in the Examples below.

A. Detection Methods

In one embodiment, the antibodies of the invention can be used to detect levels of PSMA, or levels of cells which contain PSMA on their membrane surface, which levels can then be linked to certain disease symptoms.

In a particular embodiment, the invention provides methods for detecting the presence of PSMA in a sample, or measuring the amount of PSMA on the surface of cells, comprising contacting the sample, and a control sample, with a defucosylated antibody, or an antigen binding portion thereof, which specifically binds to PSMA, under conditions that allow for formation of a complex between the antibody or portion thereof and PSMA. The formation of a complex is then detected, wherein a difference complex formation between the sample compared to the control sample is indicative the presence of PSMA in the sample. For example, standard detection methods, well-known in the art, such as ELISA and flow cytometic assays, can be performed using the compositions of the invention.

Accordingly, in one aspect, the invention further provides methods for detecting the presence of PSMA (*e.g.*, human PSMA) in a sample, or measuring the amount of PSMA, comprising contacting the sample, and a control sample, with an antibody of the invention, or an antigen binding portion thereof, which specifically binds to PSMA, under conditions that allow for formation of a complex between the antibody or portion thereof and PSMA. The formation of a complex is then detected, wherein a difference in complex formation between the sample compared to the control sample is indicative of the presence of PSMA in the sample.

The compositions of the invention can also be used to target cells expressing PSMA, for example for labeling such cells. For such use, the binding agent can be linked to a molecule that can be detected. Thus, the invention provides methods for localizing *ex vivo* or *in vitro* cells expressing PSMA. The detectable label can be, *e.g.*, a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor.

B. Inhibition of Growth of PSMA+ Cells

The antibodies can be used to inhibit growth of cells expressing PSMA which, in turn, can be linked to the prevention or amelioration of certain disease symptoms associated with PSMA expression. Differences in PSMA expression during a disease state as compared to a non-disease state can be determined by contacting a test sample from a subject suffering from the disease and a control sample with the anti-PSMA antibody under conditions that allow for the formation of a complex between the antibody and PSMA. Any complexes formed between the antibody and PSMA are detected and compared in the sample and the control.

For example, the antibodies can be used to elicit *in vivo* or *in vitro* one or more of the following biological activities: to inhibit the growth of and/or kill a cell expressing PSMA; to mediate phagocytosis or ADCC of a cell expressing PSMA in the presence of human effector cells; to inhibit shedding of soluble PSMA. As discussed herein, the defucosylated antibodies of the invention exhibit enhanced ADCC activity as compared to the fucosylated form of the antibody.

Accordingly, in another aspect, the invention provides a method of inhibiting growth of $PSMA^+$ cells comprising contacting said cells with a defucosylated anti-PSMA antibody under conditions sufficient to induce antibody-dependent cellular cytoxicity (ADCC) of said cells. The cells can be, for example, tumor cells. In a preferred embodiment, the anti-PSMA antibody is a human antibody.

In one embodiment, the antibodies, or binding portions thereof, of the present invention can be used to modulate PSMA levels on target cells, such as by capping and eliminating receptors on the cell surface. Mixtures of anti-Fc receptor antibodies can also be used for this purpose.

Target-specific effector cells, *e.g.*, effector cells linked to compositions of the invention can also be used as therapeutic agents. Effector cells for targeting can be human leukocytes such as macrophages, neutrophils or monocytes. Other cells include eosinophils, natural killer cells and other IgG- or IgA-receptor bearing cells. If desired, effector cells can be obtained from the subject to be treated. The target-specific effector cells, can be administered as a suspension of cells in a physiologically acceptable solution. The number of cells administered can be in the order of 10^8-10^9 but will vary depending on the therapeutic purpose. In general, the amount will be sufficient to obtain localization at the target cell, *e.g.*, a tumor cell expressing PSMA, and to effect cell killing by, *e.g.*, phagocytosis. Routes of administration can also vary.

Therapy with target-specific effector cells can be performed in conjunction with other techniques for removal of targeted cells. For example, anti-tumor therapy using the compositions of the invention and/or effector cells armed with these compositions can be used in conjunction with chemotherapy. Additionally, combination immunotherapy may be used to direct two distinct cytotoxic effector populations toward tumor cell rejection.

C. Use of Immunoconjugates and Combination Therapy

In one embodiment, immunoconjugates of the invention can be used to target compounds (*e.g.*, therapeutic agents, labels, cytotoxins, radiotoxins immunosuppressants, etc.) to cells which have PSMA cell surface molecules by linking such compounds to the antibody. Thus, the invention also provides methods for localizing *ex vivo* or *in vitro* cells expressing PSMA (*e.g.*, with a detectable label, such as a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor). Alternatively, the immunoconjugates can be used to kill cells which have PSMA cell surface receptors by targeting cytotoxins or radiotoxins to PSMA, such as to PSMA-expressing tumor cells to thereby eliminate the tumor cell.

In other embodiments, the subject can be additionally treated with an agent that modulates, *e.g.*, enhances or inhibits, the expression or activity of Fcγ or Fcγ receptors by, for example, treating the subject with a cytokine. Preferred cytokines for administration during treatment include of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte- macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon-γ (IFN-γ), and tumor necrosis factor (TNF).

In another embodiment, patients treated with antibody compositions of the invention can be additionally administered (prior to, simultaneously with, or following administration of an antibody of the invention) with another therapeutic agent, such as a cytotoxic or radiotoxic agent, which enhances or augments the therapeutic effect of the human antibodies. The antibody can be linked to the agent (as an immunocomplex) or can be administered separate from the agent. In the latter case (separate administration), the antibody can be administered before, after or concurrently with the agent or can be co-administered with other known therapies, *e.g.*, an anti-cancer therapy, *e.g.*, radiation. Such therapeutic agents include, among others, anti-neoplastic agents such as doxorubicin (adriamycin), cisplatin bleomycin sulfate, carmustine, chlorambucil, and cyclophosphamide hydroxyurea which, by themselves, are only effective at levels which are toxic or subtoxic to a patient. Cisplatin is intravenously administered as a 100 mg/ml dose once every four weeks and adriamycin is intravenously administered as a 60-75 mg/ml dose once every 21 days. Co-administration of the anti-PSMA antibodies, or antigen binding fragments thereof, of the present invention with chemotherapeutic agents provides two anti-cancer agents which operate via different mechanisms which yield a cytotoxic effect to human tumor cells. Such co-administration can solve problems due to development of resistance to drugs or a change in the antigenicity of the tumor cells which would render them unreactive with the antibody.

D. Treatment of Cancer

PSMA has been shown to be expressed on tumor cells, such as prostate carcinoma tumor cells, and also has been shown to be expressed on vascular endothelial cells proximate to cancerous cells, such as urothelial cancerous cells, colon cancerous cells, rectal cancerous cells, lung cancerous cells, breast cancerous cells and metastatic adenocarcinoma cancerous cells of the liver (see US Patent No.

6,136,311). Accordingly, the antibodies of the invention can be used to treat cancer by inhibiting growth of PSMA-expressing tumor cells or by inhibiting growth of vascular endothelial cells proximate to tumor cells. Thus, in another embodiment, the present invention provides a method of inhibiting growth of a tumor in a subject, wherein cells of the tumor or vascular endothelial cells proximate to the tumor are $PSMA^+$, in which a defucosylated anti-PSMA antibody of the invention is administered to the subject such that growth of the tumor is inhibited. For human subjects, the antibody preferably is a humanized or human antibody. In a preferred embodiment, the tumor cells are prostate tumor cells. In other embodiments, the tumor cells are from cancers such as colon, renal, rectal, urothelial, breast, bladder, liver, pancreas or melanoma.

The treatment methods of the invention involve administering to a subject an antibody composition of the present invention in an amount effective to treat or prevent the disorder. The antibody composition can be administered alone or along with another therapeutic agent, such as a cytotoxic or a radiotoxic agent (conjugated to or administered with the antibody) which acts in conjunction with or synergistically with the antibody composition to treat or prevent the disease associated with PSMA expression.

Kits

Also within the scope of the invention are kits comprising an antibody of the invention and instructions for use. The kit can further contain one or more additional reagents, such as an immunostimulatory reagent, a cytotoxic agent or a radiotoxic agent, or one or more additional antibodies of the invention (*e.g.*, an antibody having a complementary activity which binds to an epitope in the PSMA antigen distinct from the first antibody). Kits typically include a label indicating the intended use of the contents of the kit. The term label includes any writing, or recorded material supplied on or with the kit, or which otherwise accompanies the kit.

The present invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as further limiting. The contents of all figures and all references, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference.

Example 1: Expression of Anti-PSMA Monoclonal Antibody in Eggs of Chimeric Chickens

In this example, the expression of the anti-PSMA human monoclonal antibody, 7F12, in the eggs of chimeric chickens is described. General methodologies for expressing proteins, including antibodies, in the eggs of chimeric chickens is described in PCT Publication WO 2004/015123, the contents of which are expressly incorporated herein by reference. Additional information regarding expression of antibodies in eggs of chimeric chickens is described in U.S. Application Serial No. 11/062,325, entitled "Tissue Specific Expression of Antibodies in Chickens", filed February 18, 2005, the contents of which are expressly incorporated herein by reference.

In the following example, a transgene containing an endogenous egg white regulatory sequence comprising a promoter together with exogenous immunoglobulin light and heavy chain genes is constructed to yield tissue specific antibody expression in the tubular gland cells of the oviduct. The antibody molecules so expressed are then deposited in the egg white of a transgenic chicken. In this embodiment, antibodies encoded by any rearranged immunoglobulin gene are expressed specifically in tissue comprising the tubular gland cells of the magnum region of the oviduct and can be isolated from the whites of eggs. The rearranged immunoglobulin genes encoding the monoclonal antibody are preferentially expressed in the oviduct to the substantial exclusion of expression in other tissues, although expression in other tissues may exist above detectable levels.

Preferred transgene constructs for ovalbumin derived monoclonal antibody constructs are shown in Figure 12. These transgene constructs, designated Ov7.5 and Ov15, have approximately 7.5 kb and 15 kb, respectively, of the ovalbumin promoter flanking the MAb coding region at the 5' end sequence and 15 kb of the promoter sequence 3' of the coding region. The coding regions comprise the variable regions for both the light chain and heavy chain, J-C intron sequences, the kappa light chain constant region, an IRES sequence and the gamma 1 isotype heavy chain constant regions. The 3' end of the construct comprises a GFP gene and a selectable marker, in this case a puromycin resistance gene driven by the CX promoter. The lengths of the ovalbumin promoter sequence both 3' and 5' of the monoclonal antibody coding region are examples only and analogous constructs may include 25-100 kb or more of

the 5' sequence as well as varying lengths in the 3' sequence. Those of ordinary skill in the art will appreciate that the GFP marker is present only for detection in physiological specimens and can be removed without departing from the utility of the transgene. The puromycin resistance marker can be substituted with any marker that provides the ability to select embryonic stem cells that are successfully transformed with the transgene. Several types of analogous selectable marker are well known in the art and can be used essentially interchangeably with the puromycin resistance gene of this embodiment.

The transgene used for expression of the human anti-PSMA mAb 7F12 was referred to as Ov15mAb7F12 and included 15 kb of the 5' regulatory sequences of the ovalbumin promoter. Additionally, the signal peptide was directly joined to VL to prevent its removal during mRNA processing. Newly derived female cES cell lines (prepared as described in PCT Publication WO 2004/015123) were used so that high grade chimeras could produce eggs. The Ov15MAb7F12 vector was transfected into a female cES cell line and stably transfected clones were screened by PCR. One clone (OVH) was further analyzed by Southern blot. It showed that only one copy of the Ov15MAb7F12 transgene was integrated into the cES genome and the transgene contained at least 10 kb of the 5' Ov promoter sequences.

Chimeric chickens were made from the OVH clone for transgene analysis. Ten chimeric chicks were used for early estrogen induction. Donor cES-derived areas (GFP-positive) from various tissues including the magnum portion of the oviduct, muscle, brain, liver and gut, were collected. RT-PCR with primers specific for L and H chains were used to monitor expression of the transgene. L and H chain transcripts were detected in the magnum but not in muscle, brain and liver samples from 3 out of 4 induced female chicks (OV15-34, OV15-76 and OV15-83). However, low-level expression was also detected in ileum, cecum and colon. Immunohistochemistry of sections from estrogen-induced magnums confirmed the expression of the monoclonal antibody in GFP-positive tubular gland cells but not in GFP-positive epithelial cells. Taken together, these data demonstrate that the Ov15MAb7F12 vector directed transgene expression in the tubular gland cells of the oviduct. The low-level ectopic expression detected in the gut suggests that 15 Kb of the 5' regulatory sequences of Ov may not be sufficient to confer positional independent, tissue-specific expression of the transgene.

Sixty-nine chimeras were generated from OVH cES cells carrying the Ov15MAb7F12 to evaluate the deposition of the fully human MAb into eggs. Thirty chimeric hens were raised to sexual maturity and commenced laying. Eggs from all of the hens contained MAb in their egg white as indicated by ELISA analysis. The concentration and amount of MAb in eggs varied among the chimeric hens, presumably due to the varying degree of chimerism in the magnum. Eight chimeric hens laid eggs that contained more than 1 mg of MAb per egg and the maximal level among the 30 chimeras was 3.4 mg of MAb per egg. Four chimeric hens laid eggs whose mean level of MAb was between 1.2 and 1.6 mg per egg. Six chimeric hens laid eggs whose mean level of MAb was between 0.5 and 1.0 mg per egg.

The presence of MAb in egg white was further analyzed by western blot with a rabbit anti-human IgG (H+L) that recognizes both the H and L chains. Egg white from a wild type, non-chimeric White Leghorn hen was used as the negative control. Purified human IgG1, κ (Sigma) was used as the reference standard. Full-length L and H chains were detected in egg white samples from five chimeric hens (OV15-17, OV15-29, Ov15-71, OV16-34 and OV16-42). Fully assembled H_2L_2 was also seen, although small amounts of assembly intermediates were also present.

To determine the variation of the MAb concentration deposited in egg white, eggs from 5 different chimeric hens (OV16-34, OV16-42, OV17-29, OV17-52 and OV17-83) were monitored over a period of 3-4 months. In 3 hens, the amount of MAb peaked during the first few weeks, then dropped approximately two fold and remained stable over the next few months. In two hens, the expression level remained relatively stable over the time course. If not all of the tubular glands secrete and deposit ovalbumin protein as the egg is passing through the magnum portion of the oviduct, the amount of MAb deposited in the egg white could vary as each egg passes through the magnum due to the chimeric nature of the tubular glands in these hens.

Blood samples from 26 chimeric hens and a Barred Plymouth Rock (BPR) hen (negative control) were analyzed by ELISA for the presence of human IgG. Eighteen hens had detectable levels of MAb in blood with the highest concentration of 39 ng/ml observed in hen OV17-83. The correlation coefficient (r) between the level of MAb in blood and the concentration of MAb in egg white was 0.67. However, this comparison was complicated by the fact that the extent of chimerism in different tissues can vary significantly. For example, hen OV17-122 had very little MAb in

egg (0.02 mg/egg on average) but had the second highest concentration of MAb in blood (36 ng/ml). We speculate that the presence of MAb in blood may not be a consequence of leakage from oviduct expression but instead reflects ectopic expression (for example, the gut where ectopic expression was detected by RT-PCR in estrogen-induced chimeras).

Example 2: Purification and Protein Characterization of Antibody Product

MAb 7F12 was purified from egg white as follows. Egg white was first mixed at a low shear rate for 30 min at room temperature and then ovomucin precipitated by a method known in the art. One volume of homogenized egg white suspension was added to three volumes of reverse osmosis water and stirred for 30 min. The diluted suspension was adjusted to pH 6.0 using 0.5 M phosphoric acid and then centrifuged for 20 min at 12,100g. Approximately 3% of the egg white protein containing mostly ovomucin was removed by this method. The supernatant was adjusted to pH 7.4 using 0.5 M dibasic sodium phosphate and 150 mM sodium chloride concentration with crystalline salt. The human IgG was purified on a Protein A-Sepharose FF column (Amersham Biosciences) at a 120 cm/h linear flow rate. The adsorbed human IgG was washed with five column volumes of the loading buffer (PBS, pH 7.4) and then eluted by using 3 mM phosphoric acid. The eluted human IgG fraction was adjusted to pH 7.5 using 60 mM sodium phosphate (pH 7.5) containing 230 mM NaCl to achieve a final concentration of 40 mM sodium phosphate and 150 mM NaCl. The sample was then filtered through a 0.2 μm syringe filter (Pall).

Most of the purified material was a fully assembled MAb molecule with a purity greater than 90% (determined by ELISA and A280). The MAb7F12 produced in chicken was compared in several assays with MAb7F12 produced in conventional CHO cell culture, as follows:

1. SEC-HPLC analysis of antibody

About 10 μg of IgG sample was analyzed on a Waters 2795 HPLC using a 4.6 x 300 mm BioSep SEC S3000 column (Phenomenex). Chromatography was carried out in 0.1 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, and 0.1 M sodium sulfate, pH 7.2 at 0.4 ml/min flow rate for 20 min. Separations were monitored at A_{280}. Molecular weight

standards (Bio-Rad) were used to determine approximate molecular weight. SEC-HPLC analysis showed that both were more than 90% IgG monomer.

2. Nano LC ESI MS/MS sequence analysis of protein

Both MAb preparations (chicken egg-expressed and CHO cell-expressed) were reduced and alkylated, dialyzed overnight and digested with trypsin for 4 hours at 37° C in 25 mM ammonium bicarbonate (PH 8). Tandem mass spectrometry of both tryptic digests was performed on a Nano HPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA) interfaced to a QSTAR pulsar mass spectrometer (MDS Sciex, Concord, Ontario, Canada) operation in positive ion mode and using collision induced dissociation (CID) to obtain tandem spectra. A 1 µl aliquot of each sample was injected and separated using a 75 µm diameter Pepmap C18 column at a flow rate of 250 nl/min. The mobile phase was solvent A (95% water, 5% acetonitrile, 0.5 % formic acid) and solvent B (20% water, 80% acetonitrile, 0.5 % formic acid). The instrument was operated in information dependent acquisition mode with 7 s operating cycles, recording a full spectrum for 2 s then selecting the most intense ion to record a CID spectrum during the next 5 s. Spectra were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK). Analysis of both MAb preparations by the described methods showed no sequence difference depending on the expression system.

3. LC-MS analysis

IgG samples (50 µg) in 4 M guanidine HCl were reduced in 25 mM DTT by incubating the samples at 60°C for 90 min. Samples were then alkylated in 45 mM iodoacetic acid for 15 min at room temperature in the dark and the reaction was stopped with 22 mM DTT. Prior to LC-MS samples were dialyzed against 1 L of 25 mM ammonium bicarbonate and 50 µl of each sample was injected to a Poros R1/10 2.1 x 100 mm column (Applied Biosystems) using a Waters 2795 HPLC equipped with a Micromass ZQ mass spectrometer and analyzed in positive ion mode. The mobile phase was (A) 0.1% formic acid and 0.01% trifluoroacetic acid (TFA) and (B) 100% CH_3CN with 0.1% formic acid and 0.01% TFA. Elution (0.25 ml/min) was conducted by a linear gradient of 10-60% of (B) in (A) developed over 100 min.

Analysis of the L chain showed that both MAb preparations had identical mass (+/- 3 Da.).

4. cIEF analysis

IgG samples (50 µg each at 1.0 mg/ml) were dialyzed against water to remove salts before CE analysis. Capillary electrophoresis isoelectric focusing was performed on a P/ACE MDQ CE system (Beckman) with normal polarity, using a 50 µm internal diameter eCAP neutral capillary (Beckman) with 30 cm effective length. Sample was injected for 60 s by pressure injection at 20 psi. Separation was carried out using 15 kV for 45 min. The temperature of the capillary was 20°C. The anolyte was 20 mM phosphoric acid and the catholyte was 40 mM sodium hydroxide. The rinse solution was 10 mM phosphoric acid and the cathodic mobilizer solution was used as provided (Beckman). The separations were monitored at A_{280}. The cIEF analysis indicated that both have similar isoelectic points (pI) although CHO derived MAb7F12 had an increased charge heterogeneity

5. Thermal stability by differential scanning calorimetry

The thermal stabilities 7F12 produced in the chicken and CHO expression systems were obtained using differential scanning calorimetry (DSC) and compared with their corresponding forms that were deglycosylated in their Fc domain. Calorimetric measurements of melting temperatures (T_m) were carried out on a VP-Capillary DSC differential scanning microcalorimeter platform that is combined with an autosampler (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA). Sample cell volume is 0.144 mL. Denaturation data on the glycosylated and deglycosylated forms of the antibodies was obtained by heating the samples, at a concentration of 2.3 µM, from 30 to 95 °C at a rate of 1°C/min. The protein samples were present in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4. The same buffer was used in the reference cell to obtain the molar heat capacity by comparison. The observed thermograms were baseline corrected and normalized data was analyzed using Origin v7.0.

The unfolding profiles of the CHO and chicken derived antibodies were quite different, whereas the unfolding profiles of the Fc-deglycosylated antibodies were almost identical. The DSC data indicated that the differences in the thermal stabilities of the CHO and chicken derived Mabs is primarily due to the different glycosylation patterns present in their respective C_H2 domains. Of the several melting transition points, the first one is critical as it determines the overall stability of the antibodies at lower temperature. The T_{m1} of the chicken derived antibody was determined to be 63.8 °C, whereas the T_{m1} of the CHO expressed antibody was determined to be 62.7

°C. Given that the T_{ml} of the chicken derived antibody is higher than the T_{ml} of the CHO expressed antibody, it is likely that the chicken derived antibody is more thermo-stable at room temperature.

Example 3: Oligosaccharide Analysis of Chicken-Expressed Anti-PSMA Antibody

In this example, the glycosylation pattern of the chicken egg-expressed 7F12 antibody was analyzed using a variety of different techniques.

1. Oligosaccharide characterization by CE-LIF

Oligosaccharides were released from IgG samples (100 μg) by overnight incubation of the samples with 12.5 mU PNGaseF (Prozyme) at 40°C. Under the conditions used, the N-linked glycans from the Fc portion of HuMAbF1 expressed in CHO cells and chicken were released. Following ethanol precipitation to remove MAb protein, the supernatant containing the glycans was dried by vacuum centrifugation and resuspended in 19 mM APTS (Beckman) in 15% acetic acid and 1 M sodium cyanoborohydride in THF (Sigma). The glycan labeling reaction was allowed to continue overnight at 40°C followed by 25-fold dilution of sample in water. APTS-labeled glycans were applied to capillary electrophoresis with laser induced fluorescence on a P/ACE MDQ CE system (Beckman) with reverse polarity, using a 50 μm internal diameter N-CHO coated capillary (Beckman) with 50 cm effective length. Samples were pressure (8 sec.) injected and separation was carried out at 20°C using Carbohydrate Separation Gel Buffer (Beckman) at 25 kV for 20 min. The separations were monitored using a laser-induced fluorescence detection system (Beckman) with a 3 mW argon ion laser and excitation wavelength of 488 nm and emission of 520 nm. The oligosaccharide profile of 7F12 produced in the chicken was found to be quite different from that of 7F12 produced in the CHO cells.

2. Oligosaccharide characterization by MALDI Q-TOF MS

Purified antibodies (100 μg each at 1.0 mg/ml) were treated with 4 μl of PNGaseF, an endoglycosidase that cleaves N-linked carbohydrates (Prozyme). The samples were incubated at 37°C overnight followed by dialysis overnight against 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8). The protein was removed by ethanol precipitation. The released carbohydrates were desalted on a micro carbon column

from Glygen Corp. (Columbia, MD) essentially following the vendor's protocol, but the elution volume was reduced to 5 μl. A 1 μl aliquot of each glycan sample was mixed 1:1 (v:v) with matrix solution (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid or 2,5-dihydroxybenzoic acid (Applied Biosystems), spotted on a MALDI target plate and allowed to air-dry. MALDI-Q-TOF tandem analysis was used to perform the analysis of intact glycoconjugates. All mass spectra were recorded on a QSTAR pulsar i mass spectrometer equipped with an o-MALDI source 2 (MDS Sciex, Concord, Ontario, Canada), which provides the mass (composition) of classes of carbohydrates. After the glycan profiling of both the MAbs, the possible glycosidic linkage in each glycan was investigated. High CID mass spectra were recorded on a 4700 Proteomics analyzer with a TOF/TOf optics (Applied Biosystems, Forster City, CA). For high CID MSMS experiments, the collision energy was set at 1 kV. Inside the collision cell, the selected oligosaccharide ions were collided with argon at a pressure of 2×10^{-6} Torr.

The carbohydrate composition and possible glycosidic linkages of eleven major glycans in chicken-derived 7F12 analyzed by MALDI TOF mass spectrometry are summarized in Figures 13A and 13B. The oligosaccharide structures were found to contain high-mannose type, complex type and hybrid type N-glycans. None of the structures contained fucosyl residues.

3. Monosaccharide analysis by HPLC with HPAE-DAD

IgG samples (200 μg) were subjected to acid hydrolysis using either 2 N TFA (for estimating neutral sugars) or 6 N HCl (for estimating amino sugars) at 100°C for 4 h. Samples were dried by vacuum centrifugation at ambient temperature and were reconstituted in 200 μl water prior to analysis by HPAE-PAD (Dionex). Monosaccharides were separated using a CarboPac PA10 4 x 250 mm column with pre-column Amino Trap and Borate Trap (Dionex). Procedures were followed according to Dionex Technical Note 53. Monosaccharide peak identity and relative abundance were determined using monosaccharide standards (Dionex).

Monosaccharide analysis of chicken and CHO produced 7F12 is summarized in Table 1 below.

Table 1: Monosaccharide Analysis of chicken and CHO produced MAb 7F12

Monosaccharide	CHO MAb pmol (% total)	Chicken MAb pmol (% total)
Fucose	692 (18)	0
Glucosamine	1,536 (40)	1,571 (52)
Galactose	671 (17)	43 (1)
Mannose	940 (25)	1,513 (47)
Total	3,839 (100)	3,127 (100)

The monosaccharide analysis revealed a difference in carbohydrate composition and showed the presence of N-acetyl glusosamine residues, mannose residues, and very low content of galactose residues in 7F12 produced in chicken. No fucose residues were detected in the chicken produced 7F12, in contrast to the CHO expressed antibody preparation that contained fucosyl residues.

Exoglycosidase analysis of glycans by CE and mass spectrometry to identify the terminal sugar residues confirmed the absence of terminal sialic acid and fucose residues in MAb7F12 produced in chicken tubular gland cells.

In summary, the most striking differences in the N-linked oligosaccharide profiles were the presence of high mannose type N-glycans, the absence of fucose and the very low content of galactose residues in the antibody produced in the chicken.

Example 4: Functional Analysis of Chicken-Expressed Anti-PSMA Antibody

In this example, the functional properties of the chicken egg-expressed 7F12 anti-PSMA antibody were examined, including binding affinity, internalization, serum half life *in vivo* and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity.

1. Binding Affinity for PSMA

PSMA on LNCaP cells (ATCC CRL-1740) was used as antigen to assay for antibody binding by flow cytometry. Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate. The antigen binding property of 7F12 produced in chicken tubular gland cells was compared with that of 7F12 produced in CHO cells. 200,000 cells/well were incubated in duplicate for 30 minutes with 50 µl aliquots of antibody at various concentrations. Cells were washed twice before addition of goat anti-human IgG PE

labeled antibody (Jackson ImmunoResearch) at 1:200 dilution, 50 µl /well for 30 minutes at 4°C. Cells were washed twice in PBS with 1% BSA and assayed by FACS. EC_{50} values of MAb binding to PSMA on LNCaP cells were determined from binding curves utilizing GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software).

Both antibody preparations produced nearly identical binding curves to PSMA expressed on LNCaP cells with similar EC_{50} values. The data demonstrated that while the chicken-derived and CHO-derived antibodies are glycosylated differently, they recognize and bind antigen equivalently.

2. Antibody Internalization

Binding of the 7F12 mAb to PSMA leads to internalization of the antibody. In one potential application, MAb could be conjugated with cytotoxins in order to target and destroy PSMA-expressing tumor cells. Internalization of antibody binding to PSMA on LNCaP cells was determined by incubating cells with MAb and Hum-Zap (Advanced Targeting Systems). HumZap is a goat anti-human IgG antibody conjugated to the ribosome inactivating protein, saporin. Cells are killed when the 7F12 MAb/Hum-Zap complex binds to PSMA on the cell surface and is internalized whereas antibody or Hum-Zap alone is not toxic to LNCaP cells. LNCaP cells (10,000 / well) were incubated in triplicate, for 48 hours, at 37°C, in 150 µl of culture medium containing 300 ng Hum-Zap, and 300 ng of 7F12 MAb, or control MAb. Cell proliferation and survival was determined with the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Internalization assays were also done by incubating dilutions of antibody in cell culture medium with 10,000 adherent LNCaP cells/well, for 2 hours at 4°C. Antibody solutions were gently removed and replaced with 150 µl of medium containing 200 ng of HumZap. Cell viability was determined following 48 hours of incubation at 37°C. EC_{50} values for antibody internalization were determined graphically with Prism 3.0 (GraphPad Software).

Both the chicken-expressed and the CHO-expressed antibody preparations internalized with a similar efficiency. When tested over a range of antibody concentrations, the EC_{50} values for internalization of both the chicken-derived and CHO-derived 7F12 MAb were 0.49 nM.

3. *In Vivo* Half Life

The *in vivo* half-life of the chicken produced 7F12 MAb was analyzed in parallel with the CHO produced antibody in BALB/c mice by intravenous injection of

radiolabeled antibodies. Ten μg of MAb protein were lightly iodinated (less than one I per antibody) with ^{125}I using the Iodobead method (Pierce). Six week-old female BALB/c mice (Taconic Farms, Germantown, NY) were fed 0.1 mg/ml potassium iodide in their drinking water for one week prior to the experiment. Four mice per protein were injected intravenously into the tail vein with approximately 600,000 cpm of labeled MAb and whole body radioactivity was measured at selected times using a whole body gamma counter (Wm. B. Johnson NaI crystal detector with a Ludlum scaler). Half-life was calculated by exponential regression analysis of the residual radioactivity.

The 7F12 MAb produced by chicken tubular gland cells cleared with a half-life ($t_{1/2}$) of 102.4± 0.9 hours, while 7F12 MAb produced by CHO cells cleared more slowly with a half-life of 207.5±18.3 hours.

4. ADCC Activity

LNCaP-C42B cells were tested in a modified ^{51}Cr ADCC assay. Human peripheral blood mononuclear cells were purified from heparinized whole blood by standard Ficoll-paque separation. The cells were resuspended (at $1x10^6$ cells / ml) in RPMI1640 media containing 10% FBS and 10 U/ml of human IL-2 and incubated overnight at 37° C. The following day, the cells were collected and washed once in culture media and resuspended at 2×10^7 cells /ml. Two million target LNCaP-C42b cells are incubated with 200 μCi ^{51}Cr in 1 ml total volume for 1 hour at 37° C. The target cells are washed once, resuspended in 1ml of media, and incubated at 37° C for an additional 30 minutes. After the final incubation, the target cells were washed once and brought to a final volume of $1x10^5$ cells/ml. For the final ADCC assay, 100 μl of labeled LNCaP cells were incubated with 50 μl of effector cells and 50 μl of antibody. The final target to effector ratio of 1:100 was selected. In all studies, human IgG1 isotype control was run and compared to CHO-derived anti-PSMA 7F12 antibody. Other controls which were included were: a) target and effector cells but no antibody, b) target cells with no effector cells and c) target and effector cells in the presence of 3% Triton X-100. Following 4 hour incubation at 37° C, the supernatants were collected and counted on a gamma Counter (Cobra II auto-gamma from Packard Instruments) with a reading window of 240-400 keV. The counts per minute were plotted as a function of antibody concentration and the data was analyzed by non-

linear regression, sigmoidal dose response (variable slope) using Prism software (San Diego, CA). The percent lysis was determined by the following equation:

% Lysis = (Sample CPM- No antibody CPM)/TritonX CPM-No antibody CPM) X 100

We have found that it is important that both EC_{50} values and % Lysis are monitored in all studies. For example, it is possible when comparing two antibodies to have a change in either the EC_{50} or % lysis or both.

The results of two different ADCC experiments are shown in Figure 14A (IL-2 stimulated effector cells) and in Figure 14B (fresh human peripheral blood effector cells). Figure 14A shows that CHO derived MAb induces dose dependent cell lysis which reaches a plateau at 38% lysis with an EC_{50} of 0.11 μg/ml with IL-2 stimulated effector cells. In contrast, the chicken egg derived MAb was more potent and more efficatious. The maximum % lysis of the chicken egg derived MAb was 60% with two different preparations of the antibody. The enhanced potency over the CHO derived MAb was also demonstrated as the EC_{50} of this material was 0.018 μg/ml. That is, the EC_{50} for the chicken-expressed antibody was approximately six-fold lower than the EC_{50} for the CHO-expressed antibody. Finally, as expected, isotype control antibody did not induce cell lysis. ADCC with unstimulated effector cells (fresh PBMCs) showed a greater difference in EC_{50} values, but lower overall cell killing (Figure 14B).

CD16 (FcγRIII) is a key receptor that mediates ADCC. The specificity of the ADCC response was shown by blocking the interaction of target and effector cells using a monoclonal antibody directed against CD16. Blockade of ADCC with anti-CD16 antibodies was conducted according to the ADCC assay described above, with the following modifications. The cells were incubated with either 1 μg/ml (a saturating dose) or 0.01 μg/ml (a sub-optimal dose) of 7F12 anti-PSMA antibodies (chicken or CHO expressed) in the absence or presence of 5 μg/ml of anti-CD16 antibody 3G8 or isotype control antibody. The results are shown in Figure 15. One μg/ml of anti-PSMA antibody, in the absence of anti-CD16 antibody, induced approximately 15% and 38% lysis with CHO-derived and chicken-derived antibody,

respectively. This % lysis was reduced to ~4% in the presence of anti-CD16 antibody while isotype control antibody had no effect.

Example 5: Preparation and Characterization of Defucosylated Anti-PSMA Antibody in FUT8 Negative Host Cells

In this example, a fully human anti-PSMA monoclonal antibody was expressed in a cell line lacking a fucosyl transferase enzyme such that the cell line produces proteins lacking fucose in their carbohydrates. The defucosylated antibody was tested against a fucosylated anti-PSMA antibody (expressed in a different cell line that contains the fucosyl transferase enzyme) to determine structural and characteristic differences between the antibodies, using a variety of chemical analysis techniques, including capillary electrophoresis, comparison of amino acid sequence, mass differences by mass spectroscopy and charge variation by capillary isoelectric focusing.

