



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 36 049 T2 2008.01.10

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 064 303 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 36 049.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/05864

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 913 932.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/047554

(86) PCT-Anmeldetag: 18.03.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 23.09.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 03.01.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 09.05.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10.01.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C07K 14/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

44668 18.03.1998 US

(73) Patentinhaber:

Medarex Inc., Princeton, N.J., US

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

MURPHY, Gerald P., Seattle, WA 98112, US;  
BOYNTON, Alton L., Redmond, WA 98053, US;  
HOLMES, Eric H., Bothell, WA 98021, US; TINO,  
William Thomas, Redmond, WA 98052, US

(54) Bezeichnung: MONOKLONALE ANTIKÖRPER SPEZIFISCH FÜR DIE EXTRAZELLULÄRE DOMÄNE DES PROSTATA-SPEZIFISCHEN MEMBRANANTIGENS

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### 1. GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind monoklonale Antikörper, die an die extrazelluläre Domäne von Prostata-spezifischem Membranantigen (PSMA) binden, Hybridomzelllinien, die Antikörper produzieren und Verfahren zur Verwendung solcher Antikörper zur Diagnose und Behandlung von Krebs. Gegenstand der Erfindung ist insbesondere ein monoklonaler Antikörper, der gegen ein synthetisches Peptid generiert wird, das im Wesentlichen homolog zu einem Anteil der carboxyterminalen Region von PSMA ist, welcher Antikörper mit auf der Tumorzelloberfläche und in Seren von Patienten mit Prostatakrebs exprimiertem PSMA reagiert. Gegenstand der Erfindung sind zusätzlich vierunddreißig gegen eine Membranpräparation eines Prostatakarzinoms generierte monoklonale Antikörper, welche Antikörper auch mit auf der Zelloberfläche exprimiertem PSMA reagieren. Gegenstand der vorliegen Erfindung ist auch eine durch die Antikörper nachgewiesene neue Proteinvariante (PSM') von PSMA.

### 2. HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Prostatakrebs stellt die zweitführende Krebstodesursache unter Männern dar. Unter amerikanischen Männern gehört der Prostatakrebs faktisch zum am häufigsten diagnostizierten nicht-kutanen Krebs. Die Zahl der mit Prostatakrebs diagnostizierten Männer ist auf Grund der zunehmenden Population älterer Männer sowie des größeren Krankheitsbewusstseins, die zu seiner früheren Diagnose führen, ständig im Anstieg begriffen (Parker et al., 1997, CA Cancer J. for Clin. 47:5–28). Es wurde projiziert, dass im Jahr 1997 über 334500 Männer mit Prostatakrebs diagnostiziert würden und dass die Krankheit bei ca. 41800 zum Tod führen würde. Das Risiko, dass Männer während ihrer Lebenszeit an Prostatakrebs erkranken, liegt bei Kaukasiern bei ca. 1 von 5 und für Afroamerikaner bei 1 von 6. Diejenigen mit einer für Prostatakrebs positiven Familiengeschichte oder Afroamerikaner stellen Hochrisikogruppen dar. Über eine Lebenszeit betrachtet sterben mehr als Zweidrittel der mit Prostatakrebs diagnostizierten Männer an der Krankheit (Wingo et al., 1996, CA Cancer J. for Clin. 46:113–25). Überdies bedürfen viele Patienten, die dem Prostatakrebs nicht erliegen, der kontinuierlichen Behandlung zur Verbesserung der Symptome, wie zum Beispiel Schmerzen, Blutungen oder Harnobstruktion. Folglich stellt der Prostatakrebs auch eine bedeutende Ursache des Leidens und erhöhte Kosten für die Gesundheitsversorgung dar (Catalona, 1994, New Eng. J. Med. 331:996–1004).

**[0003]** PSMA stellt ein Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kD dar, das in den Prostatageweben exprimiert wird und ursprünglich durch Reaktivität mit einem als 7E11-C5 bezeichneten monoklonalen Antikörper identifiziert wurde (Horoszewicz et al., 1987, Anticancer Res. 7:927–935; US-Patent Nr. 5162504). PSMA wurde in gereinigter Form erhalten (Wright et al., 1990, Antibody Immunoconjugates and Radio Pharmaceuticals 3: Abstract 193) und als ein Typ II-Transmembranprotein, das Sequenzidentität mit dem Transferrinrezeptor (Israeli et al. 1994, Cancer Res. 54:1807–1811) aufweist, und mit NAALADase-Aktivität (Carter et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:749–753) gekennzeichnet. Wichtiger ist jedoch, dass PSMA beim Prostatakrebs in erhöhten Mengen exprimiert wird, und erhöhte PSMA-Spiegel auch in den Seren dieser Patienten nachweisbar sind (Horoszewicz et al., 1987, vorstehend; Rochon et al., 1994, Prostate 25:219–223; Murphy et al., 1995, Prostate 26:164–168; und Murphy et al., 1995, Anticancer Res. 15:1473–1479). Eine cDNA, die für PSMA kodiert, wurde kloniert (Israeli et al., 1993, Cancer Res. 51:227–230), und sie produziert zwei alternativ gespleißte mRNA-Spezies: eine mRNA-Spezies mit 2653 Nukleotiden, die für PSMA kodiert, und eine zweite 2387 Nukleotide enthaltende mRNA-Spezies, auf die als auf PSM' verwiesen wird (Su et al., 1995, Cancer Res. 55:1441–1443). Vor der vorliegenden Erfindung war nicht bekannt, ob PSM' für ein Proteinprodukt kodiert oder lediglich als eine nicht translatierte mRNA-Spezies existiert, weil ein PSM'-Proteinprodukt noch nie zuvor nachgewiesen wurde.

**[0004]** Ein jüngerer Bericht von Carter et al. (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:749–753) zeigt eine hochgradige Identität zwischen 1428 Basen, die einen Anteil der PSMA-cDNA und der cDNA-Sequenz vom Protein, N-acetylierte,  $\alpha$ -verknüpfte saure Dipeptidase (NAALADase), darstellt. NAALADase besitzt eine Enzymaktivität gegenüber dem Neuropeptid N-Acetylaspertylglyamat, um Glutamat und N-Acetylaspartat zu ergeben. Dieser Bericht weist darauf hin, dass die NAALADase-Aktivität dem PSMA-Protein innewohnt, aber der katalytische Anteil von PSMA nicht identifiziert wurde. NAALADase-Aktivität wurde in den PSMA exprimierenden LNCaP-Zellen, aber nicht in PC3-Zellen, die kein PSMS exprimieren, gefunden. Die Transfektion der PSMA-cDNA in PC3-Zellen führte zur Produktion von NAALADase-Aktivität und der Anwesenheit von PSMA in diesen Zellen.

**[0005]** Der Unterschied zwischen der cDNA von PSMA und PSM' besteht im Verlust der transmembranösen

und intrazellulären Kodierungsregionen, die die Nukleotide Nr. 1-171 oder Aminosäuren Nr. 1-57 enthalten. PSMA wird als ein Typ II-Membranprotein beschrieben, und es ist bekannt, dass sich die funktionelle katalytische Domäne von Typ II-Membranproteinen in der C-terminalen Extrazellulärregion des Moleküls befindet (De-Vries, et al., 1995, J. Biol. Chem., 270:8712-8722).

**[0006]** Die PSM'-mRNA findet sich im Vergleich zu Prostatageweben von Patienten mit benigner Hyperplasie oder Prostatakrebs in größeren Mengen in normalen Prostatageweben (Su et al., 1995, vorstehend). Dagegen wird PSMA-mRNA im Vergleich zu Patienten ohne Prostatakrebs in höheren Spiegeln in Patienten mit Prostatakrebs festgestellt (Su et al., 1995, vorstehend). Dieser beobachtete Unterschied ist konsistent mit den zuvor beschriebenen Serum-Proteinspiegeln von PSMA (Horoszewicz et al., 1987, vorstehend; Rochon et al., 1994, vorstehend; Murphy et al., 1995, vorstehend; und Murphy et al., 1995, vorstehend). In diesem Zusammenhang wurde ein erhöhter PSMA-Spiegel in Seren von Patienten mit Prostatakrebs mit Progression versus Remission der Krankheit korreliert und kann als prognostischer Marker verwendet werden (Murphy et al., 1995, vorstehend).

**[0007]** Das vom monoklonalen Antikörper 7E11-C5 erkannte Epitop wurde den ersten 6 Aminosäuren der N-terminalen Intrazellulärregion von PSMA zugeordnet (Troyer et al., 1995, Urol. Oncol. 1:29-37) (**Fig. 1**). Mit Hilfe der Elektronen-Immunzytochemie unter Verwendung von 7E11-C5 wurde sein Epitop auf dem Zytoplasma und spezifisch auf dem inneren Blatt der Plasmamembran lokalisiert (Troyer et al., 1994, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 35:283, Abstract 1688). In in vitro-Tests färbt der monoklonale Antikörper 7E11-C5 überdies nur fixierte und permeabilisierte Zellen (Horoszewicz et al., 1987, vorstehend), was mit dem Mapping des 7E11-C5-Epitops zum N-Terminus- oder der Intrazellulärdomäne von PSMA übereinstimmt. Während 7E11-C5 zum Nachweis von Prostatakrebs in vivo nützlich ist, der vermutlich sein Epitop durch Nekrose und/oder Apoptose exponiert, würde ein für die Extrazellulärdomäne von PSMA spezifischer monoklonaler Antikörper eine effizientere PSMA-Detektion auf der Krebszelloberfläche zulassen. Außerdem wird PSM' vom monoklonalen Antikörper 7E11-C5 nicht erkannt, da PSM', basierend auf der Sequenz seines mRNA-Transkripts, die Intrazellulärdomäne von PSMA mangelt.

**[0008]** Die Angabe oder die Identifizierung von jedweder Referenz in diesem Abschnitt oder in jedwedem anderen Abschnitt dieser Anmeldung darf nicht als Eingeständnis ausgelegt werden, dass ein derartiger Verweis als aus dem Stand der Technik für die vorliegende Erfindung zur Verfügung steht.

**[0009]** Murphy G. P. et al. („Measurement of prostate-specific membrane antigen in the serum with a new antibody“, Prostate, Vol. 28, Nr. 4, 1996, Seiten 266–271) offenbart einen gegen PSMA/PSM' gerichteten monoklonalen Antikörper, der durch die Bindung vom Hybridom 3F5.4G6 an ein lineares Epitop in der Extrazellulärregion von PSMA produziert wird, die die Aminosäurereste 716–723 überspannt, und bespricht seinen Nutzen bei der Detektion von PSMA bei an Prostatakrebs leidenden Patienten.

**[0010]** WO97/35616 offenbart auch das Hybridom 3F5.4G6 und monoklonale Antikörper, die von den Hybridomen 3D7-1.1 und 4E10-1.14 produziert werden, wobei die letzten beiden Antikörper auch an lineare Epitope in der Extrazellulärregion von PSMA/PSM' binden, die die Aminosäurereste 134–437 überspannt, und fähig sind, an PSMA exprimierende Lebendzellen zu binden.

### 3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0011]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind monoklonale Antikörper, die für ein konformationales Epitop der Extrazellulärdomäne von PSMA spezifisch sind, Hybridomzelllinien, die die Antikörper produzieren und Verfahren zur Verwendung der Antikörper zur Diagnose und Behandlung von Prostatakrebs sowie eine als PSM' bekannte variante Proteinform von PSMA, die von solchen Antikörpern erkannt wird.

**[0012]** Gegenstand der Erfindung ist teils die Entdeckung der Anmelderinnen von monoklonalen Antikörpern, die die Extrazellulärdomäne von PSMA erkennen.

**[0013]** Die erfindungsgemäßen Antikörper sind in Kombination mit einem Antikörper nützlich, der gegen die Intrazellulärdomäne von PSMA in einem Two-Site-Capture-Assay zur Detektion der Anwesenheit von PSMA in einer Testprobe gerichtet ist. Die hierin offenbarten Antikörper können überdies in einem Two-Site-Capture-Assay zum Nachweis der Anwesenheit von PSM' in einer Testprobe verwendet werden.

**[0014]** Es sind viele verschiedene erfindungsgemäße Verwendungszwecke eingeschlossen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Entwicklung und Verwendung eines Immunassays zur Detektion oder zur Stadi-

eneinteilung von Prostatakrebs in einem Patienten, der Bildgebung eines primären und/oder metastasierenden Prostatakrebses in vivo, therapeutischer Anwendungszwecke der Antikörper, einschließlich der Anwendungszwecke von an ein Zystostatikum oder Chemotherapeutikum konjugierten Antikörpern; und die Konstruktion und Verwendung von Antikörperfragmenten, chimären Antikörpern, humanisierten Antikörpern oder bifunktionalen Antikörpern.

**[0015]** Bestimmte hierin beschriebene Antikörper sind lediglich für Hintergrundszwecke und/oder um die Erfindung in Kontext zu bringen, bestimmt.

#### 4. KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0016]** [Fig. 1](#). Deduzierte Aminosäuresequenzen von PSMA- und PSM'-Antigenen (SEQ ID NO: 2) Israeli et al., 1994 Cancer Res. 54:1807–1811). Die PSM'-mRNA enthält nicht das 5'-Ende des PSMA, das für die ersten 57 Aminosäuren (erste Zeile der Aminosäuresequenz) kodieren würde und folglich vermutlich bei Aminosäure 58 beginnt. PSM' wurde jedoch vor der vorliegenden Erfindung noch nie in ihrer Proteinform identifiziert. Die unterstrichene Region stellt die putative Transmembrandomäne dar und die Region im Fettdruck (Aminosäure Nr. 716–723) stellt ein für die monoklonale Antikörper-Entwicklung ausgewähltes Peptid dar.

**[0017]** [Fig. 2](#). Nachweis des monoklonalen Antikörpers 3F5.4G6 (ein vom primären Hybridom 3F5 hergeleiteter Subklon) und seine Reaktivität mit einem Protein, das im LNCaP-Lysat mit einem Molekulargewicht von 120 kD vorhanden ist, das PSMA entspricht. Der Western Blot wurde mit dem HRP-anti-IgG-Sekundärantikörper entwickelt. Spur 1 = LNCaP-Lysat, sondiert mit 7E11-C5; Spur 2 = LNCaP-Lysat, sondiert mit 3F5.4G6.

**[0018]** [Fig. 3](#). Nachweis mittels Western Blot von PSMA in Seren von Patienten mit Prostatakrebs (Stadium D2) unter Verwendung monoklonaler Antikörper 3F5.4G6 (Spuren 3 und 4) und 7E11-C5 (Spuren 1 und 2) als Kontrolle.

**[0019]** [Fig. 4](#). Western Blot-Assay von LNCaP-Lysaten unter Verwendung der monoklonalen Antikörper 7E11-C5 (Spur 1) und 3F5.4G6 (Spur 2) und mit HRP-anti-IgM-Sekundärantikörper entwickelt. Sowohl 7E11-C5 als auch 3F5.4G6 erkannten ein Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kD. Außerdem erkannte 3F5.4G6 auch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 105–110 kD, das der vorhergesagten Proteinform von PSM' entspricht. Man sollte zur Kenntnis nehmen, dass 7E11-C5 PSM' nicht erkannte, weil das Epitop vom monoklonalen Antikörper 7E11-C5 nicht in PSM' gefunden wurde. Der Antikörper 3F5.4G6 erkennt den C-terminalen Anteil des Proteins (Aminosäure Nr. 716–723), der der Extrazellulärdomäne von PSMA und PSM' entspricht.

**[0020]** [Fig. 5](#). Nachweis, dass die monoklonalen Antikörper 7E11-C5 und 3F5.4G6 ein identisches Protein erkannten, dass aber 3F5.4G6 ein zusätzliches Protein erkannte, das PSM' entspricht. Das LNCaP-Lysat wurde initial mit dem monoklonalen Antikörper 7E11-C5 immunpräzipitiert und das immunpräzipitierte Material wurde auf SDS-Gelen getrennt und in einem Western Blot-Assay mit entweder den monoklonalen Antikörpern 7E11-C5 (Spuren 1–4) oder mit 3F5.4G6 (Spuren 5–8) sondiert. Bei den Spuren 1 und 5 handelte es sich um LNCaP-Rohlysat; bei den Spuren 2 und 6 um vorgereinigtes LNCaP-Lysat; bei den Spuren 3 und 7 um Material, das mit dem monoklonalen Antikörper 7E11-C5 immunpräzipitierte und bei den Spuren 4 und 8 um Proteine, die in dem zuvor immunpräzipitierten LNCaP-Lysat zurückgelassen wurden. Der Antikörper 7E11-C5 immunpräzipitierte ein Protein von 120 kD (Spur 3), das auch von 3F5.4G6 (Spur 7) erkannt wurde. Nach der Immunpräzipitation von 7E11-C5 wurde jedoch von 3F5.4G6 ein zweites Protein erkannt (Spur 8), das nicht von 7E11-C5 (Spur 4) präzipitiert wurde und das PSM' entsprach. Folglich wird PSM' nicht von 7E11-C5 erkannt.

**[0021]** [Fig. 6](#). Nachweis, dass die monoklonalen Antikörper 7E11-C5 und 3F5.4G6 ein identisches Protein von 120 kD erkannten. PSMA aus einem LNCaP-Lysat wurde vom monoklonalen Antikörper 3F5.4G6 immunpräzipitiert, die Proteine im Immunpräzipitat wurden auf einem SDS-Gel getrennt, an Immobilon P transferiert und in einem Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper 7E11-C5 sondiert. Spur 1 = LNCaP-Lysatkontrolle und mit 7E11-C5 sondiert; Spur 2 = 3F5.4G6-Immunpräzipitation.

**[0022]** [Fig. 7A](#) und B. Nachweis mittels FACS-Analyse der Erkennung von LNCaP-Lebendzellen durch den monoklonalen Antikörper 3F5.4G6, die die Antikörperbindung an die Extrazellulärdomäne von PSMA veranschaulicht. [Fig. 7A](#) stellt eine Kontrolle mit keinem Primärantikörper dar; und [Fig. 7B](#) stellt mit 100 µg/ml 3F5.4G6 inkubierte LNCaP-Zellen vor der FACS-Analyse dar. Die Verschiebung nach rechts deutet die Bindung des Antikörpers an die LNCaP-Lebendzellen an.

[0023] [Fig. 8](#). Nachweis der Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 3F5.4G6 mit aus Samenflüssigkeit isolierter und gereinigter PSM'. Spur 1 stellt LNCaP-Lysat und Spur 2 stellt gereinigtes PSM' aus Samenflüssigkeit dar. Die Proteine wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen getrennt und an Immobilon P-Papier transferiert und mittels Western Blot-Verfahren mit dem monoklonalen Antikörper 3F5.4G6 sondiert. Das aus Samenflüssigkeit gereinigte und in Spur 2 dargestellte Protein weist ein Molekulargewicht von 90 kD auf, wobei es sich wahrscheinlich um ein nicht glykosyliertes oder teilweise glykosyliertes Produkt von PSM' mit einem Molekulargewicht von 105–110 kD handelt.

[0024] [Fig. 9](#). Nachweis der Reaktivität der monoklonalen Antikörper 3D7-1.1 und 4E10-1.14 mit nativem PSMA und drei PSMA-Fragmenten. 96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit natürlichem PSMA oder einem von drei bakteriell exprimierten Polypeptidfragmenten von PSMA beschichtet und mit Hybridom-Überständen in einem ELISA zur Reaktion gebracht. Während alle drei getesteten Antikörper eine vergleichbare Bindung an natives PSMA zeigten, reagierten 3D7-1.1 und 4E10-1.14 stark mit einem Fragment, das einem Epitop in der Extrazellulärdomäne von PSMA entsprach.

[0025] [Fig. 10](#). Western Blot-Analyse von PSMA unter Verwendung der monoklonalen Antikörper 3D7-1.1. Spur 1 = LNCaP-Lysat; Spur 2 = PC-3-Lysat; Spur 3 = immunaffinitätsgereinigtes PSMA.

[0026] [Fig. 11](#). Western Blot-Analyse eines Baculovirus-exprimierten PSMA der vollen Länge. Rekombinante PSMA wurde auf SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, elektrogeblottet und mit verschiedenen Antikörperpräparationen sondiert.