The anti-PSMA fully human monoclonal antibody 2A10 was used. The amino acid and nucleotide sequences of the 2A10 heavy chain are shown in Figure 5A and the amino acid and nucleotide sequences of the 2A10 light chain are shown in Figure 5B. The 2A10 heavy and light chain variable sequences were subcloned into an expression vector. The 2A10 kappa variable region cDNA, including its signal sequence and an optimal Kozak sequence, was subcloned in frame with the human kappa constant region. The 2A10 heavy chain variable region cDNA, including its signal sequence and an optimal Kozak sequence, was subcloned in frame with the human γ1 heavy constant region. Both light and heavy chain expression were driven by the SR alpha promoter. This expression vector is described in further detail in PCT Application No. PCT/US2004/028954, the contents of which are expressly incorporated herein by reference.

The expression vector was transfected into the $FUT8^{-/-}$ host cell line Ms704 by DNA electroporation. The Ms704 $FUT8^{-/-}$ cell line was created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors, and is more fully described in U.S. Patent Publication 20040110704 by Yamane *et al.* and Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22. The Ms704 cells were adapted to growth in suspension culture in growth medium EX-CELL™ 325 PF CHO

Medium (JRH #14335) supplemented with 100 μM hypoxanthine with 16 μM thymidine (Invitrogen #11067-030) and 6 mM L-glutamine (Invitrogen #25030-081). The vector DNA to be used for electroporation was ethanol precipitated and resuspended in water. 1.5 μg DNA was utilized for each of eight electroporations. The Ms704 cells were prepared for transfection by washing the cells in a sucrose-buffered solution (SBS) and resuspending the cells at 1 X 10^7 cells/ml SBS solution. 400 μl cells were mixed with construct DNA and electroporated utilizing settings at 250 volts, 275 microfaradays capacitance and 25 ohms resistance (BTX Molecular Delivery Systems #630 electro cell manipulator). The cells were removed from the electroporation cuvettes and 20 ml growth medium was added. The cells were plated into a 96 well dish using 200 μl cells per well, approximately 4 X 10^4 cells/well. 2 days after the electroporation, 150 μl of medium was removed from each well and replaced with 150 μl selection medium, growth medium with 400 μg/ml G418 (Invitrogen #10131-035). Every three to seven days, 150 μl of selection medium per well was replaced with fresh selection medium.

CHO DG44 host cells (FUT 8 +/+) were electroporated with the identical 2A10 construct using a similar procedure and CHO DG44 transfectants expressing recombinant 2A10 antibody containing fucosylated carbohydrate were established.

The highest producing Ms704 and CHO DG44 clones were expanded and recombinant 2A10 antibody was purified from cell culture supernatants by Protein A affinity chromatography.

Comparative analysis of N-linked oligosaccharides derived from the Ms704 and the CHO DG44 derived anti-PSMA monoclonal antibody samples was done by capillary electrophoresis laser induced fluorescence (cLIF) (Chen and Evangelista (1998) *Electrophoresis* 15:1892). The N-linked oligosaccharides of the purified antibody were released by adding the peptide N-glycanase (Prozyme) and incubating overnight. The protein was ethanol precipitated, and the carbohydrate containing supernatant was transferred to a new tube and dried using a Speedvac. The carbohydrates were resuspended and derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS) under mild reductive amination conditions in which desialylation and loss of fucose residues was minimized. The reaction adducts were analyzed by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence detector (Beckman Coulter) (Ma and Nashabeh (1999) *Anal. Chem.* 71:5185). Differences in the

oligosaccharide profile were observed between the antibody obtained from the Ms704 cell line as compared to the CHO DG44 cell line, consistent with an absence of fucose residues in the Ms704 derived anti-PSMA antibodies. Monosaccharide analysis using Dionex-HPLC anion exchange with pulsed amperometric detection confirmed that the Ms704-expressed antibody lacked expression of any fucose residues. The results are summarized below in Table 2.

Table 2: Monosaccharide Analysis of MAb 2A10 from FUT8 -/- and FUT8 +/+ Cells

Monosaccharide	FUT8 +/+ pmol (% total)	FUT8 -/- pmol (% total)
Fucose	159 (11)	0 (0)
Glucosamine	655 (46)	645 (58)
Galactose	52 (4)	107 (10)
Mannose	561 (39)	358 (32)
Total	1,427 (100)	1,110 (100)

Aside from the difference in oligosaccharides shown by capillary electrophoresis and monosaccharide analysis, the Ms704 and CHO DG44 derived anti-PSMA antibody protein samples were essentially identical. Analysis of N-terminal protein sequence revealed an identical N-terminal amino acid sequence. Mass spectroscopy of the light chain of the Ms704 and CHO DG44 derived anti-PSMA antibodies yielded masses of 23,552 and 23,548, respectively, which were within the error of the instrument. The two antibodies were also tested using a standard capillary isoelectric focusing kit assay (Beckman Coulter) and showed that the two antibody samples had essentially identical isoelectric points. These studies indicate that the protein component of the antibody samples derived from the Ms704 and the CHO DG44 cells are essentially identical with the exception of the defucosylation of the Ms704 derived antibodies. Carbohydrate analysis indicated that the defucosylated form of the antibody had more terminal galactose residues than the fucosylated form of the antibody.

Example 6: Assessment of ADCC Activity of Defucosylated Anti-PSMA Antibody Expressed in FUT8 Negative Host Cells

The cytotoxic activity of Ms7040-derived (defucosylated) 2A10 antibody against LNCaP-C42B cells (obtained commercially from ViroMed Laboratories, Minnetonka, MN) was tested in a modified ^{51}Cr ADCC assay. Human peripheral blood mononuclear cells were purified from heparinized whole blood by standard Ficoll-paque separation. The cells were resuspended (at $1x10^6$ cells / ml) in RPMI1640 media containing 10% FBS and 10 U/ml of human IL-2 and incubated overnight at 37° C. The following day, the cells were collected and washed once in culture media and resuspended at 2×10^7 cells /ml. Two million target LNCaP-C42b cells are incubated with 200 μCi ^{51}Cr in 1 ml total volume for 1 hour at 37° C. The target cells are washed once, resuspended in 1ml of media, and incubated at 37° C for an additional 30 minutes. After the final incubation, the target cells are washed once and brought to a final volume of $1x10^5$ cells/ml. For the final ADCC assay, 100 μl of labeled LNCaP cells were incubated with 50 μl of effector cells and 50 μl of antibody. The final target to effector ratio of 1:100 was selected. In all studies, human IgG1 isotype control was run and compared to CHO DG44-derived (fucosylated) anti-PSMA 2A10 antibody. Other controls which were included were: a) target and effector cells but no antibody, b) target cells with no effector cells and c) target and effector cells in the presence of 3% Triton X-100. Following 4 hour incubation at 37° C, the supernatants were collected and counted on a gamma Counter (Cobra II auto-gamma from Packard Instruments) with a reading window of 240-400 keV. The counts per minute were plotted as a function of antibody concentration and the data was analyzed by non-linear regression, sigmoidal dose response (variable slope) using Prism software (San Diego, CA). The percent lysis was determined by the following equation:

% Lysis = (Sample CPM- No antibody CPM)/TritonX CPM-No antibody CPM) X 100

The results of three separate ADCC experiments are shown in Figures 16A, 16B (IL-2 stimulated effector cells) and 16C (fresh human peripheral blood effector

cells). A cell cytotoxicity curve for the LnCaP cell line using varying concentrations of fuc-2A10 and defuc-2A10 was determined and EC_{50} and % Lysis values were determined. The results from the three experiments corresponding to Figs 16A, 16B and 16C, respectively, are shown in Table 3 below:

Table 3: Cytotoxic Ability of Defucosylated Anti-PSMA mAb 2A10

Experiment	EC_{50} (μg/ml) Fucosylated	EC_{50} (μg/ml) Defucosylated	EC_{50} Ratio	% Lysis Fucosylated	% Lysis Defucosylated
Expt. #1	0.08	0.007	11.4	49%	63%
Expt. #2	0.026	0.009	2.9	32%	51%
Expt. #3	0.036	0.002	18.0	n.d.	n.d.

The enhanced potency of the Ms704-derived (i.e., defucosylated) 2A10 mAb, as compared to the CHO DG44-derived (i.e., fucosylated) 2A10b mAb is evident by the lower EC50 values and higher % lysis values for the defucosylated form of the antibody. For example, the EC50 values for the defucosylated form are approximately 3-fold to 18-fold lower for the defucosylated form. ADCC activity with unstimulated effector cells (fresh PBMCs), as compared to IL-2 stimulated effector cells, showed a greater difference in EC_{50} values, but lower overall cell killing (Figure 16C).

CD16 (FcγRIII) is a key receptor that mediates ADCC. The specificity of the ADCC response was shown by blocking the interaction of target and effector cells using a monoclonal antibody directed against CD16. Blockade of ADCC with anti-CD16 antibodies was conducted according to the ADCC assay described above, with the following modifications. The cells were incubated with either 1 μg/ml (a saturating dose) or 0.01 μg/ml (a sub-optimal dose) of 2A10 anti-PSMA antibodies (Ms704 or CHO DG44 expressed) in the absence or presence of 5 μg/ml of anti-CD16 antibody 3G8 or isotype control antibody. The results are shown in Figure 17. One μg/ml of anti-PSMA antibody, in the absence of anti-CD16 antibody, induced approximately 12% and 37% lysis with fucosylated and defucosylated antibody, respectively. This % lysis was reduced to less than 5% in the presence of anti-CD16 antibody while isotype control antibody had essentially no effect.

Equivalents

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents of the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

SUMMARY OF SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO:	SEQUENCE	SEQ ID NO:	SEQUENCE
1	VH a.a. 4A3	26	VH CDR1 a.a. 2F5
2	VH a.a. 7F12	27	VH CDR1 a.a. 1C3
3	VH a.a. 8C12		
4	VH a.a. 8A11	28	VH CDR2 a.a. 4A3
5	VH a.a. 16F9	29	VH CDR2 a.a. 7F12
6	VH a.a. 2A10	30	VH CDR2 a.a. 8C12
7	VH a.a. 2C6	31	VH CDR2 a.a. 8A11
8	VH a.a. 2F5	32	VH CDR2 a.a. 16F9
9	VH a.a. 1C3	33	VH CDR2 a.a. 2A10
		34	VH CDR2 a.a. 2C6
10	Vk a.a. 4A3	35	VH CDR2 a.a. 2F5
11	Vk a.a. 7F12	36	VH CDR2 a.a. 1C3
12	Vk a.a. 8C12		
13	Vk a.a. 8A11	37	VH CDR3 a.a. 4A3
14	Vk a.a. 16F9	38	VH CDR3 a.a. 7F12
15	Vk a.a. 2A10	39	VH CDR3 a.a. 8C12
16	Vk a.a. 2C6	40	VH CDR3 a.a. 8A11
17	Vk a.a. 2F5	41	VH CDR3 a.a. 16F9
18	Vk a.a. 1C3	42	VH CDR3 a.a. 2A10
		43	VH CDR3 a.a. 2C6
19	VH CDR1 a.a. 4A3	44	VH CDR3 a.a. 2F5
20	VH CDR1 a.a. 7F12	45	VH CDR3 a.a. 1C3
21	VH CDR1 a.a. 8C12		
22	VH CDR1 a.a. 8A11	46	Vk CDR1 a.a. 4A3
23	VH CDR1 a.a. 16F9	47	Vk CDR1 a.a. 7F12
24	VH CDR1 a.a. 2A10	48	Vk CDR1 a.a. 8C12
25	VH CDR1 a.a. 2C6	49	Vk CDR1 a.a. 8A11

SUMMARY OF SEQUENCE LISTING

50	Vk CDR1 a.a. 16F9	75	Vk 04/014 germline a.a.
51	Vk CDR1 a.a. 2A10	76	VH 3-30.3 germline a.a.
52	Vk CDR1 a.a. 2C6	77	Vk L18 germline a.a.
53	Vk CDR1 a.a. 2F5		
54	Vk CDR1 a.a. 1C3	78	VH n.t. 1C3
		79	VH n.t. 2A10
55	Vk CDR2 a.a. 4A3	80	VH n.t. 2C6
56	Vk CDR2 a.a. 7F12	81	VH n.t. 2F5
57	Vk CDR2 a.a. 8C12		
58	Vk CDR2 a.a. 8A11	82	Vk n.t. 1C3
59	Vk CDR2 a.a. 16F9	83	Vk n.t. 2A10
60	Vk CDR2 a.a. 2A10	84	Vk n.t. 2C6
61	Vk CDR2 a.a. 2C6	85	Vk n.t. 2F5
62	Vk CDR2 a.a. 2F5		
63	Vk CDR2 a.a. 1C3	86	JH6b germline a.a.
		87	JK3 germline a.a.
64	Vk CDR3 a.a. 4A3	88	JK4 germline a.a.
65	Vk CDR3 a.a. 7F12	89	$(Gly_4\text{-}Ser)_3$ a.a.
66	Vk CDR3 a.a. 8C12		
67	Vk CDR3 a.a. 8A11		
68	Vk CDR3 a.a. 16F9		
69	Vk CDR3 a.a. 2A10		
70	Vk CDR3 a.a. 2C6		
71	Vk CDR3 a.a. 2F5		
72	Vk CDR3 a.a. 1C3		
73	VH 5-51 germline a.a.		
74	Vk L6 germline a.a.		

We claim:

1. An isolated anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) antibody, which lacks fucose residues.

2. The antibody of claim 1, wherein said antibody enhances antibody dependent cellular cytotoxicity of cells expressing cell surface PSMA, as compared to a form of the antibody that contains fucose residues.

3. The antibody of claim 2, wherein the antibody that lacks fucose residues has an EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells of 0.05 μg/ml or less.

4. The antibody of claim 2, wherein the antibody that lacks fucose residues has an EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells that is at least 3-fold lower than the EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells of the form of the antibody that contains fucose residues.

5. The antibody of claim 1, which is a monoclonal antibody.

6. The antibody of claim 5, which is a humanized or chimeric antibody.

7. The antibody of claim 6, wherein the humanized or chimeric antibody is prepared from a mouse anti-PSMA antibody selected from the group consisting of: 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 and J591.

8. The antibody of claim 5, which is a human antibody.

9. The antibody of claim 8, wherein the human antibody comprises a human heavy chain variable region and a human light chain variable region, wherein: (a) the human heavy chain variable region comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-9; and

(b) the human light chain variable region comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10-18.

10. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.

11. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11.

12. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12.

13. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13.

14. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14.

15. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15.

16. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.

17. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17.

18. The antibody of claim 9, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18.

19. The antibody of claim 5, comprising:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-27;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28-36;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-45;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 46-54;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 55-63; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 64-72.

20. The antibody of claim 19, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 19;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 28;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 37;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 46;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 55; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 64.

21. The antibody of claim 19, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 20;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 29;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 38;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 47;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 56; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 65.

22. The antibody of claim 19, which comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 21;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 30;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 39;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 48;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 57; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 66.

23. The antibody of claim 19, which comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 22;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 31;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 40;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 49;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 58; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 67.

24. The antibody of claim 19, which comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 23;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 32;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 41;

(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 50;

(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 59; and

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 68.

25. The antibody of claim 19, which comprises:

(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 24;

(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 33;

(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 42;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 51;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 60; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 69.

26. The antibody of claim 19, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 25;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 34;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 43;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 52;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 61; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 70.

27. The antibody of claim 19, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 26;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 35;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 44;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 53;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 62; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 71.

28. The antibody of claim 19, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 27;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 36;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 45;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 54;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 63; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 72.

29. The antibody of claim 8, which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 5-51 or V_H 3-30.3 gene.

30. The antibody of claim 8, which comprises a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L6, 04/014 or L18 gene.

31. The antibody of claim 8, which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 5-51 or V_H 3-30.3 gene and a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L6, 04/014 or L18 gene.

32. A host cell comprising immunoglobulin heavy and light chain genes encoding an anti-PSMA antibody, wherein said host cell lacks a fucosyltransferase such that the anti-PSMA antibody expressed by said host cell lacks fucose residues.

33. The host cell of claim 32, wherein the immunoglobulin heavy and light chain genes are human immunoglobulin heavy and light chain genes.

34. The host cell of claim 32, wherein said fucosyltransferase is FUT8.

35. The host cell of claim 32, which is a CHO cell.

36. A method of inhibiting growth of $PSMA^+$ cells comprising contacting said cells with a defucosylated anti-PSMA antibody under conditions sufficient to induce antibody-dependent cellular cytoxicity (ADCC) of said cells.

37. The method of claim 36, wherein said cells are tumor cells.

38. The method of claim 36, wherein said anti-PSMA antibody is a human antibody.

39. A method of inhibiting growth of tumor cells in a subject, wherein the tumor cells or vascular endothelial cells proximate to the tumor cells express PSMA,

comprising administering to the subject a defucosylated anti-PSMA antibody in an amount effective to inhibit growth of tumor cells in the subject.

40. The method of claim 39, wherein said anti-PSMA antibody is a human antibody.

41. The method of claim 39, wherein said tumor cells are prostate cancer tumor cells.

42. The method of claim 39, wherein the tumor cells are of a cancer selected from the group consisting of colon, renal, rectal, urothelial, breast, bladder, liver, pancreas or melanoma.

```
                                                                            CDR1
5-51 germline  E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T  S Y W I G
4A3            - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - - -
7F12           A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  - F - - -
8C12           - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - - - - - - - - T - -  - - - - -
8A11                       - - - - - - T - - - - - - - - - - - - - - T - -  N - - - -
16F9                       - - - - L - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  N - - - -

                                                         CDR2
5-51 germline  W V R Q M P G K G L E W M G  I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G  Q V T I
4A3            - A - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - -
7F12           - A - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - -
8C12           - - - - - - - - - P - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - F
8A11           - - - - - - - - - P - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - F
16F9           - A - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - -

                                                                     CDR3
5-51 germline  S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R
4A3            - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S A  A N S S H W Y F D L
7F12           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T  - - - - F - N - - -
8C12           - - - - - - - - - - - - - N - - - T - - - - - - - - - T  - - P - Y - - - - -
8A11           - - - - - - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - - - T  - - P - Y - - - - -
16F9           - - - - - V - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - T  - - - - F - N - - -

4A3            W G R G T L V T V S S
7F12           - - - - - - - - - - -
8C12           - - - - - - - - - - -
8A11           - - - - - - - - - - -
16F9           - - - - - - - - - - -
```

Fig. 1

```
                                                                CDR1
L6 germline:   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C  R A S Q S V S S Y L A
4A3:           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - -
7F12:          - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - -
8C12:          - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - -

                                                  CDR2
L6 germline:   W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y  D A S N R A T  G I P A R F S G S G S
4A3:           - F - - - - - - - - - - - - -  - - - - - - -  - - - - - - - - - - -
7F12:          - - - - - - - - - - - - - - -  - - - - - - -  - - - - - - - - - - -
8C12:          - - - - - - - - - - - - - - -  - - - - - - -  - - - - - - - - - - -

L6 germline:   G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C
4A3:           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
7F12:          - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
8C12:          - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                      CDR3
L6 germline:   Q Q R S N W
4A3:           - - - - - - L M Y T  F G Q G T K L E I K
7F12:          - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - -
8C12:          - - - - D - - - - -  - - - - - - - - - -
```

Fig. 2

```
VK 04/014                                                    CDR1
germline:    D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C   R V S Q G I S S Y L N
8A11:                    - - - - - - - - - - - S - - - - -   - - - - - - - - - - -
16F9:                    - - - - - - - - - - - - - - - - -   - - - - - - - - - - -

                                                  CDR2
014 germline: W Y R Q K P G K V P K L L I Y   S A S N L Q S   G V P S R F S G S G S
8A11:         - - - - - - - - - - - - - -   - - - - - - -   - - - - - - - - - - -
16F9:         - - - - - - - - - - - - - M -   - - - - - - -   - - - - - - - - - - -

                                                        CDR3
014 germline: G T D F T L T I S S L Q P E D V A T Y Y G   Q R T Y N A P F T
8A11:         - - - - - - - - N - - - - - - - - - - -   - - - - - - - - - F G P G
16F9:         - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -   - - - - - - - - - - - - -

8A11:         T K V D I K
16F9:         - - - - - -
```

Fig. 3

```
Anti-PMSA 1C3 VH
   V segment:      3-30.3
   D segment:      undetermined
   J segment:      JH6b

      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
1    CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                                         CDR1
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   A   M   H   W
55   AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT ATG CAC TGG

                                                             CDR2
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   S   Y   D
109  GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

                  CDR2
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      G   N   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163  GGA AAC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
217  GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                                  CDR3
                                     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   A   V   P   W   G   S   R   Y   Y   Y
271  ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GCC GTC CCC TGG GGA TCG AGG TAC TAC TAC
                                                                 └─► JH6b
         CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~
      Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325  TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Fig. 4A

Anti-PSMA 1C3 VK

V segment: L18

J segment: JK4

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

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

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

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

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

             CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     F   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271  TTT AAC AGT TAT CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
                         └──►JK4
```

Fig. 4B

Anti-PMSA 2A10 VH
V segment: 5-51
D segment: 7-27
J segment: JH2

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 5A

Anti-PSMA 2A10 VK

V segment: L18
J segment: JK4

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

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

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

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

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

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

Fig. 5B

109

Anti-PMSA 2C6 VH

V segment: 5-51

D segment: 6-13

J segment: JH4b

	E	V	Q	L	V	Q	S	G	S	E	V	K	K	P	G	E	S	L
1	GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGA	TCA	GAG	GTG	AAA	AAG	CCC	GGG	GAG	TCT	CTG
												CDR1	CDR1	CDR1	CDR1	CDR1		
	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	N	Y	W	I	G	W
55	AAG	ATC	TCC	TGT	AAG	GGT	TCT	GGA	TAC	AGC	TTT	ACC	AAC	TAC	TGG	ATC	GGC	TGG
													CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	
	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	I	I	Y	P	G
109	GTG	CGC	CAG	ATG	CCC	GGG	AAA	GGC	CTG	GAG	TGG	ATG	GGG	ATC	ATC	TAT	CCT	GGT
	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2						
	D	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A
163	GAC	TCT	GAT	ACC	AGA	TAC	AGC	CCG	TCC	TTC	CAA	GGC	CAG	GTC	ACC	ATC	TCA	GCC
	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D
217	GAC	AAG	TCC	ATC	AGC	ACC	GCC	TAT	CTG	CAG	TGG	AGC	AGC	CTG	AAG	GCC	TCG	GAC
								CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	
	T	A	M	Y	Y	C	A	S	P	G	Y	T	S	S	W	T	S	F
271	ACC	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	CCC	GGG	TAT	ACC	AGC	AGT	TGG	ACT	TCT	TTT
	CDR3	CDR3																
	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S					
325	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA					

Fig. 6A

Anti-PSMA 2C6 VK

V segment: L6
J segment: JK3

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

                                CDR1
                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W   Y
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                                        CDR2
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N   R
109   CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~~~
      A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163   GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

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

              CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   S   N   W   P   L   F   T   F   G   P   G   T   K   V   D   I   K
271   CGT AGC AAC TGG CCC CTA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
```

Fig. 6B

Anti-PMSA 2F5 VH

V segment: 5-51
D segment: 7-27
J segment: JH2

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

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

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

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


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

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

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

Fig. 7A

Anti-PSMA 2F5 VK
V segment: L18
J segment: JK4

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

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

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

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

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

             CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     F   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271  TTT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
                      └→JK4

     I   K
325  ATC AAA
```

Fig. 7B

```
                                                                      __CDR1___
5-51 germline:  E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G
2A10 VH:        - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N - - -
2C6 VH:         - - - - - - - - S - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N - - - -
2F5 VH:         - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N - - -

                                            ____________CDR2_______________
5-51 germline:  W V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I
2A10 VH:        - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2C6 VH:         - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2F5 VH:         - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                  _____CDR3_____
5-51 germline:  S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R
2A10 VH:        - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Q T G F L W S
2C6 VH:         - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S P G Y T S S W
2F5 VH:         - - - - - - - - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                __CDR3__
2A10 VH:        S     D L W G R G T L V T V S S (JH2)
2C6 VH:         T S F - Y - - Q - - - - - - - - (JH4b)
2F5 VH:         F     - - - - - - - - - - - - - (JH2)
```

Fig. 8

```
3-30.3 germline:  Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R Q
                                                                        CDR1
1C3 VH:           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                CDR2
3-30.3 germline:  A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
1C3 VH:           - - - - - - - - - - - - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                CDR3
3-30.3 germline:  L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
JH6b germline:
1C3 VH:           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A V P W G S R - - - - - - - - - - -

JH6b germline:    T T V T V S S
1C3 VH:           - - - - - - - -(JH6b)
```

Y Y Y Y Y G M D V W G Q G

Fig. 9

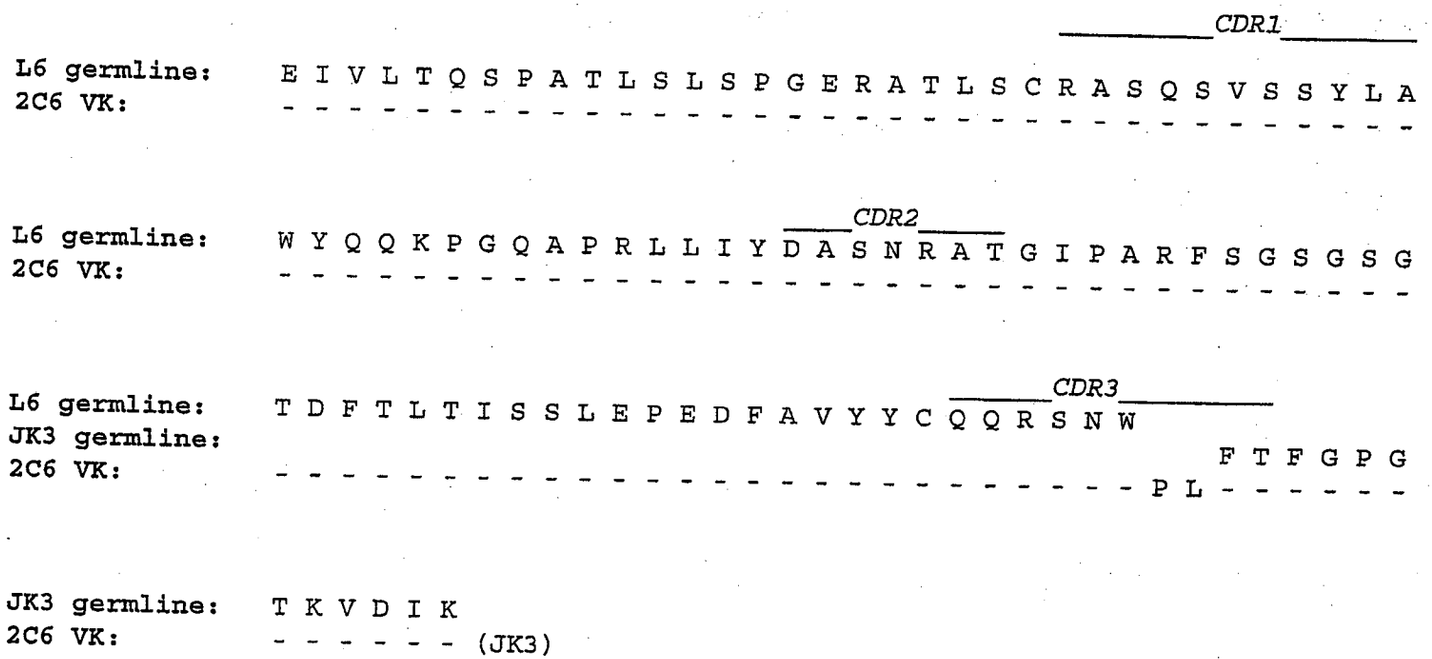

CDR1
L6 germline: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
2C6 VK: -
CDR2
L6 germline: W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
2C6 VK: -
CDR3
L6 germline: T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W
JK3 germline: F T F G P G
2C6 VK: - P L - - - - - -
JK3 germline: T K V D I K
2C6 VK: - - - - - - (JK3)

Fig. 10

```
                                                                     CDR1
L18 germline:  A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S A L A
1C3 VK:        - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A10 VK:       - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D - - - - - -
2F5 VK:        - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D - - - - - -

                                                 CDR2
L18 germline:  W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G
1C3 VK:        - - - - - S - - - - - - - - F - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A10 VK:       - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2F5 VK:        - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Y - - -

                                                    CDR3
L18 germline:  T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P
JK4 germline:                                                        L T F G G G T
1C3 VK:        - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A10 VK:       - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2F5 VK:        - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

JK4 germline:  K V E I K
1C3 VK:        - - - - - (JK4)
2A10 VK:       - - - - - (JK4)
2F5 VK:        - - - - - (JK4)
```

Fig. 11

116

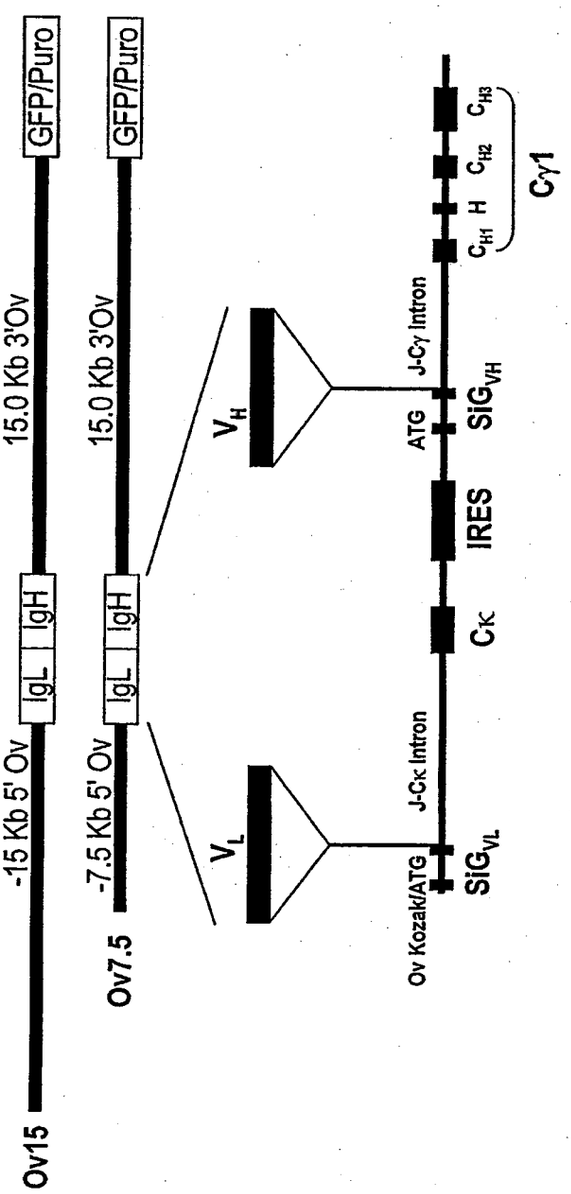

GFP/Puro
GFP/Puro
15.0 Kb 3'Ov
15.0 Kb 3'Ov
IgL
IgH
IgL
IgH
-15 Kb 5' Ov
-7.5 Kb 5' Ov
Ov15
Ov7.5
V_H
V_L
J-Cγ Intron
J-Cκ Intron
ATG
Ov Kozak/ATG
SIG_{VH}
SIG_{VL}
IRES
C_K
C_{H1} H C_{H2} C_{H3}
$C_γ1$

Fig. 12

Structure characterization of anti-PSMA 7F12 expressed in chicken eggs

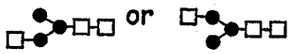
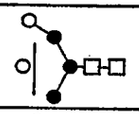
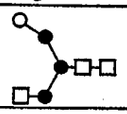
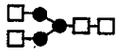
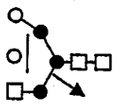
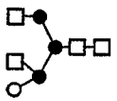
Obs. mass+Na+	Theo. mass+ Na+	Structure	Possible structure connectivity	Type
1136.4	1136.5	$(Man)_3(GlcNAc)_3$		
1257.4	1257.6	$(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_2$		
1298.4	1298.44	$(Hex)(Man)_3(GlcNAc)_3$		
1339.46	1339.5	$(Man)_3(GlcNAc)_4$		GO
1460.49	1460.5	$(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_3$		
1501.53	1501.5	$(Hex)(Man)_3(GlcNAc)_4$		

Fig. 13A

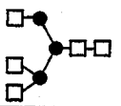
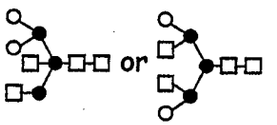
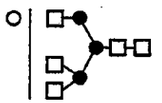
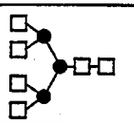
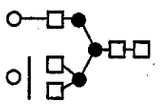
Obs. mass+Na+	Theo. mass+ Na+	Structure	Possible structure connectivity	Type
1542.56	1542.6	$(Man)_3(GlcNAc)_5$		
1663.6	1663.58	$(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_4$		
1704.6	1704.6	$(Hex)(Man)_3(GlcNAc)_5$		
1745.66	1745.6	$(Man)_3(GlcNAc)_6$		
1866.7	1866.7	$(Hex)_{2(}Man)_3(GlcNAc)_5$		
1948.7	1948.68	$(Man)_3(GlcNAc)_6$		

Fig. 13B

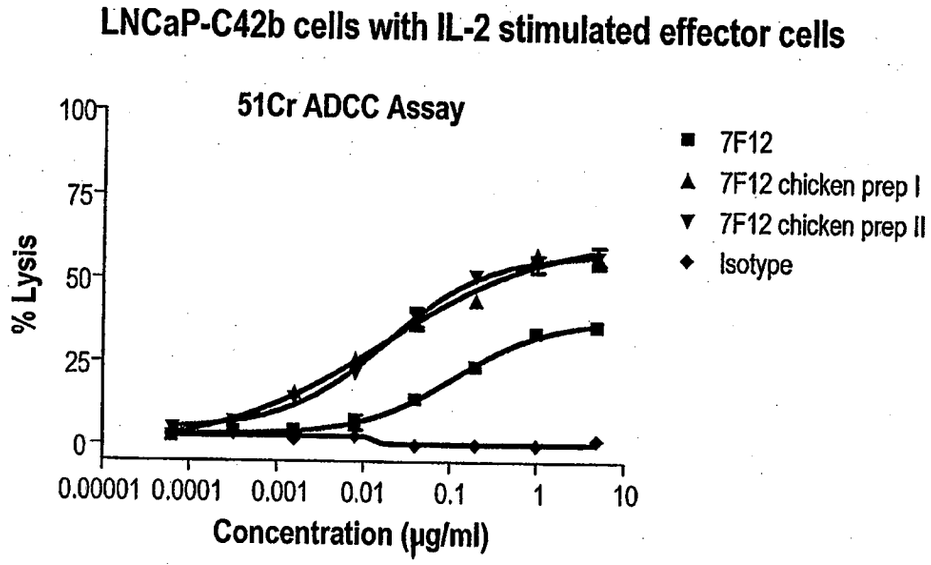


Fig. 14A

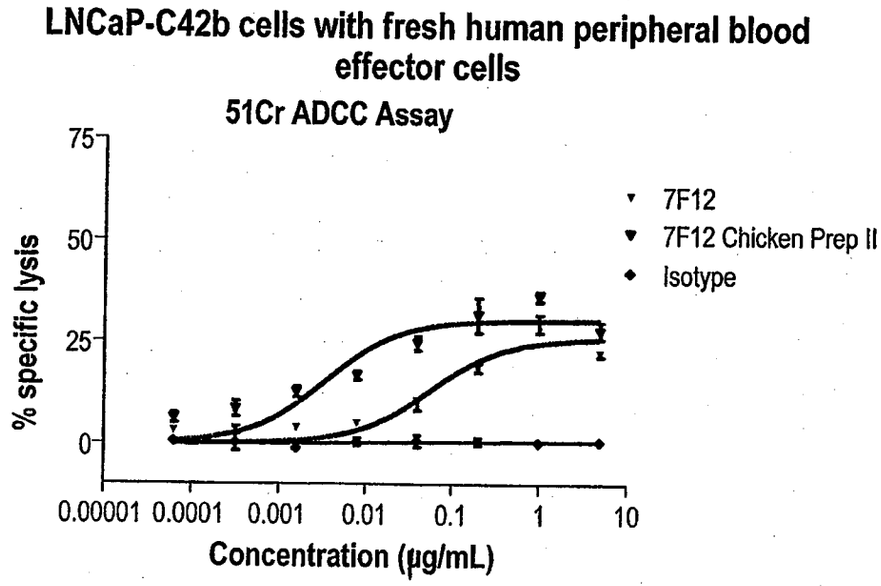


Fig. 14B

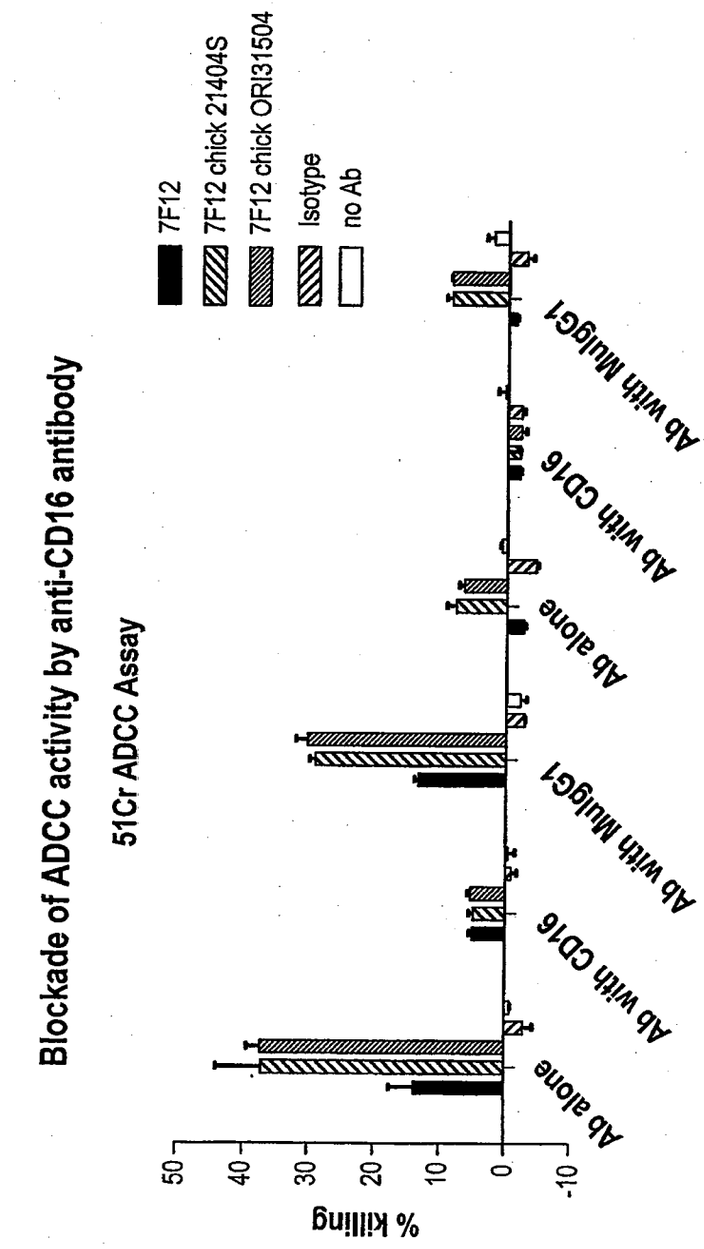

Blockade of ADCC activity by anti-CD16 antibody
51Cr ADCC Assay
7F12
7F12 chick 21404S
7F12 chick ORI31504
Isotype
no Ab
% killing
50
40
30
20
10
0
-10
Ab alone
Ab with CD16
Ab with MulgG1
Ab alone
Ab with CD16
Ab with MulgG1
1µg/mL
0.01 µg/mL
Ab used

Fig. 15

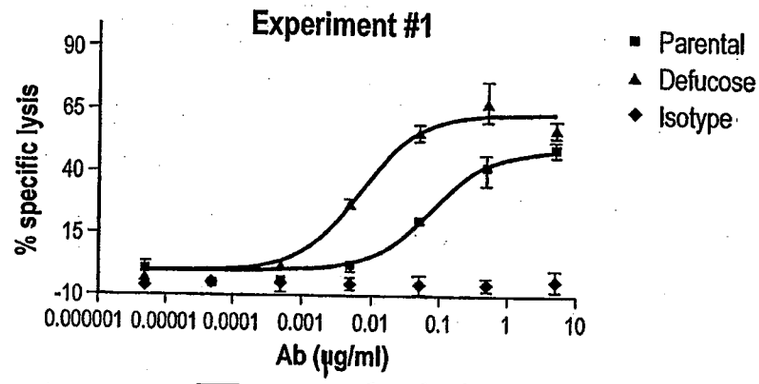


Fig. 16A

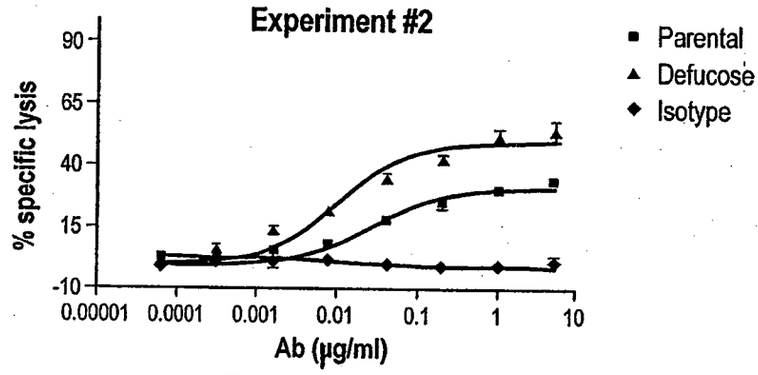


Fig. 16B

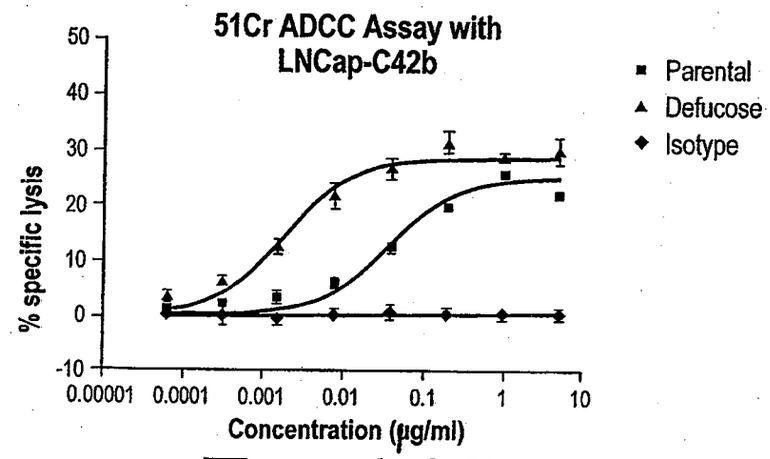


Fig. 16C

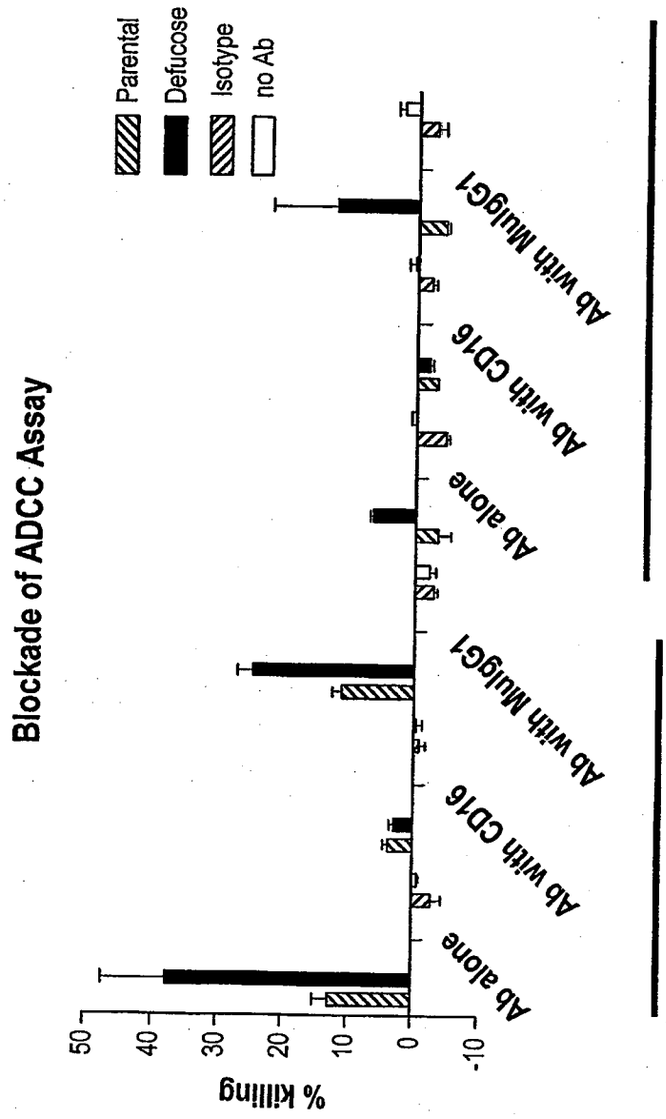

Blockade of ADCC Assay
Parental
Defucose
Isotype
no Ab
% killing
50
40
30
20
10
0
-10
Ab alone
Ab with CD16
Ab with MuIgG1
Ab alone
Ab with CD16
Ab with MuIgG1
1µg/mL
0.01 µg/mL
Ab used

Fig. 17

SEQUENCE LISTING

<110> MEDAREX, INC.

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA) LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

<130> MXI-335PC-2

<140>
<141>

<150> 60/660,431
<151> 2005-03-09

<160> 89

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<400> 2
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

```
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Phe
            20                  25                  30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Thr Ala Asn Ser Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

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

<400> 3

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Val Thr Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Thr Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg
20 25 30

Gln Met Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly
35 40 45

Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Phe
50 55 60

Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu
65 70 75 80

Lys Thr Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Asn Pro Ser
85 90 95

Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 5
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Ala Arg
20 25 30

Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly
35 40 45

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

Ser Ala Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu
65 70 75 80

Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Asn Ser Ser
85 90 95

Phe Trp Asn Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Asn
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Asn
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Val Pro Trp Gly Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
            100                 105                 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

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

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

```
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met
                85                  90                  95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100                 105
```

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Leu Met
                85                  90                  95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100                 105
```

<210> 13
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

```
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys
  1               5                  10                  15

Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys
            20                  25                  30

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
     50                  55                  60

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
 65                  70                  75                  80
```

Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Asp Ile Lys
100

<210> 14
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
1 5 10 15

Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys
20 25 30

Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Asp Ile Lys
100

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

<400> 15
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

Phe Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

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

<400> 20
Ser Phe Trp Ile Gly
1 5

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Ser Asn Trp Ile Gly
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Ser Asn Trp Ile Gly
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Ala Asn Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Ala Asn Ser Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Ala Asn Ser Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu
1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Pro Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Thr Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Ala Val Pro Trp Gly Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Thr Cys Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1 5 10

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

<400> 50
Thr Cys Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Gln Gln Arg Ser Asp Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 73
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 74
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
85 90

<210> 75
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe
85 90 95

Thr

<210> 76
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 77
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 78
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 78
```
cag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg   48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1               5                  10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat   96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
             20                  25                  30

gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg   144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
         35                  40                  45

gca gtt ata tca tat gat gga aac aat aaa tac tac gca gac tcc gtg   192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
     50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat   240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt   288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95

gcg aga gcc gtc ccc tgg gga tcg agg tac tac tac tac ggt atg gac   336
Ala Arg Ala Val Pro Trp Gly Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
            100                 105                 110

gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca                   372
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 79
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 79
```
gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag   48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
  1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 80
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 81
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 82
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 82