Spur 1 = Blindprobe;  
 Spur 2 = Kontrollmedium (20 % FCS in RPMI 1640);  
 Spur 3 = monoklonaler Antikörper 3D7-1.1;  
 Spur 4 = monoklonaler Antikörper 3D7-1.2;  
 Spur 5 = monoklonaler Antikörper 3D7-1.3;  
 Spur 6 = monoklonaler Antikörper 3D7-1.7;  
 Spur 7 = monoklonaler Antikörper 3D7-2.7;  
 Spur 8 = monoklonaler (Ausgangs-)Antikörper 4E10;  
 Spur 9 = monoklonaler Antikörper 4E10-1.3;  
 Spur 10 = monoklonaler Antikörper 4E10-1.14;  
 Spur 11 = Blindprobe;  
 Spur 12 = Blindprobe;  
 Spur 13 = monoklonaler Antikörper 7E11-C5.

[0027] [Fig. 12A–D](#). Nachweis mittels FACS-Analyse und Erkennung von LNCaP-Lebendzellen durch den monoklonalen Antikörper 3D7-1.1 und 4E10-1.14, wobei die Antikörperbindung an die Extrazellulärdomäne von PSMA veranschaulicht wird. [Fig. 12A](#) stellt mit 4E10-1.14 inkubierte LNCaP-Zellen dar. [Fig. 12B](#) stellt mit 4E10-1.14 inkubierte PC-3-Zellen dar. [Fig. 12C](#) stellt mit 3D7-1.1 inkubierte LNCaP-Zellen dar. [Fig. 12D](#) stellt mit 3D7-1.1 inkubierte PC-3-Zellen dar. Die verschiedenen Muster bei der Verschiebung nach rechts in [Fig. 12A](#) und [Fig. 12C](#) deuten darauf hin, dass die beiden Antikörper gegebenenfalls verschiedene Epitope von PSMA erkennen könnten.

[0028] [Fig. 13](#). Detektion von PSMA mittels eines Two-Site-Capture-ELISA unter Verwendung von zwei monoklonalen Antikörpern an distinkten Epitopen von PSMA. Reihenverdünntes immunaffinitätsgereinigtes PSMA wurde mit 7E11-C5 beschichteten 96-Well-Platten zugefügt und durch Inkubieren mit 3D7-1.1- oder 4E10-1.14-Überständen nachgewiesen. Die Absorption bei 405 nm wurde in einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen. — = 3D7-1.1; —■— = 4E10-1.14.

[0029] [Fig. 14](#). Detektion von PSMA in einer Reihe verschiedener biologischer Proben mittels eines Two-Site-Capture-ELISA unter Verwendung der monoklonalen Antikörper 3D7-1.1 und 4E10-1.14.

[0030] [Fig. 15](#). Detektion von immunaffinitätsgereinigtem PSMA, reihenverdünnt in normalem humanem Serum, mittels eines Two-Site-Capture-ELISA unter Verwendung der monoklonalen Antikörper 3D7-1.1 und 4E10-1.14.

[0031] [Fig. 16](#). Detektion von PSMA mittels eines alternativen Two-Site-Capture-ELISA. Reihenverdünntes, immunaffinitätsgereinigtes PSMA wurde mit 3D7-1.1-beschichteten 96-Well-Platten zugefügt und mittels Inkubieren mit biotinyliertem 7E11-C5 (40 µg/ml), gefolgt von Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin, nachgewiesen. Die Absorption bei 405 nm wurde in einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen. 7E11-C5 wurde

unter Verwendung von EZ-Link Biotinylation Kits (Pierce) gemäß den Anleitungen des Herstellers biotinyliert.

**[0032]** [\*\*Fig. 17.\*\*](#) Western Blot-Analyse von LNCaP-Zelllysat und verschiedenen Fraktionen eines semigereinigten PSMA-Fragments (entspricht den Aminosäuren 134 bis 750 von PSMA der vollen Länge, die als ein Insert von 1,9 kb in einem Baculovirus-Expressionssystem exprimiert wurden), das mit dem Gewebekulturerstand aus dem Hybridom 4E10-1.14 sondiert wurde. Die Identifizierung des Proteinprodukts aus dem 1,9 kb großen Konstrukt (Aminosäuren 134–750 von PSMA) ist durch den Pfeil angezeigt.

**[0033]** Spur 1 = Marker; Spur 2 = LNCaP-Rohzelllysat; Spur 3 = Viruspellet, d. h. 100000 xg Pellet aus mit dem Baculovirus infizierten lysierten SF9-Zellen, der ein 1,9 kb großes PSMA-Fragment exprimiert; Spur 4 = 100000 xg Überstandsfraktion aus mit dem Baculovirus infizierten lysierten SF9-Zellen, der ein 1,9 kb großes PSMA-Fragment exprimiert; Spur 5 = Durchfluss der in Spur 4 gezeigten Fraktion nach der Passage durch eine Ni-NTA-Matrix; Spur 6 = Elution der Ni-NTA-Matrix mit 0,5 M NaCl; Spur 7 = Elution der Ni-NTA-Matrix mit 1 M Imidazol, pH 7,6; Spur 8 = Durchfluss der in Spur 4 gezeigten Fraktion nach der Passage durch eine Ni-NTA-Matrix; Spur 9 = Elution der Ni-NTA-Matrix mit 0,5 M NaCl; und Spur 10 = Elution der Ni-NTA-Matrix mit 1 M Imidazol, pH 7,6. Beachtet werden sollte auch in Spur 2 die Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 4E10-1.14 mit in LNCaP-Zellen exprimiertem nativem PSMA der vollen Länge.

**[0034]** [\*\*Fig. 18.\*\*](#) Western Blot von Rohlysaten von mit einem Baculovirus infizierten SF9-Zellen, der entweder ein irrelevantes Insert oder ein 1,9 kb großes Insert, das für einen PSMA-Anteil (Aminosäuren 134–750 von PSMA der vollen Länge) kodiert, die mit dem Antikörper 7E11-C5 sondiert wurden. Spuren 1, 2 = MW-Marker; Spur 3 = irrelevantes, Virusinfiziertes SF9-Zelllysat; Spur 4 = SF9-Zelllysat; und Spur 5 = Virus-infiziertes SF9-Lysat, das ein 1,9 kb großes PSMA-Insert enthält. Beachtet werden sollte, dass mit keinem der in den SF9-Zellen vorliegenden Proteinprodukte oder denen mit einem der beiden Viren infizierten 7E11-C5-positive Banden beobachtet wurden.

**[0035]** [\*\*Fig. 19.\*\*](#) Western Blot von PSMA und PSM', erhalten aus LNCaP-Zellen, humaner Samenflüssigkeit und humanem Serum, die mit dem monoklonalen Antikörper 3D7-1.1 sondiert wurden. Spur 1 = LNCaP-Zelllysat; Spur 2 = 7E11-C5-immunoaffinitätsgereinigtes PSMA aus LNCaP-Zellen, Spur 3 = humane Samenflüssigkeit; und Spur 4 = humanes Serum vom Mann. Die Positionen von PSMA und PSM' sind angezeigt.

**[0036]** [\*\*Fig. 20.\*\*](#) Diagrammatische Darstellung von PSMA und PSMA-Fragmenten, die als bakterielle Fusionsproteine exprimiert werden. PSMA der vollen Länge ist definiert als Aminosäuren 1 bis 750. Bei PSM' fehlen die ersten 57 Aminosäuren, die auch die Transmembrandomäne (TM, Reste 20 bis 43) des Proteins enthalten. Die verwendeten PSMA-Fragmente setzen sich aus den Aminosäuren 1 bis 173, Aminosäuren 134 bis 437 und Aminosäuren 438 bis 750, wie in der Figur ersichtlich ist, zusammen. Die Antikörper sind unter der Region des Proteins angegeben, die annähernd dem Ort ihrer Bindungsepitopen entsprechen. Der untere Anteil der Figur listet 3 Antikörper auf, von denen festgestellt wurde, dass sie nur an native Konformationen des Proteins und nicht an denaturiertes Protein oder Proteinfragmente binden. Basierend auf immunzytochemischen und flowzytometrischen Experimenten mit Lebendzellen werden diese Epitope der Extrazellulärdomäne in den Aminosäuren 44 bis 750 zugeordnet.

## 5. AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0037]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind monoklonale Antikörper, die für konformationale Epitope auf der Extrazellulärdomäne von PSMA spezifisch sind, Verfahren zur Verwendung dieser Antikörper und eine durch diese Antikörper identifizierte trunkierte Proteinvariante PSM'. Obwohl die hierin beschriebenen spezifischen Verfahren und Methoden unter Verwendung eines C-terminalen Peptids, einer PSMA-exprimierenden Tumormembranpräparation oder eines gereinigten PSMAs an immunisierte Mäuse erläutert werden, dienen sie lediglich der Erläuterung der praktischen Ausführung der Erfindung. Analoge Verfahren und Techniken sind gleichermaßen auf viele verschiedene Tierwirte anwendbar, die gegen PSMA in der Form von Protein, Peptiden, Zelloberflächenantigen und Rohmembranpräparationen immunisiert wurden.

### 5.1 HYBRIDOMZELLINNEN UND ANTIKÖRPERPRODUKTION

**[0038]** In einer spezifischen Ausführungsform anhand des Beispiels in Abschnitt 6, nachstehend, wurde ein sich aus der C-terminalen Region von PSMA herleitendes synthetisches Peptid als Immunogen verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass ein als 3F5.4G6 bezeichneter Antikörper an die Extrazellulärdomäne von PSMA bindet, die auf der Zelloberfläche lebender Prostatakrebszellen und in den Seren von Patienten mit Prostatakrebs exponiert ist. Außerdem weisen die Arbeitsbeispiele in den Abschnitten 7 und 8, nachstehend, darauf hin, dass

nach der Immunisierung von Tieren mit einer PSMA-exprimierenden Tumormembranpräparation die Produktion zusätzlicher monoklonaler Antikörper gegen die Extrazellulärdomäne von PSMA gerichtet ist. In diesem Zusammenhang können Krebszellen, wie zum Beispiel LNCaP, die PSMA exprimieren, mit der PSMA-Kodiersequenz transfizierte Wirtszellen, gereinigte PSMA, Peptide der PSM'- oder PSMA-Extrazellulärdomäne als Immunogen zum Auslösen einer Immunantwort in Tierwirten zur Generierung monoklonaler Antikörper, die für die Extrazellulärdomäne von PSMA spezifisch sind, verwendet werden.

**[0039]** Somatische Zellen mit dem Potenzial zur Antikörperproduktion und, insbesondere B-Lymphozyten, sind zur Fusion mit einer B-Zell-Myelomlinie geeignet. Diese Antikörperproduzierenden Zellen, die sich im teilenden Plasmablastenstadium befinden, fusionieren bevorzugt. Somatische Zellen können aus den Lymphknoten, der Milz und dem peripheren Blut von mit Antigen geprägten Tieren gewonnen werden, und die lymphatischen Zellen der Wahl hängen weitgehend von ihrem empirischen Nutzen im entsprechenden Fusionsystem ab. Einmal geprägte oder hyperimmunisierte Tiere können als Quelle Antikörper-produzierender Lymphozyten verwendet werden. Mauslymphozyten ergeben einen höheren Prozentsatz stabiler Fusionen mit den nachstehend beschriebenen Myelomlinien von der Maus. Von diesen ist die BALB/c-Maus bevorzugt. Jedoch können auch andere Mausstämme, Kaninchen, Hamster, Schafe und Frösche als Wirte zur Präparation Antikörper-produzierender Zellen verwendet werden. Wie von Goding (in: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2. Aufl., S. 60–61, Orlando, Fla, Academic Press, 1986) besprochen, kann die Verwendung von Rattenlymphozyten mehrere Vorteile bereitstellen.

**[0040]** Als Alternative sind humane somatische Zellen, die zur Produktion von Antikörpern, spezifisch B-Lymphozyten, fähig sind, zur Fusion mit Myelomzelllinien geeignet. Während B-Lymphozyten aus der biopsierten Milz, den Tonsillen oder Lymphknoten des Individuums verwendet werden können, sind die leichter zugänglichen B-Lymphozyten im peripheren Blut bevorzugt. Die Lymphozyten können sich von Patienten mit diagnostizierten Prostatakarzinomen herleiten. Humane B-Zellen können außerdem durch das Epstein-Barr-Virus direkt immortalisiert werden (Cole et al., 1995, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., S. 77–96).

**[0041]** Myelomzelllinien, die zur Verwendung in Hybridom-produzierenden Fusionsverfahren, die bevorzugt keine Antikörper produzieren, geeignet sind, weisen eine hohe Fusionseffizienz und Enzymdefizienzen auf, die sie unfähig machen, in bestimmten Selektivmedien zu wachsen, welche das Wachstum der gewünschten Hybridome unterstützen. Beispiele solcher Myelomzelllinien, die zur Produktion fusionierter erfundungsgemäßer Zellhybriden verwendet werden können, schließen P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4.1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul ein, die sich alle von Mäusen herleiten; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F und 4B210, die sich von Ratten herleiten und U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, die sich alle von Menschen herleiten (Goding in: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2. Aufl., S. 65–66, Orlando, Fla, Academic Press, 1986; Campbell, in: Monoclonal Antibody Technology, Laborstory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden und von Knippenberg, Hrsg., S. 75–83, Amsterdam, Elsevier, 1984).

**[0042]** Verfahren zum Generieren von Hybriden von der Antikörperproduzierenden Milz oder Lymphknotenzellen und Myelomzellen umfassen gewöhnlich das Mischen somatischer Zellen mit Myelomzellen in einem Verhältnis von 2:1 (obwohl das Verhältnis von ca. 20:1 bis ca. 1:1 variieren kann), in Anwesenheit eines Mittels oder von Mitteln (chemisch oder elektrisch), das/die die Fusion von Zellmembranen fördert/fördern. Es wird häufig bevorzugt, dass die gleiche Tierspezies als Quelle der im Fusionsverfahren verwendeten somatischen und Myelomzellen verwendet wird. Fusionsverfahren wurden von Kohler und Milstein (1975, Nature 256:495–497, 1976, Eur. J. Immunol. 6:511–519), und von Gefter et al. (1977, Somatic Cell Genet. 3:231–236) beschrieben. Bei den von diesen Untersuchern verwendeten Fusionsförderungsmitteln handelte es sich um das Sendai-Virus bzw. Polyethylenglykol (PEG). Die von Goding (1986, in: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2. Aufl., S. 71–74, Orlando, Fla, Academic Press) besprochenen Fusionsverfahren, die die vorstehende sowie die elektrisch induzierte Fusion einschließen, sind auch zur Generierung erfundungsgemäßer monoklonaler Antikörper geeignet.

**[0043]** Fusionsverfahren produzieren gewöhnlich viable Hybriden, bei sehr niedriger Frequenz, ca.  $1 \times 10^{-6}$  bis  $1 \times 10^{-8}$  somatische Zellen. Auf Grund der niedrigen Frequenz, mit der viable Hybriden erhalten werden, ist es wesentlich, dass man ein Mittel zum Auswählen fusionierter Zellhybriden aus den zurückgebliebenen nicht fusionierten Zellen, insbesondere der nicht fusionierten Myelomzellen hat. Ein Mittel zur Detektion der erwünschten Antikörperproduzierenden Hybridome unter den anderen resultierenden fusionierten Zellhybriden ist auch notwendig.

**[0044]** Im Allgemeinen werden die fusionierten Zellen in Selektivmedien, zum Beispiel im HAT-Medium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin, kultiviert. Das HAT-Medium erlaubt die Proliferation von Hybridenzellen und verhindert das Wachstum von nicht fusionierten Myelomzellen, die sich in der Regel weiterhin unbegrenzt teilen würden. Aminopterin blockiert die de novo-Purin- und -Pyrimidinsynthese durch Inhibition der Produktion von Tetrahydrofolat. Das Zufügen von Thymidin umgeht die Blockade der Pyrimidinsynthese, während Hypoxanthin in das Medium eingeschlossen wird, damit inhibierte Zellen unter Verwendung des Salvage-Pathway der Nukleotide Purin synthetisieren. Die eingesetzten Myelomzellen stellen Mutanten dar, denen die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) fehlt und folglich den Salvage-Pathway nicht nutzen können. In dem überlebenden Hybriden stellt der B-Lymphozyt die genetische Information zur Produktion dieses Enzyms bereit. Da B-Lymphozyten selbst in Kultur eine begrenzte Lebensspanne (ca. zwei Wochen) aufweisen, handelt es sich bei den einzigen Zellen, die in HAT-Medium proliferieren können, um die aus Myelom- und Milzzellen gebildeten Hybriden.

**[0045]** Zur Förderung des Screenings des durch die Hybriden sezernierten Antikörpers und zur Verhinderung, dass individuelle Hybriden andere überwachsen, wird das Gemisch von fusioniertem Myelom und B-Lymphozyten in HAT-Medium verdünnt und in multiplen Wells von Mikrotiterplatten kultiviert. In zwei bis drei Wochen, wenn Hybridklone mikroskopisch sichtbar werden, wird die Überstandsflüssigkeit der individuellen Wells, die die Hybridklone enthalten, auf spezifische Antikörper untersucht. Der Assay muss empfindlich, einfach und schnell sein. Die Assay-Verfahren schließen Radioimmunassays, Enzymimmunassays, Zytotoxizitätsassays, Plaque-Assays, Dot Immuno Binding Assays und dergleichen ein.

**[0046]** Sobald die gewünschten fusionierten Zellhybriden ausgewählt und in individuelle Antikörperproduzierende Zelllinien kloniert sind, kann jede Zelllinie auf die eine oder andere von zwei standardmäßigen Weisen propagiert werden. Eine Probe des Hybridoms kann in ein histokompatibles Tier des Typs injiziert werden, der zur Bereitstellung der somatischen und Myelomzellen für die Originalfusion verwendet wurde. Das injizierte Tier entwickelt Tumoren, die den spezifischen monoklonalen Antikörper, der durch den fusionierten Zellhybriden produziert wird, sezernieren. Die Körperflüssigkeiten des Tieres, wie zum Beispiel Serum oder Aszitesflüssigkeit, können zur Bereitstellung monoklonaler Antikörper in hoher Konzentration abgenommen werden. Als Alternative können die individuellen Zelllinien *in vitro* in Laborkulturgefäßen propagiert werden; das Kulturmedium, das auch hohe Konzentrationen eines einzelnen spezifischen monoklonalen Antikörpers enthält, kann durch Dekantieren, Filtration oder Zentrifugation geerntet werden.

**[0047]** Außer der Hybridom-Technologie können für die Extrazellulärdomäne von PSMA spezifische monoklonale Antikörper mittels anderer im Stand der Technik überall bekannter Verfahren produziert werden. So können zum Beispiel molekulare Ansätze unter Verwendung der Phagen-Display-Technologie zur Expression von PSMA bindenden variablen Antikörperregionen verwendet werden (US-Patente Nr. 5223409; 5403484 und 5571698).

**[0048]** Monoklonale Antikörper oder gereinigte Fragmente der monoklonalen Antikörper mit mindestens einem Anteil einer Antigenbindungsregion, die zum Beispiel Fv-, F(ab')<sub>2</sub>-, Fab-Fragmente (Harlow und Lane, 1988, Antibody, Cold Spring Harbor), Einzelketten-Antikörper (US-Patent 4946778), chimäre oder humanisierte Antikörper (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851; Newuberger et al., 1984 Nature 81:6851) und Komplementarität-bestimmende Regionen (CDR) einschließen, können mittels üblicher Verfahren hergestellt werden. Die Reinigung der Antikörper oder Fragmente kann durch viele verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren erreicht werden, einschließlich der Präzipitation durch Ammoniumsulfat oder Natriumsulfat, gefolgt von einer Dialyse gegen Kochsalz, Ionenaustauschchromatographie, Affinitäts- oder Immunaffinitätschromatographie wie auch Gelfiltration, Zonenelektrophorese usw. (siehe Goding in: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2. Aufl., S. 104–126, Orlando, Fla, Academic Press).