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

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

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

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

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

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

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

<210> 83
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

<210> 84
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

<210> 85
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 85

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

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

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

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

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

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

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

<210> 86
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

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

Thr Val Ser Ser
             20
```

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

<210> 88
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Gly-Ser linker

<400> 89
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE CARECEN DE RESIDUOS FUCOSILO CONTRA ANTÍGENO MEMBRANAL ESPECÍFICO DE PRÓSTATA (PSMA)

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer de próstata es una causa principal de morbilidad y mortalidad entre varones. Los tratamientos para el cáncer de próstata incluyen cirugía, hormonas, radiación y quimioterapia. Existen tratamientos poco efectivos para la enfermedad metastásica de próstata. Por lo tanto, la identificación de genes y/o productos génicos que representen marcadores de diagnóstico y de pronóstico, así como también objetivos para terapia, es crítica. El antígeno específico de próstata (PSA) es un marcador de cáncer que es útil en el diagnóstico clínico e identificación de etapas del cáncer de próstata. Sin embargo, el PSA no puede diferenciar la hiperplasia prostática benigna (BPH) de la prostatitis o cáncer de próstata en el intervalo de 4-10 ng/ml, de esta manera, se necesita una valoración citológica y/o histológica para confirmar el diagnóstico apropiado (Barren, R.J. et al. (1998) Prostate 36:181-188).

El antígeno membranal específico de próstata (PSMA) es una glicoproteína transmembranal tipo II de 750 aminoácidos de aproximadamente 110 kD que tiene 54% de homología con el receptor de transferrina. El PSMA tiene 3 dominios estructurales, que incluyen un dominio intracelular

de 19 aminoácidos, un dominio transmembranal de 24 aminoácidos, y un dominio extracelular de 707 aminoácidos. La proteína PSMA muestra actividad de neurocarboxipeptidasa y folato hidrolasa y se reporta involucrada en la relación neuroendócrina del crecimiento y diferenciación de la próstata (Heston, W.D. (1996) Urologe-Ausgabe A. 35:400-407). El PSM' es una forma empalmada de manera alternativa del PSMA que se localiza en el citoplasma.

El PSMA se expresa predominantemente por células epiteliales prostáticas. La expresión de PSMA se incrementa en el cáncer de próstata, especialmente en carcinomas deficientemente diferenciados, metastásicos y refractarios a hormonas (Gregorakis, A.K. et al. (1998) Seminars in Urologic Oncology 16:2-12; Silver, D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85). Un bajo nivel de expresión de PSMA se observa en tejidos extraprostáticos tales como el intestino delgado, glándulas salivales, mucosa duodenal, túbulos renales proximales, y cerebro (Silver, D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85). El PSMA se expresa también en células endoteliales de vasos capilares y áreas peritumorales y endotumorales de ciertas neoplasias malignas, incluyendo carcinoma de células renales, y carcinomas de colón, pero no en vasos sanguíneos de tejidos normales. Además, el PSMA se reporta relacionado con la angiogénesis tumoral (Silver, D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85).

Se han descrito anticuerpos contra el dominio extracelular del PSMA (véase por ejemplo, Liu, H. et al. (1997) Cancer Res. 57:3629-3634; Murphi, G.P. et al. (1998) J. Urol. 160:2396-2401; Wang, S. et al. (2001) Ent. J. Cancer 92:871-876; Kato, K. et al. (2003) Ent. J. Urol. 10:439-444; Patente Norteamericana No. 6,150,508 y Patente Norteamericana No. 6,107,090). Más recientemente, anticuerpos humanos y humanizados que se unen al PSMA se han descrito (véase por ejemplo, Bander, N.H. et al. (2003) Semin. Oncol. 30:667-676; Publicación de PCT WO 02/098897; Publicación de PCT WO 01/09192; Publicación de PCT WO 03/064606; Publicación de PCT WO 03/034903; y Solicitud Norteamericana No. 2004/0033229). Tales anticuerpos se han utilizado para adquirir imágenes de células cancerosas de próstata (véase por ejemplo, Yao, D. et al. (2002) Semin. Urol. Oncol. 20:211-218; Bander, N.H. et al. (2003) J. Urol. 170:1717-1721). Los anticuerpos anti-PSMA se han utilizado también para la intervención terapéutica en el tratamiento de cáncer de próstata, típicamente como un conjugado con un agente quimioterapéutico o isótopo radiactivo (véase por ejemplo, Nanus, D.M. et al. (2003) J. Urol. 170:S84-89; Milowsky, M.I. et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:2522-2531; Henry, M.D. et al. (2004) Cancer Res. 64:7995-8001).

Se desean anticuerpos terapéuticos mejorados contra PSMA que sean efectivos para tratar y/o prevenir

enfermedades que involucran la expresión de PSMA, en particular anticuerpos que tengan efectos citotóxicos sin la necesidad de conjugarse a un agente quimioterapéutico o isótopo radiactivo.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona anticuerpos desfucosilados aislados (es decir, anticuerpos que carecen de residuos de fucosa) que se unen a PSMA humano y exhiben eliminación citotóxica celular dirigida por anticuerpos (ADCC) intensificada de células que expresan PSMA, en comparación con la forma no desfucosilada del anticuerpo (es decir, anticuerpos que contienen residuos de fucosa). También se proporcionan métodos para tratar una diversidad de enfermedades que involucran la expresión de PSMA utilizando los anticuerpos y composiciones de la invención.

Los anticuerpos desfucosilados de la presente invención se unen a PSMA e inhiben el crecimiento de células que expresan PSMA al intensificar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en la presencia de células efectoras humanas (por ejemplo, monocitos o células mononucleares), en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo. En consecuencia, los anticuerpos de la presente invención proporcionan un medio mejorado para tratar trastornos caracterizados por la expresión de

PSMA.

En consecuencia, en un aspecto, la invención concierne a un anticuerpo anti-antígeno membranal específico de próstata (PSMA) aislado, que carece de residuos de fucosa. Preferiblemente, el anticuerpo intensifica la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de las células que expresan PSMA en superficie celular, en comparación con una forma del anticuerpo que contiene residuos de fucosa. En modalidades preferidas, el anticuerpo que carece de residuos de fucosa tiene una EC_{50} de actividad ADCC contra células cancerosas de próstata LNCaP de 0.05 μg/ml o menos, o 0.04 μg/ml o menos, o 0.03 μg/ml o menos, o 0.02 μg/ml o de aproximadamente 0.018 μg/ml o menos. En otras modalidades preferidas, el anticuerpo que carece residuos de fucosa tiene una EC_{50} de actividad ADCC contra células cancerosas de próstata LNCaP que es por lo menos 3 veces menor (o por lo menos 4 veces menor, o por lo menos 5 veces menor o por lo menos 6 veces menor) que la EC_{50} de la actividad ADCC contra células cancerosas de próstata LNCaP de la forma del anticuerpo que contiene residuos de fucosa.

Preferiblemente, el anticuerpo desfucosilado de la invención es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, la invención concierne a un anticuerpo monoclonal humanizado o quimérico. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o quimérico se prepara a partir de un anticuerpo anti-PSMA de

ratón seleccionado del grupo que consiste de: 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 y J591. En otro aspecto, la invención concierne a un anticuerpo monoclonal humano.

En una modalidad preferida, el anticuerpo monoclonal humano comprende una región variable de cadena pesada humana y una región variable de cadena ligera humana, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 1-9; y

(b) la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 10-18.

En diversas modalidades, las siguientes combinaciones de cadena pesada y ligera se prefieren: la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 1 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 10;

la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 2 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 11;

la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 3 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 12;

la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 4 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 13;

la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 5 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 14;

la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 6 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 15;

la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 7 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 16;

la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 8 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 17;

la región variable de cadena pesada humana

comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 9 y la región variable de cadena ligera humana comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 18.

En otra modalidad, un anticuerpo monoclonal de la invención comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 19-27;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 28-36;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 37-45;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 46-54;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 55-63; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 64-72.

En diversas modalidades, las siguientes combinaciones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena

ligera se prefieren:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 19;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 28;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 37;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 46;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 55; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 64; o

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 20;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 29;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 38;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 47;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 56; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 65; o

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 21;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 30;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 39;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 48;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 57; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 66; o

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 22;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 31;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 40;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 49;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 58; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 67; o

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 23;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 32;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 41;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 50;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 59; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 68; o

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 24;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 33;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 42;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 51;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 60; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 69; o

(a) una región variable de cadena pesada humana

CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 25;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 34;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 43;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 52;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 61; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 70; o

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 26;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 35;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 44;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 53;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 62; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 71; o

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 27;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 36;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 45;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 54;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 63; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 72.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-PSMA humano desfucosilado que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_H 5-51 o V_H 3-30.3 humano. La invención también proporciona un anticuerpo anti-PSMA humano desfucosilado que comprende una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_k L6, 04/014 o L18 humano. La invención aún además proporciona un anticuerpo anti-PSMA humano desfucosilado que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_H 5-51 o V_H 3-30.3 humano y una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_k L6, 04/014 o L18 humano.

En otro aspecto, la invención concierne a una

gallina quimérica que comprende genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican un anticuerpo anti-PSMA de manera que el anticuerpo anti-PSMA se expresa en los huevos de la gallina quimérica, en donde el anticuerpo anti-PSMA expresado en los huevos de la gallina quimérica carece de residuos de fucosa. Preferiblemente, los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana.

En otro aspecto, la invención concierne a una célula huésped que comprende genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican un anticuerpo anti-PSMA, en donde la célula huésped carece de una fucosiltransferasa de manera que el anticuerpo anti-PSMA expresado por la célula huésped carece de residuos de fucosa. Preferiblemente, los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, la fucosiltransferasa es FUT8. Preferiblemente, la célula huésped es una célula CHO.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células $PSMA^+$. El método involucra contactar las células con un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado bajo condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células. Las células pueden ser, por ejemplo, células tumorales. Preferiblemente, el anticuerpo

anti-PSMA es un anticuerpo humano.

La invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, en donde las células tumorales o células endoteliales vasculares próximas a las células tumorales expresan PSMA. El método involucra administrar al sujeto un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de las células tumorales en el sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo anti-PSMA es un anticuerpo humano. En modalidades preferidas, las células tumorales son células tumorales de carcinoma prostático.

Otras características y ventajas de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos que no deben interpretarse como limitantes. Los contenidos de todas las referencias, entradas de Genbank, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas en toda esta solicitud se incorporan expresamente en la presente para referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11 y 16F9 (SEC. DE IDENT. NOS: 1-5, respectivamente) con la secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 73) de V_H 5-51 de línea germinal humana.

La Figura 2 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 4A3, 7F12 y 8C12 (SEC. DE IDENT. NOS: 10-12, respectivamente) con la secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 74) de V_k L6 de línea germinal.

La Figura 3 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 8A11 y 16F9 (SEC. DE IDENT. NOS: 13 y 14, respectivamente) con la secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 75) de V_k 04/014 de línea germinal humana.

La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC. DE IDENT. NO: 78) y secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 9) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1C3. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO: 27), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO: 36) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO: 45) se delinean y las derivaciones de línea germinal V, D y J se indican.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC. DE IDENT. NO: 82) y secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO:18) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1C3. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO: 54), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO: 63) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO: 72) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J se indican.

La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos

(SEC. DE IDENT. NO: 79) y secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 6) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2A10. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO: 24), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO: 33) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO: 42) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J se indican.

La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC. DE IDENT. NO: 83) y secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 15) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2A10. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO: 51), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO: 60) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO: 69) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J se indican.

La Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC. DE IDENT. NO: 80) y secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 7) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2C6. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO: 25), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO: 34) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO: 43) se delinean y las derivaciones de línea germinal V, D, y J se indican.

La Figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC. DE IDENT. NO: 84) y secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 16) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2C6. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO: 52), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO: 61) y CDR3 (SEC. DE

IDENT. NO: 70) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J se indican.

La Figura 7A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC. DE IDENT. NO: 81) y secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 8) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2F5. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO:26), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO: 35) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO: 44) se delinean y las derivaciones de línea germinal V, D, y J se indican.

La Figura 7B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC. DE IDENT. NO: 85) y secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 17) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2F5. Las regiones CDR1 (SEC. DE IDENT. NO: 53), CDR2 (SEC. DE IDENT. NO: 62) y CDR3 (SEC. DE IDENT. NO: 71) se delinean y las derivaciones de línea germinal V y J se indican.

La Figura 8 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2A10, 2C6 y 2F5 (SEC. DE IDENT. NOS: 6-8, respectivamente) con la secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 73) de V_H 5-51 de línea germinal humana.

La Figura 9 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 1C3 (SEC. DE IDENT. NO: 9) con la secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 76) de V_H 3-30.3 de línea germinal humana y la

línea germinal JH6b (SEC. DE IDENT. NO: 86).

La Figura 10 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2C6 (SEC. DE IDENT. NO: 16) con la secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 74) de V_k L6 de línea germinal humana y la línea germinal JK3 (SEC. DE IDENT. NO: 87).

La Figura 11 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 1C3, 2A10 y 2F5 (SEC. DE IDENT. NOS: 18, 15 y 17, respectivamente) con la secuencia de aminoácidos (SEC. DE IDENT. NO: 77) de V_k L18 de línea germinal humana y la línea germinal JK4 (SEC. DE IDENT. NO: 88).

La Figura 12 es un diagrama de los vectores de expresión Ov7.5 y Ov15. Las posiciones de las secuencias reguladoras 5' y 3' de Ov se indican. Se incluye en el extremo 3' del vector un casete con EGFP y puromicina (Puro) dirigidos por un promotor (Cx) que funciona en todos los tipos celulares para facilitar el aislamiento de líneas transfectadas estables de células cES y la identificación de la contribución de la célula cES a las quimeras. Detalles del casete MAb se ilustran en la parte inferior del diagrama. La línea negra delgada representa secuencias de intrones o secuencias no traducidas derivadas de las cadenas L y H humanas (aunque las secuencias de intrones no se presentan en

la construcción Ov15Mab7F12). SiGvL: secuencia para péptido señal de la cadena L, VL: secuencia para gen V de la cadena L, Cic: secuencia para región constante de la cadena Kappa L, IRES: secuencia de entrada ribosomal interna, SiG_{vH}: secuencia para péptido señal de la cadena H, VH: secuencia para gen V de la cadena H, C_{H1}, H, C_{H2} y C_{H3}: secuencias codificantes de los dominios C_{H1}, bisagra, C_H2 y C_H3 de la cadena H gamma 1.

Las Figuras 13A-13B son resúmenes de las estructuras de oligosacáridos del anticuerpo anti-PSMA 7F12 expresado en huevos de gallina, según se determina por espectrometría de masas MALDI TOF. Los círculos oscuros representan manosa; los círculos opacos representan hexosa (manosa o galactosa) y los cuadrados oscuros representan N-acetil glucosamina. La línea vertical indica que la última hexosa puede conectarse a cualquiera de los residuos de manosa o N-acetil glucosalina a lo largo de la línea.

Las Figuras 14A-14B son gráficas que muestran los resultados del ensayo de ADCC con 7F12 expresado en célula CHO ("7F12") y TF12 expresado en pollo, en comparación con un control de isotipo. Los resultados se expresan como % de lisis. La Figura 14A muestra resultados utilizando células efectoras estimuladas con IL-2. La Figura 14B muestra resultados utilizando células efectoras de sangre periférica humana frescas.

La Figura 15 es una gráfica de barras que muestran

los resultados de experimentos en los que la actividad ADCC de 7F12 expresado en célula CHO ("7F12") y 7F12 expresado en pollo, en comparación con un control de isotipo, se bloqueo con anticuerpo anti-CD16.

Las Figuras 16A-16C son gráficas que muestran los resultados de ensayos ADCC mAb 2A10 desfucosilado ("defucosa") en comparación mAb 2A10 fucosilado ("progenitor") y un control de isotipo. Las Figuras 16A y 16B representan dos experimentos independientes utilizando células objetivo LNCaP-C42b y células efectoras estimuladas con IL-2. La Figura 16C representa un experimento utilizando células objetivo LNCaP-C42b y células efectoras de sangre periférica humana frescas.

La Figura 17 es una gráfica de barras de resultados del ensayo de ADCC 2A10 mAb desfucosilado ("defucosa") en comparación con 2A10 mAb fucosilado ("progenitor") y un control de isotipo o sin control de anticuerpo, en que la actividad ADCC se bloqueo con un anticuerpo anti-CD16.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona composiciones de anticuerpos y terapias mejoradas basadas en anticuerpo para tratar y diagnosticar una serie de trastornos asociados con la expresión de PSMA y/o células que expresan PSMA. Los

anticuerpos de la invención carecen de residuos fucosilo en las cadenas de carbohidratos del anticuerpo. Adicionalmente, los anticuerpos exhiben eliminación citotóxica celular dirigida por anticuerpos (ADCC) intensificada de células PSMA+.

En modalidades particulares, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanizados o completamente humanos y en particular son útiles para el tratamiento terapéutico en humanos de trastornos asociados con células que expresan PSMA. Métodos para utilizar anticuerpos anti-PSMA que carecen de residuos fucosilo para tratamiento terapéutico (por ejemplo, para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con la expresión de PSMA) también se contemplan por la invención.

A fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definirán como sigue. Definiciones adicionales se establecen a lo largo de la descripción detallada.

Los términos "antígeno membranal específico de próstata" y "PSMA" se utilizan de manera intercambiable en la presente e incluyen cualesquiera variantes, isoformas y especies homólogas de PSMA humano que se expresan de manera natural por las células y que retienen unión a los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 descritos en la presente. La secuencia de aminoácidos

completa de la proteína PSMA humana tiene el número de acceso de Genbank NP_004467. La secuencia de ADNc completa que codifica la proteína PSMA humana tiene el número de acceso de Genbank NM_004476.

Como se utilizan en la presente, los términos "anticuerpo que carecen de residuos de fucosa" y "anticuerpo desfucosilado" se utilizan de manera intercambiable y pretenden referirse a un anticuerpo en el que la porción de carbohidratos del anticuerpo no contiene un residuo fucosilo o en el cual el residuo fucosilo se ha eliminado. Un anticuerpo que carece residuos de fucosa puede generarse, por ejemplo, por expresión del anticuerpo en una célula o sistema de expresión que minimiza o no une residuos fucosilo a la cadena de carbohidratos del anticuerpo, o por modificación química del anticuerpo para eliminar residuos fucosilo de la cadena de carbohidratos (por ejemplo, tratamiento del anticuerpo con una fucosidasa). Como tales, los términos "carecen de residuos de fucosa" y "desfucosilado" no pretenden limitarse por el mecanismo por el cual el anticuerpo con estructura alterada de carbohidratos se prepara.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo que expresa residuos de fucosa" y "anticuerpo fucosilado" se utilizan de manera intercambiable y pretenden referirse a un anticuerpo en el que la porción de

carbohidratos del anticuerpo contiene fucosa.

El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocitarias, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas, y complementos) que resulta en daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con tejidos, células cancerosas, o en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Como se utiliza en la presente, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmune que se involucra en la fase efectora de una respuesta inmune, en oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunes ejemplares incluyen una célula de un origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T incluyendo células T citolíticas (CTLs)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinofilos, neutrofilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basofilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En modalidades preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de

anticuerpos (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos y macrófagos, los cuales expresan FcR se involucran en eliminación específica de células objetivo y presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmune, o unión a células que presentan antígenos. En otras modalidades, una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo o célula objetivo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede regularse por factores humorales tales como citocinas. Por ejemplo, la expresión de FcaRI se ha encontrado sobre regulada por G-CSF o GM-CSF. Esta función intensificada incrementa la función efectora de las células que llevan FcαR1 contra objetivos. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno objetivo o una célula objetivo.

"Célula objetivo" se refiere a cualquier célula o patógeno cuya eliminación puede ser benéfica en un sujeto (por ejemplo, un humano o animal) y a la que puede dirigirse una composición (por ejemplo, anticuerpo) de la invención. Por ejemplo, la célula objetivo puede ser una célula que expresa o sobre-expresa PSMA.

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una reacción citotóxica mediada por células en la que una célula objetivo PSMA+ con anticuerpo anti-PSMA unido se reconoce por una célula

efectora que lleva receptores Fc y se lisa subsecuentemente sin requerir la intervención del complemento.

Como se utiliza en la presente, el término "intensifica la ADCC" (por ejemplo, en referencia a las células) pretende incluir cualquier incremento medible en lisis celular cuando se contactan con un anticuerpo anti-PSMA que carecen de residuos fucosilo en comparación con la eliminación celular de la misma célula en contacto con un anticuerpo anti-PSMA fucosilado en la presencia de células efectoras (por ejemplo, en una proporción de células objetivo: células efectoras de 1:50), por ejemplo, un incremento en lisis celular en por lo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, o 325%.

El término "anticuerpo" según se refiere en la presente incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada se comprende de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se comprende de tres dominios C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}.

Cada cadena ligera se comprende de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se comprende de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden además subdividirse en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que se encuentran más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada V_H y V_L se componen de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PSMA). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión contemplados

dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de la bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste de un dominio V_H; y (vi) una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, se codifican por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite elaborarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena Fv sencilla (scFv); véase 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 contemplarse dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas para aquellos con experiencia en la técnica, y los fragmentos se tamizan por utilidad de la misma manera que

los anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado del mismo (descrito además en lo siguiente), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre, empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de armazón y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden sujetarse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando un animal transgénico para secuencias de Ig humana se utiliza, mutagénesis somática *in vivo*) y de esta manera las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se

derivan de y se relacionan con las secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" como se utiliza en la presente se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpos monoclonales muestra una sola especificidad de unión y afinidad por un epítopo en particular.

El término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, pretende referirse un anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones de armazón y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatoria o dirigida o por mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad

de unión que tienen regiones variables en las que las regiones de armazón y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada. El término "anticuerpo monoclonal humano", como se utiliza en la presente, también incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanas o un hibridoma preparado del mismo (descrito además en lo siguiente), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una librería de anticuerpos humanos combinatoria, recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de armazón y CDR se derivan de secuencias de

inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden sujetarse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando un animal transgénico para secuencias de Ig humana se utiliza, mutagénesis somática *in vivo*) y de esta manera las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y se relacionan con secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en la presente, pretende referirse a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PSMA es sustancialmente libre de anticuerpos que unen específicamente antígenos diferentes al PSMA). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítopo, isoforma o variante de PSMA humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otra especie (por ejemplo, homólogos de especie de PSMA). Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos. En una modalidad de la invención, una combinación de

anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades se combinan en una composición bien definida.

El término "anticuerpo humanizado" pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de armazón humanas. Modificaciones adicionales a la región de armazón pueden hacerse dentro de las secuencias de armazón humanas.

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

El término "epítopo" significa un determinante de proteína capaz de unión específica a, o unión específica por, un anticuerpo. Los epítopos usualmente consisten de agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como también características de carga específica. Epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que

la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en la presencia de solventes desnaturalizantes.

Como se utiliza en la presente, "unión específica" se refiere a unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una K_D que es por lo menos dos veces menor que su K_D para la unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente al antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan de manera intercambiable en la presente con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Como se utiliza en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgGI) que se codifica por genes de región constante de cadena pesada.

El término "vector", como se utiliza en la presente, pretender referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es una "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse. Otro tipo de

vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped en la introducción en la célula huésped, y en consecuencia se replican junto con genoma huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se enlazan operativamente. Tales vectores son referidos en la presente como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en la forma de plásmidos. En la especificación presente, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que desempeñan funciones equivalentes.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se utiliza en la

presente, pretende referirse a una célula en la que un vector de expresión recombinante se ha introducido. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no solo a la célula sujeto en particular sino a la progenie de tales células. Ya que ciertas modificaciones pueden presentarse en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie, de hecho, puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se utiliza en la presente. Células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, célula CHOs, transfectomas, y células linfocíticas.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, anfibios, reptiles, etc.

Los términos "animal no humano transgénico" se refieren a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (ya sea integrado o no integrado en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpo completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgen de cadena ligera humana y ya sea un transgen de cadena pesada humana o

transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos anti-PSMA humanos cuando se inmuniza con antígeno PSMA y/o células que expresan PSMA. El transgen de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como en el caso de, por ejemplo, ratones HuMAb transgénicos, o el transgen de cadena pesada humana puede mantenerse de manera extracromosomal, como en el caso de ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) según se describe en WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir isotipos múltiples de anticuerpos monoclonales humanos para PSMA (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) al experimentar recombinación V-D-J y conmutación de isotipo.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos Anti-PSMA que Carecen de Residuos de Fucosa y que Tienen Actividad ADCC Intensificada

La presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado con citotoxicidad celular dirigida por anticuerpo (ADCC) intensificada contra células que expresan PSMA en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo. En una modalidad preferida, un anticuerpo desfucosilado de la invención intensifica la ADCC de células de carcinoma prostático LnCaP (ATCC CRL-1740) *in vitro*

comparado con la forma fucosilada del anticuerpo, por ejemplo bajo condiciones de una concentración de anticuerpos de 0.1 μg/ml y una proporción célula objetivo a célula efectora de 1:100. Preferiblemente, las células efectoras utilizadas son células efectoras estimuladas con IL-2 de sangre periférica humana (por ejemplo, 1 x 10^6 células mononucleares de sangre periférica humana se incuban con 10U/ml de IL-2 humana durante la noche a 37°C). La forma desfucosilada del anticuerpo de preferencia se compara con una forma fucosilada que se obtiene de la expresión en célula huésped de mamífero, tales como células CHO.

En modalidades preferidas, la forma desfucosilada del anticuerpo tiene una EC_{50} para actividad ADCC de 0.05 μg/ml o menos, de más preferencia 0.04 μg/ml o menos, incluso de más preferencia 0.03 μg/ml o menos, incluso más preferiblemente 0.02 μg/ml o menos, e incluso de más preferencia una EC_{50} de aproximadamente 0.018 μg/ml. En otras modalidades preferidas, la forma desfucosilada del anticuerpo tiene una EC_{50} para actividad ADCC de 0.01 μg/ml o menos, más preferiblemente 0.009 μg/ml o menos, incluso más preferiblemente 0.008 μg/ml o menos, incluso más preferiblemente 0.007 μg/ml o menos, incluso más preferiblemente 0.005 μg/ml o menos e incluso más preferiblemente una EC_{50} de aproximadamente 0.002 μg/ml. Preferiblemente, la EC_{50} para actividad ADCC se determina

utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 4 y utilizando células efectoras estimuladas con IL-2 o utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 4 y utilizando células efectoras de sangre periférica humana fresca.

En otras modalidades preferidas, la forma desfucosilada del anticuerpo tiene una EC_{50} para actividad ADCC que es por lo menos 3 veces menor que la EC_{50} ya que la forma fucosilada del anticuerpo (por ejemplo, una forma del anticuerpo expresada en célula), más preferiblemente por lo menos 4 veces menor que la EC_{50} de la forma fucosilada del anticuerpo, incluso más preferiblemente por lo menos 5 veces menor que la EC_{50} de la forma fucosilada del anticuerpo, incluso más preferiblemente por lo menos 6 veces menor que la EC_{50} de la forma fucosilada del anticuerpo, incluso más preferiblemente por lo menos 7 veces menor que la EC_{50} de la forma fucosilada del anticuerpo, incluso más preferiblemente por lo menos 8 veces menor que la EC_{50} de la forma fucosilada del anticuerpo, incluso más preferiblemente por lo menos 9 veces menor que la EC_{50} de la forma fucosilada del anticuerpo y incluso más preferiblemente por lo menos 10 veces menor que la EC_{50} de la forma fucosilada del anticuerpo. Otra vez, de preferencia, la EC_{50} para actividad ADCC se determina utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 4 y utilizando células efectoras estimuladas con IL-2 o utilizando el ensayo descrito en Ejemplo 4 y utilizando células efectoras de

sangre periférica humana fresca. Típicamente, la proporción de EC50 (fucosilado): EC_{50} (desfucosilado) se encontró mayor utilizando las células efectoras de sangre periférica humana fresca, aunque el porcentaje de lisis máximo se encontró menor utilizando las células efectoras de sangre periférica fresca.

La actividad ADCC incrementada de un anticuerpo desfucosilado de la invención puede cuantificarse, por ejemplo, como un incremento en porcentaje de lisis celular, en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo, cuando la actividad ADCC se mide bajo las mismas condiciones para las forma desfucosilada y fucosilada (por ejemplo, mismas concentraciones de anticuerpo y mismas proporciones de célula objetivo a efectora). Adicional o alternativamente, la actividad ADCC incrementada de un anticuerpo desfucosilado de la invención puede cuantificarse, por ejemplo, como una potencia incrementada al medirse por una disminución en el valor de EC_{50} para la forma desfucosilada, en comparación con la forma fucosilada. Esto puede cuantificarse por la proporción de la EC_{50} para la forma fucosilada a la forma desfucosilada.

Ejemplos de líneas celulares PSMA+ que pueden utilizarse en los ensayos de ADCC de la invención y contra las que un anticuerpo desfucosilado de la invención exhibe actividad ADCC intensificada, en comparación con la forma

fucosilada del anticuerpo, incluyen células LnCaP, células 22Rv1 y/o células PCa2b. La ADCC intensificada efectuada por anticuerpos anti-PSMA desfucosilados puede resultar en actividad ADCC sobre células PSMA+ en concentraciones de anticuerpo donde la ADCC puede no observarse con la forma fucosilada del anticuerpo.

Desfucosilación de Anticuerpos Anti-PSMA

Los anticuerpos anti-PSMA (por ejemplo, anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados y humanos) se conocen en la técnica, y pueden utilizarse en la presente invención. El anticuerpo anti-PSMA de la presente invenciones modifica de manera que el anticuerpo carecen de residuos fucosilo. Un anticuerpo puede elaborarse de manera que carezca de residuos fucosilo por uno de una diversidad de métodos. Por ejemplo, el anticuerpo puede expresarse utilizando tecnología de ADN recombinante, en una célula con un mecanismo de glucosilación alterado de manera que la adición de residuos fucosilo a cadenas de carbohidratos se inhiba. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede desfucosilarse a través de eliminación química del residuo fucosilo.

Además aún, en una modalidad preferida, el anticuerpo puede expresarse en un sistema de expresión de gallina quimérica, de manera que el anticuerpo se produzca en los huevos de la gallina quimérica. La preparación de

gallinas quiméricas que expresan un anticuerpo anti-PSMA en los huevos de la gallina se describe en detalle en Ejemplo 1 y la carencia de residuos de fucosa tales anticuerpos anti-PSMA expresados en huevo de gallina se demuestra en el Ejemplo 3. Gallinas quiméricas adecuadas para utilizarse en la expresión de proteínas en los huevos de la gallina se describen en Publicación de PCT WO 2004/015123. En consecuencia, en otro aspecto, la invención concierne a una gallina quimérica que comprende genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican un anticuerpo anti-PSMA de manera que el anticuerpo anti-PSMA se expresa en los huevos de la gallina quimérica, en donde el anticuerpo anti-PSMA expresado en los huevos de la gallina quimérica carece de residuos de fucosa. Preferiblemente, los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana.

En otra modalidad, el anticuerpo se expresa en una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de manera que la línea celular produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos (véase Ejemplos 5 y 6). Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares $FUT8^{-/-}$ Ms704, Ms705, y

Ms709 se crearon por la interrupción dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazo (véase la Publicación de Patente Norteamericana No. 20040110704 por Yamane et al. y Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22). Como otro ejemplo, EP 1,176,195 por Hanai et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6. Hanai et al. también describe líneas celulares que también tienen de manera natural una baja actividad enzimática para agregar mucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). La Publicación de PCT WO 03/035835 por Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn(297), lo que resulta también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación de PCT WO 99/54342 por Umana et al. describe líneas celulares diseñadas para expresar glicosil transferasas de modificación de glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-

acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas exhiben estructuras GlcNac divididas incrementadas que resultan en actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

En otra modalidad, un anticuerpo anti-PSMA se expresa y el o los residuos fucosilo se escinden utilizando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina residuos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23).

Adicionalmente, en otras modalidades, otras formas de glucosilación de un anticuerpo se modifican también. Por ejemplo, un anticuerpo glucosilado puede elaborarse (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, al alterar uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos puede hacerse que resulten en eliminación de uno o más sitios de glucosilación de armazón de región variable para eliminar en consecuencia la glucosilación en ese sitio. Tal aglucosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal estrategia se describe en mayor detalle en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,714,350 y 6,350,861 por Co et al.

Caracterización de la Ausencia de Residuos fucosilo en Anticuerpos Anti-PSMA

Los anticuerpos de la invención carecen de residuos fucosilo, por ejemplo en la cadena de carbohidratos de la porción Fc. Los anticuerpos pueden probarse por la ausencia de residuos fucosilo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tal como fluorescencia inducida por láser en electroforesis capilar con APTS. Brevemente, los oligosacáridos enlazados a N del anticuerpo anti-PSMA purificado pueden liberarse al agregar el péptido N-glicanasa (Prozyme) e incubar durante la noche. Los carbohidratos se resuspenden y se derivan con 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonato (APTS) bajo condiciones suaves de aminación reductiva en las que la desialilación y pérdida de residuos fucosilo se minimiza. Los aductos de la reacción se analizan por electroforesis capilar con un detector de fluorescencia inducida por láser (Beckman Coulter). Una ausencia de fucosa puede observarse por un cambio en la electroforesis en comparación con el mismo anticuerpo que contienen fucosa. Otra técnica para probar la ausencia de fucosa en anticuerpos anti-PSMA es un análisis de monosacáridos utilizando HPLC. Otras técnicas para analizar el contenido y estructura de carbohidratos para el anticuerpo incluye perfil de MS carbohidratos expresados (glucómica), análisis MALDI-TOF directo de glucanos intactos liberados (para proporcionar la

masa de clases de carbohidratos), espectro CID MSMS bajo (para proporcionar composición estructural de los glucanos), espectro CID MSMS alto y espectro MSn (para proporcionar información acerca de la conectividad de los glucanos) y digestión con exoglucosidasa secuencial (para proporcionar información de conectividad de estructura de los glucanos). Las metodologías para examinar el contenido de carbohidratos de los anticuerpos se describe en detalle en el Ejemplo 3.

Caracterización de Eliminación Celular Dependiente de Anticuerpos de Células PSMA+

Los anticuerpos anti-PSMA desfucosilados pueden probarse por su capacidad para mediar fagocitosis y eliminación de células que expresan PSMA. En una modalidad, un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado intensifica la eliminación de células que expresan PSMA en comparación con el mismo anticuerpo que contiene fucosa cuando se compara en la misma concentración. En otra modalidad, un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado induce eliminación de células que expresan PSMA donde el mismo anticuerpo que contienen fucosa no induce eliminación celular en la misma concentración.

La actividad ADCC de un anticuerpo monoclonal puede probarse en ensayos *in vitro* establecidos. Como un ejemplo, un ensayo de ADCC de liberación de cromo puede utilizarse. Brevemente, células mononucleares de sangre

periférica (PBMCs), u otras células efectoras, de donadores sanos pueden purificarse por centrifugación por densidad de Ficoll Hypaque, seguida por lisis de eritrocitos contaminantes. Las PBMCs lavadas puede suspenderse en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado con calor y mezclarse con células que expresan PSMA etiquetadas con ^{51}Cr, en diversas concentraciones de células efectoras a células tumorales (células efectoras:células tumorales). El anticuerpo anti-PSMA puede entonces agregarse en varias concentraciones. Un anticuerpo correlacionado con isotipo puede utilizarse como un control negativo. Los ensayos pueden llevarse a cabo durante 4-18 horas a 37°C. Las muestras pueden ensayarse para citólisis al medir el ^{51}Cr liberado en el sobrenadante de cultivo. El anti-PSMA monoclonal puede también probarse en combinaciones entre sí para determinar si la citólisis se intensifica con múltiples anticuerpos monoclonales.

Un ensayo alternativo que puede utilizarse para la capacidad del anticuerpo anti-PSMA para mediar fagocitosis y muerte de células que expresan PSMA es un ensayo de fluorometría resuelta en tiempo. Brevemente, células que expresan PSMA se cargan con un acetoximetil éster de ligando de intensificación de fluorescencia (BATDA), que penetra las membranas celulares. Dentro de la célula, los enlaces éster se hidrolizan y el compuesto no puede pasar más la membrana

celular. El anticuerpo anti-PSMA puede entonces agregarse en diversas concentraciones. Después de la citólisis, una solución de europeo (Perkin Elmer) se agrega y cualquier ligando libre se une al europeo para formar un quelato altamente fluorescente y estable (EuTDA) que puede leerse en un lector de microplacas (Perkin Elmer). La señal medida se correlaciona con la cantidad de células lisadas.

Los ensayos de ADCC preferidos para examinar la actividad ADCC de los anticuerpos anti-PSMA de la invención se describen en detalle en el Ejemplo 4.

Los anticuerpos anti-PSMA también pueden probare en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones) para determinar su eficacia en mediar la fagocitosis y muerte de células que expresan PSMA, por ejemplo, células tumorales. Estos anticuerpos pueden seleccionarse, por ejemplo, con base en los siguientes criterios, que no pretenden ser exclusivos:

1) unión a células vivas que expresan PSMA;

2) alta afinidad de unión a PSMA;

3) unión a un epítopo único en el PSMA (para eliminar la posibilidad de que anticuerpos monoclonales con actividades complementarias cuando se utilizan en combinación pudieran competir por la unión al mismo epítopo);

4) internación por células que expresan PSMA;

5) mediación de inhibición de crecimiento,

fagocitosis y/o eliminación *in vitro* de células que expresan PSMA en la presencia de células efectoras humanas.

Los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención reúnen uno o más de estos criterios. En una modalidad particular, los anticuerpos monoclonales se utilizan en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-PSMA o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-PSMA que tienen diferentes actividades, pero complementarias, pueden combinarse en una sola terapia para lograr un efecto terapéutico o de diagnostico deseado. Una ilustración de esto puede ser una composición que contienen un anticuerpo monoclonal anti-PSMA que media la eliminación altamente efectiva de células objetivos en la presencia de células efectoras, combinado con otro anticuerpo monoclonal anti-PSMA que inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA.

Caracterización de la Unión a PSMA

Los anticuerpos de la invención pueden probarse por su unión a PSMA por, por ejemplo, ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como ELISA, análisis de FACS y/o análisis Biacore. En un ensayo de ELISA típico, brevemente, placas de microvaloración se recubren con PSMA purificado a 0.25 μg/ml en PBS, y entonces se bloquean con 5% albúmina sérica bovina en PBS. Diluciones de anticuerpo

se agregan a cada pozo y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween y se incuban entonces con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpo humanos o un reactivo policlonal específico de Fc anti-IgG humana de cabra) conjugado a fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a una OD de 405-650.

A fin de mostrar la unión de los anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan el PSMA, puede utilizarse citometría de flujo. En un ejemplo típico (pero no limitante) de un protocolo de citometría de flujo, líneas celulares que expresan PSMA (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contienen 0.1% de BSA y 20% de suero de ratón, y se incuba a 37°C durante 1 hora. Después de lavar, las células se hacer reaccionar con anticuerpo secundario etiquetado con Fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-IgG humana) bajo las mismas condiciones que la tinción de anticuerpo primaria. Las muestras pueden analizarse por un instrumento FACScan utilizando luz y propiedades de dispersión lateral para sincronizarse sobre células sencillas. Un ensayo alternativo que utiliza microscopía de fluorescencia puede utilizarse (además de o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo.

Las células pueden teñirse exactamente como se describe en lo anterior y examinarse por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad disminuida lo que depende de la densidad del antígeno.

Los anticuerpos anti-PSMA pueden además probarse por reactividad con antígeno PSMA por transferencia Westem. Por ejemplo, extractos celulares de células que expresan PSMA pueden prepararse y sujetarse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con 20% suero de ratón, y se sondean con los anticuerpos monoclonales que se probarán. La unión del anticuerpo puede probarse utilizando un anticuerpo secundario específico anti-especie enlazado a fosfatasa alcalina y revelado con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Otras técnicas para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia PSMA se conocen en la técnica, incluyendo análisis RIAs y Biacore. Ensayos adecuados para determinar la unión a PSMA se describen en detalle en el Ejemplo 4.

Anticuerpos Anti-PSMA Quiméricos o Humanizados

En ciertas modalidades, un anticuerpo anti-PSMA

desfucosilado de la invención es un anticuerpo quimérico humanizado. Tales anticuerpos pueden prepararse utilizando anticuerpos anti-PSMA de ratón que se encuentran disponibles en la técnica y procedimientos establecidos para convertir un anticuerpo de ratón a un anticuerpo quimérico o humanizado. Ejemplos no limitantes de tales anticuerpos anti-PSMA de ratón incluyen los anticuerpos monoclonales 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 y J591. Hibridomas que secretan 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6 o 4C8B9 se han depositado públicamente y se describen en la Patente Norteamericana No. 6,159,508. Hibridomas que secretan E99, J415, J533 o J591 se han depositado públicamente y se describen en la Patente Norteamericana No. 6,107,090. Más aún, anticuerpos anti-PSMA humanizados, incluyendo una versión humanizada de J591, se describen en mayor detalle en la Publicación de PCT WO 02/098897. Adicionalmente, otros anticuerpos anti-PSMA humano de ratón se han descrito en la técnica, tales como mAb 107-1A4 (Wang, S. et al. (2001) Ent. J. Cancer 92:871-876) y mA.b 2C9 (Kato, K. et al. (2003) Ent. J. Urol. 10:439-444).

Anticuerpos Anti-PSMA Monoclonales Humanos

Los anticuerpos preferidos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales anti-PSMA humanos. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-PSMA humanos incluyen los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, aislados y estructuralmente caracterizados según se describe originalmente en las Solicitudes PCTs WO 01/09192 y WO 03/064606 y en la Solicitud Provisional Norteamericana No. Serie 60/654,125, titulada "Anticuerpos Monoclonales Humanos para Antígeno Membranal Específico de Próstata (PSMA)", presentada el 18 de febrero de 2005, cuyo contenido de cada una se incorpora expresamente en la presente para referencia. Las secuencias de aminoácidos de V_H de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en las SEC. DE IDENT. NOS: 1-9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 10-18, respectivamente. Otros anticuerpos anti-PSMA humanos que pueden utilizarse en la invención incluyen los anticuerpos descritos en la Publicación de PCT WO 03/034903 y Solicitud Norteamericana No. 2004/0033229.

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a PSMA, las secuencias V_H y V_L pueden "mezclarse y correlacionarse" para crear otras moléculas de unión anti-PSMA de la invención. La unión a PSMA de tales anticuerpos "mezclados y correlacionados" puede probarse utilizando los

ensayos de unión bien conocidos en la técnica, tales como análisis de FACS y ensayos de ELISA. Preferiblemente, cuando las cadenas V_H y V_L se mezclan y correlacionan, una secuencia V_H de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. Asimismo, de preferencia una secuencia V_L de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_L estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias de V_H de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6 y 2F5 son particularmente accesibles para mezclar y correlacionar, ya que estos anticuerpos utilizan secuencias de V_H derivadas de la misma secuencia de línea germinal (V_H 5-51) y de esta manera exhiben similitud estructural. Asimismo, las secuencias V_L de 4A3, 7F12, 8C12, y 2C6 son particularmente accesibles para mezclar y correlacionarse, ya que estos anticuerpos utilizan secuencias V_L derivadas de la misma secuencia de línea germinal (V_L L6) y de esta manera exhiben similitud estructural. Asimismo, las secuencias V_L de 8A11 y 16F9 son particularmente accesibles para mezclar y correlacionarse, ya que estos anticuerpos utilizan secuencias V_L derivadas de la misma secuencia de línea germinal (V_L 04/014) y de esta manera exhiben similitud estructural. Asimismo, las secuencias V_L de 1C3, 2A10 y 2F5 son particularmente accesibles para mezclar y correlacionar, ya que estos anticuerpos utilizan secuencias V_L derivadas de la misma secuencia de línea germinal (V_L L18) y de esta manera

exhiben similitud estructural.

En modalidades particulares, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 1-9; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 10-18;

en donde el anticuerpo une específicamente PSMA humano.

Combinaciones de cadena pesada y ligera preferidas incluyen:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 1; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 10; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 2; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 11; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 3; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 12.

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 4; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 13; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 5; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 14; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 6; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 15; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 7; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 16; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 8; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 17; o

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 9; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 18.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos desfucosilados que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 19-27, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las V_H CDR2 de V_H 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 28-36, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 37-45, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de V_K 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 46-54, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR2 de V_K de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 55-63, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR3 de V_K de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEC. DE IDENT. NOS: 64-72, respectivamente. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department de Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a PSMA y que la especificidad de unión a antígeno se proporciona de manera primera por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V_H y secuencias CDR1, 2 y 3 de V_k pueden "mezclarse y correlacionarse" (es decir, las CDRs de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y correlacionarse, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, 2 y 3 de V_H y una CDR1, 2 y 3 de V_k) para crear otras moléculas de unión anti-PSMA de la invención. La unión a PSMA de tales anticuerpos "mezclados y correlacionados" puede probarse utilizando ensayos de unión conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de FACS y ensayos de ELISA. Preferiblemente, cuando las secuencias CDR de V_H se mezclan y correlacionan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_H particular se reemplaza con una o unas secuencias CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias CDR de V_k se mezclan y correlacionan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_k particular de preferencia se reemplaza con una o unas secuencias CDR estructuralmente similares. Será fácilmente aparente para el técnico con experiencia ordinaria que secuencias de V_H y V_L novedosas pueden crearse al sustituir una o más secuencias de región CDR de V_H y/o V_L CDR con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR descritas en la presente para anticuerpos monoclonales 4A3, 7F12,

8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 19-27;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 28-36;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 37-45;

(d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 46-54;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 55-63; y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 64-72;

en donde el anticuerpo une específicamente PSMA.

En una modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 19;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 28;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 37;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 46;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 55; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 64.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 20;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 29;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 38;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 47;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 56; y

(f) una región variable de cadena ligera humana

CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 65.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 21;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 30;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 39;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 48;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 57; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 66.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 22;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 31;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 40;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 49;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 58; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 67.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 23;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 32;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 41;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 50;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 59; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 68.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 24;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 33;

(c) una región variable de cadena pesada humana

CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 42;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 51;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 60; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 69.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 25;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 34;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 43;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 52;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 61;

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 70.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 26;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 35;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 44;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 53;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 62; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 71.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 27;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 36;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 45;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 54;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 63; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 72.

Anticuerpos que Tienen Secuencias de Línea Germinal Particulares

En ciertas modalidades, un anticuerpo desfucosilado de la invención comprende una región variable de cadena pesada de un particular gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular.

Por ejemplo, en una modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_H 5-51 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a PSMA humano. En otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_H 3-30.3 humano, en donde el anticuerpo une específicamente PSMA. En otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_k L6 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a PSMA humano. En otra modalidad preferida,

la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_k 04/014 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a PSMA humano. En otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_k L18 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a PSMA humano.

En aún otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

(a) comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_H 5-51 o 3-30.3 humano (que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEC. DE IDENT. NOS: 73 y 76, respectivamente);

(b) comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva a partir de un gen V_k L6, 04/014, o L18 humano (que codifica las secuencias de aminoácidos establecidas en SEC. DE IDENT. NOS: 74, 75 y 77, respectivamente); y

(c) se une específicamente a PSMA humano.

Una combinación preferida de línea germinal V_H y V_k es V_H 5-51 y V_k L6. Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_K de V_H 5-51 y V_k L6, respectivamente, son los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12 y 2C6. Otra combinación preferida de línea germinal V_H y V_k es V_H 5-51 y V_k 04/014. Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_k de V_H 5-51 y Vk.04/014, respectivamente, son los anticuerpos 8A11 y 16F9. Otra combinación preferida de línea germinal V_H y V_k es V_H 5-51 y V_k L18. Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_k de V_H 5-51 y V_k L18, respectivamente, son los anticuerpos 2A10 y 2F5. Otra combinación preferida de línea germinal V_H y V_k es V_H 3-30.3 y V_k L18. Un ejemplo de un anticuerpo tiene V_H y V_k de V_H 3-30.3 y V_k L18, respectivamente, es el anticuerpo 1C3.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utilice genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o tamizar una genoteca de inmunoglobulina humana desplegada en el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal al

comparar las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, utilizando la base de datos Vbase) y seleccionar la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que es más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) con la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias en aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas que se presentan de manera natural o introducción intencionada de mutación dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es por lo menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otra especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser por lo menos 95%, o incluso por lo menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia

de línea germinal humana particular mostrará no más de 10 diferencias en aminoácidos a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia en aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

En aún otra modalidad, un anticuerpo desfucosilado de la invención comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-PSMA de la invención.

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 1-9;

(b) la región variable de cadena ligera comprende

una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 10-18; y

(c) el anticuerpo se une específicamente a PSMA humano.

En otras modalidades, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga con las secuencias establecidas en lo anterior. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen alta homología (es decir, 80% o mayor) con las regiones V_H y V_L de las secuencias establecidas en lo anterior, puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida o mediada por PCR) de una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias SEC. DE IDENT. NOS: 1-18, seguido por la prueba por función retenida del anticuerpo alterado codificado (es decir, unión a PSMA) utilizando los ensayos de unión descritos en la presente. Moléculas de ácidos nucleicos que codifican SEC. DE IDENT. NOS: 6-9 y 15-18 pueden encontrarse en SEC. DE IDENT. NOS: 78-85. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican SEC. DE IDENT. NOS: 1-5 y 10-14 pueden encontrarse en la Publicación de PCT WO 03/064606, Figuras 17A y 17B.

Como se utiliza en la presente, el porcentaje de homología entre dos secuencia de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El

porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesita introducirse para alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes en lo siguiente.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse utilizando un programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacio de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede también determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se

ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteína de la presente invención pueden además utilizarse como una "secuencia de consultas" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et

al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, calificación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineamientos espaciales para propósitos de comparación, Gapped BLAST puede utilizarse como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) pueden utilizarse. Véase http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

En ciertas modalidades, un anticuerpo desfucosilado de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR comprenden secuencias de aminoácidos específicas con base en los anticuerpos preferidos descritos en la presente (por ejemplo, 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3), o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-PSMA de la invención. En consecuencia,

la invención proporciona un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde:

(a) la secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 37-45, y modificaciones conservadoras de la misma;

(b) la secuencia CDR3 de región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 64-72, y modificaciones conservadoras de la misma; y

(c) el anticuerpo se une específicamente a PSMA humano.

En una modalidad preferida, la secuencia CDR2 de región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 28-36, y modificaciones conservadoras de la misma; y la secuencia CDR2 de región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 55-63, y modificaciones conservadoras de la misma. En otra modalidad preferida, la secuencia CDR1 de región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 19-27, y modificaciones conservadoras de la misma; y la secuencia CDR1

de región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 46-54, y modificaciones conservadoras de la misma.

Como se utiliza en la presente, el término "modificaciones conservadoras de secuencia" pretende referirse a modificaciones en aminoácidos que no afectan o alteran de manera significativa las características de unión del anticuerpo que contienen la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo de la invención por técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son una en que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena latera similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han identificado en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina),

cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). De esta manera, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención puede reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede probarse por función retenida (es decir, las funciones establecidas en (i) y hasta (iv) en lo anterior) utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Alternativamente, en otra modalidad, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-PSMA, tal como por mutagénesis por saturación, y los anticuerpos anti-PSMA modificados resultantes pueden tamizarse para actividad de unión.

Anticuerpos que se Unen al Mismo Epítopo como los Anticuerpos Anti-PSMA de la Invención

En otra modalidad, la invención proporciona anticuerpos desfucosilados que se unen al mismo epítopo como lo hacen los diversos anticuerpos anti-PSMA de la invención proporcionados en la presente, tales como otros anticuerpos humanos que se unen al mismo epítopo que los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 descritos

en la presente. Tales anticuerpos adicionales pueden identificarse con base en su capacidad de competencia cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención, tales como 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 o 1 C3, en ensayos de unión a PSMA a estándar. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, a PSMA humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con aquel anticuerpo para unirse a PSMA humano; de manera que un anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítopo o una relacionado (por ejemplo, uno estructuralmente similar o espacialmente próximo) en PSMA humano como el anticuerpo con el cual compite. En una modalidad preferida, el anticuerpo desfucosilado que se une al mismo epítopo en PSMA humano como 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en las Publicaciones de PCT WO 01/09192 y WO 03/064606.

Anticuerpos Diseñados y Modificados

Un anticuerpo desfucosilado de la invención además puede prepararse utilizando un anticuerpo que tiene una o

más de las secuencias V_H y/o V_L descritas en la presente como material de inicio para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas a partir del anticuerpo de inicio. Un anticuerpo puede diseñarse al modificar uno o más residuos de aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de armazón. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse al modificar residuos dentro de la o las regiones constantes, por ejemplo para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de diseño de región variable que puede realizarse es injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones de determinación de complementaridad (CDRs) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más variadas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Ya que las secuencias CDR son los responsables de la mayor parte de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos que se presentan de manera natural al construir vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico que se presenta de manera natural

injertadas en secuencias de armazón de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Véase. U.S.A. 86:10029-10033; Patente Norteamericana No. 5,225,539 para Winter, y Patentes Norteamericanas Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 para Queen et al.).

En consecuencia, otra modalidad de la invención concierne a un anticuerpo monoclonal desfucosilado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 19-27, SEC. DE IDENT. NOS: 28-36, y SEC. DE IDENT. NOS: 37-45, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 46-54, SEC. DE IDENT. NOS: 55-63 y SEC. DE IDENT. NOS: 64-72, respectivamente. De esta manera, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR V_H y V_L de anticuerpos monoclonales 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, aún pueden contener diferentes secuencias de armazón de estos anticuerpos.

Tales secuencias de armazón pueden obtenerse de

base de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena pesada y ligera humana pueden encontrarse en la base de datos de secuencia de línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como también en Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins de Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department de Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire de Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory de Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836; los contenidos de cada una de las cuales se incorporan expresamente en la presente para referencia.

Secuencias de armazón preferidas para utilizarse en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias de armazón utilizadas por anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similares a las secuencias V_H 5-51 o 3-30.3 (SEC. DE IDENT. NOS: 73 y 76, respectivamente) y/o la secuencia de armazón V_k L6, 04/014 o L18 (SEC. DE IDENT. NOS: 74, 75 y 77, respectivamente) utilizadas por anticuerpos monoclonales

preferidos de la invención. Las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_H, y las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_K, pueden injertarse en regiones de armazón que tienen la secuencia idéntica como aquella que se encuentra en el gen de inmunoglobulina de línea germinal de la que se deriva la secuencia de armazón derive, o las secuencias CDR pueden injertarse en regiones de armazón que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertas instancias es benéfico mutar residuos dentro de las regiones de armazón para mantener o intensificar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véase por ejemplo, Patentes Norteamericanas Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 para Queen et al).

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_K para mejorar por consecuencia una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para introducir la o las mutaciones y el efecto en la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede valuarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* según se describe en la presente y se proporciona en los Ejemplos. Preferiblemente se introducen modificaciones conservadoras (como se discute en lo anterior). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones

o eliminaciones de aminoácidos, pero de preferencia son sustituciones. Más aún, típicamente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR alterada.

En consecuencia, en otra modalidad, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-PSMA desfucosilado, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región variable CDR1 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 19-27, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 19-27; (b) una región CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 28-36, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 28-36; (c) una región CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 37-45, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de

aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 37-45; (d) una región CDR1 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 46-54, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 46-54; (e) una región CDR2 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 55-63, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 55-63; y (f) una región CDR3 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 64-72, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NO: 64-72.

Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquellos que se han hecho modificaciones a los residuos de armazón dentro de V_H y/o V_K, por ejemplo para mejorar las

propiedades del anticuerpo. Típicamente tales modificaciones de armazón se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "restituir" uno o más residuos de armazón a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener residuos de armazón que difieren de la secuencia de línea germinal de la que el anticuerpo se deriva. Tales residuos pueden identificarse a comparar las secuencias de armazón del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de la que el anticuerpo se deriva. Por ejemplo, para 8C12 y 8A11, el residuo #13 de aminoácido (dentro de FR1) de V_H es una treonina mientras que este residuo en la secuencia de línea germinal V_H 5-51 correspondiente es una lisina. Para regresar la secuencia de la región de armazón a la configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "restituirse" a la secuencia de línea germinal por, por ejemplo, mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR (por ejemplo, el residuo 13 de FR1 de la V_H de 8C12 o 8A11 puede "restituirse" de treonina a lisina. Tales anticuerpos "restituidos" pretenden también contemplarse por la invención.

Otro tipo de modificación de armazón involucra mutar uno o más residuos dentro de la región de armazón, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar

epítopos de célula T para reducir por consecuencia la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Esta estrategia es también referida como "desinmunización" y se describe en mayor detalle en la Publicación de Patente Norteamericana No. 20030153043 por Carr et al.

Como adición o alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones de armazón o CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media sérica, fijación del complemento, unión a receptor de Fc, y/o citotoxicidad dependiente de antígeno. Adicionalmente, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más porciones química pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, una vez más para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modalidades se describe en mayor detalle en lo siguiente. La numeración de residuos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat.

En una modalidad, la región de la bisagra de CHI se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región de la bisagra se altera, por ejemplo, incrementándose o disminuyendo. Esta estrategia se describe además en la Patente Norteamericana No. 5,677,425 por Bodmer

et al. El número de residuos de cisteína en la región de la bisagra de CHI se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamble de las cadenas ligera y pesada o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra modalidad, la región de la bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones en aminoácidos se introducen en la región de interconexión del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de manera que el anticuerpo tiene unión impedida a la proteína A estafilococcica (SpA) con relación a la unión A-SpA de dominio Fc bisagra nativo. Esta estrategia se describe en mayor detalle en la Patente Norteamericana No. 6,165,745 por Ward et al.

En otra modalidad, el anticuerpo se modifica para incrementar su vida media biológica. Diversas estrategias son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones puede introducirse: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente Norteamericana No. 6,277,375 para Ward. Alternativamente, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CHI o CL para que contenga un epítopo de unión a receptor silvestre tomado a partir de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,869,046 y 6,121,022 por Presta et al.

Aún en otras modalidades, la región Fc se altera al reemplazar por lo menos un residuo de aminoácidos con un residuo de aminoácidos diferente para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 puede reemplazarse con un residuo de aminoácidos diferente de manera que el anticuerpo tenga un afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector para el cual se altera la afinidad, puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente Cl del complemento. Esta estrategia se describe en mayor detalle en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,624,821 y 5,648,260, ambas por Winter et al.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga unión alterada a Clq y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida o suprimida. Esta estrategia se describe en mayor detalle en la Patente Norteamericana No. 6,194,551 por Idusogie et al.

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran para alterar por consecuencia la capacidad del anticuerpo para fijar complemento. Esa estrategia se describe en mayor

detalle en la Publicación de PCT WO 94/29351 por Bodmer et al.

Aún en otro ejemplo, la región Fc se modifica para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcφ al modificar uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta estrategia se describe además en la Publicación de PCT WO 00/42072 por Presta. Más aún, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito por variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 demostraron mejorar la unión a FcγRIII. Adicionalmente, las siguientes mutantes de combinación mostraron mejorar la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

Otra modificación de los anticuerpos en la presente que se contempla por la invención es pegilación. Un

anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, incrementar la vida media biológica (por ejemplo, sérica) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster o aldehído reactivo derivado de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero análogo soluble en agua reactivo). Como se utiliza en la presente, el término "polietilenglicol" pretende contemplar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivar las proteínas, tales como mono alcoxi (de 1 a 10 átomos de carbono) o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas modalidades, el anticuerpo que se pegilará es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegilar la proteína se conocen en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase por ejemplo, EP 0 154 316 por Nishimura et al. y EP 0 401 384 por Ishikawa et al.

Métodos para Diseñar Anticuerpos

Como se discutió en lo anterior, los anticuerpos anti-PSMA desfucosilados que tienen secuencias de V_H y V_K

descritas en la presente pueden utilizarse para crear nuevos anticuerpos anti-PSMA al modificar la secuencias de VH y/o V_K, o la o las regiones constantes unidas a las mismas. De esta manera, en otro aspecto de la invención, las características estructuras de un anticuerpo anti-PSMA de la invención, por ejemplo 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, se utilizan para crear anticuerpos anti-PSMA desfucosilados estructuralmente relacionados que retienen por lo menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como unión a PSMA humano. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, o mutaciones de las mismas, pueden combinarse de manera recombinantemente con regiones de armazón conocidas y/o otras CDRs para crear anticuerpos anti-PSMA diseñados de manera recombinante adicionales de la invención, como se discute en lo anterior. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de inicio para el método de diseño es una o más de las secuencias de V_H y/o V_K proporcionadas en la presente, o uno o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar de hecho (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de V_H y/o V_K proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Antes bien, la información contenida en la o las secuencias se utiliza

como el material de inicio para crear una o unas secuencias de "segunda generación" derivadas de la o las secuencias originales y entonces la o las secuencias de "segunda generación" se preparan y expresan como una proteína.

En consecuencia, en otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-PSMA que comprende:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesa que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 19-27, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 28-36 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 37-45; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 46-54, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 55-63 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 64-72;

(b) alterar por lo menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera para crear por lo menos una secuencia de anticuerpo alterada; y

(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Técnicas estándar en biología moléculas pueden utilizarse para preparar y expresar las secuencias de anticuerpo alteradas. La secuencia de anticuerpo alterada preparada así puede entonces elaborarse en forma desfucosilada utilizando los métodos descritos en la presente para obtener un anticuerpo anti-PSMA alterado desfucosilado.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden valorarse utilizando ensayos estándares disponibles en la técnica y/o descritos en la presente, tales como aquellos establecidos en los Ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de unión, ensayos de ADCC).

En ciertas modalidades de los métodos para diseñar anticuerpos de la invención, las mutaciones pueden introducirse aleatoria o selectivamente a lo largo de la totalidad o en una parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-PSMA y los anticuerpos anti-PSMA resultantes pueden tamizarse para actividad de unión y/o otras propiedades funcionales como se describe en la presente. Método mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la Publicación de PCT WO 02/092780 por Short describe método para crear y tamizar mutaciones de anticuerpo utilizando mutagénesis por saturación, ensamble por ligación

sintética o una combinación de las mismas. Alternativamente, la Publicación de PCT WO 03/074679 por Lazar et al. describe métodos de tamización computacionales para tamizar las propiedades fisioquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de Ácidos Nucleicos que Codifican Anticuerpos de la Invención

Otro aspecto de la invención concierne a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención. El término "molécula de ácido nucleico", como se utiliza en la presente, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, pero de preferencia es ADN de doble hebra. Los ácidos nucleicos pueden presentarse en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aísla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica retirándose de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, gradientes CsCI, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols en Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Enterscience, New York. Un ácido

nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o RNA y puede o no puede contener secuencias intrónicas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse utilizando técnicas en biología molecular estándar. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humanas como se describe adicionalmente en lo siguiente), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo elaborado por el hibridoma pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulinas (por ejemplo, utilizando técnica de presentación en fago), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son aquellas que codifican las secuencias VH y VL de los anticuerpos monoclonales 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos VH y VL de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9 se publican en la Publicación de PCT No. WO 03/064606 (véase Figuras 17A y 17B), los contenidos de la cual se incorporan expresamente para referencia. La

secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 1C3 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 78. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 1C3 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 82. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 2A10 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 79. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 2A10 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 83. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 2C6 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 80. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 2C6 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 84. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VH de 2F5 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 81. La secuencia de ADN que codifica la secuencia VL de 2C6 se muestra en SEC. DE IDENT. NO: 85.

Una vez que los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL se obtienen, estos fragmentos de ADN pueden además manipularse por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmento Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se enlaza de manera operativa a otro fragmento de ADN que codifican otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado", como se utiliza en este contexto, pretende dar a entender que los dos fragmentos de ADN se

unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco de lectura.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse a un gen de cadena pesada de longitud completa al enlazar de manera operativa el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CHI, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., el al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que contemplan esas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero de mayor preferencia es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede enlazarse de manera operativa a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante de CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse a un gen de cadena pesada de longitud completa (así como también un gen de cadena ligera Fab) al enlazarlo operativamente al ADN que codifica VL a otra molécula de ADN

que codifica región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins de Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que contemplan estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero de mayor preferencia es una región constante kappa.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se enlazan operativamente a otro fragmento que codifican un enlazador flexible, por ejemplo, que codifican la secuencia de aminoácidos $(Gly_4\text{-}Ser)_3$ (SEC. DE IDENT. NO: 89), de manera que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína de cadena única contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque con frecuencia en una secuencia nativa (excepto para sitios de restricción modificados y similares), ya sea ADNc, genómico o mezclas pueden mutarse, de los mismo de acuerdo con técnicas estándar para proporcionar secuencias

génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones, pueden afectar la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, las secuencias de ADN sustancialmente homólogas o derivadas de conmutaciones constantes de V, D, J, nativas y otras secuencias tales descritas en la presente se contemplan (donde "derivada" indica que una secuencia es idéntica o modificada a partir de otra secuencia).

Producción de Anticuerpos Monoclonales de la Invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente invención pueden producirse por una diversidad de técnicas, incluyendo metodología de anticuerpos monoclonales convencional por ejemplo, la técnica de hibridación celular somática estándar de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque se prefieren procedimientos de hibridación celular somática, en principio, otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales pueden emplearse por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Protocolos y técnicas de inmunización para aislamiento de esplenocitos inmunizador para fusión se conocen en la técnica. Progenitores de fusión (por ejemplo, células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión se conocen

también.

En diversas modalidades, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpo quiméricos.

Los anticuerpo quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse con base en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describe en lo anterior. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma murino de interés y diseñarse para contener secuencias de inmunoglobulinas no murinas (por ejemplo, humanas) utilizando técnicas en biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden enlazarse a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 4,816,567 para Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en un armazón humano utilizando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 5,225,539 para Winter, y las Patentes Norteamericanas Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 para Queen et al.). Una diversidad de anticuerpos anti-PSMA de ratón se conocen en la técnica que pueden utilizarse para crear anticuerpos anti-PSMA quiméricos o humanizados, por ejemplo, 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11,

4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 109, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 y J591. En una modalidad preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PSMA pueden generarse utilizando ratones transgénicos o ratones cromosómicos que llevan partes del sistema inmune humano más que del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos en la presente como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se refieren de manera colectiva en la presente como "ratón de Ig humana".

El HuMAb mouse® (Medarex, Enc.) contiene miniloci de gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humana sin ordenar, en conjunto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena μ y κ (véase por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones exhiben expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos de cadena pesada y ligera humana experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar IgGκ monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Entern. Rev. Immunol. 13: 65-93,

and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMab, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describen además en Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) Enternational Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBOJ. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, los contenidos de todas se incorporan específicamente por la presente para referencia en su totalidad. Véase además, las Patentes Norteamericanas Nos. 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; la Patente Norteamericana No. 5,545,807 para Surani et al.; las Publicaciones de PCT Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas para Lonberg y Kay; y la Publicación de PCT No. WO 01/14424 para Korman et al.

En otra modalidad, los anticuerpos humanos de la invención pueden amplificarse utilizando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que lleva un transgen de

cadena pesada humana y transcromosoma de cadena ligera humana. Tales ratones, referidos en la presente como "ratones KM", se describen en detalle en la Publicación de PCT WO 02/43478 para Ishida et al.

Adicionalmente incluso, sistemas animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana se encuentran disponibles en la técnica y pueden utilizarse para amplificar anticuerpos anti-PSMA de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo referido como el Xenomouse (Abgenix, Enc.) puede utilizarse; tales ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 y 6,162,963 para Kucherlapati et al.

Más aún, sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana se encuentran disponibles en la técnica y pueden utilizarse para amplificar anticuerpos anti-PSMA de la invención. Por ejemplo, los ratones que llevan un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana, referido como "ratón TC" puede utilizarse; tales ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Adicionalmente, vacas que llevan transcromosomas de cadena pesada y ligera humana se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y pueden utilizarse para amplificar

anticuerpos anti-PSMA de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando métodos de presentación en fagos para tamización de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos se establecen en la técnica. Véase por ejemplo: las Patentes Norteamericanas Nos. 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 para Ladner et al.; las Patentes Norteamericanas Nos. 5,427,908 y 5,580,717 para Dower et al.; las Patentes Norteamericanas Nos. 5,969,108 y 6,172,197 para McCafferty et al.; y las Patentes Norteamericanas Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 para Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden también prepararse utilizando ratones SCID en los que células inmunes humanas se han reconstituido de manera que una respuesta de anticuerpos humanos puede generarse en la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,476,996 y 5,698,767 para Wilson et al.

Inmunización de Ratones de Ig Humana

Cuando ratones de Ig humana se utilizan para amplificar anticuerpos humanos de la invención, tales ratones pueden inmunizarse con una línea celular que expresa PSMA

(tales como células LnCaP, ATCC CRL-1740), con una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA (tal como membranas celulares de LnCaP) y/o con PSMA recombinante, o una proteína de fusión de PSMA recombinante, como se describe en general por Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; y la Solicitud de PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad en la primera infusión. Por ejemplo, una preparación membranal de células LnCaP puede utilizarse para inmunizar los ratones de Ig humana de manera intraperitoneal.

Procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para PSMA se describen en las Publicaciones PCT WO 01/09192 y WO 03/064606. Experiencia acumulada con varios antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente de manera intraperitoneal (IP) con antígeno el adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, adyuvantes diferentes al de Freund también se encuentran efectivos. Además, células completas en ausencia de adyuvante se encuentran altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede monitorearse durante el curso de protocolo de inmunización con muestras plasmáticas obteniéndose por sangrados retroorbitales. El

plasma puede tamizarse por ELISA (como se describe en lo siguiente), y ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-PSMA pueden utilizarse para fusiones. Los ratones pueden reforzarse de manera intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y remoción del bazo. Se espera que 2-3 para cada inmunización se necesiten realizar. Entre 6 y 24 ratones se inmuniza típicamente para cada antígeno. Usualmente se utilizan las cepas HCo7 y HCo12. Además, los transgenes HCo7 y HCo12 pueden reproducirse juntos en un solo ratón que tiene dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12).

Generación de Hibridomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos de la Invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, esplenocitos y/o células de nódulo linfático de ratones transgénicos inmunizados que llevan genes de inmunoglobulina humanas pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden tamizarse para la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Por ejemplo, suspensiones celulares sencillas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados pueden fusionarse a una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no

secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50% PEG. Las células se colocan en placas a aproximadamente 2 x 10^5 en placas de microvaloración de fondo plano, seguida por una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene 20% de Clone Serum fetal, 18% de medio condicionado "653", 5% de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0.055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y HAT 1X (Sigma; el HAT se agrega 24 horas después de la fusión. Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el que el HAT se reemplaza con HT. Pozos individuales pueden entonces tamizarse por ELISA para anticuerpos IgM y IgG monoclonales humanos. Una vez que se presenta crecimiento extensivo del hibridoma, el medio puede observarse usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden recolocarse en placas, tamizarse otra vez, y si aún son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse por lo menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden entonces cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en el medio de cultivo del tejido para caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces para agitación de dos litros para purificación de anticuerpos

monoclonal. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida puede verificarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse por PBS, y la concentración puede determinarse por OD280 utilizando un coeficiente de extensión de 1.43. Los anticuerpos monoclonales pueden guardarse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

Generación de Transfectomas que Producen Anticuerpos Monoclonales de la Invención

Los anticuerpos de la invención pueden también reproducirse en un transfectoma de célula huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica bien conocidos (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADNs que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, pueden obtenerse por técnicas en biología molecular estándar (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADNs pueden insertarse en vectores de expresión de manera que los genes se enlacen operativamente a

secuencias de control transcripcional y transduccional. En este contexto, el término "operativamente enlazado" pretende dar a entender que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y transduccional dentro del vector desempeñan su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de vector de expresión y secuencias de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementario en el fragmento del gen del anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no se presentan sitios de restricción). Las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos descritos en la presente pueden utilizarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo al insertarlo en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado de manera que el segmento V_H se enlaza operativamente al o los segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_K se enlaza operativamente al segmento C_L dentro

del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal se enlaza en marco de lectura al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia regulatoria" pretende incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped que se transformará, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Secuencias

reguladoras preferidas para expresión en célula huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o intensificadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus 40 de Simio (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, secuencias reguladoras no virales pueden utilizarse, tales como el promotor de ubiquitina o promotor de β-globina. Incluso además, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tal como el sistema promotor SRα, que contiene secuencias del promotor temprano SV40 y el repetido terminal largo del virus tipo 1 de la leucemia de células T humanas(Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Gell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores selectivos. El gen marcador selectivo facilita la selección de célula huésped en las que el vector se ha introducido (véase, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas para Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador selectivo confiere resistencia a fármacos, tales como G418,

higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que el vector se ha introducido. Genes marcadores selectivos preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para utilizarse en células huésped de dhfr- con selección/amplificación por metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped por técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden contemplar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación con calcio-fosfato, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en célula huésped procariótica o eucarióticas, la expresión de los anticuerpos en células eucarióticas, y de mayor preferencia en células huésped de mamífero, es la más preferida ya que tales células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, tienen mayor probabilidad que las células procarióticas para ensamblar y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. La expresión procariótica de genes de anticuerpo se ha reportado inefectiva para la producción de altos rendimientos de

anticuerpo activo (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Células huésped preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células que modifican la fucosilación de un anticuerpo expresado. Por ejemplo, la célula huésped puede ser una célula que carece de una enzima fucosiltransferasa de manera que la célula huésped produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos, o una célula huésped que expresa glicosil transferasas que modifican glicoproteínas de manera que los anticuerpos expresados en la célula huésped tienen estructuras incrementadas GlcNac divididas que evitan la fucosilación. Otras células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen las de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador selectivo DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para utilizarse con células de mieloma NS0, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS descrito en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando os vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen

al cultivar las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultiva la célula huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas estándar.

Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado, o un fragmento del mismo, conjugado a una porción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se refieren en la presente como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se refieren como "inmunotoxinas." Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para (por ejemplo, mata) las células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismo.

Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado caliqueamicina anticuerpo se encuentra comercialmente disponible (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citocinas pueden conjugarse a los anticuerpos de la invención utilizando tecnología de enlazador disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazador que se han utilizado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptido. Un

enlazador puede elegirse para que sea, por ejemplo, susceptible a la escisión por bajo pH dentro del compartimento lisosomal o susceptible a la escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas de preferencia en tejido tumoral tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

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

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse a un isótopo radiactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, referidos también como radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse a anticuerpos para utilizarse de manera diagnóstica o terapéutica incluyen, pero no se limitan a, yodo^{131}, indio^{111}, itrio^{90} y lutecio^{177}. El método para preparar radioinmunoconjugados se establece en la técnica. Ejemplos de radioinmunoconjugados se encuentran comercialmente disponibles, incluyendo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y

Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y métodos similares pueden utilizarse para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpos de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y la porción del fármaco no debe interpretarse como limitada a los agentes terapéuticos típicos clásicos. Por ejemplo, la porción del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-γ; o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoncinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos, u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tal porción terapéutica a anticuerpos se conocen bien, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies Y 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 Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological Y Clinical Applications, Pinchera *et al. (eds.)*, pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, Y Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection Y Therapy, Baldwin *et al. (eds.)*, pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation Y Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o una o unas porciones de unión-antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, do o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (inmunoconjugados) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno objetivo o que tienen actividad complementaria.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación pueden incluir un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado de la presente invención combinado con por lo menos otro agente anti-neoplásico, anti-inflamatorio, o inmunosupresor. Tales agentes terapéuticos incluyen entre otros, fármacos anti-inflamatorios esteroidales y no esteroidales (NSAIDS), por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, tales como ibuprofeno (Motrin, Advil), naproxeno (Naprosyn), sulindaco (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), cetoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolaco (Lodine), oxaprozin (Daypro), indometacina (Indocin), y aspirina en altas dosis. Otros ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en terapia de combinación se describen en mayor detalle en lo siguiente, en la sección de usos de los anticuerpos de la invención.

Como se utiliza en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera o todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifungales, agentes de retardamiento isotónicos y de absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. De preferencia, 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, es decir, anticuerpo o inmunoconjugado, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto progenitor y no imparte ningunos efectos toxicológicos indeseados (véase 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. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodihídrico, fosforoso y similares, así como también de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos, sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición básica incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-

dibenziltilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una composición farmacéutica de la invención puede también incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidamente solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamino tetra-acético, (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol,, polioles (tales como glicero, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, de uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones pueden también contener adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse por procedimientos de esterilización, *supra*, y por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifungales, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico, y similares. Puede también ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares de las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión inyectable estéril. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto a tal lado que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención se contemplan. Compuestos activos suplementarios pueden también incorporarse en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación

y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración del fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, poli-alcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada en la composición inyectable puede realizarse al incluir en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Soluciones inyectables estériles pueden prepararse al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en lo anterior, como se requiera, seguido por microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de

aquellos enumerados en lo anterior. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son, secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada estéril de los mismos.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se trata,, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una sola forma de dosificación generalmente será aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, fuera del cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0.01 a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, de preferencia de aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, de mayor preferencia de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un solo bolo puede

administrarse, varias dosis divididas pueden administrarse durante el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración, y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente dispuestas, adecuadas como dosificaciones unitarias para os sujetos que se tratarán; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención se dicta por y depende por (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se logrará, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para combinar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0.01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hueso. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ó 10 mg/kg de peso corporal o dentro

del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses y una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal ó 3 mg/kg de peso corporal vía administración intravenosa, con el anticuerpo que se da utilizando uno de los siguientes calendarios de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran de manera simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo usualmente se administra en ocasiones múltiples. Los intervalos entre dosificaciones sencillas pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos pueden ser también irregulares como se indica al medir niveles de sangre del anticuerpo para el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración plasmática de

anticuerpo de aproximadamente 1-1000 μg /ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 μg /ml.

Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación prolongada, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo si el tratamiento el profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos se requiere algunas veces hasta que el progreso de la enfermedad se reduzca o se termine, y de preferencia hasta que el paciente muestre mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. En lo sucesivo, el paciente puede administrarse por un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación actuales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse, de manera que se obtenga

una cantidad de ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para una paciente, composición y modo de administración particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una serie de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal, o amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente que se trata, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-PSMA de la invención de preferencia resulta en una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y duración de los periodos libres de síntomas de enfermedad, o una prevención del deterioro y discapacidad debidos a la aflicción de la enfermedad.. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores cancerosos, una "dosificación terapéuticamente efectiva" de preferencia inhibe el crecimiento celular o crecimiento tumoral en por lo menos aproximadamente 20%, de más

preferencia por lo menos aproximadamente 40%, aun de más preferencia por lo menos aproximadamente 60%, y aún de más preferencia por lo menos aproximadamente 80% con relación a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esa propiedad de una composición puede evaluarse al examinar la capacidad del compuesto para inhibir, la inhibición *in vitro* por ensayos conocidos para el profesional experto. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de otra manera mejorar los síntomas en un sujeto. Alguien con experiencia ordinaria en la técnica debe ser capaz de determinar tales cantidades con base en factores tales como la talla del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición de o ruta de administración particular seleccionadas.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una o más rutas de administración utilizando uno o más de una serie de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el técnico experto, la ruta y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas preferidas de administración para los anticuerpos de la invención incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea

espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se utiliza en la presente significa modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye sin limitación inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e inyección intraesternal e infusión.

Alternativamente, un anticuerpo desfucosilado de la invención puede administrarse mediante una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópicamente.

Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Polímeros biodegradables biocompatibles pueden utilizarse, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones se patentan o en general

se conocen por aquellos con experiencia en la técnica. *Véase*, por ejemplo, Sustained y Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica, por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; ó 4,596,556. Ejemplos de implantes y modelos bien conocidos útiles en la presente incluyen: Patente Norteamericana No. 4,487,603, que describe una bomba de micro-infusión implantable para distribuir médicamente a una velocidad controlada; Patente Norteamericana No. 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente Norteamericana No. 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar médicamente a una velocidad de infusión precisa; Patente Norteamericana No. 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro continuo de fármaco; Patente Norteamericana No. 4,439,196, que describe un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimientos de cámara múltiple; y

Patente Norteamericana No. 4,475,196, que describe un sistema de suministro de fármaco osmótico. Estas patentes se incorporan en la presente para referencia. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos se conocen por aquellos con experiencia en la técnica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos desfucosilados de la invención pueden formularse para asegurar distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), puedan formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan de manera selectiva en células u órganos específicos, de esta manera intensifican el suministro de fármaco dirigido (*véase,* por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. *Clin. Pharmacol.* 29:685). Opciones de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, Patente Norteamericana 5,416,016 para Low *et al.)*; manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBSLett.* 357:140;. M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptores de proteína A tensioactiva (Briscoe *et al.* (1995)

Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBSLett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y Métodos de la Invención

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

Rutas adecuadas para la administración de las

composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo o inmunoconjugado) de la invención *in vivo e in vitro* se conocen bien en la técnica y pueden seleccionarse por aquellos con experiencia ordinaria. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Dosificaciones adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

En una modalidad, los anticuerpos de la invención pueden probarse inicialmente para actividad de unión asociada con uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden probarse utilizando ensayos de ELISA y citometría de flujo. Además, la actividad de estas moléculas en el inicio de por lo menos una actividad de célula efectora mediada por efector incluyendo la inhibición del crecimiento de y/o eliminación de células que expresan PSM pueden ensayarse. Protocolos para ensayar la ADCC mediada por célula efectora se describen en los Ejemplos a continuación.

A. Métodos de Detección

En una modalidad, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para detectar niveles de PSMA, o niveles de células que contienen PSMA en su superficie membranal, cuyos

niveles pueden entonces asociarse con ciertos síntomas de enfermedad.

En una modalidad particular, la invención proporciona métodos para detectar la presencia de PSMA en una muestra, o mediar la cantidad de PSMA en la superficie de células, que comprende contactar la muestra, y una muestra control, con un anticuerpo desfucosilado, o una porción de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a 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 entonces, en donde una diferencia en la formación del complejo entre la muestra comparada con la muestra control es indicativo de la presencia de PSMA en a muestra. Por ejemplo, métodos de detección estándar, bien conocidos en la técnica, tales como ensayos de ELISA y citometría de flujo pueden realizarse utilizando las composiciones de la invención.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención además proporciona métodos para detectar la presencia de PSMA (por ejemplo, PSMA humano) en una muestra, o medir la cantidad de PSMA, que comprende contactar la muestra, y una muestra control, con un anticuerpo de la invención, o una porción de unión de antígeno del mismo, que se une específicamente a PSMA, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del