## 5.2 CHARAKTERISIERUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN UND PSM'

**[0049]** Unter Verwendung von allgemein in Abschnitt 5.1 vorstehend und in den Abschnitten 6–8, nachstehend, beschriebenen Verfahren wurden fünfunddreißig Hybridomzelllinien auf Grund ihrer Produktion von für die Extrazellulärdomäne von PSMA spezifischen monoklonalen Antikörpern ausgewählt. Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfasst die in den Abschnitten 6, 7 und 8, nachstehend, erläuterten monoklonalen Antikörper, die spezifisch an konformationale Epitope der Extrazellulärdomäne von PSMA und PSM' binden, die insbesondere jedwede Antikörper einschließen, die die Bindung von jedwedem einen oder jedweden mehreren der vorstehend erwähnten Antikörper gegen PSMA kompetitiv inhibieren, wie in einem Enzymimmunassay, einem Radioimmunassay oder in jedwedem anderen kompetitiv bindenden Immunassay beurteilt wurde.

**[0050]** Der Antikörper 3F5.4G6 stellt einen Antikörper vom IgM-Isotyp dar, der spezifisch an PSMA bindet, der in Prostatakrebszelllysaten und auf der Zelloberfläche von Prostatakrebszellen ebenso wie in Seren, die von Patienten mit Prostatakrebs erhalten werden, exprimiert wird. Außerdem bindet 3F5.4G6 auch spezifisch an PSM'. Das 3F5.4G6-reaktive PSMA-Epitop ist extrazellulär, C-terminal und distinkt von dem durch 7E11-C5 erkannten (Horoszewicz et al., *Cancer Res.* 7:927–936), das im Zytoplasma der Zelle Membran-assoziiert ist. Die Antikörper 3D7-1.1 und 4E10-1.14 stellen auch IgM-Antikörper dar und binden an PSMA, das in Prostatakrebszelllysaten und auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Diese Antikörper können zum Nachweis von sowohl primärem Prostatakrebs als auch metastasierenden Tumoren, wie zum Beispiel Knochenmetastasen bei Prostatakrebs verwendet werden. Außerdem wurden zweiunddreißig Antikörper des IgG-Isotyps generiert, und sie sind für Epitope überall in der Extrazellulärdomäne von PSMA spezifisch. Antikörper des IgG-Isotyps aktivieren die Komplementvermittelte Zytolyse und binden über ihre Fc-Region an phagozytische Zellen. Außerdem kann ihre kleinere Größe und Stabilität gegebenenfalls eine bessere Penetration als IgM in Geweben *in vivo* zulassen.

**[0051]** Während der Entwicklung einer Antikörperantwort sezernieren die Antikörper-produzierenden Zellen zuerst den IgM-Isotyp, der nach und nach auf IgG umschaltet. Derartige Klassen-Switch-Ereignisse treten durch das DNA-Rearrangement von Genen in konstanter Region auf, damit die gleiche Antigenspezifität erhalten bleibt. Die verschiedenen Antikörper-Isotypen besitzen verschiedene Effektorfunktionen. IgM und alle IgG-Unterklassen außer IgG4 können nach der Antigenbindung Komplement fixieren. Dagegen bindet IgE bei einer allergischen Reaktion zum Triggern der Histaminfreisetzung an Mastzellen.

**[0052]** Hybridomzelllinien produzieren auch während der Langzeitkultur Klassen-Switch-Varianten. Insbesondere monoklonale Antikörper, die von IgM auf IgG oder IgG<sub>1</sub> auf IgG<sub>2a</sub> umschalten, wurden auf Grund ihrer höheren Affinität zu Protein A ausgewählt, wodurch ihre Reinigung gefördert wird. Jedwede Klassen-Switch-Variante kann auf eine besonders wünschenswerte Effektorfunktion selektiert werden (Spira et al., 1985, in: *Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine*, Hrsg. Springer, S. 77–88, Plenum Press, NY; Harlow und Lane, 1988 *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory). Da einige von ihnen vom IgM-Isotyp sind, ist im Fall der erläuterten Antikörper erwünscht, auch auf IgG-Varianten zu selektieren, die die gleiche Antigenspezifität besitzen, die für bestimmte Zwecke *in vitro* oder *in vivo* gegebenenfalls nützlicher sein könnten. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind IgG-Varianten der erfindungsgemäß monoklonalen Antikörper, die 3F5.4G6, 3D7-1.1 und 4E10-1.14 einschließen.

**[0053]** Abschnitte 6–8, nachstehend, zeigen, dass die erläuterten Antikörper ein Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kD erkennen. Die meisten dieser Antikörper erkennen insbesondere auch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 105–110 kD in Prostatatumorzelllysaten. Während das 120 kD große Protein auch vom Antikörper 7E11-C5 erkannt wird, wird das Protein mit niedrigerem Molekulargewicht nur durch die erfindungsgemäß Antikörper nachgewiesen. Deshalb stellt das Protein von 105–110 kD das Produkt einer als PSM' bekannten mRNA dar. Vor der vorliegenden Erfindung wurde ein PSM'-Protein jedoch noch nie berichtet, und es wurde angenommen, dass es sich um eine nicht translatierte mRNA handelt. Da der Aminosäuresequenz von PSM', wie von ihrer RNA-Sequenz abgeleitet, vermutlich die Zytoplasma- und Transmembranregionen von PSMA fehlen, ist miteinander vereinbar, dass 7E11-C5, auf Grund seiner Spezifität für ein intrazelluläres Epitop, mit diesem Produkt nicht reagieren würde. Im Gegensatz dazu erkennen Antikörper, die für die Extrazellulärdomäne von PSMA spezifisch sind, auch PSM'.

### 5.3 KODIERSEQUENZEN VON PSMA-SPEZIFISCHEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

**[0054]** In einer anderen erfindungsgemäß Ausführungsform können die erläuterten Hybridomzelllinien zur Herstellung von Zusammensetzungen verwendet werden, die eine Antigenbindungsstelle oder Antikörpertypen umfassen, welche die murinen variablen oder hypervariablen Regionen mit der humanen konstanten Region oder den konstanten und variablen Framework-Regionen, d. h. chimäre oder humanisierte Antikörper ebenso wie humanisierte Antikörper, die nur die Antigen-bindenden CDRs aus dem Ausgangsantikörper in Assoziation mit humanen Framework-Regionen erhalten, kombinieren (siehe, Waldmann, 1991, *Science* 252:1657, 1662, insbesondere 1658–59 und darin angegebene Referenzen). Es wird erwartet, dass solche chimären oder humanisierten Antikörper, welche die Bindungsspezifität des murinen Antikörpers beibehalten, eine reduzierte Immunogenität aufweisen, wenn sie für erfindungsgemäß diagnostische, prophylaktische oder therapeutische Applikationen *in vivo* verabreicht werden.

**[0055]** In noch anderen erfindungsgemäß Ausführungsformen umfasst die Verwendung der Hybridomzelllinien als eine Quelle von DNA oder mRNA, kodierend für die rearrangierten, aktivierte Immunglobulingene, die isoliert, durch bekannte rekombinante DNA-Verfahren kloniert und an andere Zellen zur Produktion von An-

tigen-bindenden Fragmenten, die für die Extrazellulärdomäne von PSMA spezifisch sind, transferiert werden können. Durch die Isolierung von rearrangierter DNA oder die Präparation von cDNA aus der Messenger-RNA der erfindungsgemäßen Hybridomzelllinie, kann eine Sequenz frei von Intronen erhalten werden.

**[0056]** Zur Erläuterung und nicht durch Einschränkung kann eine Immunexpressionsbibliothek hergestellt und auf Antikörper-bindende Fragmente für PSMA und PSM' wie folgt durchsucht werden (siehe, Huse et al., 1989, Sci. 246:1275–1281; Mullinax et al., 1990, Proc. Natl Acad. Sci. USA 87:8045–8099). Die Gesamt-RNA kann (z. B. unter Verwendung gewerblich erhältlicher Kits) gereinigt und unter Verwendung eines Oligo-(dT)-Primers für die Leichtkette (L-Kette) und einen spezifischen Primer für die Schwerkette (H-Kette) unter Verwendung einer reversen Transkriptase, in cDNA umgewandelt werden. In der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann die Amplifikation der H- und L-Kettensequenzen des Immunglobulins mit Sets von Primerpaaren getrennt durchgeführt werden. Sich stromaufwärts befindende Primer können zum Hybridisieren an partiell konservierte Sequenzen in den Leader- und/oder Framework-Regionen von  $V_H$  oder  $V_L$  ausgelegt werden, und sich stromabwärts befindende Primer können zum Hybridisieren an Sequenzen in einer konstanten Domäne ausgelegt werden. Solche Primer würden L-Ketten der vollen Länge konservieren und H-Ketten bereitstellen, die dem Fd von IgG entsprechen, und die H-L-Disulfidbindungen konservieren. Die PCR-amplifizierten L- und H-DNA-Fragmente werden dann verdaut und getrennt in H- und L-Kettenvektoren ligiert. Solche Vektoren enthalten eine pelB-Leader-Sequenz, eine Ribosomenbindungsstelle und Stopcodons. Geeignete λ-Phagenvektoren zur Expression in *E. coli* können aus gewerblich erhältlichen Vektoren (ImmunoZAP L, ImmunoZAP H; Stratacyte, La Jolla, CA) hergestellt werden. Die ligierte rekombinante Phagen-DNA wird mit einem in vitro-Packungsextrakt in den Bakteriophagen inkorporiert und zum Infizieren von *E. coli* verwendet. Die so erstellte Immunexpressionsbibliothek wird unter Verwendung von PSMA, PSM' oder einem spezifischen Peptid davon auf Antigen-bindungsfragmente durchsucht. Positive Klone können gescreent und wie von Mullinax et al. (vorstehend) beschrieben gescreent und identifiziert werden.

#### 5.4 VERWENDUNGEN VON EXTRAZELLULÄREN PSMA-DOMÄNEN-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN UND ANTIKÖRPERZUSAMMENSETZUNGEN

**[0057]** Obwohl die hierin beschriebenen spezifischen Verfahren und Methoden unter Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper erläutert sind, sind sie für die erfindungsgemäße praktische Ausführung lediglich als veranschaulichend vorgesehen. Gereinigte Fragmente der monoklonalen Antikörper mit mindestens einem Anteil der Antigen-bindenden Region, die Fv-,  $F(ab')_2$ -, Fab-Fragmente, Einzelketten-Antikörper, chimäre oder humanisierte Antikörper oder CDRs einschließen, können in den nachstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren und Methoden verwendet werden.

##### 5.4.1 IMMUNHISTOLOGISCHE UND IMMUNZYTOTOLOGISCHE APPLIKATIONEN

**[0058]** Erfindungsgemäße monoklonale Antikörper können zum Nachweis von Prostatakarzinomzellen in histologischen und zytologischen Proben und insbesondere zum Unterscheiden maligner Tumoren von normalen Geweben und nicht malignen Tumoren verwendet werden. Die Gewebsproben können mittels der Antikörper gefärbt und ihre Bindung durch einen zweiten Antikörper, der an eine Markierung, wie zum Beispiel Peroxidase, Fluoreszein, alkalische Phosphatase und dergleichen konjugiert wurde, nachgewiesen werden.

**[0059]** Außerdem können die Immunfluoreszenz-Verfahren die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper zur Untersuchung des humanen Gewebes, Zell- und Körperflüssigkeitsproben verwenden. In einem typischen Protokoll werden Objektträger mit Gefrierschnitten von gefrorenen, nicht fixierten, durch Biopsie erhaltenen Gewebsproben oder zytologische Abstriche luftgetrocknet, mit Formalin oder Aceton fixiert und mit der monoklonalen Antikörperpräparation in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert.

**[0060]** Die Objektträger werden dann gewaschen und weiter mit einer Antikörperpräparation, die gegen den monoklonalen Antikörper gerichtet ist, gewöhnlich einen Typ des Antimaus-Immunglobulins, wenn sich die verwendeten monoklonalen Antikörper von der Fusion eines Lymphozyten am der Mausmilz und einer Maus-Myelomzelllinie herleiten, inkubiert. Dieses Antimaus-Immunglobulin wird mit einer Verbindung, zum Beispiel Rhodamin- oder Fluoreszeinisothiozyanat, das bei einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert, getaggt. Das Färbungsmuster und die Färbungsintensitäten in der Probe werden dann mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt und optional photographisch registriert.

**[0061]** Als noch andere Alternative kann die Computer-enhanced Fluoreszenzbildanalyse oder die Flowzytometrie zur Untersuchung der Gewebsproben oder exfoliierten Zellen, d. h. Einzelzellpräparationen aus Aspirationsbiopsien von Prostatatumoren unter Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper ein-

gesetzt werden. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper sind besonders nützlich bei der Quantifizierung von lebenden Tumorzellen, d. h. Einzelzellpräparationen aus Aspirationsbiopsien von Prostatatumoren mittels des Computer-enhanced Fluoreszenzbildanalysators oder mit einem Flowzytometer. Die erfindungsgemäßen Antikörper sind in solchen Assays zum Differenzieren benigner von malignen Prostatatumoren besonders nützlich, da PSMA, an das die monoklonalen Antikörper binden, von malignen Tumoren in erhöhten Mengen exprimiert wird. Der prozentuale Anteil der PSMA-positiven Zellpopulation, allein oder zusammen mit der Bestimmung der DNA-Ploidie dieser Zellen, kann zusätzlich sehr nützliche prognostische Informationen durch Bereitstellung eines frühen Indikators für die Krankheitsprogression darstellen.

**[0062]** In einer noch anderen alternativen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper in Kombination mit anderen bekannten Prostata-Antikörpern zur Bereitstellung zusätzlicher Informationen in Bezug auf den malignen Phänotyp eines Prostatakarzinoms verwendet werden.

#### 5.4.2 IMMUNSEROLOGISCHE APPLIKATIONEN

**[0063]** Die Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper kann sich auf das Screening von humanen biologischen Flüssigkeiten auf Anwesenheit der erkannten spezifischen Antigendeterminanten erstrecken. Die immunserologische in vitro-Bewertung biologischer Flüssigkeiten, die den Patienten entnommen werden, ermöglichen hierdurch die nicht invasive Diagnose von Krebs. Humane Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Prostataflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Vollblut, Serum oder Urin, können, zur Erläuterung, einem Patienten entnommen werden und auf das spezifische Epitop, entweder als freigesetztes Antigen oder Membran-gebunden an Zellen in der Probenflüssigkeit unter Verwendung monoklonaler Antikörper, die für die Extrazellulärdomäne von PSMA und PSM' in Standard-Radioimmunassays oder Enzyme-linked Immunassays, kompetitiv bindender Enzyme-linked Immunassays, Dot-Blot oder Western Blot oder anderer im Stand der Technik bekannten Assays spezifisch sind, bestimmt werden.

**[0064]** Außerdem kann durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen die nicht überlappenden Epitopen auf PSMA und PSM' gerichtet sind, ein empfindlicherer diagnostischer Assay auf PSMA- oder PSM'-Protein entwickelt werden. Antikörper, die für die gegenüberliegenden Enden von PSMA, wie zum Beispiel 7E11-C5 und die erfindungsgemäßen Antikörper spezifisch sind, sind besonders zur Verwendung in einem derartigen Assay geeignet. In dieser Hinsicht kann ein Antikörper mit einem Substrat zum Capturing von PSMA oder PSM' in einer biologischen Flüssigkeit verankert werden, während der andere Antikörper zur Detektion des Antikörper-gebundenen Antigens verwendet wird. Da die Expression von PSMA und PSM' überdies beim Prostatakrebs bzw. in normalen Prostatageweben erhöht ist, können Antikörper, die diese beiden Formen unterscheiden, zur Bereitstellung einer genaueren Weise zur Überwachung der Tumorregression versus -progression nach der Behandlung eingesetzt werden. Da die meisten erfindungsgemäßen Antikörper beide Formen erkennen, aber 7E11-C5 nur an PSMA bindet, können diese Antikörper zusammen zur Bestimmung der genauen Spiegel von jeder Form in einem Patienten verwendet werden, wodurch ihre Mengen mit der Tumorlast korrelieren. 7E11-C5 kann zum Beispiel als ein verankerter Antikörper in einem Two-Site-Capture-Assay verwendet werden, und jedweder eine der anderen Extrazellulärdomänen-spezifischen Antikörper kann als ein Nachweisantikörper zur Quantifizierung von PSMA verwendet werden. Andererseits kann jedwede Kombination von zwei der Extrazellulärdomänen-spezifischen Antikörper von PSMA in einem ähnlichen Two-Site-Capture-Assay zum spezifischen Messen der PSM'- plus PSMA-Konzentrationen insgesamt verwendet werden. Eine einfache Subtraktion von PSMA von PSMA und PSM' insgesamt quantifiziert spezifisch PSM'.

**[0065]** Außer der Detektion der Extrazellulärdomäne von PSMA und PSM' durch einen monoklonalen Antikörper in Geweben und Körperflüssigkeiten können Messungen der NAALADase-Enzymaktivität zur Quantifizierung der Extrazellulärdomäne von PSMA und/oder PSM' in Geweben und/oder Körperflüssigkeiten verwendet werden.

**[0066]** So können zum Beispiel die Gewebespiegel durch ein Detergents, das homogenisierte Gewebe solubilisiert, Pelletierung des unlöslichen Materials durch Zentrifugation und Messen der NAALADase-Aktivität im zurückbleibenden Überstand bestimmt werden. Auf ähnliche Weise kann auch die NAALADase-Aktivität in Körperflüssigkeiten durch zuerst Pelletieren des zellulären Materials durch Zentrifugieren und Durchführen eines typischen Enzym-Assays auf NAALADase-Aktivität am Überstand gemessen werden.

**[0067]** Die NAALADase-Assay-Protokolle, die den Vorteil der Antikörper bindenden Spezifitäten nutzen, können auch eingeschlossen werden. So könnten zum Beispiel feste Oberflächen, die mit entweder 7E11-C5 oder den erfindungsgemäßen Antikörpern beschichtet sind, zum Capturing des PSMA- oder PSM'-Proteins zur Detektion unter Verwendung eines NAALADase-Enzym-Assays verwendet werden. Folglich kann dies zur diffe-

renziellen Detektion und Quantifizieren des PSMA-Proteins der vollen Länge und PSM' in einer Probe verwendet werden, vorausgesetzt, dass ein Extrazellulärdomänen-spezifischer Antikörper an sowohl PSMA als auch PSM' bindet, wohingegen 7E11-C5 nur an PSMA binden würde.

**[0068]** Zweckmäßiger NAALADase-Enzym-Assays, die den Vorteil der Reaktionseigenschaften von Glutamatdehydrogenase wahrnehmen, können auch angewendet werden (Frieden, 1959, J. Biol. Chem., 234:2891). In diesem Assay stellt das Reaktionsprodukt des NAALADase-Enzyms Glutaminsäure dar. Dies leitet sich von der Enzymkatalysierten Spaltung von N-Acetylaspartylglutamat her, um N-Acetylasparaginsäure und Glutaminsäure zu ergeben. Glutaminsäure, in einem NAD(P)<sup>+</sup> erforderlich machenden Schritt, ergibt 2-Oxoglutarat plus NAD(P)H in einer durch Glutamatdehydrogenase katalysierten Reaktion. Der Reaktionsablauf kann aufgrund der Umwandlung von NAD(P)<sup>+</sup> in NAD(P)H leicht und zweckmäßigerweise durch Änderung der Absorption bei 340 nm gemessen werden. Folglich können Verbesserungen an dem Assay der NAALADase-Aktivität, die auf einem Festphasenformat mit immobilisierten Capture-Antikörpern anwendbar ist, erreicht werden. Auf diese Weise können mehrere Assays in einem Mikroplatten-Lesegerät, das auf der Absorptionsänderung bei 340 nm vor und nach dem Zufügen von NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> basiert, gleichzeitig durchgeführt werden. Er wurde nicht auf die Festphasen-Assays beschränkt, da Lösungsassays, von zum Beispiel Serum, mit diesem Typ des NAALADase-Assays auch möglich wären.

**[0069]** Kits, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper oder Fragmente davon enthalten, können zur in vitro-Diagnose, -Prognose und/oder der -Überwachung des Prostatakarzinoms durch die vorstehend beschriebenen immunhistologischen, immunzytologischen und immunserologischen Verfahren hergestellt werden. Die Komponenten der Kits können entweder in wässrigem Medium oder in lyophilisierter Form verpackt werden. Wenn die monoklonalen Antikörper (oder Fragmente davon) in den Kits in der Form von Konjugaten verwendet werden, worin ein Markierungsteil, wie zum Beispiel ein Enzym oder ein radioaktives Metallion angelagert ist, können die Komponenten solcher Konjugate entweder in vollkommen konjugierter Form, in der Form von Intermediaten oder als durch den Verwender des Kits zu konjugierende separate Teile geliefert werden.