mismo y PSMA. La formación de un complejo entonces se detecta, en donde la diferencia en la formación del complejo entre la muestra comparada con la muestra control es indicativo de la presencia de PSMA en la muestra.

Las composiciones de la invención pueden también utilizarse para dirigirse a células que expresan PSMA, por ejemplo, para etiquetar tales células. Para tal uso, el agente de unión puede enlazarse a una molécula que pueda detectarse. De esta manera, la invención proporciona métodos para localizar células que expresan PSMA *ex vivo* o *in vitro*. La etiqueta detectable puede ser, por ejemplo, a radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

B. Inhibición de Crecimiento de Células PSMA+

Los anticuerpos pueden utilizarse para inhibir el crecimiento de células que expresan PSMA lo cual, a su vez, puede asociarse a la prevención o mejoría de ciertos síntomas de enfermedad asociados con la expresión de PSMA. Diferencias en la expresión de PSMA durante una condición de enfermedad en comparación con una condición de no enfermedad pueden determinarse al contactar una muestra de prueba de un sujeto que adolece de la enfermedad y una muestra control con el anticuerpo anti-PSMA bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y PSMA.

Cualesquiera complejos formados entre el anticuerpo y PSMA se detectan y comparan en la muestra y el control.

Por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse para obtener, *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: para inhibir el crecimiento de y/o eliminar una célula que expresa PSMA; para mediar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa PSMA en la presencia de células efectoras humanas; para inhibir la secreción de PSMA soluble. Como se discute en la presente, los anticuerpos desfucosilados de la invención exhiben actividad ADCC intensificada en comparación con la forma fucosilada del anticuerpo.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de células $PSMA^+$ que comprende contactar las celdas con un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado bajo condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células. Las células pueden ser, por ejemplo, células tumorales. En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-PSMA es un anticuerpo humano.

En una modalidad, los anticuerpos, o porciones de unión de los mismos de la presente invención pueden utilizarse para modular niveles de PSMA en las células objetivo, tal como por bloqueo y eliminación de receptores en la superficie celular. Mezclas de anticuerpos anti-receptor

de Fc pueden también utilizarse para este propósito.

Células efectoras específicas de objetivo, por ejemplo, células efectoras enlazadas a composiciones de la invención pueden también utilizarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras para el direccionamiento pueden ser leucocitos humanos, tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células que llevan receptor IgG- o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse del sujeto que se tratará. Las células efectoras específicas de objetivo, pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administrado puede estar en el orden de 10^8-10^9 pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener localización en la célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral que expresa PSMA, y para efectuar la eliminación de la célula por, por ejemplo, fagocitosis. Las rutas de administración pueden variar también.

La terapia con células efectoras específicas de objetivo puede realizarse en conjunto con otras técnicas para la remoción de células objetivo. Por ejemplo, terapia anti-tumoral utilizando las composiciones de la invención y/o células efectoras armadas con esas composiciones pueden utilizarse en conjunto con la quimioterapia. Adicionalmente,

inmunoterapia de combinación puede utilizarse para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de la célula tumoral.

C. Uso de Inmunoconjugados y Terapia de Combinación

En una modalidad, los inmunoconjugados de la invención pueden utilizarse para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, etiquetas, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen moléculas de superficie celular de PSMA al enlazar tales compuestos al anticuerpo. De esta manera, la invención también proporciona métodos para localizar células que expresan PSMA *ex vivo* o *in vitro* (por ejemplo, con una etiqueta detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático). Alternativamente, los inmunoconjugados pueden utilizarse para eliminar células que tienen receptores de superficie celular de PSMA al dirigir citotoxinas o radiotoxinas a PSMA, tal como a células tumorales que expresan PSMA para eliminar por consiguiente la célula tumoral.

En otras modalidades, el sujeto puede adicionalmente tratarse con un agente que modula, por ejemplo, intensifica o inhibe, la expresión de la actividad de Fcγ o receptores de Fcγ, por ejemplo, al tratar al sujeto con una citocina. Citocinas preferidas para la administración

durante el tratamiento incluyen del factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón-γ (IFN-γ), y factor de necrosis tumoral.

En otra modalidad, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención pueden adicionalmente administrarse (previo a, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que intensifica o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos. El anticuerpo puede enlazarse al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En el ultimo caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o de manera concurrente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti,-cáncer, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-neoplásicos tales como doxorubicina, (adriamicina), sulfato de cisplatina bleomicina, carmustina, clorambucil y ciclofosfamida hidroxiurea que, por sí mismos, sólo son efectivos a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. La cisplatina se administra de manera intravenosa como una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas y la diamicina se administra de manera intravenosa como una dosis

a 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos anti-PSMA, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporcionan dos agentes anti-cancerosos que operan mediante mecanismos diferentes lo cual produce un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Tal coadministración puede resolver problemas debidos a desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que podría volverlas no reactivas con el anticuerpo.

D. Tratamiento de Cáncer

Se ha mostrado que el PSMA se expresa en células tumorales, tales como células tumorales de carcinoma prostático y también se ha mostrado que se expresa en células endoteliales vasculares próximas a las células cancerosas, tales como células cancerosas uroteliales, células cancerosas de colon, células cancerosas rectales, células cancerosas pulmonares, células cancerosas de mama y células cancerosas de adenocarcinoma metastático del hígado (véase Patente Norteamericana No.6,136,311). Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para tratar cáncer al inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan PSMA o al inhibir el crecimiento de células endoteliales vasculares próximas a las células tumorales. De

esta manera, en otra modalidad, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, en donde las células del tumor o células endoteliales vasculares próximas al tumor son $PSMA^+$, en las cuales un anticuerpo anti-PSMA desfucosilado de la invención se administra al sujeto de manera que el crecimiento del tumor se inhibe. Para sujetos humanos, el anticuerpo de preferencia es un anticuerpo humanizado o humano. En una modalidad preferida, las células tumorales son células tumorales de próstata. En otras modalidades, las células son de cánceres tales como de colon, renal, rectal, urotelial, de mama, de vejiga, de hígado, de páncreas o melanoma.

Los métodos de tratamiento de la invención involucran administrar a un sujeto una composición de anticuerpos de la presente invención en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el trastorno. La composición de anticuerpos puede administrarse sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico (conjugado a o administrado con el anticuerpo) que actúa en conjunto con o de manera sinergística con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir la enfermedad asociada con la expresión de PSMA.

Equipos

También dentro del alcance de la invención se

encuentran equipos que comprenden un anticuerpo de la invención e instrucciones para uso. El equipo puede además comprender uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunoestimulador, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tenga una actividad complementaria que se une a un epítopo en el antígeno PSMA distinto del primer anticuerpo). Los equipos típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del equipo. El término etiqueta incluye cualquier escritura, o material registrado suministrado en o con el equipo, o que de otra manera acompaña al equipo.

La presente invención además se ilustra por los siguientes ejemplos que no deben interpretarse además como limitantes. Los contenidos de todas las figuras y todas las referencias, patentes, y solicitudes de patente publicadas en toda esta solicitud se incorporan expresamente en la presente para referencia.

Ejemplo 1 : Expresión de Anticuerpo Monoclonal Anti-PSMA en Huevos de Gallinas Quiméricas

En este ejemplo, la expresión del anticuerpo monoclonal humano anti-PSMA, 7F12, en los huevos de gallinas quiméricas se describe. Metodologías generales para expresar proteínas, que incluyen anticuerpos, en los huevos de

gallinas quiméricas se describen en la Publicación PCT WO 2004/015123, los contenidos de la cual se incorporan expresamente en la presente para referencia. Información adicional con respecto a la expresión de anticuerpos en huevos de gallinas quiméricas se describe en la Solicitud Norteamericana No. de Serie 11/062,325, titulada "Expresión de Anticuerpos Específicos de Tejido en Gallinas, presentada el 18 de febrero de 2005, los contenidos de la cual se incorporan expresamente en la presente para referencia.

En el siguiente ejemplo, un transgen que contiene una secuencia reguladora de clara de huevo endógena que comprende un promotor junto con genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina exógena se construyen para producir expresión de anticuerpos específica de tejido en las células glandulares tubulares del oviducto. La molécula del anticuerpo expresada de esta manera se deposita entonces en la clara de huevo de una gallina transgénica. En esta modalidad, los anticuerpos codificados por cualquier gen de inmunoglobulina reacomodados se expresan específicamente en el tejido que comprende las células glandulares tubulares de la región del magno del oviducto y pueden aislarse de las claras de los huevos. Los genes de inmunoglobulina reacomodados que codifican el anticuerpo monoclonal se expresan preferencialmente en el oviducto a la exclusión sustancial de la expresión en otros tejidos, aunque la

expresión en otros tejidos puede existir por arriba de niveles detectables.

Construcciones transgénicas preferidas para construcciones de anticuerpos monoclonales derivados de ovoalbúminas se muestran en la Figura 12. Estas construcciones transgénicas, designadas Ov7.5 y Ov15, tienen aproximadamente 7.5 kb y 15 kb, respectivamente, del promotor de ovoalbúmina que flanquea la adhesión codificante de MAb en la secuencia del extremo 5' y 15 kb de la secuencia 3' del promotor de la región codificante. Las regiones codificantes comprenden las regiones variables para la cadena ligera y cadena pesada, secuencias de intrones J-C, la región constante de cadena ligera kappa, una secuencia IRES y las regiones constantes de cadena pesada y su tipo 1. El extremo 3' de la construcción comprende un gen GFP y una marcador selectivo, en este caso un gen de resistencia a puromicina dirigido por el promotor CX. Las longitudes de la secuencia del promotor de ovoalbúmina en 3' y 5' de la región codificante del anticuerpo monoclonal son ejemplos solamente y construcciones análogas pueden incluir 25-100 kb o más de la secuencia 5' así como también longitudes diversas en la secuencia 3'. Aquellos con experiencia ordinaria en la técnica apreciarán que el marcador GFP se presenta sólo para detección en especímenes fisiológicos y puede eliminarse sin apartarse de la utilidad del transgen. El marcador de

resistencia a puromicina puede sustituirse con cualquier marcador que proporcione la capacidad de seleccionar células troncales embrionarias que se transformen exitosamente con el transgen. Varios tipos de marcador selectivo análogo son bien conocidos en la técnica y pueden utilizarse esencialmente de manera intercambiable con el gen de resistencia a puromicina de esta modalidad.

El transgen utilizado para expresión del mAb 7F12 anti-PSMA humano se refirió como Ovl5mAb7F12 e incluye 15 kb de las secuencias reguladoras 5' del promotor de ovoalbúmina. Adicionalmente, el péptido señal se unió directamente a VL para evitar su remoción durante el procesamiento del ARNm. Líneas celulares cES femeninas recién derivadas (preparadas como se describe en la Publicación PCT WO 2004/015123) se utilizaron de manera que quimeras de alto grado pudieran producir huevos. El vector Ov15MAb7F12 se transfectó en una línea celular cES femenina y los clones transfectadas estables se tamizaron por PCR. Un clon (OVH) se analizó adicionalmente por transferencia Southern blot. Se mostró que sólo una copia transgen Ov15MAb7F12 se integró en el genoma de cES y que el transgen contenía por lo menos 10 kb de la secuencias promotoras Ov 5'.

Las gallinas quiméricas se elaboraron a partir del clon OVH para análisis del transgen. Diez gallinas quiméricas se utilizaron para inducción temprana con estrógenos. Áreas

derivadas de cES donante (GFP positiva) de diversos tejidos incluyendo la porción del magno del oviducto, músculo, cerebro, hígado e intestino se recolectaron. RT-PCR con cebadores específicos para cadenas L y H se utilizó para monitorear la expresión del transgen.. Los transcritos de cadena L y H se detectaron en el magno pero no en muestras de músculo, cerebro e hígado a partir de 3 de 4 gallinas inducidas (OV15-34, OV15-76 y OV15-83). Sin embargo, expresión de bajo nivel se detectó también en íleo, ciego y colon. Inmunohistoquímica de secciones a partir de magnos inducidos con estrógenos confirmaron la expresión del anticuerpo monoclonal en células glandulares tubulares positivas GFP pero no en células epiteliales positivas GFP. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el vector Ov15MAb7F12 dirigió la expresión del transgen en células glandulares tubulares del oviducto. La expresión ectópica de bajo nivel detectada en el intestino sugiere que 15 Kb de las secuencias reguladoras 5' de Ov pueden no ser suficientes para conferir expresión específica de tejido de posición independiente del transgen.

Sesenta y nueve quimeras se generaron a partir de las células OVH cES que llevan el Ov15MAb7F12 para evaluar la deposición del Mab completamente humano en los huevos. Treinta gallinas quiméricas se criaron hasta la madurez sexual y comenzaron a ovopositar. Los huevos de todas las

gallinas contenían MAb en su clara de huevo según se indica por análisis de ELISA. La concentración y cantidad de MAb en los huevos varió entre las gallinas quiméricas, presumiblemente debido al grado variable de quimerismo en el magno. Ocho gallinas quiméricas pusieron huevos que contenían más de 1 mg de Mab por huevo y el nivel máximo entre las 30 quimeras fue 3.4 mg de Mab por huevo. Cuatro gallinas quiméricas pusieron huevos cuyo nivel medio de MAb fue de entre 1.2 y 1.6 mg por huevo. Seis gallinas quiméricas pusieron huevos cuyo nivel medio de Mab fue de entre 0.5 y 1.0 mg por huevo.

La presencia de of MAb en la clara de huevo se analizó además por transferencia western con una IgG anti-humana de conejo (H+L) que reconoce las cadenas H y L. La clara de huevo de una gallina White Leghorn no quimérica tipo silvestre se utilizó como control negativo. IgG1 humana purificada, *k* (Sigma) se utilizó como el estándar de referencia. Las cadenas L y H de longitud completa se detectaron en muestras de clara de huevo de cinco gallinas quiméricas (OV15-17, OV15-29, Ov15-71, OV16-34 y OV16-42). H_2L_2 completamente ensamblado se observó también, aunque pequeñas cantidades de intermediarios de ensamble estuvieron también presentes.

Para determinar la variación de la concentración de MAb depositada en la clara de huevo, huevos de 5 diferentes

gallinas quiméricas (OV16-34, OV16-42, OV17-29, OV17-52 y OV17-83) se monitorearon durante un periodo de 3-4 meses. En 3 gallinas, la cantidad de Mab tuvo un pico durante las primeras semanas, y entonces cayó aproximadamente dos veces y permaneció estable durante los siguientes cinco meses. En dos gallinas, el nivel de expresión permaneció relativamente estable durante el curso del tiempo. Si no todas las glándulas tubulares secretan y depositan la proteína ovoalbúmina a medida que el huevo pasa a través de la porción del magno del oviducto, la cantidad de Mab depositada en la clara de huevo puede variar a medida que cada huevo pasa a través del magno debido a la naturaleza quimérica de las glándulas tubulares en estas gallinas.

Muestras sanguíneas de 26 quiméricas y una gallina Barred Plymouth Rock (BPR) (control negativo) se analizaron por ELISA para la presencia de IgG humana. Dieciocho gallinas tuvieron niveles detectables de Mab en la sangre con la concentración más alta de 39 ng/ml observado en la gallina OV17-83. El coeficiente de correlación (r) entre el nivel de MAb en la sangre y la concentración de Mab en la clara de huevo fue de 0.67. Sin embargo, esta comparación fue complicada por el hecho de que el grado de quimerismo en diferentes tejidos puede variar significativamente. Por ejemplo, la gallina OV17-122 tuvo muy poco MAb en el huevo (0.02 mg/huevo en promedio) pero tuvo la segunda

concentración más alta de Mab en la sangre (36 ng/ml). Se especula que la presencia de MAb en la sangre puede no ser una consecuencia de fuga de la expresión en el oviducto sino que refleja la expresión ectópica (por ejemplo, el intestino donde la expresión ectópica se detectó por RT-PCR en quimeras inducidas con estrógenos).

Ejemplo 2: Purificación y Caracterización de Proteína del Producto de Anticuerpo

El MAb 7F12 se purificó a partir de clara de huevo como sigue. La clara de huevo se mezcló primero a una baja velocidad de corte durante 30 minutos a temperatura ambiente y después la ovomucina se precipitó por un método conocido en la técnica. Un volumen de suspensión homogenizada de clara de huevo se agregó a tres volúmenes de agua de ósmosis inversa y se agitó durante 30 minutos. La suspensión diluida se ajustó a pH 6.0 utilizando ácido fosfórico 0.5 M y después se centrifugó durante 20 minutos a 12,100g. Aproximadamente 3% de la proteína de clara de huevo que contenía en su mayor parte ovomucina se eliminó por este método. El sobrenadante se ajustó a pH 7.4 utilizando fosfato de sodio dibásico 0.5 M y cloruro de sodio y 150 mM en concentración con sal cristalina. La IgG humana se purificó en una columna de Proteína A-Sefarosa FF (Amersham Biosciences) a una velocidad de flujo lineal de 120 cm/h. La IgG humana absorbida se lavó

con cinco volúmenes de columna del tampón de carga (PBS, pH 7.4) y después de eluyó al utilizar ácido fosfórico 3 mM. La fracción de IgG humana se ajustó a pH 7.5 utilizando fosfato de sodio 60 mM (pH 7.5) conteniendo NaCl 230 mM para alcanzar una concentración final de 40 mM de fosfato de sodio y 150 mM de NaCl. La muestra se filtró entonces a través de un filtro para jeringa de 0.2 μm (Pall).

La mayor parte del material purificado fue una molécula de Mab completamente ensamblada con una pureza mayor que 90% (determinada por ELISA y A280). El MAb7F12 producido en gallinas se comparó en diversos ensayos con el MAb7F12 producido en cultivo celular CHO convencional, como sigue:

1. Análisis SEC-HPLC del anticuerpo

Aproximadamente 10 μg de muestra de IgG se analizó en un Waters 2795 HPLC utilizando una columna BioSep SEC S3000 de 4.6 x 300 mm (Phenomenex). La cromatografía se llevó a cabo en fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, y sulfato de sodio 0.1 M, pH 7.2 a 0.4 ml/min de velocidad de flujo durante 20 minutos. Las separaciones se monitorearon a A_{280}. Marcadores de peso molecular (Bio-Rad) se utilizaron para determinar el peso molecular aproximado. El análisis SEC-HPLC mostró que ambos tenían más de 90% de monómero IgG.

2. Análisis de secuencia de proteína Nano LC ESI MS/MS

Preparaciones de MAb (expresadas en huevo de gallina y expresadas en célula CHO) se redujeron y alquilaron, dializaron durante la noche y digirieron con tripsina durante 4 horas a 37°C en bicarbonato de amonio 25 mM (PH 8). La espectrometría de masas en tándem de ambos digeridos trípticos se realizó en un sistema Nano HPLC Dionex, Sunnyvale, CA) en interacción con la operación con un espectrómetro de masas QSTAR (MDS Sciex, Concord, Ontario, Canada) en modo de ión positivo y utilizando disociación inducida por colisión (CID) para obtener espectros en tándem. Una alícuota de 1 µl de cada muestra se inyectó y separó utilizando una columna Pepmap C18 de 75 pm de diámetro a una velocidad de flujo de 250 nl/min. La fase móvil fue solvente A (95% de agua, 5% acetonitrilo, 0.5% de ácido fórmico) y solvente B (20% de agua, 80% acetonitrilo, 0.5% de ácido fórmico). El instrumento se operó en modo de adquisición dependiente de información con ciclos de operación 7 s, registrando un espectro completo durante 2 s y después seleccionando el ión más intenso para registrar un espectro CID durante los 5 s. Los espectros se analizaron utilizando Mascot (Matrix Science, London, UK). El análisis de ambas preparaciones de Mab por los métodos descritos no mostró diferencias en secuencia dependiente del sistema de expresión.

3. Análisis LC-MS

Muestras de IgG (50 μg) en guanidina HCl 4 M se redujeron en DTT 25 mM al incubar las muestras a 60°C durante 90 min. Las muestras se alquilaron después en ácido iodoacético 45 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y la reacción se detuvo con DTT 22 mM. Previo a LC-MS las muestras se dializaron contra con 1 L de bicarbonato de amonio 25 mM y 50 μl de cada muestra se inyectó en una columna de 2.1 x 100 mm Poros R1/10 2.1 x 100 mm (Applied Biosystems) utilizando un Waters 2795 HPLC equipado con un espectrómetro de masas Micromass ZQ y se analizó en modo de ión positivo. La fase móvil fue (A) 0.1% de ácido fórmico y 0.01% de ácido trifluoroacético (TFA) y (B) 100% de CH_3CN con 0.1% de ácido fórmico y 0.01% de TFA. La elución (0.25 ml/min) se condujo por un gradiente lineal de 10-60% de (B) en (A) desarrollado durante 100 min.

El análisis de la cadena L mostró que ambas preparaciones de MAb tenían masas idénticas. (+/- 3 Da.).

4. Análisis cIEF

Muestras de IgG samples (50 μg cada una a 1.0 mg/ml) se dializaron contra agua para eliminar sales antes del análisis CE. Enfoque isoeléctrico por electroforesis capilar se realizó en un sistema P/ACE MDQ CE (Beckman) con polaridad normal, utilizando un capilar neutral eCAP de 50 μm interno (Beckman) con 30 cm de longitud efectiva. La muestra se inyectó durante 60 s por inyección a presión a 1.406

kgl/cm^2 (20 psi). La separación se llevó a cabo utilizando 15 kV durante 45 min. La temperatura del capilar fue de 20°C. El anolito fue ácido fosfórico 20 mM y el catiolito fue hidróxido de sodio 40 mM. La solución de enjuague fue ácido fosfórico 10 mM y la solución movilizadora catódica fue utilizada como se proporcionó (Beckman). Las separaciones se monitorearon a A_{280}. El análisis cIEF indicó que ambas tenían puntos isoeléctricos (pi) similares, aunque MAb7F12 derivado de CHO tuvo una heterogeneidad de carga incrementada.

5. Estabilidad térmica por calorimetría de barrido diferencial

Las estabilidades térmicas 7F12 producidas en los sistemas de expresión en la gallina y CHO se obtuvieron utilizando calorimetría de barrido diferencial (DSC) y se compararon con sus formas correspondientes que se desglicosilaron en su dominio Fc. Mediciones de calorimetría de temperaturas de fusión (T_m) se llevaron a cabo en una plataforma de microcalorímetro de barrido diferencial VP-Capilar DSC que se combina con un automuestreador (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA). El volumen celular de la muestra es 0.144 mL. Datos de desnaturalización en las formas glicosilada y desglicosilada de los anticuerpos se obtuvieron al calentar las muestras, a una concentración de 2.3 μM, de 30 a 95°C a una velocidad de 1°C/min. Las muestras de proteína se presentaron en solución salina tamponada de

fosfatos (PBS) a pH 7.4. El mismo tampón se utilizó en la celda de referencia para obtener la capacidad térmica molar por comparación. Los termogramos observados se corrigieron con la referencia y los datos normalizados se analizaron utilizando Origin v7.0.

Los perfiles sin plegar de los anticuerpos derivados de CHO y gallina, fueron bastante diferentes, mientras que los perfiles sin plegar de los anticuerpos Fc desglicosilados fueron casi idénticos. Los datos de DSC indicaron que las diferencias en las estabilidades térmicas de los Mabs derivados de CHO y gallina, se deben principalmente a los patrones de glicosilación diferentes presentes en sus respectivos dominios C_H2. De los diversos puntos de transición de fusión, el primero es crítico ya que determina la estabilidad global de los anticuerpos a temperatura menor. La T_{m1} del anticuerpo derivado de gallina se determinó de 63.8°C, mientras que la T_{m1} del anticuerpo expresado en CHO se determinó de 62.7°C. Dado que la T_{m1} del anticuerpo derivado de gallina es mayor que la T_{m1} del anticuerpo expresado en CHO, es probable que el anticuerpo derivado de gallina sea más termo-estable a temperatura ambiente.

Ejemplo 3: Análisis de Oligosacáridos de Anticuerpo Anti-PSMA Expresado en Gallina

En este ejemplo, el patrón de glicosilación del anticuerpo 7F12 expresado en huevo de gallina se analizó utilizando una diversidad de técnicas diferentes.

1. Caracterización de Oligosacáridos por CE-LIF

Los oligosacáridos se liberaron de las muestras de IgG (100 μg) por incubación durante la noche de las muestras con 12.5 mU de PNGaseF (Prozyme) a 40°C. Bajo las condiciones utilizadas, los glicanos enlazados a N de la porción Fc de HuMAbF1 expresados en células CHO y gallina se liberaron. Después de precipitación con etanol para eliminar la proteína Mab, el sobrenadante que contenía los glicanos se secó por centrifugación al vacío y se resuspendió en APTS 19 mM (Beckman) en 15% de ácido acético y cianoborohidruro de sodio 1 M en THF (Sigma). La reacción de etiquetado del glucano se dejó continuar durante la noche a 40°C seguido por dilución de 25 veces de la muestra en agua. Los glicanos etiquetas con APTS se aplicaron a electroforesis capilar fluorescencia inducida por láser en un sistema P/ACE MDQ CE (Beckman) con polaridad inversa, utilizando un capilar recubierto con N-CHO de 50 μm del diámetro interno (Beckman) con longitud efectiva de 50 cm. Las muestras se inyectaron por presión (8 sec.) y la separación se llevó a cabo a 20°C utilizando Tampón de Gel de Separación de Carbohidratos (Beckman) a 25 kV durante 20 min. Las separaciones se monitorearon utilizando un sistema de detección de fluorescencia inducida por láser (Beckman)

con un láser de ión argón de 3 mW y longitud de onda de excitación de 488 nm y emisión de 520 nm. El perfil de oligosacárido de 7F12 producido en la gallina se encontró bastante diferente de aquel de 7F12 producido en las células CHO.

2. Caracterización de oligosacáridos por MALDI Q-TOF MS

Anticuerpos purificados (100 μg cada uno a 1.0 mg/ml) se trataron con 4 μl de PNGaseF, una endoglucosidasa que escinde de carbohidratos unidos a N (Prozyme). La muestras se incubaron a 37°C durante la noche seguidas por diálisis durante la noche contra bicarbonato de amonio 50 mM. La proteína se eliminó por precipitación con etanol. Los carbohidratos liberados se desalaron en la columna de microcarbono de Glygen Corp. (Columbia, MD) siguiendo esencialmente el protocolo del vendedor, pero el volumen de elusión se redujo a 5 μl. Una alícuota de 1 μl para cada muestra del glucano se mezcló 1:1 (v:v) cn solución de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico o ácido 2,5 dihidroxibenzoico (Applied Biosystems), en manchas sobre una placa objetivo de MALDI y dejadas secar al aire. Análisis en tandem de MALDI-Q-TOF se utilizaron para realizar el análisis de glicoconjugados intactos. Todos los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas QSTAR pulsar i equipado con una fuente 2 o-MALDI (MDS Sciex, Concord,

Ontario, Canada), que proporciona la masa (composición) de clases de carbohidratos. Después del perfilado de glicanos de ambos MAb, se investigó el posible enlace glucosílico en cada glucano. Cada espectro de masas CID se registro en un analizador 4700 Proteomics con una óptica TOF/ToF (Applied Biosystems, Forster City, CA). Para experimentos de alta CID MSMS, la energía de colisión se estableció a 1. Dentro de la celda de colisión, los iones de oligosacáridos seleccionados se hicieron colisionar con argón a una presión de 0.000266644 Pa (2×10^{-6} Torr).

La composición de carbohidratos y posibles enlaces glicosílicos de once glicanos principales en 7F12 derivado de gallina analizados por espectrometría de masas MALDI TOF se resumen en las Figuras 13A y 13B. Se encontró que las estructuras de oligosacáridos contenían altos glicanos N tipo manosa, tipo complejo y tipo híbrido. Ninguna de las estructuras contenía residuos fucosilo.

3. Análisis de monosacáridos por HPLC con HPAE-DAD

Muestras de IgG samples (200 μg) se sujetaron a hidrólisis ácida utilizando TFA 2 N (para estimar azúcares neutrales) o HCl 6 N (para estimar aminoazúcares) a 100°C durante 4 h. Las muestras se secaron por centrifugación al vacío a temperatura ambiente y se reconstituyeron en 200 μl de agua previo al análisis por HPAE-PAD (Dionex). Los

monosacáridos se separaron utilizando una columna de 4 x 250 mm CarboPac PA 10 4 con Amino Trap y Borato Trap (Dionex) de pre-columna. Los procedimientos se siguieron de acuerdo con la Nota Técnica 53 Dionex. La identidad de pico y abundancia relativa de monosacáridos se determinaron utilizando marcadores de monosacáridos (Dionex).

El análisis de monosacáridos de 7F12 producido en gallina y en CHO se resume en la Tabla 1 en lo siguiente.

Tabla 1: Análisis de Monosacáridos de MAb 7F12 producido en gallina y en CHO.

Monosacárido	MAb de CHO pmol (% total)	MAb de gallina pmol (% total)
Fucosa	692 (18)	0
Glucosamina	1,536 (40)	1,571 (52)
Galactosa	671 (17)	43 (1)
Manosa	940 (25)	1,513 (47)
Total	3,839 (100)	3,127 (100)

El análisis de monosacáridos reveló una diferencia en composición de carbohidratos y mostró la presencia de residuos de N-acetil glucosamina, residuos de manosa, y muy bajo contenido de residuos de galactosa en 7F12 producidos en gallina. No se detectaron residuos de fucosa en 7F12 producidos en gallina, en contraste con la preparación del anticuerpo expresado en CHO que contenía residuos fucosilo.

El análisis de exoglucosidasa de los glicanos por CE y espectrometría de masas para identificar los residuos de azúcar terminales confirmó la ausencia de residuos de ácido sialico y fucosa terminales en MAb7F12 producidos en células glandulares tubulares de gallina.

En resumen, las diferencias más notables en los perfiles de oligosacáridos enlazados a N fueron la presencia de N-glicanos tipo manosa, la ausencia de fucosa y el muy bajo contenido de residuos de galactosa en el anticuerpo producido en la gallina.

Ejemplo 4: Análisis Funcional de Anticuerpo Anti-PSMA Expresado en Gallina

En este ejemplo, las propiedades funcionales del anticuerpo anti-PSMA 7F12 expresado en huevo de gallina se examinaron, incluyendo afinidad de unión, internación, vida media sérica *in vivo* y actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

1. Afinidad de Unión para PSMA

PSMA en células LNCaP (ATCC CRL-1740) se utilizó como antígeno para el ensayo para unión a anticuerpo por citometría de flujo. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, y piruvato de sodio 1 mM. La propiedad de unión a antígeno de 7F12 producido en células glandulares tubulares

de gallina se comparó con aquella de 7F12 producida en células CHO. 200,000 células/pozo se incubaron por duplicado durante 30 minutos con alícuotas de 50 µl de anticuerpo a varias concentraciones. Las células se lavaron dos veces antes de la adición de anticuerpo etiquetado con PE anti-IgG humana de cabra (Jackson ImmunoResearch) a dilución 1:200, 50 µl/pozo durante 30 minutos 4°C. Las células se lavaron dos veces en PBS con 1% de BSA y se realizó ensayo por FACS. Los valores de EC_{50} de la unión de MAb a PSMA en células LNCaP se determinaron a partir de curvas de unión utilizando GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software).

Ambas preparaciones de anticuerpos produjeron curvas de unión casi idénticas a PSMA expresadas en células LNCaP con valores de EC_{50} similares. Los datos demostraron que mientras los anticuerpos derivados de gallina y derivados de CHO glucosidan de manera diferente, reconocen y se unen al antígeno de manera equivalente.

2. Internación de Anticuerpos

La unión del 7F12 mAb a PSMA conduce a la internación del anticuerpo. En una aplicación potencial, el MAb puede conjugarse con citotoxinas a fin de dirigirse a y destruir las células tumorales que expresan PSMA. La internación del anticuerpo que se une a PSMA en células LNCaP se determinó al incubar las células con MAb y Hum-Zap (Advanced Targeting Systems). HumZap es un anticuerpo anti-

IgG humana de cabra conjugado a la proteína de inactivación de ribosoma, saporina. Las células se eliminan cuando el complejo 7F12 MAb/Hum-Zap se une a PSMA en la superficie celular y se interna mientras que el anticuerpo o Hum-Zap solo no es tóxico para las células LNCaP. Las células LNCaP (10,000/pozo) se incubaron por triplicado durante 48 horas, a 37°C, en 150 μl de medio de cultivo que contenía 300 ng de Hum-Zap, y 300 ng de 7F12 MAb, o MAb control. La proliferación y supervivencia se determinaron celular con el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo (Promega). Los ensayos de internación se hicieron también al incubar diluciones de anticuerpo en medio de cultivo celular con 10,000 células LNCaP adherentes/pozo, durante 2 horas a 4°C. Las soluciones de anticuerpo se eliminaron suavemente y se reemplazaron con 150 μl de medio que contenía 200 ng de HumZap. La viabilidad celular se determinó después de 48 horas de incubación a 37°C. Los valores de EC_{50} para la internación de anticuerpos se determinaron gráficamente con Prism 3.0 (GraphPad Software).

Las preparaciones de anticuerpos expresados en gallina y los expresados en CHO se internaron con una eficiencia similar. Cuando se probaron con un intervalo de concentraciones de anticuerpos, los valores de EC_{50} para la internación de 7F12 MAb derivado de gallina y derivado de CHO fueron de 0.49 nM.

3. Vida Media *In Vivo*

La vida media *in vivo* del 7F12 MAb producido en gallina se analizó en paralelo con el anticuerpo producido en CHO en ratones BALB/c por inyección intravenosa de anticuerpos radioetiquetados. Diez μg de proteína MAb se iodinaron ligeramente (menos de un I por anticuerpo) con ^{125}I utilizando el método Iodobead method (Pierce). Ratones BALB/c hembras de seis semanas de edad (Taconic Farms, Germantown, NY) se administraron con 0.1 mg/ml ioduro de potasio en su agua de bebida durante una semana previa al experimento. Cuatro ratos por proteína se inyectaron de manera intravenosa en la vena caudal con aproximadamente 600,000 cpm de MAb etiquetado y la radioactividad corporal completa se midió en tiempos seleccionados utilizando un contador de gamma de cuerpo completo (detector de cristal de NaI Wm. B. Jonson con un contador de impulsos Ludlum scaler). La vida media se calculó por análisis de regresión exponencial de la radioactividad residual.

El 7F12 MAb producido por células glandulares tubulares de gallina se depuró con una vida media ($t_{1/2}$) de 102.4± 0.9 horas, mientras el 7F12 MAb producido por células CHO se depuró más lentamente con una vida media de 207.5+18.3 horas.

4. Actividad ADCC

Células LNCaP-C42B se probaron en un ensayo ADCC

^{51}Cr modificado. Células mononucleares de sangre periférica humana se purificaron a partir de sangre completa heparinizada por separación estándar de Ficoll-paque. Las células se resuspendieron (a $1x10^6$ células/ml) en medio RPMI1640 que contenía 10% de FBS y 10 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante la noche a 37°C. Al siguiente día, las células se recolectaron y lavaron una vez en medio de cultivo y se resuspendieron a 2 x 10^7 células/ml. Dos millones de células LNCaP-C42b objetivo se incubaron con 200 μCi de ^{51}Cr en 1 ml de volumen total durante 1 hora a 37°C. Las células objetivo se lavaron una vez, se resuspendieron en 1 ml de medio, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos adicionales. Después de la incubación final, las células objetivo se lavaron una vez y se llevaron a un volumen final de $1x10^5$ células/ml. Para el ensayo de ADCC final, 100 μl de células LNCaP etiquetadas se incubaron con 50 μl de células efectoras y 50 μl de anticuerpos. Se seleccionó la proporción final objetivo a efectora de 1:100. En todos los estudios, el control de isotipo de IgG1 humana se corrió y se compararó con el anticuerpo 7F12 anti-PSMA derivado de CHO. Otros controles que se incluyeron fueron: a) células objetivo y efectoras pero no anticuerpo, b) células objetivo sin células efectoras y c) células objetivo y efectoras en la presencia de 3% de Triton X-100. Después de 4 horas de incubación a 37°C, los sobrenadantes se recolectaron y contaron en un

Contador gamma (Cobra II auto-gamma de Packard Instruments) con una ventana de lectura de 240-400 keV. Los conteos por minuto se graficaron como una función de la concentración de anticuerpo y los datos se analizaron por regresión no lineal, respuesta de dosis sigmoidea (pendiente variable) utilizando el software Prism software (San Diego, CA). El porcentaje de lisis se determinó por la siguiente ecuación:

% Lisis = (CPM de Muestra - CPM Sin anticuerpo)/CPM de TritonX - CPM Sin anticuerpo) X 100

Se encontró que es importante que los valores de EC_{50} y de % de Lisis se monitoreen en todos los estudios. Por ejemplo, es posible cuando se comparan dos anticuerpos tener un cambio ya sea en la EC_{50} o % lisis o en ambos.

Los resultados de dos experimentos de ADCC diferentes se muestran en la Figura 14A (células efectoras estimuladas con IL-2) y en la Figura 14B (células efectoras de sangre periférica humana fresca). La Figura 14A muestra que el MAb derivado de CHO induce lisis celular dependiente de dosis que alcanzó una meseta a 38% de lisis con una EC_{50} de 0.11 μg/ml con células efectoras estimuladas con IL-2. En contraste, el MAb derivado de huevo de gallina fue más potente y más eficaz. El % de lisis máximo del MAb derivado de huevo de gallina fue de 60% con dos preparaciones

diferentes del anticuerpo. La potencia intensificada sobre el MAb derivado de CHO se demostró también, ya que la EC_{50} de este material fue de 0.018 μg/ml. Esto es, la EC_{50} para el anticuerpo expresado en gallina fue aproximadamente seis veces menor que la EC_{50} para el anticuerpo expresado en CHO. Finalmente, como se esperaba, el anticuerpo de control de isotipo no indujo lisis celular. La ADCC con células efectoras no estimulados (PBMC frescas) mostró una diferencia mayor en los valores de EC_{50}, pero eliminación celular global menor (Figura 14B).

CD16 (FcγRIII) es un receptor clave que media la ADCC. La especificidad de la respuesta a ADCC se mostró al bloquear la interacción de células objetivo y efectoras utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD16. El bloque de la ADCC con anticuerpos anti-CD16 se condujo de acuerdo con el ensayo ADCC descrito en lo anterior, con las siguientes modificaciones. Las células se incubaron ya sea con 1 μl/ml (una dosis de saturación) o 0.01 μl/ml (una dosis sub-óptima) de anticuerpos anti-PSMA 7F12 (expresados en gallina o CHO) en la ausencia o presencia de 5 anticuerpos/ml de anticuerpo 3G8 anti-CD16 o anticuerpo de control de isotipo. Los resultados se muestran en la Figura 15. Un μl/ml de anticuerpo anti-PSMA en la ausencia de anticuerpo anti-CD16, indujo aproximadamente 15% y 38% de lisis con anticuerpo derivado de CHO y derivado de gallina,

respectivamente. Este % lisis se redujo a ~4% en la presencia de anticuerpo anti-CD16 mientras que el anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto.

Ejemplo 5: Preparación y Caracterización de Anticuerpo Anti-PSMA Desfucosilado en Células Huésped Negativas a FUT8

En este ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-PSMA completamente humano se expresó en una línea celular que carece de una enzima fucosil transferasa de manera que la línea celular produce proteínas que carecen de fucosa en sus carbohidratos. El anticuerpo desfucosilado se probó contra un anticuerpo anti-PSMA fucosilado (expresado en una línea celular diferente que contiene la enzima fucosil transferasa) para determinar diferencias estructurales y en características entre los anticuerpos, utilizando una diversidad de técnicas de análisis clínicos, incluyendo electroforesis capilar, comparación de secuencia de aminoácido, diferencias de masas por espectroscopia de masas y variación de carga por enfoque isoeléctrico capilar.

Se utilizó el anticuerpo 2A10 monoclonal completamente humano anti-PSMA. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la cadena pesada de 2A10 se muestran en la Figura 5A y las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la cadena ligera de 2A10 se muestran en la Figura 5B. La

secuencias variables de cadena pesada y ligera de 2A10 se subclonaron en un vector de expresión. El ADNc de región variable kappa de 2A10, incluyendo su secuencia señal y una secuencia Kozak óptima, se subclonó en marco de lectura con la región constante kappa humana. El ADNc de región variable de cadena pesada de 2A10, incluyendo su secuencia señal y una secuencia Kozak óptima, se subclonó en marco de lectura con la región constante pesada γ1 humana. Las expresiones de cadena ligera y pesada se dirigieron por el promotor SR alfa. Este vector de expresión se describe en mayor detalle en la solicitud PCT No. PCT/US2004/028954, los contenidos de la cual se incorporan expresamente en la presente para referencia.

El vector de expresión se transfectó en la línea Ms704 de células huésped $FUT8^{-/-}$ por electoporación de ADN. La línea celular Ms704 $FUT8^{-/-}$ se creó por la interrupción dirigida del gen FTO8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazo, y se describe más completamente en la Publicación de Patente Norteamericana 20040110704 por Yamane *et al.* y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22. Las células Ms704 se adaptaron al crecimiento en cultivo de suspensión en el medio de cultivo EX-CELL™ 325 PF CHO (JRH #14335) suplementado con hipoxantina 100 μM con timidina 16 μM (Invitrogen #11067-030) y L-glutamina 6 mM (Invitrogen #25030-081). El ADN vector utilizado para

incorporación se precipitó con etanol y se resuspendió en agua. 1.5 μg de ADN se utilizó para cada una de ocho electroporaciones. Las células Ms704 se prepararon para la transfección al lavar las células en una solución tamponada de sacarosa (SBS) y resuspender las células a 1 X 10^7 células/ml en solución SBS. 400 μl de célula se mezclaron con el ADN de la construcción y se electroporaron utilizando ajustes a 250 voltios, 275 microfaradays de capacitancia y 25 ohms de resistencia (electromanipulador celular BTX Molecular Delivery Systems #630). Las células se eliminaron de las celvillas de electroporación y se agregaron 20 ml de medio de cultivo. Las células se colocaron en placas en una placa de 96 pozos utilizando 200 μl de células por pozo, aproximadamente 4 X 10^4 células/pozo. 2 días después de la electroporación, 150 μl de medio se eliminaron de cada pozo y se reemplazaron con 150 μl de medio de selección, medio de cultivo con 400 μg/ml de G418 (Invitrogen #10131-035). Cada tres a siete días, 150 μl de medio de selección por pozo se reemplazaron con medio de selección fresco.

Células huésped CHO DG44 (FUT 8 +/+) se electroporaron con la construcción 2A10 idéntica utilizando un procedimiento similar y las CHO DG44 transfectantes expresando anticuerpo 2A10 recombinante que contiene carbohidratos fucosilados se establecieron.

Los clones Ms704 y CHO DG44 de más alta producción

se expandieron y el anticuerpo 2A10 recombinante se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad a proteína A.

Análisis comparativo de muestras de oligosacáridos enlazados a N derivados de Ms704 y el anticuerpo monoclonal anti-PSMA derivado de CHO DG44 se realizó por fluorescencia inducida por láser en electroforesis capilar (cLIF) (Chen y Evangelista (1998) *Electrophoresis* 15:1892). Los oligosacáridos enlazados a N del anticuerpo purificado se liberaron al agregar la péptido N-glicanasa (Prozyme) e incubaron durante la noche. La proteína se precipitó con etanol, y el sobrenadante que contenía carbohidrato se transfirió a un nuevo tubo y se secó utilizando un Speedvac. Los carbohidratos se resuspendieron y derivaron con 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonato (APTS) bajo condiciones suaves de aminación reductiva en las que la desialización y pérdida de residuos de fucosa se minimizaron. Los aductos de reacción se analizaron por electroforesis capilar con un detector de fluorescencia inducida por láser (Beckman Coulter) (Ma y Nashabeh (1999) *Anal. Checo.* 71:5185). Diferencias en el perfil de oligosacáridos se observaron entre el anticuerpo obtenido a partir de la línea celular Ms704 en comparación la línea celular CHO DG44, consistentes con una ausencia de residuos de fucosa en los anticuerpos anti-PSMA derivados de Ms704. El análisis de monosacáridos utilizando intercambio

aniónico Dionex-HPLC con detección amperométrica en impulsos confirmó que el anticuerpo expresado en Ms704 carecía de expresión de cualesquier residuos de fucosa. Los resultados se resumen en lo siguiente en la Tabla 2.

Tabla 2: Análisis de Monosacáridos de MAb 2A10 de Células FUT8-/- y FUT8 +/+

Monosacárido	FUT8 +/+ pmol (% total)	FUT8 +/+ pmol (% total
Fucosa	159 (11)	0
Glucosamina	655 (46)	645 (58)
Galactosa	52 (4)	107 (10)
Manosa	561 (39)	358 (32)
Total	1,427 (100)	1,110 (100)

Fuera de la diferencia en oligosacáridos mostrada por electroforesis capilar y análisis de monosacáridos, las muestras de proteína de anticuerpo anti-PSMA derivadas de Ms704 y CHO DG44 fueron esencialmente idénticas. Análisis de secuencia de proteína N terminal reveló una secuencia e aminoácidos N terminal idéntica. Espectrometría de masas de la cadena ligera de los anticuerpos anti-PSM derivados de Ms704 y CHO DG44 produjeron masas de 23,552 y 23,548, respectivamente, que estuvieron dentro del error del instrumento. Los anticuerpos se probaron también utilizando un equipo de enfoque isoeléctrico capilar estándar (Beckman

Coulter) y mostraron que las dos muestras de anticuerpos tenían esencialmente puntos isoeléctricos idénticos. Estos estudios indican que el componente de proteína de las muestras de anticuerpo derivados de las células Ms704 y las CHO DG44 son esencialmente idénticas con la excepción de la desfucosilación de los anticuerpos derivados de Ms704. El análisis de carbohidratos indicó que la forma desfucosilada del anticuerpo tenía más residuos de galactosa terminales que la forma fucosilada del anticuerpo.

Ejemplo 6: Valoración de la Actividad de ADCC del Anticuerpo Anti-PSMA Desfucosilado Expresado en Células huésped FUT8 Negativas

La actividad citotóxica del anticuerpo 2A10 derivado de Ms7040 (desfucosilado) contra células LNCaP-C42B (comercialmente obtenidas de ViroMed Laboratories, Minnetonka, MN) se probó en un ensayo de ADCC con ^{51}Cr modificado. Células mononucleares de sangre humana periférica se purificaron a partir de sangre completa heparinizada por separación Ficoll estándar. Las células se resuspendieron (a $1x10^6$ células/ m1) en medio in RPMI1640 que contenía 10% de FBS y 10 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, las células se recolectaron y lavaron una vez en medio de cultivo y se resuspendieron a 2 x 10^7 células/ml. Dos millones de células LNCaP-C42b objetivo

se incuban con 200 μCi ^{51}Cr en 1 ml de volumen total durante 1 hora a 37°C. Las células objetivo se lavan una vez, se resuspenden en 1 ml de medio, y se incuban a 37°C durante 30 minutos adicionales. Después de la incubación final, las células objetivo se lavan una vez y se llevan a un volumen final de $1x10^5$ células/ml. Para el ensayo de ADCC final, 100 μl de células LNCaP etiquetadas se incubaron con 50 μl de células efectoras y 50 μl de anticuerpo. Se seleccionó la proporción final objetivo a efectora de 1:100. En todos los estudios, se corrió control de isotipo de IgG1 humana y se comparó con anticuerpo 2A10 anti-PSMA derivado de CHO DG44 (fucosilado). Otros controles que se incluyeron fueron: a) células objetivo y efectoras pero sin anticuerpo, b) células objetivo sin células efectoras y c) células objetivo y efectoras en la presencia de 3% de Triton X-100. Después de 4 horas de incubación a 37°C, los sobrenadantes se recolectaron y contaron en un Contador gamma (Cobra II auto-gamma de Packard Instruments) con una ventana de lectura de 240-400 keV. Los conteos por minuto se reflejaron como una función de la concentración de anticuerpo y los datos se analizaron por regresión no lineal, respuesta de dosis sigmoidea (pendiente variable) utilizando software Prism software (San Diego, CA). El porcentaje de lisis se determinó por la siguiente ecuación:

% de Lisis = (CPM de Muestra - CPM Sin anticuerpo)/CPM DE TritonX - CPM Sin anticuerpo) X 100

Los resultados de tres experimentos de ADCC separados se muestran en las Figuras 16A, 16B (células efectoras estimuladas con IL-2) y 16C (células efectoras de sangre periférica humana fresca). Una curva de citotoxicidad celular para la línea celular LnCaP utilizando concentraciones variables de fuc-2A10 y defuc-2A10 se determinó y los valores de EC_{50} y % de Lisis se determinaron. Los resultados de los tres experimentos correspondientes a las Figuras 16A, 16B y 16C respectivamente, se muestran en la Tabla 3 en lo siguiente:

Tabla 3: Capacidad Citotóxica del mAb 2A10 anti-PSMA Desfucosilado

Experimento	**EC_{50} (µg/ml Fucosilado**	**EC_{50} (µg/ml Desfucosilado**	**Proporción EC_{50}**	**% de Lisis Fucosilado**	**% de Lisis Desfucosilado**
Expt. #1	0.08	0.007	11.4	49%	63%
Expt. #2	0.026	0.009	2.9	32%	51%
Expt. #3	0.036	0.002	18.0	n.d.	n.d

La potencia intensificada del mAb 2A10 derivado de Ms704 (es decir, desfucosilado), en comparación con el mAb 2A10 derivado de CHO DG44 (es decir, fucosildado), es evidente por los valores de EC50 menores y los valores de % de lisis mayores para la forma desfucosilada del anticuerpo.

Por ejemplo, de EC50 para la forma desfucosilada son aproximadamente 3 veces a 18 veces menores para la forma desfucosilada. La actividad ADCC con células efectoras sin estimular (PBMC frescas), en comparación con las células efectoras estimuladas con IL-2, mostró una diferencia mayor en los valores de EC_{50}, pero eliminación celular global menor (Figura 16C).

CD16 (FcγRIII) es un receptor clave que media la ADCC. La especificidad de la respuesta ADCC se mostró al bloquear la interacción de células objetivo y efectoras utilizando un anticuerpo monoclonal dirigida contra CD16. El bloqueo de la ADCC con anticuerpos anti-CD16 se condujo de acuerdo con el ensayo ADCC descrito en lo anterior con las siguientes modificaciones. Las células se incubaron ya sea con un 1 µg/ml (una dosis de saturación) ó 0.01 µg/ml (una dosis subóptima) de anticuerpos anti-PSMA 2A10 (expresado en Ms704 o CHO DG44) en la ausencia o presencia de 5 µg/ml de anticuerpo 3G8 anti-CD16 o anticuerpo de control de isotipo. Los resultados se muestran en la Figura 17. Un µg/ml de anticuerpo anti-PSM, en la ausencia de anticuerpo anti-CD16, indujo aproximadamente 12% y 37% de lisis con anticuerpo fucosilado y desfucosilado, respectivamente. Este porcentaje de lisis se redujo a menos de 5% en la presencia de anticuerpo anti-CD16 mientras que el anticuerpo de control de isotipo no tuvo esencialmente efecto.

Equivalentes

Aquellos con experiencia en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando nomás que la experimentación de rutina, muchos equivalentes de las modalidades específicas de la invención descritos en la presente. Tales equivalentes pretenden contemplarse por las siguientes reivindicaciones.

SUMARIO DE LISTA DE SECUENCIA

SEC. DE IDENT. NO:	SECUENCIA	SEC. DE IDENT. NO:	SECUENCIA
1	VH a.a. 4A3	26	VH CDR1 a.a. 2F5
2	VH a.a. 7F12	27	VH CDR1 a.a. 1C3
3	VH a.a. 8C12		
4	VH a.a. 8A11	28	VH CDR2 a.a. 4A3
5	VH a.a. 16F9	29	VH CDR2 a.a. 7F12
6	VH a.a. 2A10	30	VH CDR2 a.a. 8C12
7	VH a.a. 2C6	31	VH CDR2 a.a. 8A11
8	VH a.a. 2F5	32	VH CDR2 a.a. 16F9
9	VH a.a. 1C3	33	VH CDR2 a.a. 2A10
		34	VH CDR2 a.a. 2C6
10	Vk a.a. 4A3	35	VH CDR2 a.a. 2F5
11	Vk a.a. 7F12	36	VH CDR2 a.a. 1C3
12	Vk a.a. 8C12		
13	Vk a.a. 8A11	37	VH CDR3 a.a. 4A3
14	Vk a.a. 16F9	38	VH CDR3 a.a. 7F12
15	Vk a.a. 2A10	39	VH CDR3 a.a. 8C12
16	Vk a.a. 2C6	40	VH CDR3 a.a. 8A11
17	Vk a.a. 2F5	41	VH CDR3 a.a. 16F9
18	Vk a.a. 1C3	42	VH CDR3 a.a. 2A10
		43	VH CDR3 a.a. 2C6
19	VH CDR1 a.a. 4A3	44	VH CDR3 a.a. 2F5
20	VH CDR1 a.a. 7F12	45	VH CDR3 a.a. 1C3
21	VH CDR1 a.a. 8C12		
22	VH CDR1 a.a. 8A11	46	Vk CDR1 a.a. 4A3
23	VH CDR1 a.a. 16F9	47	Vk CDR1 a.a. 7F12
24	VH CDR1 a.a. 2A10	48	Vk CDR1 a.a. 8C12
25	VH CDR1 a.a. 2C6	49	Vk CDR1 a.a. 8A11

SUMARIO DE LISTA DE SECUENCIA

50	Vk CDR1 a.a. 16F9	75	Vk 04/014 línea germinal a.a.
51	Vk CDR1 a.a. 2A10	76	VH 3-30.3 línea germinal a.a.
52	Vk CDR1 a.a. 2C6	77	Vk L18 línea germinal a.a.
53	Vk CDR1 a.a. 2F5		
54	Vk CDR1 a.a. 1C3	78	VH n.t. 1C3
		79	VH n.t. 2A10
55	Vk CDR2 a.a. 4A3	80	VH n.t. 2C6
56	Vk CDR2 a.a. 7F12	81	VH n.t. 2F5
57	Vk CDR2 a.a. 8C12		
58	Vk CDR2 a.a. 8A11	82	Vk n.t. 1C3
59	Vk CDR2 a.a. 16F9	83	Vk n.t. 2A10
60	Vk CDR2 a.a. 2A10	84	Vk n.t. 2C6
61	Vk CDR2 a.a. 2C6	85	Vk n.t. 2F5
62	Vk CDR2 a.a. 2F5		
63	Vk CDR2 a.a. 1C3	86	JH6b línea germinal a.a.
		87	JK3 línea germinal a.a.
64	Vk CDR3 a.a. 4A3	88	JK4 línea germinal a.a.
65	Vk CDR3 a.a. 7F12	89	$(Gly_4\text{-}Ser)_3$ a.a.
66	Vk CDR3 a.a. 8C12		
67	Vk CDR3 a.a. 8A11		
68	Vk CDR3 a.a. 16F9		
69	Vk CDR3 a.a. 2A10		
70	Vk CDR3 a.a. 2C6		
71	Vk CDR3 a.a. 2F5		
72	Vk CDR3 a.a. 1C3		
73	VH 5-51 línea germinal a.a.		
74	Vk L6 línea germinal a.a.		

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado anti-antígeno membranal específico de próstata (PSMA), que carece de residuos de fucosa, en donde el anticuerpo (a) tiene una EC_{50} de actividad ADCC contra células cancerosas de próstata LNCaP de 0.05 μg/ml o menos, o (b) tiene una EC_{50} de actividad ADCC contra células cancerosas de próstata LNCaP que es por lo menos 3 veces menor que la EC_{50} de la actividad ADCC contra células cancerosas de próstata LNCaP de una forma del anticuerpo que contiene residuos de fucosa.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo intensifica la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células que expresan PSMA en superficie celular, en comparación con la forma del anticuerpo que contiene residuos de fucosa.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, que es un anticuerpo humanizado o quimérico.

5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo humanizado o quimérico se prepara de un anticuerpo anti-PSMA de ratón seleccionado del grupo que consiste de: 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 y J591.

6. El anticuerpo de la reivindicación 3, que es un anticuerpo humano.

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo humano comprende una región variable de cadena pesada humana y una región variable de cadena ligera humana, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 1-9; y

(b) la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 10-18.

8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 1 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 10.

9. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 2 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 11.

10. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 3 y la región

variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 12.

11. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 4 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 13.

12. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 5 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 14.

13. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 6 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 15.

14. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 7 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 16.

15. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 8 y la región

variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 17.

16. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 9 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. DE IDENT. NO: 18.

17. El anticuerpo de la reivindicación 3, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 19-27;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 28-36;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 37-45;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 46-54;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 55-63; y

(f) una región variable de cadena ligera humana

CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC. DE IDENT. NOS: 64-72.

18. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 19;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 28;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 37;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 46;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 55; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 64.

19. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 20;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 29;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 38;

(d) una región variable de cadena ligera humana

CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 47;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 56; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 65.

20. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 21;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 30;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 39;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 48;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 57; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 66.

21. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 22;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 31;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 40;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 49;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 58; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 67.

22. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 23;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 32;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 41;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 50;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 59; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 68

23. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana

CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 24;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 33;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 42;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 51;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 60; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 69.

24. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 25;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 34;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 43;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 52;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 61; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 70.

25. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 26;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 35;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 44;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 53;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 62; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 71..

26. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 27;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 36;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 45;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 54;

(e) una región variable de cadena ligera humana

CDR2 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 63; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende SEC. DE IDENT. NO: 72.

27. El anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_H 5-51 o V_H 3-30.3 humano.

28. El anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_k L6, 04/014 o L18 humano.

29. El anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_H 5-51 o V_H 3-30.3 humano y una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva a partir de un gen V_k L6, 04/014 o L18 humano.

30. Una célula huésped que comprende genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina que codifican el anticuerpo anti-PSMA de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la célula huésped carece de actividad fucosiltransferasa efectiva y por lo cual el anticuerpo anti-PSMA expresado por la célula huésped carece de residuos de fucosa.

31. La célula huésped de la reivindicación 30, en

donde los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana.

32. La célula huésped de la reivindicación 30, en donde la fucosiltransferasa es FUT8.

33. La célula huésped de la reivindicación 30, que es una célula CHO.

34. Un método para inhibir el crecimiento de células $PSMA^+$ que comprende contactar las células con el anticuerpo anti-PSMA desfucosilado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes bajo condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células.

35. El método de la reivindicación 34, en donde las células son células tumorales.

36. El método de la reivindicación 34, en donde el anticuerpo anti-PSMA es un anticuerpo humano.

37. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, en donde las células tumorales o células endoteliales vasculares próximas a las células tumorales expresan PSMA, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo anti-PSMA desfucosilado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de células tumorales en el sujeto.

38. El método de la reivindicación 37, en donde el anticuerpo anti-PSMA es un anticuerpo humano.

39. El método de la reivindicación 37, en donde las células tumorales son células tumorales de cáncer prostático.

40. El método de la reivindicación 37, en donde las células tumorales son de un cáncer seleccionado del grupo que consiste de colon, renal, rectal, urotelial, de mama, vejiga, hígado, páncreas o melanoma.

RESUMEN

La invención concierne a anticuerpos anti-PSMA que carecen de residuos fucosilo. Los anticuerpos de la invención exhiben actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada en comparación con la forma fucosilada de los anticuerpos. La invención también proporciona células huésped que expresan los anticuerpos anti-PSMA que carecen de residuos fucosilo, en donde las células huésped son deficientes para una fucosil transferasa. También se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos para inhibir el crecimiento de células PSMA+, tales como células tumorales.

```
                                                                                  CDR1
Línea germinal 5-51 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T  S Y W I G
4A3                 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - - -
7F12                A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  - F - - -
8C12                - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - - - - - - - - T - -  - - - - -
8A11                            - - - - - - T - - - - - - - - - - - - - - T - -  N - - - -
16F9                            - - - - L - - - - - - - - - - - - - - - - - - -  N - - - -

                                                              CDR2
Línea germinal 5-51 W V R Q M P G K G L E W M G  I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G  Q V T I
4A3                 - A - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - -
7F12                - A - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - -
8C12                - - - - - - - - - P - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - F
8A11                - - - - - - - - - P - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - F
16F9                - A - - - - - - - - - - - -  - - - - - - - - - - - - - - - - -  - - - -

                                                                                    CDR3
Línea germinal 5-51 S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R
4A3                 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S A  A N S S H W Y F D L
7F12                - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T  - - - - F - N - - -
8C12                - - - - - - - - - - - - - N - - - T - - - - - - - - - T  - - P - Y - - - - -
8A11                - - - - - - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - - - T  - - P - Y - - - - -
16F9                - - - - - V - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - T  - - - - F - N - - -

4A3                 W G R G T L V T V S S
7F12                - - - - - - - - - - -
8C12                - - - - - - - - - - -
8A11                - - - - - - - - - - -
16F9                - - - - - - - - - - -
```

Fig. 1

343

CDR1

	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A
Línea germinal L6:																																		
4A3:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7F12:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8C12:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CDR2

	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S
Línea germinal L6:																																		
4A3:	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7F12:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8C12:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C
Línea germinal L6:																					
4A3:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7F12:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8C12:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CDR3

	Q	Q	R	S	N	W															
Línea germinal L6:																					
4A3:	-	-	-	-	-	-	L	M	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	
7F12:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8C12:	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fig. 2

```
VK 04/014                                                      CDR1
Línea germinal:     D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C   R V S Q G I S S Y L N
8A11:                             - - - - - - - - - - S - - - - -   - - - - - - - - - - -
16F9:                             - - - - - - - - - - - - - - - -   - - - - - - - - - - -

                                                   CDR2
Línea germinal 014: W Y R Q K P G K V P K L L I Y   S A S N L Q S   G V P S R F S G S G S
8A11:               - - - - - - - - - - - - - - -   - - - - - - -   - - - - - - - - - - -
16F9:               - - - - - - - - - - - - - M -   - - - - - - -   - - - - - - - - - - -

                                                                        CDR3
Línea germinal 014: G T D F T L T I S S L Q P E D V A T Y Y G   Q R T Y N A P F T
8A11:               - - - - - - - - N - - - - - - - - - - - -   - - - - - - - - - F G P G
16F9:               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -   - - - - - - - - - - - - -

8A11:               T K V D I K
16F9:               - - - - - -
```

Fig. 3

345

4/22

Anti-PMSA 1C3 VH
Segmento V: 3-30.3
Segmento D: No Determinado
Segmento J: JH6b

```
     Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
1    CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                                     CDR1
                                                 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   A   M   H   W
55   AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT ATG CAC TGG

                                                         CDR2
                                                     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   S   Y   D
109  GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

                 CDR2
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     G   N   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163  GGA AAC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

     D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
217  GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                                 CDR3
                                         ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     T   A   V   Y   Y   C   A   R   A   V   P   W   G   S   R   Y   Y   Y
271  ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GCC GTC CCC TGG GGA TCG AGG TAC TAC TAC
                                                                 |
                                                                 └──► JH6b
         CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325  TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Fig. 4A

Anti-PSMA 1C3 VK
Segmento V : L18
Segmento J : JK4

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

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

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

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

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

             CDR3
     ----------------------------
     F   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271  TTT AAC AGT TAT CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
                         └──►JK4
```

Fig. 4B

```
Anti-PMSA 2A10 VH
  Segmento V :     5-51
  Segmento D :     7-27
  Segmento J :     JH2

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 5A

Anti-PSMA 2A10 VK

Segmento V : L18
Segmento J : JK4

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

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

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

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

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

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

Fig. 5B

Anti-PMSA 2C6 VH
Segmento V : 5-51
Segmento D : 6-13
Segmento J : JH4b

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

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

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

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


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

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

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

Fig. 6A

Anti-PSMA 2C6 VK

Segmento V : L6
Segmento J : JK3

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

                                CDR1
                    ----------------------------------------
     A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W   Y
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                                        CDR2
                                                    ----------
     Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N   R
109  CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

       CDR2
     --------
     A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

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

                CDR3
     ------------------------------
     R   S   N   W   P   L   F   T   F   G   P   G   T   K   V   D   I   K
271  CGT AGC AAC TGG CCC CTA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
```

Fig. 6B

352


```
Anti-PMSA 2F5 VH
 Segmento V :      5-51
 Segmento D :      7-27
 Segmento J :      JH2

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 7A

353

Anti-PSMA 2F5 VK
Segmento V : L18
Segmento J : JK4

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

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

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

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

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

              CDR3
     ----------------------------
     F   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271  TTT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
                      └──►JK4

     I   K
325  ATC AAA
```

Fig. 7B

```
                                                                                   __CDR1__
Línea germinal 5-51:  E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G
2A10 VH:              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N - - -
2C6 VH:               - - - - - - - - S - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N - - - -
2F5 VH:               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N - - -

                                                    ____________CDR2____________
Línea germinal 5-51:  W V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I
2A10 VH:              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2C6 VH:               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2F5 VH:               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                                 ____CDR3____
Línea germinal 5-51:  S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R
2A10 VH:              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Q T G F L W S
2C6 VH:               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S P G Y T S S W
2F5 VH:               - - - - - - - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                      __CDR3__
2A10 VH:              S     D L W G R G T L V T V S S  (JH2)
2C6 VH:               T S F - Y - - Q - - - - - - - -  (JH4b)
2F5 VH:               F     - - - - - - - - - - - - -  (JH2)
```

Fig. 8

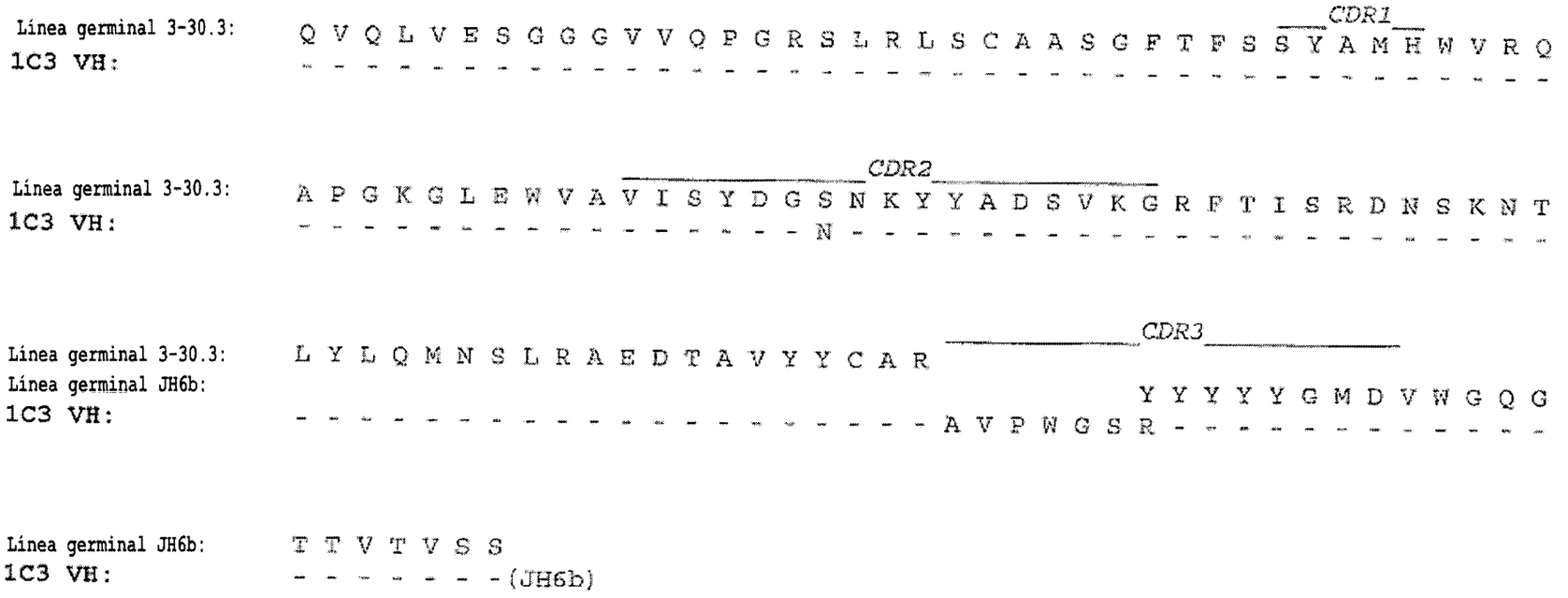

Línea germinal 3-30.3: Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R Q
1C3 VH: -
CDR1
Línea germinal 3-30.3: A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
1C3 VH: - - - - - - - - - - - - - - - - - - N -
CDR2
Línea germinal 3-30.3: L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
Línea germinal JH6b: Y Y Y Y Y G M D V W G Q G
1C3 VH: - A V P W G S R - - - - - - - - - - - - - - - -
CDR3
Línea germinal JH6b: T T V T V S S
1C3 VH: - - - - - - - (JH6b)

Fig. 9

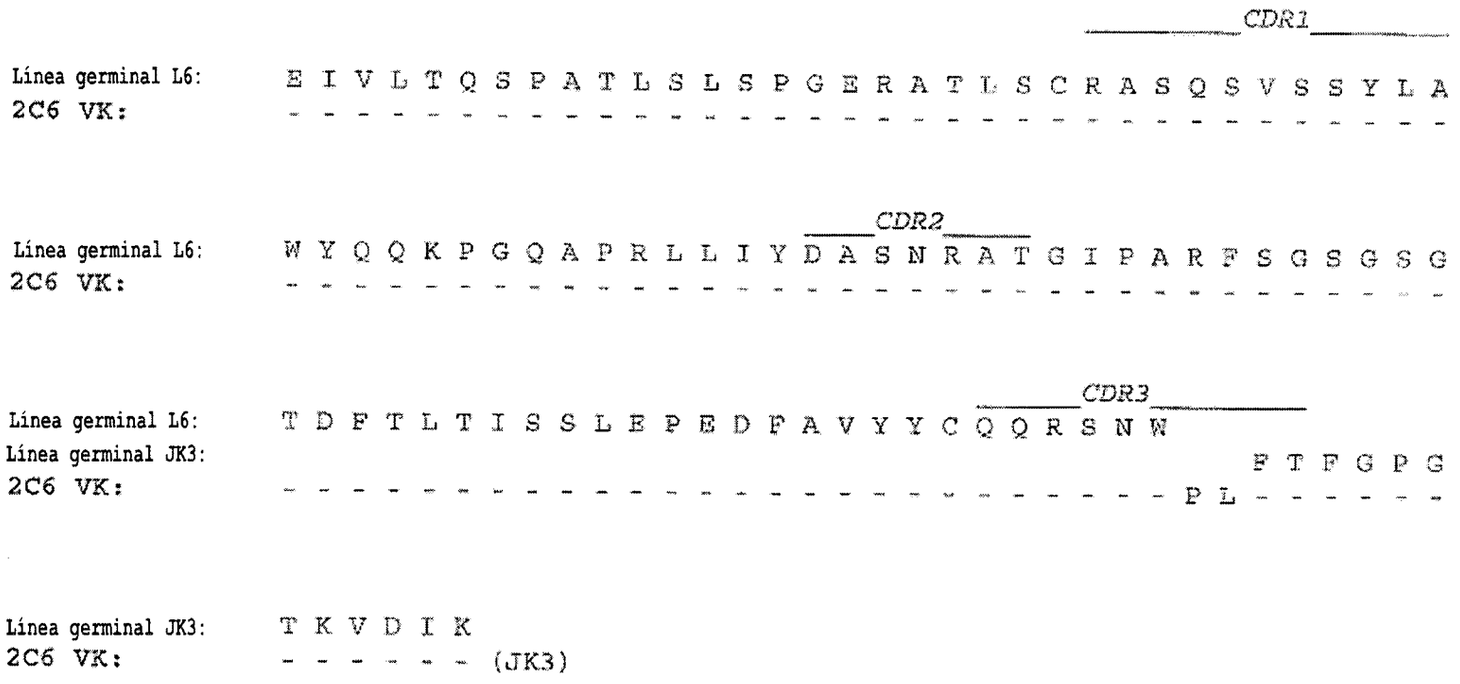

CDR1
Línea germinal L6: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
2C6 VK: -
CDR2
Línea germinal L6: W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
2C6 VK: -
CDR3
Línea germinal L6: T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W
Línea germinal JK3: F T F G P G
2C6 VK: - P L - - - - - -
Línea germinal JK3: T K V D I K
2C6 VK: - - - - - - (JK3)

Fig. 10

```
                                                                                CDR1
Línea germinal L18:  A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S A L A
1C3 VK:              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A10 VK:             - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D - - - - - -
2F5 VK:              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D - - - - - -