**[0070]** Ein Kit kann einen Träger umfassen, der zur Aufnahme in engem Raum darin von einem oder mehr Behältnismittel(n) oder einer Reihe von Behältnismitteln, wie zum Beispiel Teströrchen, Durchstichflaschen, Kolben, Flaschen, Spritzen oder dergleichen, kompartimentalisiert ist. Ein erstes dieser Behältnismittel oder eine Reihe von Behältnismitteln kann den monoklonalen Antikörper (oder ein Fragment davon) oder PSMA oder PSM' enthalten. Ein zweites Behältnismittel oder eine Reihe von Behältnismitteln kann eine Markierung oder ein Linker-Markierungsintermediat, das zur Bindung an den Primärantikörper (oder ein Fragment davon), PSMA oder PSM' fähig ist, enthalten.

#### 5.4.3 DIAGNOSTISCHE, PROPHYLAKTISCHE UND THERAPEUTISCHE ANWENDUNGEN IN VIVO

**[0071]** Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper oder Fragmente davon sind besonders nützlich zum Targetieren der Prostatakrebszellen in vivo. Sie können zur Tumorlokalisierung, zum Nachweis und zur Überwachung ebenso wie für die Therapie des primären Prostatakarzinoms und Metastasen angewendet werden. Für diese in vivo-Applikationen ist die Verwendung gereinigter monoklonaler Antikörper oder gereinigter Fragmente der monoklonalen Antikörper mit mindestens einem Anteil einer Antigenbindungsregion, die zum Beispiel Fv-, F(ab')<sub>2</sub>-, Fab-Fragmente (Harlow und Lane, 1988, Antibody Cold Spring Harbor), Einzelketten-Antikörper (US-Patent 4946778), chimäre oder humanisierte Antikörper (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851; Newuberger et al., 1984 Nature 81:6851), CDR und dergleichen einschließt, bevorzugt. Die Reinigung der Antikörper oder Fragmente kann mithilfe vieler verschiedener dem Fachmann bekannter Verfahren, einschließlich Präzipitation durch Ammoniumsulfat oder Natriumsulfat, gefolgt von der Dialyse gegen Kochsalzlösung, Ionenaustauschchromatographie, Affinitäts- oder Immunaffinitätschromatographie ebenso wie Gelfiltration, Zonenelektrophorese usw. erreicht werden (siehe Goding in: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2. Aufl., S. 104–126, Orlando, Fla, Academic Press).

**[0072]** Zur Anwendung beim in vivo-Nachweis und/oder bei der Überwachung des Prostatakarzinoms können die gereinigten monoklonalen Antikörper kovalent, entweder direkt oder über einen Linker, an eine Verbindung angelagert werden, die als eine Reporter-Gruppe dient, um die Bildgebung von spezifischen Geweben oder Organen nach der Verabreichung und Lokalisierung der Konjugate oder Komplexe zu erlauben. Eine Reihe vieler verschiedener Substanztypen können als Reporter-Gruppe dienen, die zum Beispiel radioopake Farbstoffe, radioaktives Metall und Nichtmetallisotope, fluorogene Verbindungen positronenemittierende Isotope, nicht paramagnetische Metalle usw. einschließen.

**[0073]** Zur Anwendung bei der in vivo-Therapie des Prostatakarzinoms können die gereinigten monoklonalen Antikörper allein oder kovalent, entweder direkt oder über einen Linker, an eine Verbindung, welche nach Verabreichung und Lokalisierung der Konjugate die malignen Zellen oder Gewebe abtötet und/oder die Proliferation derselben inhibiert, verwendet werden. Wenn der Antikörper allein angewendet wird, kann er die Zerstörung des Tumors durch Komplementfixierung oder Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität vermitteln. Als Alternative kann der Antikörper in Kombination mit einem Chemotherapeutikum zum Erreichen synergistischer therapeutischer Wirkungen verabreicht werden (Baslya und Mendelsohn, 1994 Breast Cancer Res. and Treatment 29:127–138). Eine Reihe vieler verschiedener Substanztypen können zur therapeutischen Anwendung direkt an den Antikörper konjugiert werden, zu diesen gehören radioaktives Metall und Nichtmetallisotope, Chemotherapeutika, Toxine usw. (Vitetta und Uhr, 1985, Annu. Rev. Immunol. 3:197).

**[0074]** Gemäß einer alternativen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper zur in vivo-Therapie des Prostatakarzinoms dergestalt modifiziert werden, dass sie in der Form eines bifunktionalen oder bispezifischen Antikörpers, d. h. als ein Antikörper mit einer Antigen-bindenden Region, die für die Extrazellulärdomäne des Prostata-spezifischen Membranantigens spezifisch ist und eine Antigen-bindende Region, die für eine Effektorzelle spezifisch ist, die eine tumorizide oder tumorinhibitorische Aktivität aufweist, vorliegen. Die beiden Antigen-bindenden Regionen des bispezifischen Antikörpers sind entweder chemisch verknüpft oder können durch eine zur Produktion des bispezifischen Antikörpers genetisch manipulierte Zelle exprimiert werden (Siehe im Allgemeinen Fanger et al., 1995 Drug News & Perspec. 8(3):133–137). Geeignete Effektorzellen mit tumorizider Aktivität schließen die folgenden ein, sind aber nicht beschränkt auf zytotoxische T-Zellen (hauptsächlich CD8<sup>+</sup>-Zellen), natürliche Killerzellen usw. Eine wirksame Menge eines erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörpers wird an einen Patienten mit Prostatakarzinom verabreicht, und der bispezifische Antikörper tötet die malignen Zellen nach der Lokalisierung an den Stellen der primären oder metastasierenden Tumoren, die PSMA tragen, ab und/oder inhibiert ihre Proliferation.

**[0075]** Verfahren zur Herstellung von Antikörper-Konjugaten der erfindungsgemäßen Antikörper (oder Fragmenten davon), die zur Detektion, zur Überwachung und/oder Therapie nützlich sind, werden in den US-Patenten Nr. 4671958; 4741900 und 4867973 beschrieben.

**[0076]** Antikörper und Antigen-bindende Antikörperfragmente können mithilfe chemischer Konjugation oder rekombinanter DNA-Technologie auch an ein heterologes Protein oder Peptid konjugiert werden. Das sich ergebende chimäre Protein besitzt die Antigen-bindende Spezifität des Antikörpers und die Funktion des heterologen Proteins. Ein Polynukleotid, das zum Beispiel für die Antigen-bindende Region eines Antikörpers kodiert, der für die Extrazellulärdomäne von PSMA spezifisch ist, kann genetisch an eine Kodiersequenz für die Zeta-Kette des T-Zellrezeptors fusioniert werden. Nach der Expression dieses Konstrukts in T-Zellen, werden die T-Zellen ex vivo expandiert und in einen Patienten mit Prostatakrebs infundiert. Die dieses chimäre Protein exprimierenden T-Zellen werden spezifisch an Tumoren gerichtet, die auf Grund der Antikörper-bindenden Spezifität PSMA exprimieren und die Abtötung der Tumorzellen veranlassen. Als Alternative wird ein Antikörper an ein Protein fusioniert, das die Migration von Leukozyten induziert oder eine Affinität zum Anziehen anderer Verbindungen an die Tumorstelle aufweisen. Ein spezifisches Protein dieses Typs stellt Streptavidin dar. Der Bindung eines Streptavidin-konjugierten Antikörpers an eine Tumorzelle kann das Zufügen eines biotinierten Arzneimittels, Toxins oder Radioisotops folgen, um die spezifische Abtötung des Tumors zu veranlassen.

**[0077]** Kits zur Verwendung mit einer solchen in vivo-Tumorlokalisierung und solchen Therapieverfahren, die die monoklonalen Antikörper (oder Fragmente davon) konjugiert an jedwede der vorstehenden Substanztypen enthalten, können hergestellt werden. Die Komponenten der Kits können entweder in wässrigem Medium oder in lyophilisierter Form verpackt werden. Wenn die monoklonalen Antikörper (oder Fragmente davon) in den Kits in der Form von Konjugaten verwendet werden, in denen eine Markierung oder ein therapeutischer Teil, wie zum Beispiel ein radioaktives Metallion oder ein therapeutisches Arzneimittelteil angelagert ist, können die Komponenten solcher Konjugate entweder in vollständig konjugierter Form, in der Form von Intermediaten oder als durch den Verwender des Kits zu konjugierende separate Teile geliefert werden.

## 6. BEISPIEL: PRODUKTION EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS GEGEN EIN PSMA-PEPTID

### 6.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

#### 6.1.1 HERSTELLUNG EINES IMMUNISIERUNGSPERIODS

**[0078]** PSMA-Peptid Nr. 716–723 ( $\text{NH}_2\text{-ESKVDP SK}$ ) (SEQ ID NO: 1) wurde an Keyhole-Limpet-Hämocyanin

(KLH) als einen Träger unter Verwendung des EDC-Verfahrens nach Pierce (Rockford, IL) gekoppelt. Der Peptid-KLH-Komplex wurde in inkomplettem Freund-Adjuvant (Sigma, St. Louis, MO) mit 1 mg/ml Muramylpeptid (MDP, Pierce, Rockford, IL) in einer Endkonzentration von 250 µg/ml gekoppelt. Die emulgierte Antigenpräparation wurde bei 4 °C gelagert.

#### 6.1.2 IMMUNISIERUNG

**[0079]** Weibliche BALB/c-Mäuse wurden alle vierzehn Tage für eine Dauer von sechs Wochen subkutan mit 0,1 ml des emulgierten Peptid-Träger-Komplexes immunisiert. Den Mäusen wurde Blut abgenommen und ihre Seren wurden in einem Peptid-spezifischen Radioimmunassay (RIA) auf die Anwesenheit von gegen das Peptid gerichteten Antikörpern getestet. Mäuse, die für gegen das Peptid gerichtete Antikörper mit einem Titer von 1:1000 oder größer positiv testeten, wurden in einem Fusionsprotokoll als Spender verwendet. Drei Tage vor der Fusion wurden die Mäuse mit 50 µg Peptid-KLH-Komplex, aufgelöst in Kochsalzlösung, intraperitoneal immunisiert.

#### 6.1.3 ZELLFUSION

**[0080]** Drei Tage nach dem endgültigen Boost mit dem gleichen Peptid-KLH-Komplex wurde die Milz einer BALB/c-Maus aseptisch entfernt, und es wurde eine Einzellsuspension hergestellt. Die roten Blutzellen wurden durch osmotischen Schock lysiert und die zurückbleibenden Lymphozyten wurden in RPMI-1640-Medium suspendiert. Die Splenozyten wurden mit P3X63Ag8U.1 (X63) Myelomzellen (CRL 1597 von ATCC, Rockville, MD) in einem Verhältnis von 10:1 ( $100 \times 10^6$  Splenozyten:  $10 \times 10^6$  X63 Myelomzellen) gemischt. Die Fusion der Splenozyten an X63-Zellen wurde mithilfe des Verfahrens von Galfre und Milstein (1981, Methods in Enzymology, Vol. 73, Immunochemical Techniques, Teil B) durchgeführt. Die Hybridomzellen wurden durch den Einschluss von Aminopterin in das Zellkulturmedium (RPMI-1640-20 % fetales Kalbserum) ausgewählt.

#### 6.1.4 SCREENING VON PRIMÄREN HYBRIDOMEN

**[0081]** Fünfzig Mikroliter (µl) des Zellkulturüberstands wurden aus den individuellen Hybridomkulturen entfernt und in einem Peptid-spezifischen RIA auf die Anwesenheit von Peptid-spezifischen Antikörpern getestet. Die Überstände wurden, um es kurz zusammenzufassen, den Wells einer 96-Well-Pro-Bind-Platte (Falcon) zugefügt, die zuvor mit Peptid, gekoppelt an bovinen Serumalbumin (BSA) in Höhe von 50 µg/ml beschichtet wurden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Platten viermal mit PBS-0,1 % BSA gewaschen. Jedem Well wurden fünfzig Mikroliter einer Verdünnung (1:500) von Kaninchen-Antimäuse-IgM und -IgG (ICN) zugefügt und die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden wie vorstehend viermal gewaschen und jedem Well wurden 50 µl  $^{125}\text{I}$ -Protein A zugefügt. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und wie vorstehend viermal gewaschen. Die Platten wurden über Nacht einem Autoradiographie-Film (Kodak, X-OMAT) ausgesetzt und entwickelt. Positive Wells wurden ausgewählt und die Zellen wurden in einem Zellkulturmedium zum weiteren Testen expandiert.

#### 6.1.5 WESTERN BLOT-SCREENING

**[0082]** Überstände aus den positiven und expandierten Wells wurden in einem Western Blot-Assay auf anti-PSMA-Antikörper getestet. Lysate aus der LNCaP-Tumorzelllinie (CRL 1740 von ATCC, Rockville, MD), einem Prostatatumor, der PSMA exprimiert, wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel 90 Minuten bei 175 Volt laufen lassen. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden an eine an Immobilon-P™-Membran elektrogeblottet und die Membran wurde mittels einer Inkubation über Nacht mit 5 % BLOTO in Tris-gepufferter Kochsalzlösung blockiert. Die Membran wurde in einen Bio-Rad-Multi-Screen-Apparat (Bio-Rad) gegeben, und es wurden ca. 650 µl Hybridom-Überstand in die individuellen Spuren pipettiert. Die Membran wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Blot wurde 5-mal mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung-0,5 % Tween-20 (TBS-T) gewaschen. Der gewaschene Blot wurde mit Peroxidase-markierter Ziegen-Antimäuse-IgG (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) in einer Verdünnung von 1:5000 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde wie vorstehend 5-mal gewaschen und 1 Minute mit 2 ml Lumi-GLO™-Chemilumineszenz-Substrat (KPL, Gaithersburg, MD) inkubiert. Der Blot wurde einem Autoradiographie-Film ausgesetzt und entwickelt. Positive Hybridom-Wells (anti-PSMA-Reaktivität) wurden identifiziert und zur weiteren Entwicklung ausgewählt.

#### 6.1.6 LIMITING DILUTION-KLONIERUNG

**[0083]** Die Wells mit dem positiven primären Hybridom, die durch ihre Reaktivität auf PSMA im vorstehend

beschriebenen Western Blot-Assay identifiziert wurden, wurden durch Limiting Dilution kloniert. Die Zellen wurden auf 1 Zelle/ml in komplettem Zellkulturmedium, das syngene Thymozyten als eine Feeder-Zellpopulation enthielt, angepasst. Die Zellsuspension wurde in Aliquoten von 200 µl in die Wells einer 96-Well-Platte abgegeben. Nach einer 7- bis 10-tägigen Kultivierung waren Zellkolonien sichtbar. Wells, die Einzelkolonien enthielten, wurden herausgepickt, und die Zellen wurden in 24-Well-Platten (Kulturen von 1,5 ml) expandiert. Die Überstände von den klonalen Zellen wurden geerntet und im vorstehend beschriebenen Western Blot-Assay auf anti-PSMA-Antikörper getestet. Positive Klone wurden expandiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 6.1.7 BILDUNG VON ASZITESFLÜSSIGKEIT UND ANTIKÖRPERREINIGUNG

**[0084]** Sieben bis 10 Tage vor der Injektion der Hybridomzellen ( $10 \times 10^6$ ) wurden BALB/c-Mäuse mit 0,4 ml Pristan intraperitoneal geprämt. Die den monoklonalen Antikörper enthaltende Aszitesflüssigkeit wurde in periodischen Intervallen drainiert und bei 4 °C gelagert. Der monoklonale Antikörper wurde unter Verwendung des ImmunoPure™ IgM-Reinigungskits von Pierce (Rockford, IL) von Aszitesflüssigkeit gereinigt.

#### 6.1.8 IMMUNPRÄZIPITATION VON PSMA

**[0085]** Es wurden LNCaP-Tumorzellen (ca.  $10 \times 10^6$ ) mit 1 ml NP-40-Lysepuffer (150 mM NaCl, 1 % NP-40, 50 mM Tris) 30 Minuten bei 4 °C geprämt. Das Lysat wurde bei 12000 U/min zentrifugiert und der sich ergebende Überstand wurde durch Inkubation mit 50 µl normalem Mausserum 30 Minuten vorgereinigt, gefolgt vom Zufügen von 60 µl einer 20 %igen Suspension von Anti-Maus-IgM-Agarose-Beads. Nach der 1-stündigen Inkubation bei 4 °C wurde die Präparation zur Entfernung der Beads zentrifugiert und der sich ergebende Überstand wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3F5.4G6 zur Reaktion gebracht. Drei Lysaten (in Wiederholung) wurden variierende Mengen des monoklonalen Antikörpers 3F5.4G6 (2,5, 5 und 10 µg) zugefügt und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Einhundert Mikroliter einer 10 %igen Suspension von Anti-Maus-IgM-Agarose-Beads (Sigma) wurden zugefügt, und die Lysate wurden eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Lysate wurden bei 12000 U/min zentrifugiert, und die Agarose-Beads wurden dreimal mit NP-40-Lysepuffer gewaschen. Den Beads wurden 30 µl Elektrophoreseproben-Puffer zugefügt und sie wurden 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Beads wurden bei 12000 U/min kurz zentrifugiert, und der Probenpuffer wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Proben wie vorstehend beschrieben elektrogeblottet, und es wurde unter Verwendung des PSMA-spezifischen monoklonalen Antikörpers 7E11-C5 als der Reporter-Antikörper ein Western Blot durchgeführt.

#### 6.1.9 FLOWZYTOMETRISCHE ANALYSE

**[0086]** Die Zellen wurden zuerst mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gespült. Versen-Lösung (0,2 g EDTA.4Na/L) (2 ml für einen 75 cm<sup>3</sup> Kolben) wurde zugefügt. Der größte Teil der Versen-Lösung wurde vor der 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur entfernt. PBS wurde zugefügt und die Zellen wurden durch Pipettieren losgelöst. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und gezählt. Fünfhunderttausend bis zu einer Million Zellen wurden mit 50 µl Primärantikörper 30 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von zweimaligem Waschen mit PBS. Die Zellen wurden anschließend mit 50 µl FITCmarkiertem Sekundärantikörper (Ziegen-Antimaus-IgG für 7E11-C5 oder Ziegen-Antimaus-IgM für 4G6) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der überschüssige Sekundärantikörper wurde mit PBS von den Zellen gewaschen. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines Flowzytometers (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA) analysiert. Die Zelltrümmer wurden aus den Zellpopulationen, die bezogen auf ihre Vorwärts- und Seitwärtsstreuungsprofile analysiert wurden, ausgeschlossen.

#### 6.1.10 SERUM-ASSAYS MITTELS WESTERN BLOT

**[0087]** Die Serumproben wurden in Lysepuffer (1 % Triton X-100, 50 mM HEPES, 10 % Glycerol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM AEBSF, 1 mM EGTA) 1:7 verdünnt. Das LNCaP-Lysat wurde in Lysepuffer 1:35 verdünnt. Die verdünnten Proben wurden dann in einem Verhältnis von 2:3 mit Probenpuffer (SDS-Reduktionspuffer) kombiniert. Die Proben (20/µl) wurden auf 8,5 % SDS-PAGE (Protein-Endkonzentration von 93 mg pro Probe, wie unter Verwendung des Bio-Rad-Protein-Assays bestimmt) laufen lassen, und die getrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran für eine Stunde bei 90 Volt geblottet. Die Membranen wurden dann über Nacht in 5 % Milch-TBS blockiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen eine Stunde mit 3 µg/ml 7E11-C5-Antikörper in TBS-T sondiert, 5-mal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen und mit 167 ng/ml Schaf-Antimaus-Meerrettich-peroxidase-markiertem Sekundärantikörper 30 Minuten in TBS-T sondiert. Die Membranen wurden wiederum 5-mal für 5 Minuten jeweils in TBS-T gewaschen und die Membranen unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrat-Kits entwickelt (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) (Rochon et al., 1994,

The Prostate 15:219–223).

**[0088]** Die Blots wurden durch Aussetzen gegenüber einem Röntgenfilm sichtbar gemacht, wobei eine Proteinbande bei ca. 120 kD in Erscheinung trat. Das Blot-Image wurde mit einem Microtek ScanMaker IIHR-Scanner gescannt und die Bandenintensitäten mithilfe einer „an einem Macintosh Quadra 605 Computer unter Verwendung des sich in der öffentlichen Domäne befindenden NIH-Image-Programms (geschrieben von Wayne Rasband an den U.S. National Institutes of Health und erhältlich vom Internet durch ein anonymes ftp von zippy.nimh.nih.gov oder auf einer Diskette von NTIS, 5285 Port Royal Rd., Springfield, VA 22161, Teile-Nr. PB93-504868) durchgeführten Analyse gemessen“. Alle Patientenproben wurden gegen eine gesunde normale Spenderprobe und an einer Probe von einem Patienten mit Prostatakrebs mit einem hohen PSMA vom gleichen Western Blot wie die Standardkontrollen gemessen“.

#### 6.1.11 NACHWEIS DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT VON PSM'

**[0089]** Einhundert Milliliter humaner Samen wurden unter den WHO-Richtlinien zur Fertilitätstestung von bezahlten Spendern gesammelt. Das Zellmaterial wurde durch Zentrifugation 30 Minuten bei 10000 U/min pelleiert und der Überstand sorgfältig entfernt und über Nacht gegen zwei Wechsel von 20 mM Tris-Puffer, pH 7,6, dialysiert. Das Dialysat wurde wieder bei 10000 U/min zentrifugiert und auf eine DEAE-Sephacryl-Säule, die zuvor mit 20 mM Tris-Puffer, pH 7,6, gewaschen wurde, geladen. Die geladene Säule wurde dann wieder mit 500 ml des gleichen Puffers geladen und die Proteine durch Aufbringen eines 20 mM bis 200 mM Tris-Puffer-Gradienten bei pH 7,6 getrennt. Es wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt. Das Vorliegen von PSMA in jeder Fraktion wurde mittels des Western-Dot-Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 7E11-C5 bestimmt. Die Fraktionen, die 7E11-C5 reaktive Proteinbanden enthielten, wurden gepoolt und unter Verwendung von 70 %igem Ammoniumsulfat präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 10000 U/min 30 Minuten pelletiert und dann in 1 Liter 200 mM Tris-Puffer, pH 7,6, resuspendiert. Die solubilisierten Proteine wurden dann über Nacht gegen zwei Wechsel von 20 mM Tris-Puffer, pH 7,6, dialysiert. Das dialysierte Material wurde dann auf eine vorgewaschene Sephadex-Säule geladen und die Proteine eluiert, es wurden 3-ml-Fraktionen gesammelt. An dem eluierten Protein wurde ein Western-Dot-Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F5.4G6 durchgeführt. Die Fraktionen 88–96 waren positiv und jede dieser Fraktionen wurde mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Reinheit getestet.

#### 6.2 ERGEBNISSE

**[0090]** Zum Generieren monoklonaler Antikörper gegen die Extrazellulärdomäne von PSMA wurden mehrere Regionen des Proteins in Bezug auf ihre relative Hydrophilie basierend auf dem Verfahren nach Hopp und Woods (1983, Mol. Immunol. 20:483–489) analysiert.

**[0091]** In Tabelle 1, nachstehend, ist die relative Hydrophilie von mehreren untersuchten Peptiden ersichtlich. Insbesondere wurde ein Peptid mit der Sequenz von ESKVDPSK (Glu-Ser-Lys-Val-Asp-Pro-Ser-Lys) (SEQ ID NO: 1) synthetisiert, das den Zahlen der Aminosäurereste 716–723 in der C-terminalen Region von PSMA entspricht. Außerdem könnten andere Anteile der Extrazellulärdomäne, wie in Tabelle 1 gezeigt, oder die gesamte Extrazellulärdomäne selbst zur Herstellung von Antikörpern gegen die Extrazellulärdomäne verwendet werden. Im Gegensatz dazu induzierten zwei Aminosäurepeptide, die dem Rest Nr. 44–58 und dem Rest Nr. 196–213 entsprechen, Antipeptid-Antikörper-Anwesen und banden nicht an natives PSMA.

TABELLE 1

#### Relative Hydrophilie von PSMA-Peptiden

PEPTID (Aminosäure Nr.)	RELATIVE HYDROPHILIE
63–69	1,41
183–191	1,24
404–414	1,45
479–486	1,5
716–723	1,39

**[0092]** Vor der Immunisierung wurde das Peptid ESKVDPSK (SEQ ID NO: 1) zuerst an KLH als einen Träger

konjugiert. Die Mäuse wurden dann immunisiert und mit dem gleichen konjugierten Material in wöchentlichen Intervallen geboostet. Die Milz der Tiere mit einem nachweisbaren Antipeptid-Serumtitert wurde isoliert und mit den Myelomzellen fusioniert.

**[0093]** Initiale Screenings wurden mittels Bindungsassays unter Verwendung von Peptid-gebundenem BSA als Antigen durchgeführt. Fünfzig Mikroliter des Zellkulturüberstandes wurden aus den individuellen Hybridomkulturen entfernt und in einem Peptid-spezifischen Radioimmunassay auf die Anwesenheit von Peptid-spezifischen Antikörpern getestet. Die Überstände wurden, um es kurz zusammenzufassen, den Wells einer 96-Well-Pro-Bind-Platte zugefügt, die zuvor mit an bovines Serumalbumin (BSA) gekoppeltem Peptid beschichtet wurde. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Platten mit PBS gewaschen. Fünfzig Mikroliter einer Verdünnung von 1:500 von Kaninchen-Antimaus-IgM und -IgG wurden jedem Well zugefügt und die Platten eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden dann 4x gewaschen und es wurden jedem Well 50 µl <sup>125</sup>I-Protein A zugefügt. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und wie vorstehend 4x gewaschen. Die Platten wurden einem Autoradiographie-Film über Nacht ausgesetzt und entwickelt. Die positiven Wells wurden ausgewählt und die Zellen wurden in einem Zellkulturmedium zum weiteren Testen expandiert. Unter den identifizierten positiven Wells wurde ein als 3F5 bezeichnetes Hybridom in einem Western Blot-Assay weiter getestet, und es wurde gezeigt, dass sein sezernierter Antikörper mit in LNCaP-Lysaten enthaltenem PSMA reagierte. Die LNCaP-Zellen wurden wie von Horoszewicz et al. (1983, Cancer Res. 43: 1809–1818) beschrieben kultiviert, und die Lysate wie von Rochon et al. (1994, Prostate 25: 219–223) beschrieben hergestellt. Die 3F5-Hybridomzellen wurden durch Limiting Dilution kloniert, zahlenmäßig expandiert und in einem Western Blot-Assay erneut getestet. Ein Subklon des Antikörpers, auf den als auf 3F5.4G6 verwiesen wird, trat mit einem Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kD in den LNCaP-Lysaten in Reaktion ([Fig. 2](#)). Dieser Antikörper wurde als ein IgM isotyptisiert. Der von Boehringer Mannheim erhältene ISOStrip zum Isotypisieren der monoklonalen Antikörper von der Maus wurde zum Bestimmen des Isotyps von 3F5.4G6 verwendet. Der monoklonale Antikörper wurde 1:100 in PBS verdünnt und die verdünnte Probe (150 µl) einem Entwicklungsröhrchen zugefügt, das mit dem Kit geliefert wurde, und 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann kurz geröhrt. Der Isotyp-Streifen wurde dann in das Röhrchen insertiert und 5 Minuten entwickelt. In entweder dem λ- oder κ-Abschnitt des Streifens ebenso wie in einem der Klassen- oder Subklassen-Abschnitte trat eine blaue Bande in Erscheinung. Der monoklonale Antikörper 3F5.4G6 wurde als ein IgM-Isotyp identifiziert.

**[0094]** Der monoklonale Antikörper 3F5.4G6 wurde weiter gegen Seren getestet, die von Patienten mit Prostatakrebs des Stadiums D2 in Progression entnommen wurden, wobei der monoklonale Antikörper 7E11-C5 als Kontrolle verwendet wurde ([Fig. 3](#)). Beide Antikörper identifizierten eine Bande mit einem Molekulargewicht von Ca. 120 kD ([Fig. 3](#)). Es wurde ein zusätzlicher Western Blot-Assay von LNCaP-Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F5.4G6 mit einem für IgM spezifischen Sekundärantikörper durchgeführt ([Fig. 4](#)). Während der monoklonale Antikörper 7E11-C5 eine einzelne Bande bei ca. 120 kD, d. h. PSMA erkannte, erkannte 3F5.4G6 eine Bande mit einem ähnlichen Molekulargewicht ebenso wie eine Bande bei Ca. 105–110 kD. Diese Bande entspricht der vorhergesagten Proteinform von PSM', und weist die Nützlichkeit eines Antikörpers nach, der spezifisch die Extrazellulärdomäne sowohl von PSMA als auch PSM' erkennt.

**[0095]** Die Reaktivität von 7E11-C5 mit einem Protein von 120 kD in den Seren von Patienten mit Prostatakrebs war Antikörper-spezifisch, und nicht auf die nicht spezifische Reaktivität des Sekundärantikörpers mit Serumproteinen im Allgemeinen zurückzuführen. In einem Western Blot-Assay wurde Immobilon P-Papier, das getrennte Proteine enthält, die sich von Serumproben herleiten, mit entweder dem monoklonalen Antikörper 7E11-C5 plus dem Sekundärantikörper gekoppelt an HRP oder an einen Sekundärantikörper, nur an HRP gekoppelt, zur Reaktion gebracht. Der Film wurde eine Minute belichtet oder 45 Minuten überbelichtet, um die fehlende Reaktivität des Sekundärantikörpers mit jedwedem Protein von 120 kD in Seren nachzuweisen. Der gleiche Sekundärantikörper wurde auch mit 3F5.4G6 zum Nachweis des gleichen Antigens verwendet. Deshalb war der monoklonale Antikörper 3F5.4G6 für PSMA und PSM' spezifisch.

**[0096]** [Fig. 5](#) bestätigt, dass das durch 7E11-C5 identifizierte Protein auch vom monoklonalen Antikörper 3F5.4G6 erkannt wurde. Außerdem erkannte der monoklonale Antikörper 3F5.4G6 auch ein Protein von 105–110 kD, das vom monoklonalen Antikörper 7E11-C5 nicht nachgewiesen wurde. Dieses schneller migrierende Protein entsprach PSM'. Wenn das Lysat zuerst mit 7E11-C5 präzipitiert wurde und die übrigen Proteine mit dem 7E11-C5 sondiert wurden, detektierte der Antikörper kein Protein (Spur 4). Im Gegensatz dazu, wenn das mit 7E11-C5 vorbehandelte Lysat mit 3F5.4G6 sondiert wurde, detektierte es ein Protein von ca. 110 kD. [Fig. 6](#) zeigt, dass das Protein von 120 kD, d. h. PSMA, immunpräzipitiert durch 3F5.4G6, auch von 7E11-C5 erkannt wurde.

**[0097]** [Fig. 7A](#) und B weisen nach, dass der monoklonale Antikörper 3F5.4G6 anhand der FACS-Analyse LNCaP-Lebendzellen erkannte, wobei bestätigt wird, dass 3F5.4G6 die Extrazellulärdomäne von PSMA erkennt. Ein derartiger Antikörper, der die Extrazellulärdomäne von PSMA erkennt, ist als diagnostisches und/oder therapeutisches Werkzeug bei Prostatakrebs besonders nützlich.

**[0098]** Die humane Samenflüssigkeit wurde mit einem PSMA-spezifischen Antikörper zur Reaktion gebracht und auf Enzymaktivität bestimmt. [Fig. 8](#) erläutert, dass das durch den monoklonalen Antikörper 3F5.4G6 erkannte Protein in Spur 2 ein Molekulargewicht von ca. 90 kD aufweist. Während gezeigt wurde, dass PSM' ein Molekulargewicht von 105–110 kD in LNCaP-Lysaten aufweist, handelte es sich bei dem Protein von 90 kD in Samenflüssigkeiten wahrscheinlich um ein nicht glykosyliertes oder partiell glykosyliertes Produkt von PSM'. Da PSM' mehrere Glykosylierungsorte enthält, war dieses niedrigere Molekulargewicht auf die Aktivitäten von Glykosidasen in der Samenflüssigkeit zurückzuführen. Dass PSMA in dieser gereinigten Präparation nicht anwesend war, wird durch die Tatsache erläutert, dass 3F5.4G6 ein Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kD (Spur 1) erkennt, das in einem Lysat von LNCaP-Zellen anwesend ist, bei dem es sich um PSMA handelt, das aber kein Protein von diesem Molekulargewicht in Spur 2 erkennt. Außerdem erkannte der Antikörper 7E11-C5 nicht die Bande bei 90 kD in Samenflüssigkeiten.

**[0099]** Diese gereinigte Präparation von PSM', die vom monoklonalen Antikörper 3F5.4G6 erkannt wurde, wurde dann auf NAALADase-Aktivität untersucht. Der bei hoher Geschwindigkeit aus einem LNCaP-Lysat hergestellte Überstand wurde als eine positive Kontrolle eingesetzt. Das Protein, das mit dem monoklonalen Antikörper 3F5.4G6 positiv reagierte und konsistent daraus hervorgeht, dass es sich um PSM' handelt, enthielt unter Verwendung des in Robinson et al. (1987, J. Biol. Chem. 262:14498–14506) beschriebenen Assays eine inhärente NAALADase-Aktivität von 16,9 nmol/min/mg Protein.

## 7. BEISPIEL: PRODUKTION VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN EINE PSMA-ENTHALTENDE TUMORZELLMEMBRAN-PRÄPARATION

### 7.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

#### 7.1.1 IMMUNISIERUNG

**[0100]** LNCaP-Prostatakarzinomzellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, erhalten. Die LNCaP-Membranen wurden aus zwei Platten von 150 mm durch Entfernen von Zellen in einer Versen-Lösung, gefolgt von der Zentrifugation zum Pelletieren der Zellen, hergestellt. Dem Zellpellet wurde destilliertes Wasser zugefügt, und die Zellen wurden unter Verwendung eines Dounce-Homogenisators hergestellt. Die homogenisierte Suspension wurde bei 30000 xg zentrifugiert und die pelleteierte Membranfraktion zur Immunisierung verwendet.

**[0101]** Erwachsene weibliche BALB/c-Mäuse wurden viermal (in 2- bis 3-wöchentlichen Intervallen) mit einer LNCaP-Membranpräparation in komplettem Freund-Adjuvant intraperitoneal immunisiert. Fünf Tage vor der Zellfusion wurden die Mäuse mit 50 µg immunaffinitätsgereinigtem PSMA in PBS geboostet. Die Zellfusion wurde wie in Abschnitt 6.1.3 vorstehend durchgeführt

#### 7.1.2 SCREENING VON PRIMÄREN HYBRIDOMEN

**[0102]** Ein auf einer Festphase basierender Enzyme-linked Immunoabsorbant-Assay (ELISA) wurde zur Detektion von PSMA-spezifischen Antikörpern eingesetzt. Immunaffinitätsgereinigtes PSMA, Baculovirusexprimiertes PSMA der vollen Länge oder bakteriell exprimierte Fusionsproteine, die PSMA-Fragmente enthielten, wurden auf Maxi-Sorp (Nunc Immun, Rochester, NY) 96-Well-Platten mit einer Inkubation über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Platten wurden mit PBS-0,2 % Tween-20 gewaschen und die übrigen Stellen wurden mit einer 5 %igen BSA-Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Fünzig Mikroliter (µl) Überstand aus den Hybridomkulturen wurden den mit PSMA beschichteten Wells zugefügt und die Platten wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden wie vorstehend gewaschen und jedem Well wurden 50 µl der Verdünnung (1:600) von Kaninchen-Antimaus-IgG und Kaninchen-Antimaus-IgM (ICN, Costa Mesa, CA) zugefügt. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten wie vorstehend gewaschen und jedem Well wurden 50 µl einer Verdünnung (1:400) von HRP-konjugiertem Protein-A (Sigma, St. Louis, MO) zugefügt. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten wie vorstehend gewaschen und jedem Well wurden 100 µl ABTS-(150 mg 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure in 500 ml 0,1 M Citronensäure, pH 4,35)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µl 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 10 ml ABTS-Lösung)-Chromogen-/Substrat-Lösung zugefügt. Die Platten wurden in einem Mikroplatten-Lesegerät abgelesen und die OD<sub>405</sub> wurde

gemessen. Die Hybridomzellen, die Überstände mit OD-Werten von 0,05 über dem Hintergrund produzieren, wurden durch Limiting Dilution kloniert und einer zusätzlichen Analyse unterzogen.

**[0103]** Für das Festphasen-Capture von PSMA wurde der vorstehend erwähnte Assay wie folgt modifiziert: 50 µl einer 40 µg/ml Lösung des gegen PSMA gerichteten monoklonalen Antikörpers 7E11-C5 in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Bindungspuffer, pH 8,2, wurde den Wells einer Maxi-Sorp-Platte zugefügt und über Nacht bei 4 °C anhaften lassen. Die Platten wurden gewaschen und wie vorstehend blockiert. 50 µl von reihenverdünntem immunaffinitätsgereinigtem PSMA wurden den mit 7E11-C5-beschichteten Wells zugefügt, und die Platten wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde den Wells 50 µl unverdünnter Gewebskulturüberstand entweder aus 3D7-1.1 oder 4E10-1.14-Hybridomklonen zugefügt, und die Platten wurden 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wie vorstehend wurden die Wells mit 50 µl einer Verdünnung (1:1000) von Peroxidase-konjugiertem Ziegen-Antimaus-IgM sondiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden jedem Well 100 µl ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugefügt, und die Platten wurden in einem Mikroplatten-Lesegerät, wie vorstehend beschrieben, abgelesen.

#### 7.1.3 IMMUNAFFINITÄTSREINIGUNG VON PSMA

**[0104]** Sechzehn Milliliter gepackte LNCaP-Zellen wurden in 5 Volumen von 25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40 (Sigma, St. Louis, MO) durch zwei Hübe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators homogenisiert, gefolgt von Rühren über Nacht bei 4 °C. Der Extrakt wurde 1 Stunde bei 100000 xg zentrifugiert und das Pellet wie zuvor erneut extrahiert. Die kombinierten Überstände wurden in der Kälte über Nacht mit 7E11-C5-ImmunoBeads (Pierce, Rockford, IL) (3–5 ml Harzbettvolumen) gemischt. Die Beads wurden zentrifugiert, mit Homogenisationspuffer gründlich gewaschen und in eine Säule gegossen. Die Beads wurden wieder mit zusätzlichem Homogenisationspuffer, enthaltend 1 % NP-40 gewaschen, gefolgt von einem zusätzlichen Waschgang mit Puffer, enthaltend 1 % Triton X-100R (Aldrich, Milwaukee, WI). Die gewaschenen Beads wurden mit 100 mM Glycinpuffer, pH 2,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100R in Fraktionen von 2 ml eluiert. Die Protein-Elution wurde bei OD<sub>280</sub> überwacht.

**[0105]** Fraktionen, die Protein enthalten, wurden mittels SDS-PAGE-Gelen unter Verwendung von Silberfärbung und Western-Blotting analysiert. In typischen Präparationen war die Proteinbande bei 120 kD, die der 7E11-C5-Reaktivität in einem Western Blot entspricht, 60–80 % rein. Eine ungefähre Ausbeute von 16 ml gepackten Zellen betrug 1 mg PSMA-Protein. Das Detergens in der PSMA-Präparation wurde durch Passage der Lösung über eine Extractigel-Säule (Pierce) entfernt. Das Protein wurde lyophilisiert und mit PBS vor der Verwendung bei der Immunisierung oder beim Hybridom-Screening gründlich dialysiert.

#### 7.1.4 FLOWZYTOMETRISCHE ANALYSE

**[0106]** Die Fähigkeit monoklonaler Antikörper beim Erkennen externer oder extrazellulärer Epitopen von PSMA wurde mithilfe der Flowzytometrie beurteilt. LNCaP- (PSMA-exprimierend) und PC-3-Zellen (nicht PSMA-exprimierend) wurden aus den Gewebskulturflaschen frisch geerntet, und es wurde eine Einzelzellssuspension hergestellt. Circa eine Million Zellen wurden in 1 ml unverdünntem GewebeKulturüberstand aus entweder 3D7-1.1- oder 4E10-1.14-Hybridomklonen resuspendiert und zwei Stunden auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS-0,1 % BSA, 0,01 % Na-Azid gewaschen, in 100 µl einer Verdünnung (1:100) von FITC-konjugiertem Kaninchen-Antimaus-IgM (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA) resuspendiert und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden wie vorstehend zweimal gewaschen, in 500 µl Waschpuffer resuspendiert und durch FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA) mit CellQuest-Akquisitionssoftware auf Fluoreszenzfärbung analysiert.

#### 7.1.5 WESTERN BLOT-ANALYSE

**[0107]** GewebeKulturüberstände von den 3D7-1.1 und 4E10-1.14-Hybridomklonen wurden in einem Western Blot-Assay auf die PSMA-Reaktivität getestet. Die Western Blot-Analyse wurde unter Befolgung des Protokolls von Pelletier und Boynton (1994, J. Cell. Physiol. 158:427–434) durchgeführt. Lysate aus LNCaP- und PC-3-Zellen, immunaffinitätsgereinigter PSMA oder Baculovirus-exprimierter PSMA der vollen Länge wurden, um es kurz zusammenzufassen, auf einem 8,5%igen SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch getrennt, und die getrennten Proteine wurden 1 Stunde bei 90 Volt auf eine PVDF-Membran elektrogeblottet. Die Membranen wurden über Nacht in 5 % BLOTTOP blockiert und 90 Minuten mit 20 ml unverdünntem GewebeKulturüberstand aus dem entsprechenden Klon inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, die Blots wurden fünfmal mit TBS-0,5 % Tween-20 (TBS-T) gewaschen und mit einer Verdünnung (1:5000) von Peroxidase-konjugiertem Ziegen-Antimaus-IgM-Sekundärantikörper (Jackson) eine Stunde bei Raumtemperatur sondiert. Die Membran wurde fünf-

mal mit TBS-T gewaschen, unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrat-Kits (KPL, Gaithersburg, MD) entwickelt und durch Aussetzen gegenüber einem Röntgenfilm (Kodak) sichtbar gemacht.

#### 7.1.6 PRÄPARATION VON REKOMBINANTEM PSMA DURCH EIN BACULOVIRUS-EXPRESSIONSSYSTEM

**[0108]** Ein Insert mit der Kodiersequenz von PSMA der vollen Länge (Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53:227–230) wurde aus einer Lambda-pDR2-Humanbibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) unter Verwendung von Sonden, die für die Gensequenz spezifisch sind, kloniert. Das Insert wurde durch Smal- und Sspl-Verdau aus diesem Vektor geschnitten und gemäß den Anleitungen des Herstellers in den Transfervektor pAcHLT-C kloniert (Pharmingen, San Diego, CA). Die Cotransfektion des Transfervektors mit BacPAK6-linearisierter Virus-DNA (Clontech) ergab ein Virus, das für das PSMA-Protein der vollen Länge kodierte, das einen Polyhistidin-Schwanz am N-terminalen Ende des Proteins enthielt, das zur Proteinisolierung durch Bindung an die Ni-NTA-Säule verwendet werden soll. Das PSMA-Protein wurde durch Isolieren Plaque-gereinigter rekombinanter Baculovirus-Partikel, Amplifizieren und Infizieren von SF9-Zellen bei einer Infektionsmultiplizität von ca. 1:2 in Anwesenheit von SFM II-Medium (Gibco-BRI, Gaithersburg, MD), supplementiert mit 5 % FBS (Hyclone, Logan, UT) produziert. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die infizierten Zellen geerntet und in 1 % CHAPS lysiert und über Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Chatsworth, CA) mit Imidazol-Elution gemäß den Anleitungen des Herstellers zurückgewonnen. Das Endprodukt wurde gründlich gegen PBS dialysiert.

#### 7.2 ERGEBNISSE

**[0109]** Monoklonale Antikörper wurden gegen PSMA-enthaltende Prostatakarzinommembranen generiert. Zwei Hybridomklone, 3D7-1.1 und 4E10-1.14, wurden mit einem Festphasen-Immunassay unter Verwendung eines immunaffinitätsgereinigten nativen PSMA aus LNCaP-Zellen und bakteriell exprimierten Fragmenten von PSMA, die den Aminosäureregionen 1–173, 134–437 und 438–750 entsprechen, ausgewählt. Die Überstände aus 3D7-1.1- und 4E10-1.14-Hybridomklonen wiesen auf eine vergleichbare Bindung an native PSMA im Vergleich zum Antikörper 7E11-C5 ([Fig. 9](#)) hin. Der Hintergrund der nicht spezifischen Bindung an BSA war für alle drei Antikörperpräparationen im Wesentlichen vergleichbar.

**[0110]** Wenn die Bindungsspezifität des Epitops getestet wurde, band der monoklonale Antikörper 7E11-C5 an das Aminosäurefragment 1–173, das die N-terminale Intrazellulärdomäne von PSMA enthält. Obwohl 3D7-1.1 und 4E10-1.14 eine mittelgradige Bindung an dieses Fragment aufzeigten, wiesen diese beiden monoklonalen Antikörper die stärkste Bindung an das Aminosäurefragment 134–437 von PSMA auf, das einen Teil der Extrazellulärdomäne von PSMA ([Fig. 9](#)) darstellt. Da dieses Fragment einen Teil von PSM' darstellt, reagieren diese Antikörper auch mit PSM'.

**[0111]** Der Überstand aus dem 3D7-1.1-Hybridomklon wurde weiter in einem Western Blot-Assay gegen Lyse aus LNCaP- und PC-3-Zellen und immunaffinitätsgereinigtem PSMA getestet. [Fig. 10](#) zeigt, dass 3D7-1.1 mit einer Bande von 120 kD reagiert, die in LNCaP-Zellen (Spur 1), aber nicht in PC-3-Zellen (Spur 2) vorliegt. Sowohl Spur 1 als auch 2 weisen eine Reaktivität auf, die sehr wahrscheinlich auf eine nicht spezifische Bindung des Sekundärantikörper-Reagenzes zurückzuführen war. Spur 3, das immunaffinitätsgereinigtes PSMA enthält, zeigt bei 120 kD eine bedeutende Bande, wenn mit dem monoklonalen Antikörper 3D7-1.1 sondiert wurde. Ähnliche Western Blot-Daten wurden auch mit dem Überstand aus dem 4E10-1.14-Klon erhalten, obwohl der nicht spezifische Hintergrund des Blots viel größer war als mit 3D7-1.1. Folglich reagieren sowohl 3D7-1.1 als auch 4E10-1.14 mit einer Bande bei 120 kD, die in LNCaP-Zellen und mit immunaffinitätsgereinigtem PSMA vorliegt.

**[0112]** Das Baculovirus-exprimierte PSMA der vollen Länge wurde auf einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und an eine PVDF-Membran elektrogeblottet. Der Blot wurde in einen Mini-Protean II Multi-Screen-Apparat (Bio-Rad) insertiert, mit einer Reihe vieler verschiedener Antikörperpräparationen sondiert und als ein Western Blot entwickelt. [Fig. 11](#) zeigt, dass die monoklonalen Antikörper 3D7-1.1 und 4E10-1.14 mit einer Proteinbande reagierten, die der gleichen Bande entsprach, die durch den monoklonalen Antikörper 7E11-C5 gebunden wurde.

**[0113]** LNCaP-Zellen und PC-3-Zellen wurden mit den Überständen von 3D7-1.1- und 4E10-1.14-Hybridomklonen gefärbt und durch Flowzytometrie analysiert. Beide Antikörper färbten nicht fixierte LNCaP-Lebendzellen, färbten aber nicht PC-3-Zellen ([Fig. 12A–D](#)). Diese Ergebnisse bestätigen, dass diese zwei Antikörper mit Epitopen in der Extrazellulärdomäne des PSMA-Moleküls reagieren. Die distinkte Verschiebung der mit dem monoklonalen Antikörper 4E10-1.14 beobachtete LNCaP-Färbung im Vergleich zur Bandenschulter, die mit

3D7-1.1 gesehen wird, deutet darauf hin, dass diese beiden Antikörper verschiedene Epitope in dieser bestimmten Region des PSMA-Moleküls erkennen.

**[0114]** Ein Two-Site-Capture-ELISA auf PSMA wurde unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 7E11-C5 als ein PSMA-Capture-Reagenz und die monoklonalen Antikörper 3D7-1.1 und 4E10-1.14 als Reporter- oder Detektionsantikörper entwickelt. Da diese Antikörper verschiedene Epitope auf dem PSMA-Molekül (7E11-C5 reaktiv mit den N-terminalen 6 Aminosäuren; 3D7-1.1 und 4E10-1.14, die mit einer Sequenz in der Region der Aminosäuren 134–475) reagieren, paaren sie sich wirksam im Two-Site-Capture-Assay. Unter Verwendung des reihenverdünnten, immunaffinitätsgereinigten PSMA als ein Testantigen waren Überstände von sowohl 3D7-1.1 als auch 4E10-1.14 nach dem Capture auf mit 7E11-C5 beschichteten 96-Well-Platten zum Nachweis von PSMA fähig ([Fig. 13](#)). Außerdem wurde gereinigtes PSMA aus LNCaP-Zellen und Samenflüssigkeit ebenso wie eine Rohpräparation von Baculovirusexprimiertem PSMA der vollen Länge getestet ([Fig. 14](#)). Für das PSMA-Kontrollantigen, Samenflüssigkeit und die Baculovirus-PSMA-Präparation wurden signifikante OD<sub>405</sub>-Ablesungen beobachtet. Wenn gereinigtes PSMA in normalem weiblichem Humanserum gereinigt und die Proben unter Verwendung des Two-Site-Capture Assays bestimmt wurden, wiesen die gleichen Antikörper auch PSMA nach ([Fig. 15](#)). Deshalb wies der Two-Site-Capture-Assay, der mit monoklonalen Antikörpern entwickelt wurde, die auf verschiedene Anteile von PSMA gerichtet waren, PSMA aus vielen verschiedenen Quellen auf Antigen-spezifische Weise nach.

**[0115]** Ein alternativer Two-Site-Capture-ELISA auf PSMA wurde unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3D7-1.1 als ein PSMA-Capture-Reagenz und der monoklonale Antikörper 7E11-C5 als ein Reporter- oder Detektionsantikörper entwickelt. Reihenverdünnte immunaffinitätsgereinigte PSMA wurde als Testantigen verwendet, das auf mit 3D7-1.1 beschichteten Platten „eingefangen“ (captured) und unter Verwendung von biotinylierter monoklonalem Antikörper 7E11-C5 nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse sind in [Fig. 16](#) ersichtlich. [Fig. 16](#) weist darauf hin, dass monoklonale Antikörper, wie zum Beispiel 3D7-1.1 oder 4E10-1.14, die spezifisch an die Extrazellulärdomäne von PSMA binden, in einem Two-Site-Capture-ELISA auf PSMA nützlich sind.

**[0116]** Die Nützlichkeit von 3D7-1.1 zum Capture von PSMA deutet darauf hin, dass ein anderer alternativer Immunassay, der sich ausschließlich auf die Extrazellulärdomäne des PSMA-Proteins verlässt, nützlich ist. Ein derartiger Assay, der sich zwei für die Extrazellulärdomänen-spezifische Antikörper zum Capture und zur Detektion zu Nutze macht, wäre zur Detektion von PSM' fähig, weil die Stelle im Protein sein Epitop darstellt. Folglich würde jedweder Assay, der sich 7E11-C5 entweder zum Capture oder zur Detektion zu Nutze macht, PSM' spezifisch ausschließen. Ein Beispiel eines PSM'-spezifischen Assays würde das Capture von PSMA und PSM' durch einen Antikörper, wie zum Beispiel 3D7-1.1 oder jedweden einen der monoklonalen Antikörper, die für die Extrazellulärdomäne von PSMA in Paralleltests spezifisch sind, einschließen. Der anschließende Nachweis unter Verwendung von sowohl 4E10-1.14 für das PSMA und PSM' insgesamt als auch 7E11-C5 für nur PSMA würde durch einfache Subtraktion die PSM'-Menge ergeben. Aus diesen Daten leitet sich ein Verhältnis von PSM' zu PSMA her, das eine diagnostische Relevanz hinsichtlich der Referenz von Su et al., Cancer Res., 55: 1441–1443 (1995) aufweisen wird.

**[0117]** Su zeigt, dass das Transkript, das für PSMA kodiert, bevorzugt bei Patienten mit Prostatakrebs (im Vergleich zu gesunden Männern) nachgewiesen wird, obwohl Su keinen Nachweis erbringt, dass das PSMA-Transkript bei diesen Patienten faktisch in Protein translatiert wird. Su zeigt außerdem, dass das Transkript, das für PSM' kodiert, bevorzugt in gesunden Männern (im Vergleich zu Patienten mit Prostatakrebs) nachgewiesen wird, obwohl Su niemals irgendein PSM'-Protein nachwies. Die Erfinder wiesen in dieser Anmeldung nach, dass das PSMA-Protein in Körnergeweben und/oder Flüssigkeiten von Patienten mit Prostatakrebs (im Vergleich zu gesunden Männern) verstärkt ist und dass das PSM'-Protein in Körnergeweben und/oder Körperflüssigkeiten von gesunden Männern (im Vergleich zu Patienten mit Prostatakrebs) verstärkt ist. Erfindungsgemäß weist folglich das Verhältnis von PSM' zu PSMA einen diagnostischen und/oder prognostischen Nutzen zur klinischen Beurteilung von Patienten mit Prostatakrebs auf.

**[0118]** Ein PSMA-Fragment, das den Aminosäuren 34 bis 750 des PSMA der vollen Länge entspricht, wurde in einem Baculovirus-Expressionssystem als ein 1,9 kb großes Insert in einem Baculovirus-Expressionssystem exprimiert. Das Baculovirus-exprimierte PSMA-Fragment ist dem PSM' (das den Resten 58–750 von PSMA der vollen Länge entspricht) sehr ähnlich, außer dass zusätzliche 76 Aminosäuren der Extrazellulärdomäne von PSMA vom N-terminalen Ende des Fragments fehlen. Die Western Blot-Analyse verschiedener Baculovirus-exprimierter semigereinigter PSMA-Fragmente und LNCaP-Zelllysat wurden mit dem monoklonalen Antikörper 4E10-1.14 als Sonde entwickelt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 17](#) ersichtlich.

**[0119]** Die Western Blot Analyse von Rohlysaten von mit dem Baculovirus infizierten SF9-Zellen, die entweder ein irrelevantes Insert enthalten oder das 1,9 kb große Insert, das für das PSMA-Fragment codiert, d. h. die Aminosäuren 134–750 von PSMA der vollen Länge, wurde mit dem monoklonalen Antikörper 7E11-C5 als Sonde entwickelt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 18](#) entwickelt.

**[0120]** [Fig. 17](#) deutet darauf hin, dass Antikörper, wie zum Beispiel 4E10-1.14, die für die Extrazellulärdomäne von PSMA spezifisch sind, auch dazu fähig sind, ein dem PSM' sehr ähnliches Baculovirus-exprimiertes Proteinprodukt zu binden. Im Gegensatz dazu deutet [Fig. 18](#) darauf hin, dass dies auf Grund seiner Epitopen-spezifität (siehe die negative Reaktivität von 7E11-C5 mit dem Baculovirus exprimierten PSMA-Fragment in [Fig. 18](#)) keine Eigenschaft des monoklonalen Antikörpers 7E11-C5 darstellt. Das Baculovirus-exprimierte PSM-Proteinfragment ist mit PSM' identisch (das den Resten 58–750 von PSMA der vollen Länge entspricht), außer dass ihm zusätzliche 76 Aminosäuren vom N-terminalen Ende fehlen, die sich alle in der Extrazellulärdomäne befinden. Da die Epitopen-spezifität von sowohl 3D7-1.1 als auch 4E10-1.14 einer Region der Extrazellulärdomäne zugeordnet wird, die sowohl in PSM' als auch dem PSMA-Fragment der Aminosäuren 134–750 enthalten sind (siehe [Fig. 9](#)), würden beide Antikörper die inhärente Eigenschaft zum Binden an natives PSM' aufweisen, eine Eigenschaft, die von 7E11-C5 nicht geteilt wird.

**[0121]** Der monoklonale Antikörper 3D7-1.1 wurde als eine Sonde in einem Western Blot mit einer LNCaP Zelle verwendet, die sich von PSMA ebenso wie humanem Serum und Samenflüssigkeit herleitet, von denen bekannt ist, dass sie auch PSMA enthalten. Die Ergebnisse sind in [Fig. 19](#) ersichtlich.

**[0122]** Eine Bande, die PSMA entspricht, die bei ca. 120 kD migriert, ist in allen Fraktionen anwesend. Außerdem wurde eine zweite schneller migrierende Bande mit einem Molekulargewicht von 90 bis 100 kD im Serum und der Samenflüssigkeit, wie durch Antikörper 3D7-1.1 gezeigt wird, beobachtet. Diese schneller migrierende Bande wird in den Western Blots mit Serum unter Verwendung des 7E11-C5-Antikörpers nicht beobachtet (siehe Holmes et al., 1996, The Prostate, Suppl. 7:25–29). Diese schneller migrierende reaktive Proteinbande von 3D7-1.1 stellt sehr wahrscheinlich die in allen biologischen Flüssigkeiten vorliegende PSM' dar.

## 8. BEISPIEL: PRODUKTION MONOKLONALER ANTIKÖRPER DES IgG-ISOTYPS GEGEN PSMA

### 8.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

#### 8.1.1 IMMUNISIERUNG

**[0123]** BALB/c- und A/J-Mäuse wurden intraperitoneal mit der LNCaP-Membran in komplettem Freund-Adjuvant, gefolgt von einer sich anschließenden Immunisierung (in 2- bis 3-wöchentlichen Intervallen) mit der Zellmembran in inkomplettem Freund-Adjuvant und drei Boosts mit 50 µg immunaffinitätsgereinigtem PSMA in PBS immunisiert. PSMA wurde gemäß dem in Abschnitt 7.1.3, vorstehend, beschriebenen Verfahren gereinigt. Fünf Tage nach dem letzten Boost wurde die Zellfusion durchgeführt.

#### 8.1.2 IMMUNZYTOKHEMIE

**[0124]** Die LNCaP-Zellen wurden auf Glasobjektträgern zur Immunzytokeramie mit entweder viablen oder fixierten Zellen gezüchtet. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd-PBS 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, mit 1 % BSA-PBS gewaschen, 10 Minuten in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS quenched und in 1 % BSA-PBS gespült. Fixierte Zellen wurden mit 0,075 % Triton X-100 in 1 % BSA-PBS 2 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert.

**[0125]** Der Primärantikörper als Kulturüberstand (+0,075 % Triton X-100 für fixierte Zellen) wurde 60 Minuten bei 4°C für viabile Zellen oder bei Raumtemperatur für fixierte Zellen zugefügt. Nach der Behandlung mit dem Primärantikörper wurden viabile Zellen 20 Minuten in kaltem Methanol fixiert. Der FITC-markierte Ziegen-Antimaus-Sekundärantikörper (1:100 verdünnt in 1 % BSA-PBS + 0,075 % Triton X-100 für fixierte Zellen) wurde 60 Minuten inkubiert und gründlich mit 1 % BSA-PBS gewaschen. Die Proben wurden mit Glycerol auf die Objektträger aufgezogen und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

### 8.2 ERGEBNISSE

**[0126]** Die Immunisierung von Tieren mit sich von der Membran herleitendem und immunaffinitätsgereinigtem PSMA, führte zu einer Steigerung der Serumtitraten nach jeder Injektion. Es wurden Zellfusionen unter Verwendung von Milzzellen aus Tieren durchgeführt, die Serumtitraten über eine Verdünnung von 1:100000 hinausge-

hend aufweisen. Die Hybridome wurden mittels Festphasen-ELISA mit PSMA der vollen Länge gescreent und die Reaktivität mit bakteriell exprimierten Fusionsproteinen verglichen, die Anteile des PSMA-Proteins enthielten, wie in Abschnitt 7.1.2, vorstehend beschrieben ist, außer dass ein sekundäres Antimaus-IgG-Reagenz zur Selektion auf Antikörper des IgG-Isotyps verwendet wurde. Außerdem wurde die Antikörperreakтивität mittels der Western Blot-Analyse, der Flowzytometrie-Analyse und in einem Sandwich-ELISA unter Verwendung des Antikörpers 4E10-1.14 als ein Capture-Antikörper und einem Peroxidase-konjugierten Kaninchen-Antimaus-IgG-Sekundärantikörper bewertet.

**[0127]** Die Festphasen-Immunassays wurden zur Bestimmung des ungefähren Ortes des Bindungsepitops für jeden erhaltenen monoklonalen IgG-Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst, die die Isotyp-Unterklasse für jeden Antikörper einschließt. Unter den insgesamt 32 getesteten Antikörpern, wurde festgestellt, dass mehrere Antikörper an jedes PSMA-Fragment binden, und alle Antikörper native PSMA banden. Zwei Antikörper, 3C2 und 3C4, reagierten sowohl mit den Fragmenten 1–173 und 134–437 von PSMA, was darauf hindeutet, dass sich ihre Epitope in der überlappenden Region dieser Fragmente befinden. Drei Antikörper 3C6, 4D4 und 1G9 banden nur native PSMA, was darauf hindeutet, dass diese Antikörper eine native Proteinkonformation erkennen, die in keinem der denaturierten PSMA-Fragmente vorliegt. Zwei andere Antikörper, 3G6 und 3F6, banden auch nicht an PSMA-Fragmente, sie waren aber fähig, an denaturiertes PSMA auf Western Blots zu binden.

TABELLE 2

Bindungsspezifität und Isotyp von PSMA-spezifischen Antikörpern gegen natives PSMA und PSMA-Fragmente

Antikörper	Native PSMA	1–173	134–437	437–750	Isotyp <sup>a</sup>
3E11	+	+	–	–	IgG <sub>2b</sub>
3F6	+	–	–	–	IgG <sub>2b</sub>
3G6	+	–	–	–	IgG <sub>2b</sub>
2E4	+	schwach	–	–	IgG <sub>2a</sub>
3C2	+	+	+	–	IgG <sub>2a</sub>
3C4	+	+	+	–	IgG <sub>2a</sub>
3C9	+	–	+	–	IgG <sub>1</sub>
2C7	+	–	+	–	IgG <sub>1</sub>
2D4	+	–	+	–	IgG <sub>2b</sub>
4C8G8	+	–	+	–	IgG <sub>2b</sub>
2C4	+	–	+	–	IgG <sub>1</sub>
4C11	+	–	+	–	IgG <sub>1</sub>
1D11	+	–	+	–	IgG <sub>2b</sub>
4E8	+	–	+	–	IgG <sub>2b</sub>
2G5	+	–	+	–	IgG <sub>2b</sub>
4E6	+	–	+	–	IgG <sub>1</sub>
1F4	+	–	+	–	IgG <sub>1</sub>
1G3	+	–	–	+	IgG <sub>2a</sub>
4C8B9	+	–	–	+	IgG <sub>2a</sub>
2E3	+	–	–	+	IgG <sub>2a</sub>
3D8	+	–	–	+	IgG <sub>2a</sub>
4F8	+	–	–	+	IgG <sub>2a</sub>
3D2	+	–	–	+	IgG <sub>2a</sub>
1G7	+	–	–	+	IgG <sub>2a</sub>
3D4	+	–	–	+	IgG <sub>2a</sub>
3C6	+	–	–	–	IgG <sub>1</sub>
4D4	+	–	–	–	IgG <sub>1</sub>
1G9	+	–	–	–	IgG <sub>1</sub>
5G10	+	–	+	–	IgG <sub>1</sub>
5E9	+	–	+	–	IgG <sub>1</sub>
4D8	+	+	–	–	IgG <sub>2b</sub>
3E6	+	+	–	–	IgG <sub>1</sub>

<sup>a</sup> Die Isotyp-Spezifität wurde unter Verwendung von IsoStrip-Tests (Boehringer-Mannheim) für Bestimmungen des murinen Antikörper-Isotyps, die gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt wurden, bestimmt.

**[0128]** Die Western Blot-Analyse wurde unter Verwendung von PSMA aus vielen verschiedenen Quellen, d. h. LNCaP-Zellen, rekombinantem Baculovirus-exprimiertem PSMA und Samenflüssigkeit durchgeführt. Die Ergebnisse deuten im Allgemeinen auf eine starke Antikörperbindung an PSMA aus allen Quellen und eine negative Reaktivität mit Lysaten von PSMA negativen PC-3-Zellen. In bestimmten Fällen (Antikörper 3E11, 2E4, 3G6 und 3F6) wurde keine Reaktivität auf Baculovirus-exprimierte PMSA beobachtet, obwohl eine starke

Reaktivität auf sich von LNCaP und Samenflüssigkeit herleitendem PSMA beobachtet wurde.

**[0129]** Vermutlich war dies auf Unterschiede in der Kryptizität von Antikörper-Epitopen in dieser Region, vielleicht auf Grund der Anwesenheit der N-terminalen Substitution von Polyhistidin auf dem Baculovirusexprimierten Protein zurückzuführen.

**[0130]** Die 32 monoklonalen Antikörper können basierend auf ihrer Fähigkeit, an eine schneller migrierende Proteinbande von ca. 100 KD, die in den LNCaP-Zelllysaten vorliegt, binden. Es wurden auch Western Blots unter Verwendung eines LNCaP-Zelllysats, in dem PSMA der vollen Länge erschöpft war, durch Bindung an 7E1.1.C5-Immunebeads durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen eine Bindung an PSM' für alle Antikörper, die für die PSMA-Fragmente 134–437 und 438–750 spezifisch sind. Außerdem binden auch die Antikörper 3C2 und 3C4, die am reaktivsten mit dem Fragment von Aminosäuren 1–173 sind, an PSM'. Dies lässt weiter erkennen, dass sich das Proteinepitop für diese Antikörper im PSM' und wahrscheinlich in der überlappenden Region zwischen den Fragmenten 1–173 und 134–437 befindet.

**[0131]** Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Antikörper 2E4 und 3E11 für Epitope spezifisch sind, die in den ersten 57 Aminosäuren enthalten sind, da keiner der beiden an die Proteinbande bindet, die PSM' entspricht. Es wurde jedoch keine Reaktivität mit diesen beiden Antikörpern auf ein Peptid beobachtet, das dem Intrazelluläranteil von PSMA der vollen Länge entspricht. Diese Antikörper sind weiter zum Binden an nicht fixierte Zellen mittels der FACS-Analyse fähig, was darauf hindeutet, dass sie nicht für Epitope spezifisch sein können, die in der Transmembrandomäne des Proteins enthalten sind. Folglich müssen die Antikörper 2E4 und 3E11 an Epitope binden, die in der Extrazellulärdomäne von PSMA, am wahrscheinlichsten zwischen den Resten 44 und 57 enthalten sind. Diese gleiche Analyse deutet darauf hin, dass die Antikörper 3E6 und 4D8 (die an das PSMA-Fragment 1–173, aber nicht an das Fragment 134–437 binden), für einen Anteil des PSMA-Proteins zwischen ca. den Resten 57–134 spezifisch sind, da beide Antikörper an das PSM'-Protein mittels Western Blot binden.

**[0132]** Die FACS-Analyse unter Verwendung dieses Panels von Antikörpern zeigt eine positive Färbung von PSMA exprimierenden LNCaP-Zellen. Die stärksten Verschiebungen wurden mit den Antikörpern 3C6, 1G3, 3C9, 3C4, 3G6, 3F6, 3E11, 1D11, 3D8, 1G9 und 4D4 beobachtet. Mindestens ein geringer Anteil der Variabilität des Ausmaßes der Zelfärbung mit diesen Antikörpern ist vermutlich auf die Wirkungen der Glykosylierung durch die 10 potenziellen N-verknüpften Orte zurückzuführen, die im mehr C-terminalen Anteil des Proteins verteilt sind.

**[0133]** Die Immunzytochemie wurde sowohl an lebenden als auch fixierten LNCaP-Zellen unter Verwendung dieses Panels von Antikörpern durchgeführt. Im Allgemeinen spiegelt die Färbungsintensität von Lebendzellen die durch die Flowzytometrie erhaltenen Ergebnisse wider. Die Färbung fixierter Zellen war mit einigen Ausnahmen, wie nachstehend besprochen, auch ähnlich.

**[0134]** Der anti-PSMA-Antikörper 7E11.C5 ist für die ersten 6 Aminosäuren von PSMA spezifisch und befindet sich auf der Intrazellulärseite der Plasmamembran. Die immunzytochemische Färbung von LNCaP-Lebendzellen mit 7E11.C5 war negativ, wohingegen die Färbung in fixierten Zellen stark war. Folglich gibt dieses Ergebnis zu erkennen, dass die Integrität der in der Immunzytochemie verwendeten LNCaP-Lebendzellen, die auf die Unfähigkeit von Antikörpern verweist, die Plasmamembran von Lebendzellen zu überqueren. Es wurde eine starke Färbung von LNCaP-Lebendzellen durch die Antikörper 3C6, 4D4 und 1G9 beobachtet, was darauf hindeutet, dass sie an extrazellulär verteilte Epitope binden. Mit diesen Antikörpern wurde eine schwache oder negative Färbung von fixierten Zellen beobachtet, womit bestätigt wird, dass diese Antikörper native Proteinkonformationen erkennen, die durch Denaturierung oder Fixierung des Proteins zerstört werden. Diese drei Antikörper können für die in vivo-Diagnose und Therapie von Tumoren, einschließlich der Bildgebung von Tumoren besonders nützlich sein.

**[0135]** Es wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt, der sich den IgM-4E10-1.14-Antikörper als ein Capture-Reagenz, gefolgt von jedem IgG zur Detektion zu Nutze macht. Eine empfindliche lineare Response auf die Antigen-Konzentration wurde ungeachtet dessen beobachtet, ob der Antikörper zur Detektion verwendet wurde.

**[0136]** Schlussfolgernd sei angemerkt, dass insgesamt 32 monoklonale IgG-Antikörper mit einer Spezifität für PSMA ausgewählt wurden. Die Antikörper binden Epitope, die durch die gesamte Extrazellulärdomäne von PSMA verteilt sind. [Fig. 20](#) fasst die Verteilung der Spezifitäten des Antikörper-Epitops von diesen Antikörpern zusammen. Drei Antikörper sind für komplexere Epitope spezifisch, die mit den nativen Proteinkonformationen verwandt sind. Alle für den Anteil der PSMA spezifischen IgG-Antikörper, die die Reste 134–750 umfassen,

binden auch PSM'.

#### 9. HINTERLEGUNG VON ZELLLINIEN

**[0137]** Die folgenden Hybridomzelllinien wurden am 12. März 1996, am 11. März 1997, am 17. März 1998 und am 16. März 1999 bei der American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, hinterlegt und bekamen die folgenden Zugangsnummern zugeteilt:

Hybridom	ATCC-Zugangsnummer
3F5.4G6	HB12060
3D7-1.1	HB12309
4E10-1.14	HB12310
1G3	HB12489
1G9	HB12495
2C7	HB12490
3C4	HB12494
3C6	HB12491
3C9	HB12484
3E6	HB12486
3E11	HB12488
3G6	HB12485
4D4	HB12493
4D8	HB12487
4C8B9	HB12492
3F6	
2E4	
3C2	
2D4	
4C8G8	
2C4	
4C11	
1D11	
4E8	
2G5	
4E6	
1F4	
2E3	
3D8	
4F8	
3D2	
1G7	
3D4	
5G10	
5E9	

**[0138]** Die vorliegende Erfindung darf hinsichtlich des Umfangs durch die erläuternden Ausführungsformen, die als Veranschaulichung der einzelnen erfindungsgemäßen Aspekte bestimmt sind, nicht eingeschränkt werden. Verschiedene Modifikationen der Erfindung werden jedoch vom Fachmann, zusätzlich zu den hierin gezeigten und beschriebenen, aus der vorstehenden Beschreibung und den beiliegenden Zeichnungen erkannt werden. Es ist beabsichtigt, dass solche Modifikationen in den Umfang der anhängenden Ansprüche fallen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Northwest Biotherapeutics, Inc.

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: MONOKLONALE ANTIKÖRPER, SPEZIFISCH FÜR DIE EXTRAZELLULÄRE DOMÄNE DES PROSTATA-SPEZIFISCHEN MEMBRANANTIGENS

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) NAME: Pennie & Edmonds, LLP

(B) STRASSE: 1155 Avenue of the Americas

(C) STADT: New York

(D) STAAT: NY

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 10036-2811

(v) MASCHINENLESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: Windows

(D) SOFTWARE: FastSEQ for Windows Version 2.0b

(vi) VORLIEGENDE PATENTANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDETAG:

(C) KLASIFIKATION:

(vii) FRÜHERE PATENTANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: 09/044668

(B) ANMELDETAG: 18. MÄRZ 1998

(viii) ANGABEN ZUM PATENTANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Baldwin, Geraldine F

(B) REGISTRIERUNGNUMMER: 31232

(C) KENN-/DOCKET-NUMMER: 8511-0013-228

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATIONEN:

(A) TELEFON: 650-493-4935

(B) TELEFAX: 650-493-5556

(C) TELEX: 66141 PENNIE

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys

1 5

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 750 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

## (ii) MOLEKÜLART: Keine

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
 1           5          10          15
Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
 20          25          30
Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
 35          40          45
Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
 50          55          60
Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile
 65          70          75          80
Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
 85          90          95
Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
100         105         110
Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
115         120         125
Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
130         135         140
Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
145         150         155         160
Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
165         170         175
Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met
180         185         190
Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val
195         200         205
Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly
210         215         220
Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys
225         230         235         240
Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly
245         250         255
Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
260         265         270
Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly

```

275	280	285
Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys		
290	295	300
Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg		
305	310	315
Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn		
325	330	335
Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val		
340	345	350
Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro		
355	360	365
Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly		
370	375	380
Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg		
385	390	395
Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile		
405	410	415
Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr		
420	425	430
Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala		
435	440	445
Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val		
450	455	460
Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu		
465	470	475
Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser		
485	490	495
Trp Thr Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile		
500	505	510
Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu		
515	520	525
Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn		
530	535	540
Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu		
545	550	555
Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val		
565	570	575
Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val		
580	585	590
Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala		
595	600	605
Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr		
610	615	620
Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr		
625	630	635
Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser		
645	650	655
Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu		
660	665	670
Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg		
675	680	685
His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser		
690	695	700
Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp		
705	710	715
Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala		

Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala  
740 745 750

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Northwest Biotherapeutics, Inc.

<120> MONOKLONALE ANTIKÖRPER, SPEZIFISCH FÜR DIE EXTRAZELLULÄRE DOMÄNE DES PROSTATA-SPEZIFISCHEN MEMBRANANTIGENS

<130> P10985EP

<140> EP 99913932.2

<141> 18.03.1999

<150> PCT/US99/05864

<151> 18.03.1999

<150> US 09/044,668

<151> 18.03.1998

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid, das die Aminosäurereste 716-723 von SEQ ID NO: 2 enthält

<400> 1

Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys

1 5

<210> 2

<211> 750

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

DE 699 36 049 T2 2008.01.10

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg  
1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe  
20 25 30

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu  
35 40 45

Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu  
50 55 60

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile  
65 70 75 80

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile  
85 90 95

Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His  
100 105 110

Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile  
           115                   120                   125  
 Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe  
   130                   135                   140  
 Glu Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro  
   145                   150                   155                   160  
 Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr  
   165                   170                   175  
 Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met  
   180                   185                   190  
 Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val  
   195                   200                   205  
 Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly  
   210                   215                   220  
 Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys  
   225                   230                   235                   240  
 Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Val Gln Arg Gly  
   245                   250                   255  
 Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr  
   260                   265                   270  
 Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly  
   275                   280                   285  
 Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys  
   290                   295                   300  
 Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg  
   305                   310                   315                   320  
 Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn  
   325                   330                   335  
 Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val  
   340                   345                   350  
 Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro  
   355                   360                   365  
 Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly  
   370                   375                   380  
 Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg  
   385                   390                   395                   400  
 er Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile  
   405                   410                   415  
 eu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Trp Trp Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr  
   420                   425                   430  
 lu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala  
   435                   440                   445  
 yr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val

450

455

460

Asp	Cys	Thr	Pro	Leu	Met	Tyr	Ser	Leu	Val	His	Asn	Leu	Thr	Lys	Glu
465					470					475					480
Leu	Lys	Ser	Pro	Asp	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Ser	Leu	Tyr	Glu	Ser
															495
485								490							
Trp	Thr	Lys	Lys	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu	Phe	Ser	Gly	Met	Pro	Arg	Ile
															500
									505						510
Ser	Lys	Leu	Gly	Ser	Gly	Asn	Asp	Phe	Glu	Val	Phe	Phe	Gln	Arg	Leu
															515
										520					525
Gly	Ile	Ala	Ser	Gly	Arg	Ala	Arg	Tyr	Thr	Lys	Asn	Trp	Glu	Thr	Asn
															530
										535					540
Lys	Phe	Ser	Gly	Tyr	Pro	Leu	Tyr	His	Ser	Val	Tyr	Glu	Thr	Tyr	Glu
															545
											555				560
Leu	Val	Glu	Lys	Phe	Tyr	Asp	Pro	Met	Phe	Lys	Tyr	His	Leu	Thr	Val
															565
										570					575
Ala	Gln	Val	Arg	Gly	Gly	Met	Val	Phe	Glu	Leu	Ala	Asn	Ser	Ile	Val
															580
										585					590
Leu	Pro	Phe	Asp	Cys	Arg	Asp	Tyr	Ala	Val	Val	Leu	Arg	Lys	Tyr	Ala
															595
										600					605
Asp	Lys	Ile	Tyr	Ser	Ile	Ser	Met	Lys	His	Pro	Gln	Glu	Met	Lys	Thr
															610
										615					620
Tyr	Ser	Val	Ser	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Val	Lys	Asn	Phe	Thr
															625
										630					640
Glu	Ile	Ala	Ser	Lys	Phe	Ser	Glu	Arg	Leu	Gln	Asp	Phe	Asp	Lys	Ser
															645
										650					655
Asn	Pro	Ile	Val	Leu	Arg	Met	Met	Asn	Asp	Gln	Leu	Met	Phe	Leu	Glu
															660
										665					670
Arg	Ala	Phe	Ile	Asp	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Asp	Arg	Pro	Phe	Tyr	Arg
															675
										680					685
His	Val	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Ser	His	Asn	Lys	Tyr	Ala	Gly	Glu	Ser
															690
										695					700
Phe	Pro	Gly	Ile	Tyr	Asp	Ala	Leu	Phe	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Val	Asp
															'05
											710				715
Pro	Ser	Lys	Ala	Trp	Gly	Glu	Val	Lys	Arg	Gln	Ile	Tyr	Val	Ala	Ala
															725
											730				735
He	Thr	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Ser	Glu	Val	Ala		
															740
											745				750

**Patentansprüche**

1. Hybridomzelllinie, bestehend aus 3C6 mit der ATCC-Zugangsnummer HB12491, 4D4 mit der ATCC-Zugangsnummer HB12493 oder 1G9 mit der ATCC-Zugangsnummer HB12495.
2. Monoklonaler Antikörper, erhalten aus der Hybridomzelllinie nach Anspruch 1.
3. Monoklonaler Antikörper mit einer antigenbindenden Region, der an ein konformationelles Epitop der

extrazellulären Domäne von PSMA bindet und die immunspezifische Bindung eines zweiten monoklonalen Antikörpers an sein Zielepitop in der extrazellulären Domäne des Prostata-spezifischen Membranantigens (PSMA) kompetitiv inhibitiert, worin der zweite Antikörper nach Anspruch 2 ist.

4. In-vitro-Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit von PSMA- oder PSM'-Protein in einer biologischen Probe, umfassend das Kontaktieren einer Probe mit einem monoklonalen Antikörper nach Ansprüchen 2 oder 3 und Nachweis von jedwedem antikörpergebundenen PSMA- oder antikörpergebundenen PSM'-Protein.
5. Verfahren nach Anspruch 4, worin die Probe eine Biopsieprobe oder eine Körperflüssigkeit darstellt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, worin die Körperflüssigkeit Vollblut, Serum, Samenflüssigkeit oder Urin darstellt.
7. Verfahren nach Ansprüchen 4 bis 6, worin der Nachweis von antikörpergebundenem PSMA durch einen zweiten für PSMA spezifischen Antikörper oder durch die enzymatische Aktivität von NAALADase erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, worin die NAALADase-Aktivität durch eine Zunahme der NAD(P)H nachgewiesen wird.
9. In-vitro-Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit durch von Krebszellen exprimiertem PSMA, umfassend das Kontaktieren einer Probe von Zellen mit einem monoklonalen Antikörper nach Ansprüchen 2 oder 3 und Nachweis von jedwedem antikörpergebundenem PSMA.
10. Verfahren nach Anspruch 8, worin der Antikörper kovalent an eine Markierung gebunden ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, worin die Markierung Folgendes darstellt: ein Enzym, einen radioopaken Farbstoff, ein radioaktives Metallisotop, ein radioaktives Nichtmetallisotop, eine fluorogene Verbindung, eine fluoreszierende Verbindung, ein positronenemittierendes Isotop oder ein nicht paramagnetisches Metall.
12. Verwendung einer wirksamen Menge eines monoklonalen Antikörpers nach Ansprüchen 2 oder 3 in der Herstellung eines Arzneimittels zum Abtöten von Prostatakrebszellen in einem Patienten.
13. Verwendung nach Anspruch 12, worin der Antikörper an ein Arzneimittel, ein Toxin oder ein Radioisotop konjugiert ist.
14. Verwendung nach Ansprüchen 12 oder 13, worin der monoklonale Antikörper einen bispezifischen Antikörper darstellt, weiter umfassend eine zusätzliche antigenbindende Region, die für eine Effektorzelle mit tumorizider oder tumorinhibitorischer Aktivität spezifisch ist.
15. Verwendung nach Anspruch 14, worin der Antikörper an ein heterologes Protein oder Peptid konjugiert ist.
16. Verwendung nach Anspruch 15, worin das heterologe Protein tumorizide Zellen auf Prostatazellen abzielt.
17. Verwendung nach Anspruch 16, worin das heterologe Protein eine cytotoxische Verbindung auf Prostatazellen abzielt.
18. Kit zur Diagnose, Prognose oder Überwachung des Prostatakrebses, umfassend einen monoklonalen Antikörper nach Ansprüchen 2 oder 3.
19. Kit nach Anspruch 18, worin der Antikörper oder das antigenbindende Fragment davon in einem wässrigen Medium oder in lyophilisierter Form verpackt ist.
20. Kit nach Anspruch 19, das weiter einen zweiten Antikörper umfasst, der für PSMA spezifisch ist.
21. Kit nach Anspruch 19, das weiter Glutamatdehydrogenase umfasst.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

57	MWNLLHETDSA VYVNNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVNAOLAGAKGVILYSDPA	116
LSYPNKTTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDL	174	
DYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEVGLP	232	
SIPVHPIGYYDAQKLEKMGGSAPPDSSWR GSLKVYPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHS	290	
TNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLK	348	
KEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRV	406	
DCTPLMYSLVHNLTKEKSPDEGFEKGSLYESWTKKSPSPEFSGMMPRISKLGSGNDFE	464	
VFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFGSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVR	522	
GGMVFELANSIVLPFDICRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKN	580	
FTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMINDQLMFLERAFIGDPLGLPDRPFYRHVIYAPSS	638	
HNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDP SKAWGEVKRCIQYVAAFTVQAAAETLSEVA	696	
	750	

FIG. 1

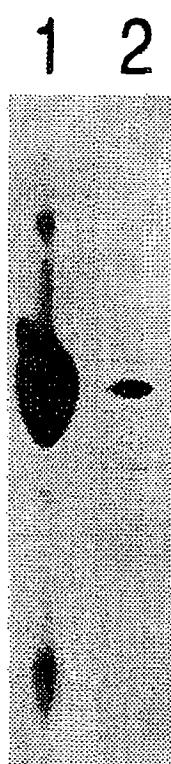


FIG.2

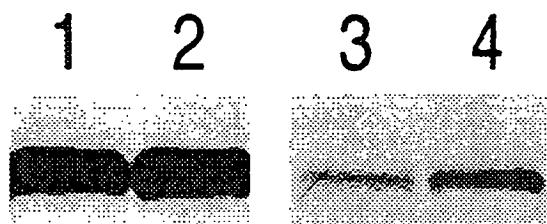


FIG.3

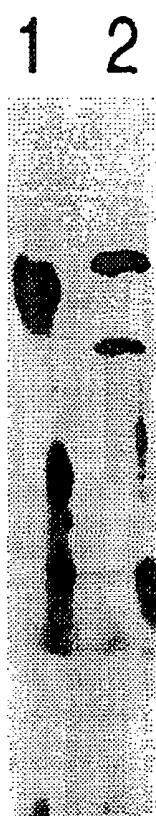


FIG.4

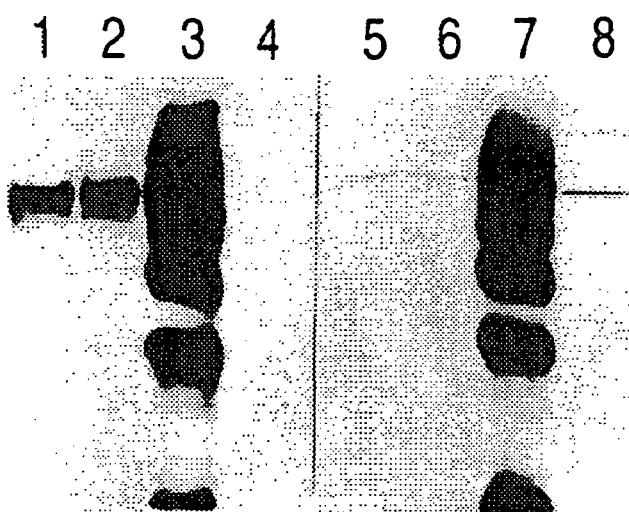


FIG.5

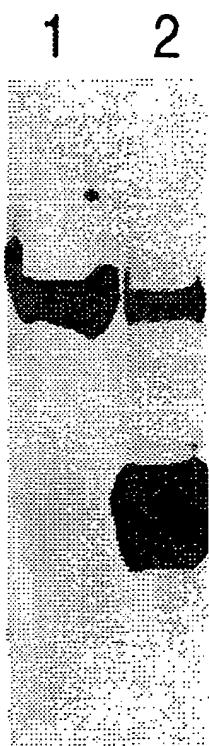


FIG.6

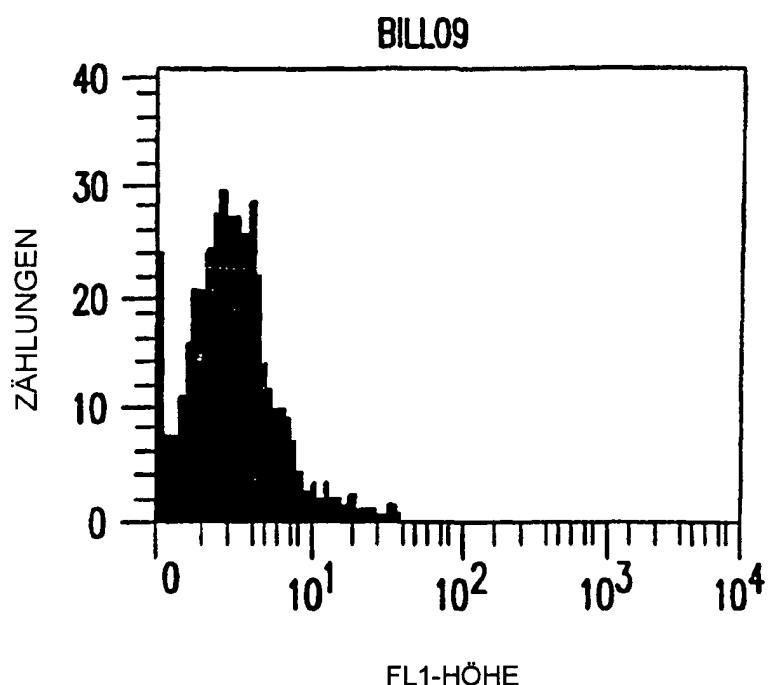


FIG.7A

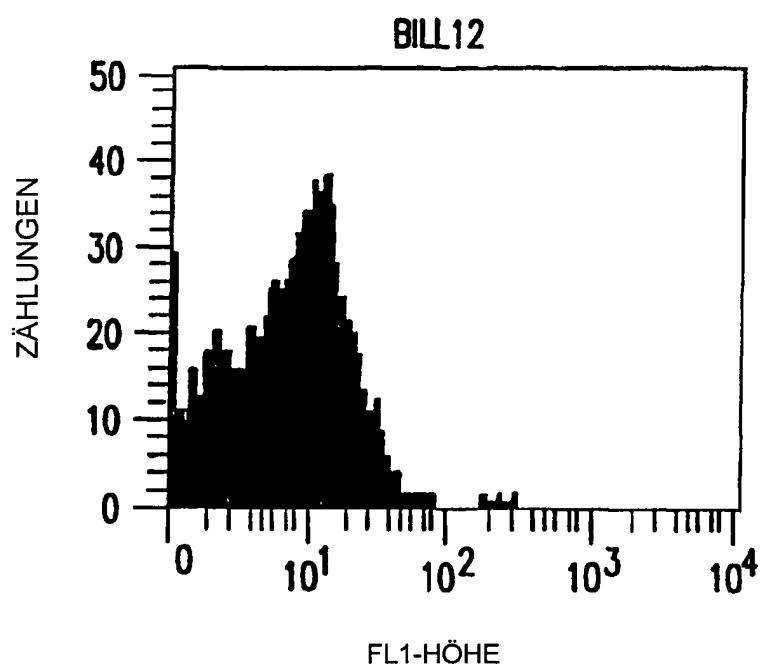


FIG.7B

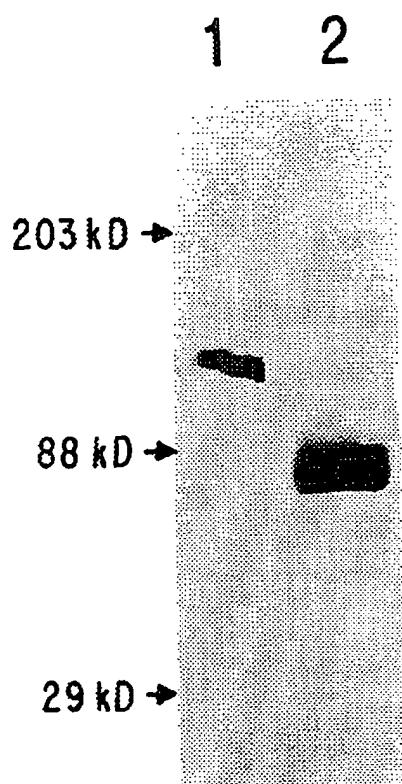
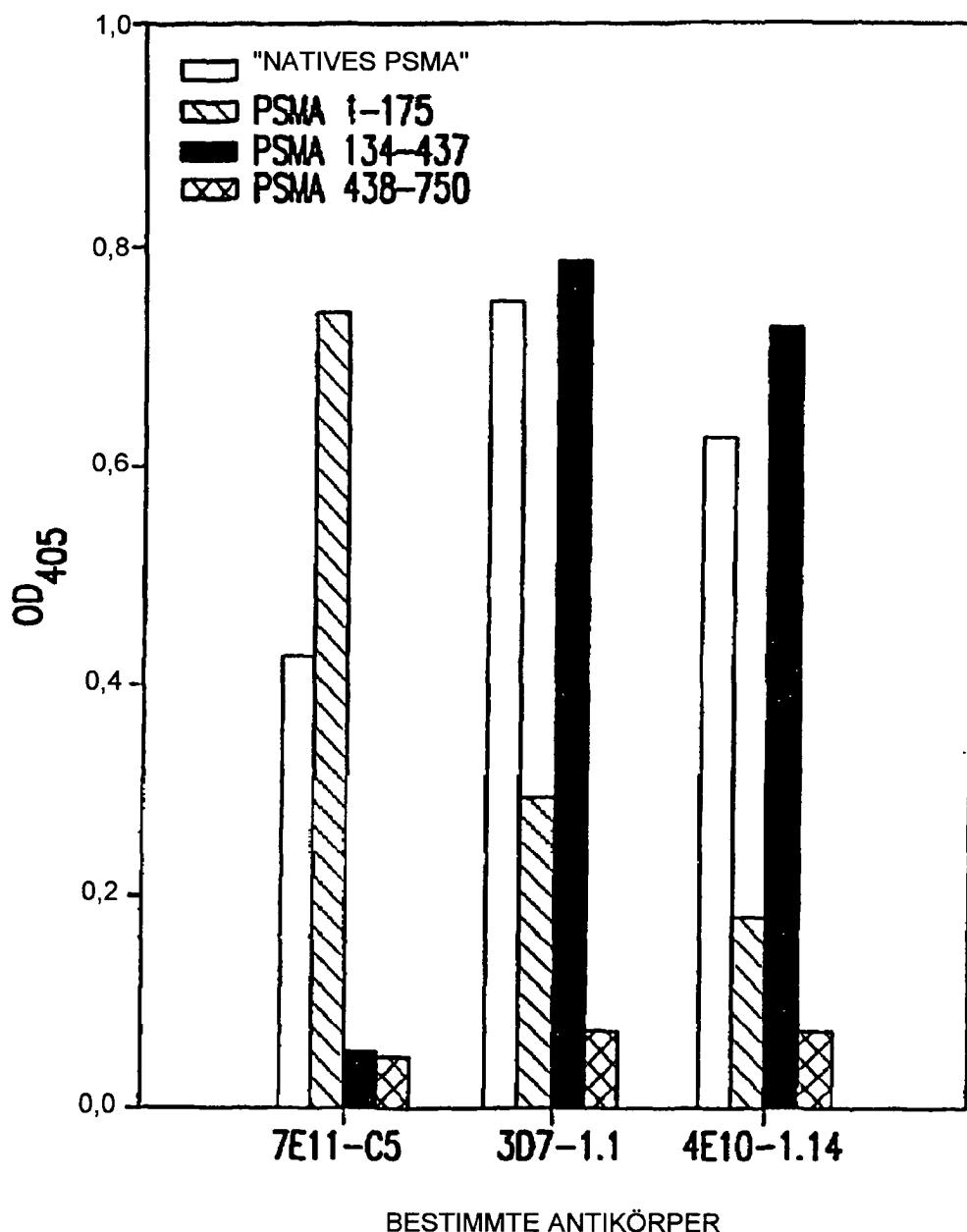


FIG.8



BESTIMMTE ANTIKÖRPER

FIG.9

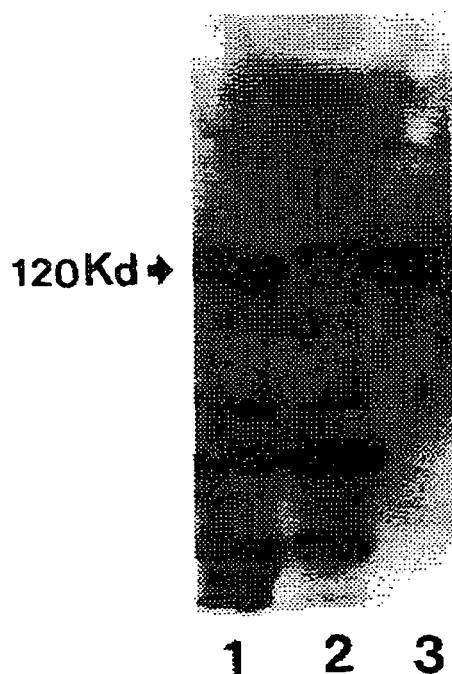


FIG.10

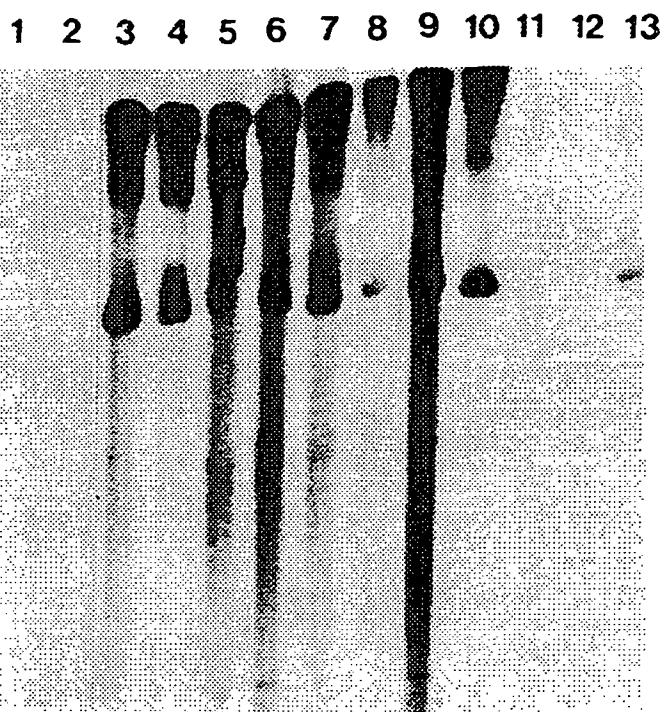


FIG.11

3D7 1.1

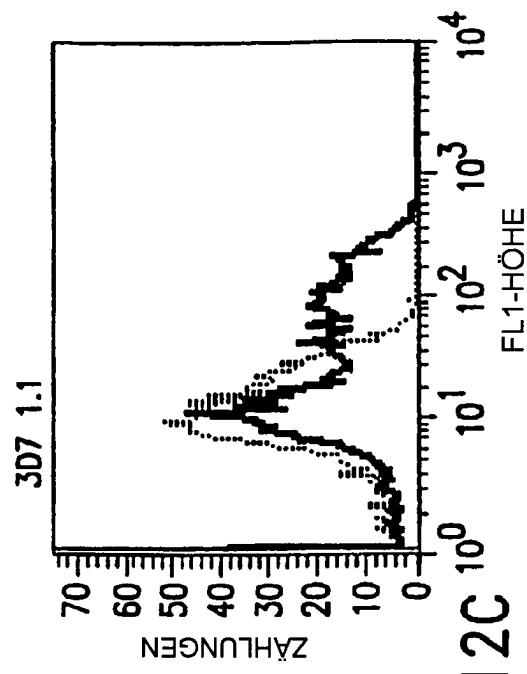


FIG.12C

4E10 1.14

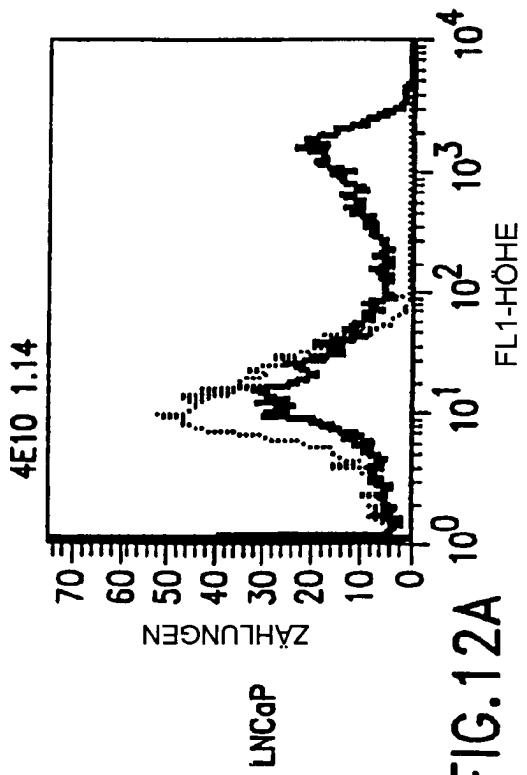


FIG.12A

UNCaP

PC-3

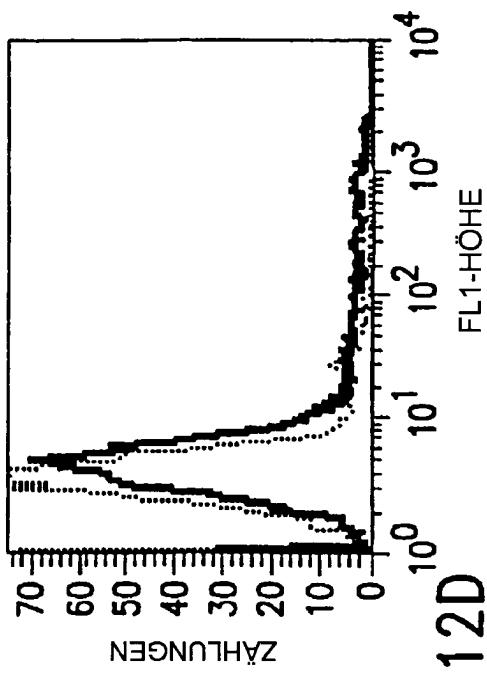


FIG.12D