                                                       CDR2
Línea germinal L18:  W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G
1C3 VK:              - - - - - S - - - - - - - - F - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A10 VK:             - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Y - - -
2F5 VK:              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                    CDR3
Línea germinal L18:  T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P
Línea germinal JK4:                                                        L T F G G G T
1C3 VK:              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A10 VK:             - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2F5 VK:              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Línea germinal JK4:  K V E I K
1C3 VK:              - - - - -  (JK4)
2A10 VK:             - - - - -  (JK4)
2F5 VK:              - - - - -  (JK4)
```

Fig. 11

357

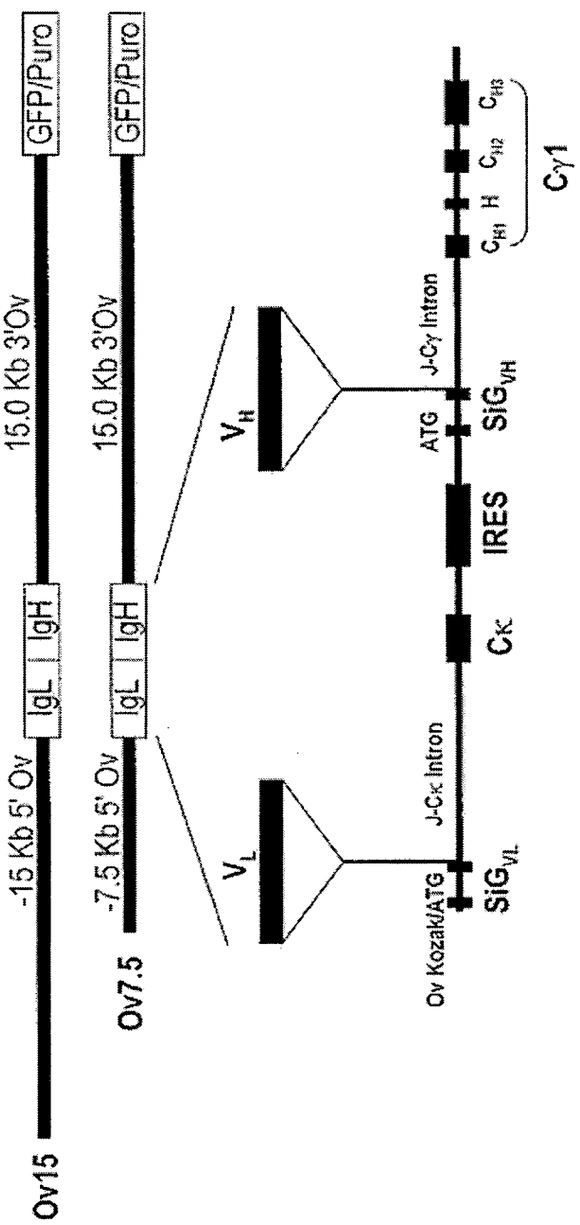

GFP/Puro
15.0 Kb 3'Ov
IgL
IgH
-15 Kb 5' Ov
Ov15
GFP/Puro
15.0 Kb 3'Ov
IgL
IgH
-7.5 Kb 5' Ov
Ov7.5
V_H
V_L
J-Cγ Intron
J-Cκ Intron
ATG
SiG_{VH}
IRES
$C\kappa$
SiG_{VL}
Ov KozakATG
C_{H1} H C_{H2} C_{H3}
Cγ1

Fig. 12

Caracterización de estructura de anti-PSMA 7F12 expresado en huevos de gallina

Masa Obs.+Na+	Masa Teo.+Na+	Estructura	Conectividad de estructura posible	Tipo
1136.4	1136.5	$(Man)_3(GlcNAc)_3$		
1257.4	1257.6	$(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_2$		
1298.4	1298.44	$(Hex)(Man)_3(GlcNAc)_3$		
1339.46	1339.5	$(Man)_3(GlcNAc)_4$		G_0
1460.49	1460.5	$(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_3$		
1501.53	1501.5	$(Hex)(Man)_3(GlcNAc)_4$		

Fig. 13A

Masa Obs. +Na+	Masa Teo. +Na+	Estructura	Conectividad de estructura posible	Tipo
1542.56	1542.6	$(Man)_3(GlcNAc)_5$		
1663.6	1663.58	$(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_4$		
1704.6	1704.6	$(Hex)(Man)_3(GlcNAc)_5$		
1745.66	1745.6	$(Man)_3(GlcNAc)_6$		
1866.7	1866.7	$(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_5$		
1948.7	1948.68	$(Man)_3(GlcNAc)_6$		

Fig. 13B

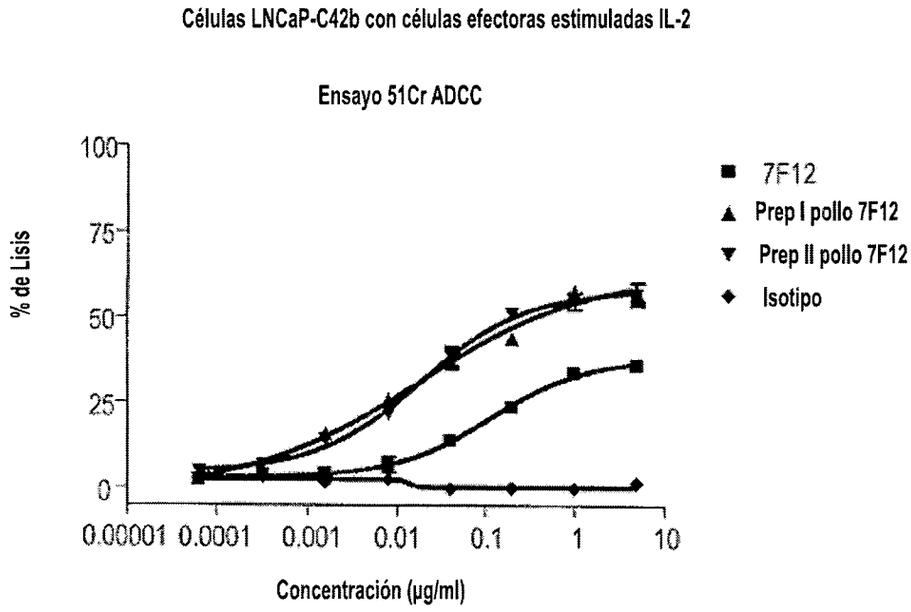


Fig. 14A

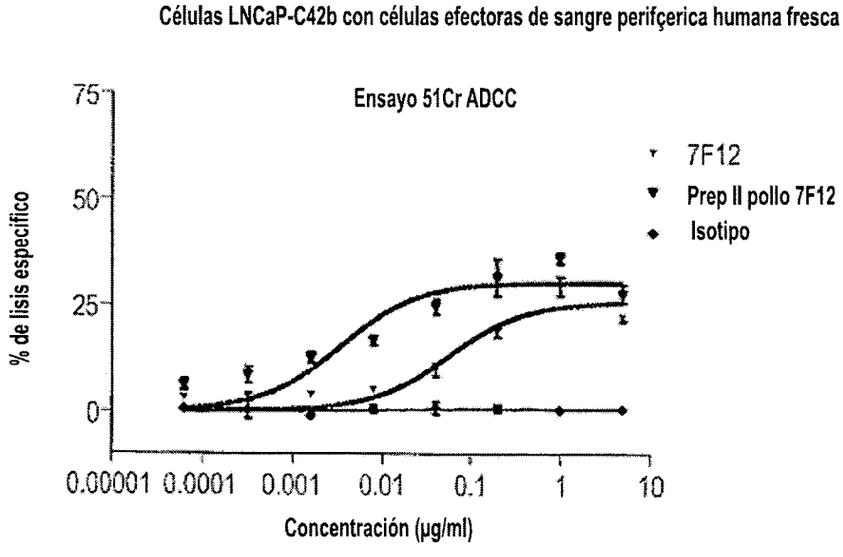


Fig. 14B

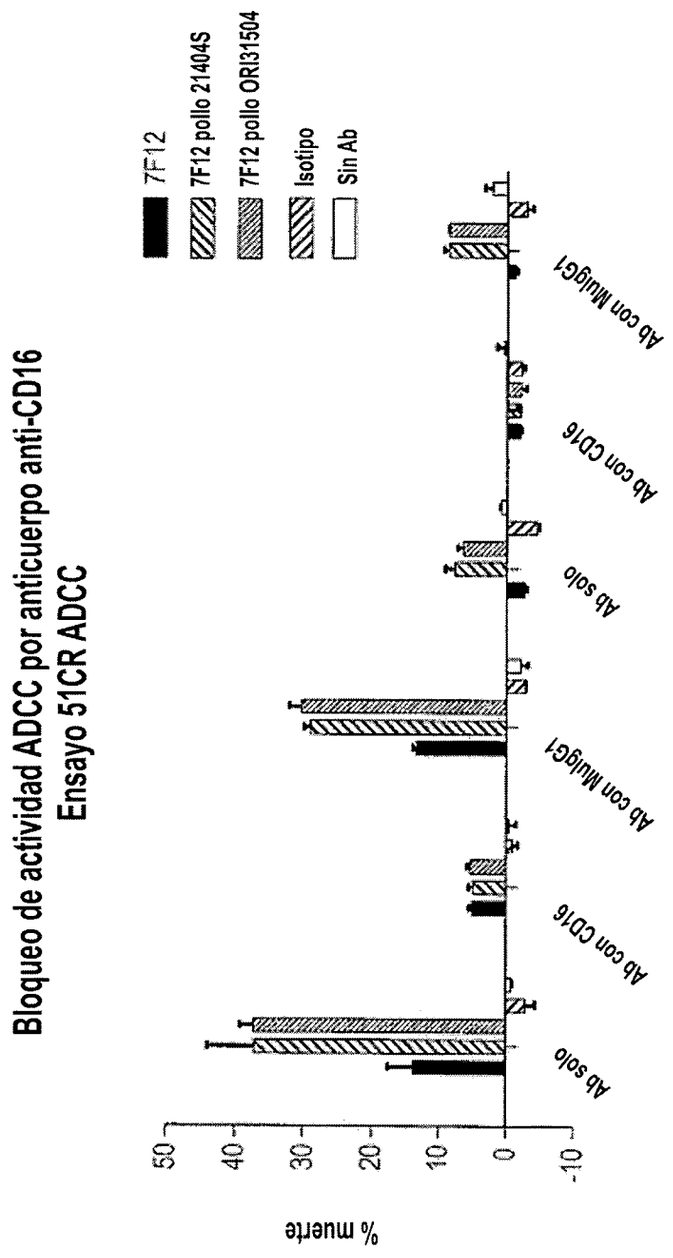

Bloqueo de actividad ADCC por anticuerpo anti-CD16
Ensayo 51CR ADCC
7F12
7F12 pollo 21404S
7F12 pollo ORI31504
Isotipo
Sin Ab
% muerte
50
40
30
20
10
0
-10
Ab solo
Ab con CD16
Ab con MuIgG1
Ab solo
Ab con CD16
Ab con MuIgG1
1µg/mL
0.01 µg/mL
Ab utilizado

Fig. 15

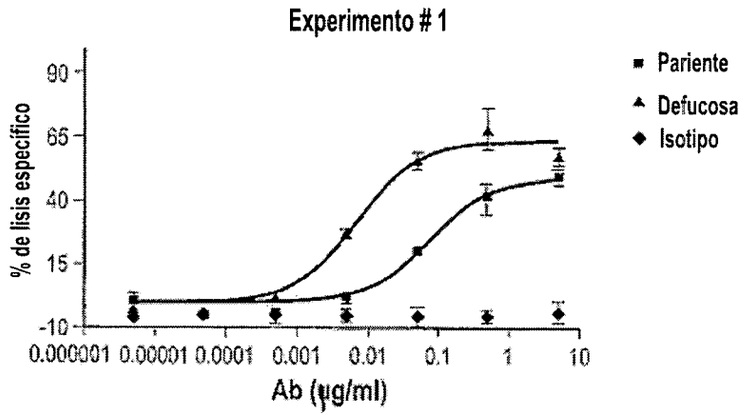


Fig. 16A

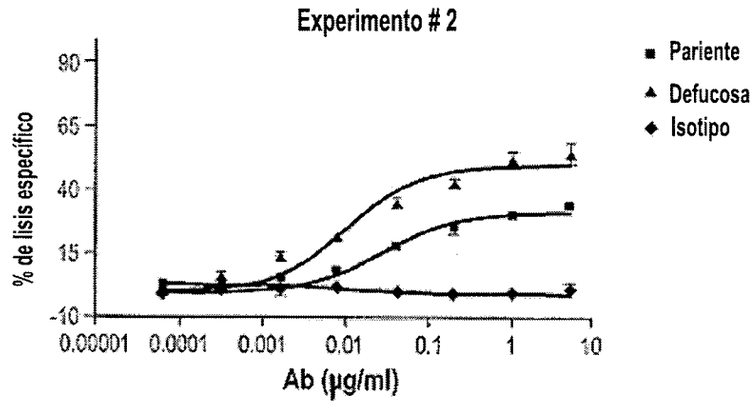


Fig. 16B

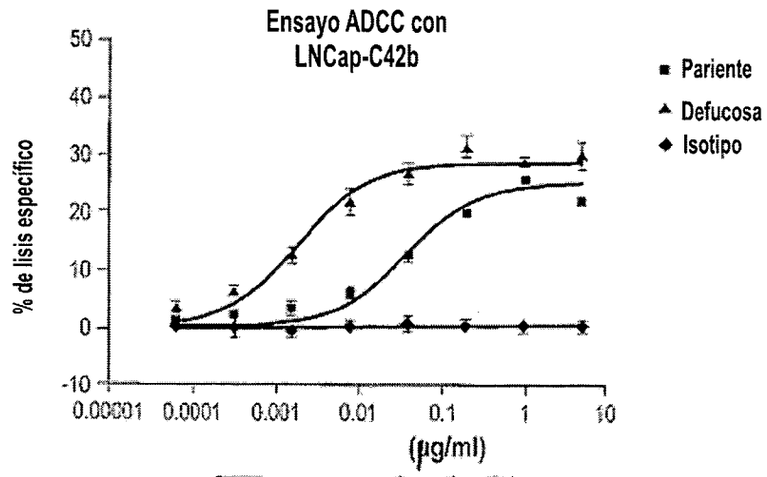


Fig. 16C

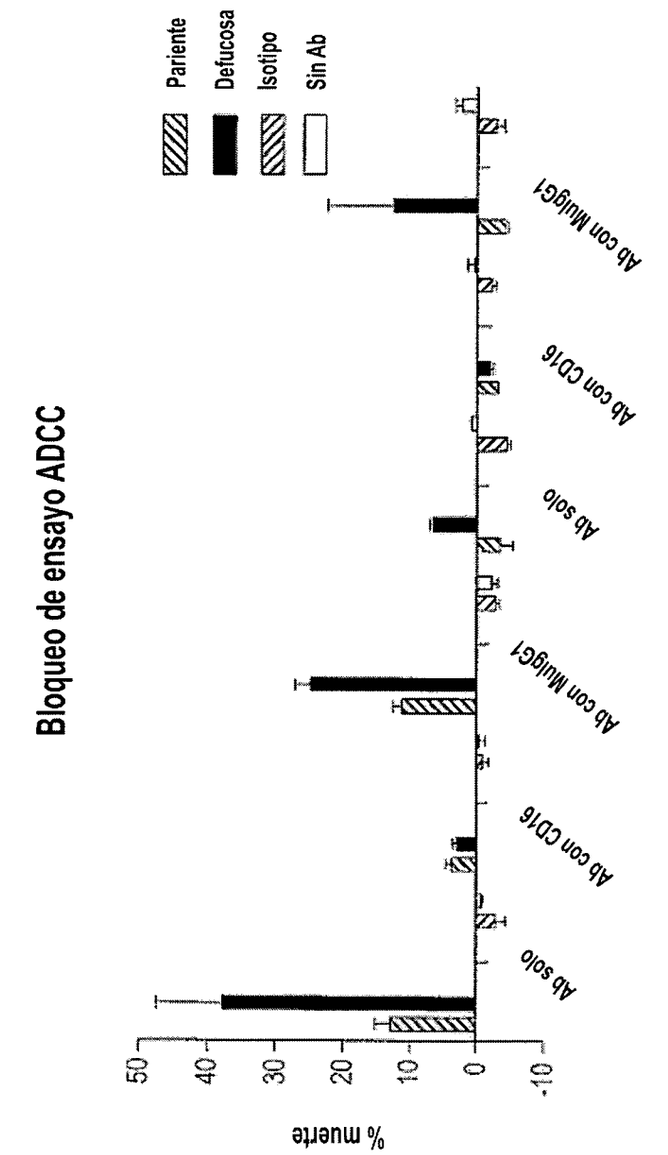

Bloqueo de ensayo ADCC
Parente
Defucosa
Isotipo
Sin Ab
% muerte
50
40
30
20
10
0
-10
Ab solo
Ab con CD16
Ab con Mulgg1
Ab solo
Ab con CD16
Ab con Mulgg1
1µg/mL
0.01 µg/mL
Ab utilizado

Fig. 17

SEQUENCE LISTING

<110> MEDAREX, INC.

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA) LACKING IN FUCOSYL RESIDUES

<130> MXI-335PC-2

<140>
<141>

<150> 60/660,431
<151> 2005-03-09

<160> 89

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<400> 2
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Ala Asn Ser Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<400> 3
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Thr Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg
20 25 30

Gln Met Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly
35 40 45

Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Phe
50 55 60

Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu
65 70 75 80

Lys Thr Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Asn Pro Ser
85 90 95

Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 5
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Ala Arg
20 25 30

Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly
35 40 45

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

Ser Ala Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu
65 70 75 80

Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Asn Ser Ser
85 90 95

Phe Trp Asn Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Asn
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Asn
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Val Pro Trp Gly Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
            100                 105                 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

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

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

```
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met
                 85                  90                  95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Leu Met
                 85                  90                  95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 13
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

```
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys
  1               5                  10                  15

Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys
             20                  25                  30

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
     50                  55                  60

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
 65                  70                  75                  80
```

Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Asp Ile Lys
100

<210> 14
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
1 5 10 15

Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys
20 25 30

Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Asp Ile Lys
100

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

<400> 15
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

Phe Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

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

<400> 20
Ser Phe Trp Ile Gly
1 5

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Ser Asn Trp Ile Gly
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Ser Asn Trp Ile Gly
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Ala Asn Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Ala Asn Ser Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Ala Asn Ser Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu
1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Pro Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Thr Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Ala Val Pro Trp Gly Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Thr Cys Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1 5 10

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

<400> 50
Thr Cys Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Gln Gln Arg Ser Asp Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 73
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 74
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
85 90

<210> 75
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe
85 90 95

Thr

<210> 76
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 77
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 78
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 78
cag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca gtt ata tca tat gat gga aac aat aaa tac tac gca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gcc gtc ccc tgg gga tcg agg tac tac tac tac ggt atg gac 336
Ala Arg Ala Val Pro Trp Gly Ser Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 79
gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 80
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 81
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 82
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 82
```
gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga   48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

<210> 83
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 83
```
gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga   48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

<210> 84
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

<210> 85
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 85

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

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

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

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

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

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

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

<210> 86
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

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

Thr Val Ser Ser
             20
```

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

<210> 88
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Gly-Ser linker

<400> 89
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/005853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/30 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/132140 A1 (SATOH MITSUO ET AL) 8 July 2004 (2004-07-08) paragraph [0376] - paragraph [0399] paragraph [0711] paragraph [0994] - paragraph [1040]	1-7,32, 34-37, 39,41,42
X	MURPHY G P ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN" JOURNAL OF UROLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 160, December 1998 (1998-12), pages 2396-2401, XP000944660 ISSN: 0022-5347 abstract page 2400, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 3	1-7,32, 34-37, 39,41,42

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 August 2006	29/08/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Irion, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/005853

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 150 508 A (MURPHY ET AL) 21 November 2000 (2000-11-21) the whole document	1-42
Y	WO 01/09192 A (MEDAREX, INC; DEO, YASHWANT; GRAZIANO, ROBERT; HUDSON, DEBRA; NORTHWES) 8 February 2001 (2001-02-08) the whole document	8-31,33, 38,40
Y	WO 03/064606 A (MEDAREX, INC; DEO, YASHWANT, M; GRAZIANO, ROBERT; HUDSON, DEBRA; HOLME) 7 August 2003 (2003-08-07) the whole document	8-31,33, 38,40
Y	WO 03/035835 A (GENENTECH, INC) 1 May 2003 (2003-05-01) page 10, line 23 - page 12, line 15 page 29, line 4 page 89, line 18 claim 9	1-42
Y	US 2004/110704 A1 (YAMANE NAOKO ET AL) 10 June 2004 (2004-06-10) the whole document paragraph [0170] paragraph [0488]	1-42
Y	EP 1 176 195 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 30 January 2002 (2002-01-30) the whole document paragraph [0048] - paragraph [0051] claim 26 claim 36	1-42
P,X	ZHU LEI ET AL: "Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 9, 28 August 2005 (2005-08-28), pages 1159-1169, XP002385238 ISSN: 1087-0156 the whole document	1-42

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/005853

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMANE-OHNUKI N ET AL: "Establishment of FUT8 knockout chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, INTERSCIENCE PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 87, no. 5, 5 September 2004 (2004-09-05), pages 614-622, XP002983153 ISSN: 0006-3592 the whole document	1-42
A	SHINKAWA T ET AL: "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 278, no. 5, 31 January 2003 (2003-01-31), pages 3466-3473, XP002355427 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/005853

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 36-42 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/005853

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004132140 A1	08-07-2004	AU 2003236015 A1	20-10-2003
		CA 2481837 A1	16-10-2003
		EP 1498490 A1	19-01-2005
		WO 03085118 A1	16-10-2003
US 6150508 A	21-11-2000	NONE	
WO 0109192 A	08-02-2001	AU 783356 B2	20-10-2005
		AU 6374500 A	19-02-2001
		CA 2380783 A1	08-02-2001
		CN 1387539 A	25-12-2002
		EP 1210374 A1	05-06-2002
		JP 2003508029 T	04-03-2003
		MX PA02000961 A	20-08-2003
		NZ 517331 A	27-02-2004
WO 03064606 A	07-08-2003	BR 0307216 A	20-12-2005
		CA 2474616 A1	07-08-2003
		CN 1652821 A	10-08-2005
		EP 1519747 A2	06-04-2005
		JP 2005518789 T	30-06-2005
		MX PA04007262 A	29-10-2004
WO 03035835 A	01-05-2003	BR 0213761 A	12-04-2005
		CA 2463879 A1	01-05-2003
		CN 1607960 A	20-04-2005
		EP 1443961 A2	11-08-2004
		JP 2005532253 T	27-10-2005
		MX PA04003798 A	30-07-2004
US 2004110704 A1	10-06-2004	AU 2003236022 A1	20-10-2003
		BR 0309145 A	01-02-2005
		CA 2481657 A1	16-10-2003
		EP 1498485 A1	19-01-2005
		WO 03085107 A1	16-10-2003
		MX PA04009924 A	01-07-2005
		US 2005216958 A1	29-09-2005
EP 1176195 A	30-01-2002	AU 3672800 A	14-11-2000
		CA 2369292 A1	19-10-2000
		WO 0061739 A1	19-10-2000
		US 2005272916 A1	08-12-2005

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	See Form PCT/IPEA/416
MXI-335PC		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2006/005853	17.02.2006	18.02.2005
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC		
INV. C07K16/30		
Applicant		
MEDAREX, INC.		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
   a. ☒ *sent to the applicant and to the International Bureau)* a total of 7 sheets, as follows:
      ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).
      ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.
   b. ☐ *(sent to the International Bureau only)* a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	Box No. II	Priority
☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐	Box No. VI	Certain documents cited
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application
☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
2006-12-15	18.04.2007
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:	Authorized officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Irion, Andrea Telephone No. +49 89 2399-8174

400

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2006/005853

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
- ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-90 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-29 as originally filed

Claims, Numbers

1-40 filed with telefax on 15.12.2006

Drawings, Sheets

1/22-22/22 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
- ☒ the claims, Nos. 41 and 42
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* *If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."*

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2006/005853

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 34-40 (IA)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 34-40 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b) and 13*ter*.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2006/005853

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	6-29, 31, 36, 38
	No:	Claims	1-5, 30, 32-35, 37, 39, 40
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-40
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-33
	No:	Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2006/005853

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:

   a. type of material:

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

   ☒ on paper

   ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

   ☒ contained in the international application as filed

   ☒ filed together with the international application in electronic form

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination

   ☐ received by this Authority as an amendment* on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

* *If item 4 in Box No. I applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ZUR PATENTIERBARKEIT (BEIBLATT)

Internationales Aktenzeichen

PCT/US2006/005853

Item I

I.1 The amendments filed with telefax dated 15.12.2005 do not appear to introduce subject-matter which extends beyond the content of the application as filed (Article 34(2)(b) PCT).

Item III

III.1 With respect to claims 34-40

Claims 34-40 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(I) PCT).

Item V

V.1 Reference is made to following documents

D1: US2004/0132140 (SATOH ET AL.) 08 July 2004 (2004-07-08)

D2: G.P. MURPHY ET AL.: 'Isolation and characterization of monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate specific membrane antigen', JOURNAL OF UROLOGY, December 1998 (1998-12), vol. 160, no. 6 part 2, pages 2396-2401

D3: US6150508 (MURPHY ET AL.) 21 November 2000 (2000-11-21)

D4: WO0109192 (MEDAREX, INC NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC) 08 February 2001 (2001-02-08)

D5: WO03064606 (MEDAREX, INC) 07 August 2003 (2003-08-07)

D6: WO03035835 (GENENTECH, INC) 01 May 2003 (2003-05-01)

D7: US2004/0110704 (YAMANE ET AL.) 10 June 2004 (2004-06-10)

D8: EP1176195 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 30 January 2002 (2002-01-30)

D9: L. ZHU ET AL.: 'Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens', NATURE BIOTECHNOLOGY, 28 August 2005 (2005-08-28), vol. 23, no. 9, pages 1159-1169

V.2 Novelty (Article 33(2) PCT)

V.2.1 With respect to claims 1-5, 30, 32-35, 37, 39, 40

Document D1 describes the production of antibodies lacking fucose residues thereby having increased ADCC function (paragraph [0376]-[0399]). Said antibodies may be those which recognizes tumor-related antigen and may be used to treat cancer diseases (paragraph [0711]). Anti-PSMA antibodies are explicitly mentioned by referring to D2 (paragraph [0711]). Said antibodies are produced in CHO cells lacking the activity of FUT8 (paragraph [0994]-[1040] Example 12). Furthermore, document D7 discloses a cell which produces antibodies lacking fucose residues and D7 discloses anti-PSMA antibodies referring to D2 (paragraph [170] and [488]).

Document D2 is the scientific publication of D3 and discloses the anti-PSMA antibodies 7E11, 3E11, 3C2, 4E10-1.14, 3C9, and 1G3 (abstract and p. 2400 left-hand col. 2nd paragraph - right-hand col. 3rd paragraph). Document D3 describes some of the anti-PSMA antibodies modified in the present application, i.e. the antibodies mentioned on p. 27 l. 2-5 of the application. Therefore, the subject-matter of claims 1-5, 30, 32-35, 37, 39, 40 is not considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V.3 Inventive step (Article 33(3) PCT)

V.3.1 With respect to claims 6-29, 31, 36, 38

The anti-PSMA antibodies described on p. 27 l. 14 - p. 27 l. 24 are disclosed in documents D4 and D5.

Document D6 describes antibodies lacking fucose residues and thereby having increase ADCC function (p. 10 l. 23 - p. 12 l. 15). Said antibodies may be used for the treatment of prostate cancer (p. 29 l. 4, p. 89 l. 18). Said antibodies bind to prostate stem cell antigen (PSCA) (claim 9).

Document D8 describes the production of antibodies lacking fucose residues by using a cell (CHO) lacking FUT8 activity (paragraph [0048]-[0051], claims 26, 36)

The subject-matter of claims 6-29, 31, 36, 38 differs from the closest prior art documents D4 and D5 in that the anti-PSMA antibodies lack fucose residues. The technical problem to be solved may be regarded as providing anti-PSMA antibodies with enhanced ADCC activity. The solution disclosed in claims 6-29, 31, 36, 38 appears to obvious, since the production of defucosylated antibodies and the effect of said modification on the ADCC activity of the antibodies is generally known in the field and used for various antibodies to improve their anti-cancer activity (see e.g. D1, D4-D8). Said procedure is even disclosed for other anti-PSMA antibodies (see D1).

Therefore, the subject-matter of claims 6-29, 31, 36, 38 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.4 Industrial applicability (Article 33(4) PCT)

V.4.1 With respect to claims 1-33

The subject-matter of claims 1-33 appears to be susceptible of industrial application.

V.4.2 With respect to claim 36-42

The subject-matter of claims 34-40 is considered to be a method of treatment by therapy of the human or animal body.

For the assessment of the present claims 34-40 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

V.5 Further remarks

V.5.1 With respect to documents D9

The examination report has been based on an assumed valid priority for the present application. Should the priority of the present application not be valid, the above cited document D9 would be relevant with respect to novelty and inventive step (Article 33(2) and (3) PCT).

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) antibody, which lacks fucose residues, wherein the antibody (a) has an EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells of 0.05 μg/ml or less, or (b) has an EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells that is at least 3-fold lower than the EC_{50} of ADCC activity against LNCaP prostate cancer cells of a form of the antibody that contains fucose residues.

2. The antibody of claim 1, wherein said antibody enhances antibody dependent cellular cytotoxicity of cells expressing cell surface PSMA, as compared to the form of the antibody that contains fucose residues.

3. The antibody of claim 1, which is a monoclonal antibody.

4. The antibody of claim 3, which is a humanized or chimeric antibody.

5. The antibody of claim 4, wherein the humanized or chimeric antibody is prepared from a mouse anti-PSMA antibody selected from the group consisting of: 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 and J591.

6. The antibody of claim 3, which is a human antibody.

7. The antibody of claim 6, wherein the human antibody comprises a human heavy chain variable region and a human light chain variable region, wherein:
(a) the human heavy chain variable region comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-9; and
(b) the human light chain variable region comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10-18.

1 ved at the EPO on Dec 15, 2006 20:37:03. P

8. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.

9. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11.

10. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12.

11. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13.

12. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14.

13. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15.

14. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.

2 ved at the EPO on Dec 15, 2006 20:37:03. P

15. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17.

16. The antibody of claim 7, wherein the human heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 and the human light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18.

17. The antibody of claim 3, comprising:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19-27;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28-36;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 37-45;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 46-54;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 55-63; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 64-72.

18. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 19;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 28;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 37;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 46;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 55; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 64.

3 ved at the EPO on Dec 15, 2006 20:37:03. P

REPLACEMENT SHEET

19. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 20;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 29;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 38;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 47;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 56; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 65.

20. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 21;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 30;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 39;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 48;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 57; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 66.

21. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 22;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 31;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 40;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 49;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 58; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 67.

22. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 23;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 32;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 41;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 50;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 59; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 68.

ved at the EPO on Dec 15, 2006 20:37:03. P AMENDED SHEET

23. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 24;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 33;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 42;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 51;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 60; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 69.

24. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 25;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 34;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 43;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 52;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 61; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 70.

25. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 26;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 35;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 44;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 53;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 62; and
(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 71.

26. The antibody of claim 17, which comprises:
(a) a human heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 27;
(b) a human heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 36;
(c) a human heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 45;
(d) a human light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 54;
(e) a human light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 63; and

5 ved at the EPO on Dec 15, 2006 20:37:03. P

(f) a human light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 72.

27. The antibody of claim 6, which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 5-51 or V_H 3-30.3 gene.

28. The antibody of claim 6, which comprises a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L6, 04/014 or L18 gene.

29. The antibody of claim 6, which comprises a heavy chain variable region that is a product of or derived from a human V_H 5-51 or V_H 3-30.3 gene and a light chain variable region that is a product of or derived from a human V_k L6, 04/014 or L18 gene.

30. A host cell comprising immunoglobulin heavy and light chain genes encoding the anti-PSMA antibody of any one of the preceding claims, wherein said host cell lacks effective fucosyltransferase activity and whereby the anti-PSMA antibody expressed by said host cell lacks fucose residues.

31. The host cell of claim 30, wherein the immunoglobulin heavy and light chain genes are human immunoglobulin heavy and light chain genes.

32. The host cell of claim 30, wherein said fucosyltransferase is FUT8.

33. The host cell of claim 30, which is a CHO cell.

34. A method of inhibiting growth of $PSMA^+$ cells comprising contacting said cells with the defucosylated anti-PSMA antibody of any one of the preceding claims under conditions sufficient to induce antibody-dependent cellular cytoxicity (ADCC) of said cells.

35. The method of claim 34, wherein said cells are tumor cells.

ved at the EPO on Dec 15, 2006 20:37:03. P AMENDED SHEET 15/12/2006

36. The method of claim 34, wherein said anti-PSMA antibody is a human antibody.

37. A method of inhibiting growth of tumor cells in a subject, wherein the tumor cells or vascular endothelial cells proximate to the tumor cells express PSMA, comprising administering to the subject the defucosylated anti-PSMA antibody of any one of the preceding claims in an amount effective to inhibit growth of tumor cells in the subject.

38. The method of claim 37, wherein said anti-PSMA antibody is a human antibody.

39. The method of claim 37, wherein said tumor cells are prostate cancer tumor cells.

40. The method of claim 37, wherein the tumor cells are of a cancer selected from the group consisting of colon, renal, rectal, urothelial, breast, bladder, liver, pancreas or melanoma.

7 ved at the EPO on Dec 15, 2006 20:37:03. P

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

PARA REALIZAR EL EXAMEN DE

PATENTABILIDAD

915

HOJA DE REEMPLAZO

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un anticuerpo de antígeno de membrana específica anti-próstata (PSMA) aislado, que carece de residuos de fucosa, en donde el anticuerpo (a) tiene un EC_{50} de actividad ADCC contra células de próstata cancerígenas LNCaP de 0.05 μG/ML o menos, o (b) tiene un EC_{50} de actividad ADCC contra células de próstata cancerígenas LNCaP que es al menos 3 veces menor que el EC_{50} de actividad ADCC contra células de próstata cancerígenas LNCaP de una forma del anticuerpo que contiene: residuos de fucosa.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo mejora la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de células que expresan PSMA de superficie celular, según se compara con la forma del anticuerpo que contiene residuos de fucosa.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, el cual es un anticuerpo quimérico humanizado.

5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo quimérico humanizado se prepara de un anticuerpo de ratón anti-PSMA seleccionado del grupo que consiste de: 3F5, 4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, E99, J415, J533 y J591.

6. El anticuerpo de la reivindicación 3, el cual es un anticuerpo humano.

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo humano comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 1-9; y

(b) la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 10-18.

8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 10.

9. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 11.

10. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:

3 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 12.

11. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 13.

12. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 14.

13. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 6 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 15.

14. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 7 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 16.

15. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 8 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 17.

16. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde la región variable de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 9 y la región variable de cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 18.

17. El anticuerpo de la reivindicación 3, comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 19-27;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 28-36;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 37-45;

(d) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 46-54;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 55-63; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 64-72.

18. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 19;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 28;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 37;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 46;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 55; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 64.

19. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 20;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 29;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 38;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 47;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 56; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 65.

HOJA DE REEMPLAZO

20. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 21;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 30;

(e) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 39;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 48;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 57; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 66.

21. El anticuerpo de la reivindicación 17) que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 22;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 31;

(e) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 40;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 49;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 58; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 67.

22. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 23;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 32;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 41;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 50;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 59; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 68.

23. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 24;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 33;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 42;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 51;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 60; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 69.

24. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 25;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 34;

(e) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 43;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 52;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 61; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 70.

25. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 26;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 35;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 44;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 53;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 62; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 71.

26. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 27;

(b) una región variable de cadena pesada humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 36;

(c) una región variable de cadena pesada humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 45;

(d) una región variable de cadena ligera humana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 54;

(e) una región variable de cadena ligera humana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 63; y

(f) una región variable de cadena ligera humana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 72.

27. El anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva de un gen V_H 5-51 o V_H 3-30.3 humano.

28. El anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva de un gen V_k L6. 04/014 o L 18 humano.

HOJA DE REEMPLAZO

29. El anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una región variable de cadena pesada que es un producto de o se deriva de un gen V_2 5-51 o V_2 3-30.3 humano y una región variable de cadena ligera que es un producto de o se deriva de un gen V_k L6. 04/014 o L 18 humano.

30. Una célula anfitriona que comprende genes de cadena ligera y pesada que codifican el anticuerpo anti-PSMA de cualquiera de una de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha células anfitrionas carecen de actividad fucosiltransferasa efectiva y por lo tanto el anticuerpo anti-PSMA expresado por dichas células anfitrionas que carece de residuos de fucosa.

31. La célula anfitriona de la reivindicación 30, en donde los genes de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina son genes de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina.

32. La célula anfitriona de la reivindicación 30, en donde dicha fucosiltransferasa es FUT8.

33. La célula anfitriona de la reivindicación 30. la cual es una célula CHO.

34. Un método para inhibir el crecimiento de células PSMA que comprende poner en contacto dichas células con el anticuerpo anti-PSMA desfucosilatado de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes bajo condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de dichas células.

HOJA DE REEMPLAZO

35. El método de la reivindicación 34, en donde dichas células son células de tumor.

36. El método de la reivindicación 34, en donde dicho anticuerpo anti-PSMA es un anticuerpo humano.

37. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, en donde las células tumorales o células endoteliales vasculares próximas a las células tumorales que expresan PSMA, comprende administrar al sujeto el anticuerpo anti-PSMA desfucosilatado de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de células tumorales en el sujeto.

38. El método de la reivindicación 37, en donde dicho anticuerpo anti-PSMA es un anticuerpo humano.

39. El método de la reivindicación 37, en donde dichas células tumorales son células tumorales de cáncer de próstata.

40. El método de la reivindicación 37, en donde las células tumorales son de un cáncer seleccionado del grupo que consiste de colon, renal, rectal, urotelial, de mama, de vejiga, de hígado, de páncreas o melanoma.

427

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 72,885
FECHA : SEPTIEMBRE 10 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-096538- -00000-0000
Fecha: 2007-09-18 16:56:11
Tra. 11 PATENTEIYII Dep. 2020 NUECREACIONE
Act. 411 PRESENTACION Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 427

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63769921	10/09/2007	51,530,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL : $	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Color 16053-841-002-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-096538- -00000-0000
Fecha: 2007-09-18 16:56:11 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 427
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

428

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [ ] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Descripción de la invención [ ]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia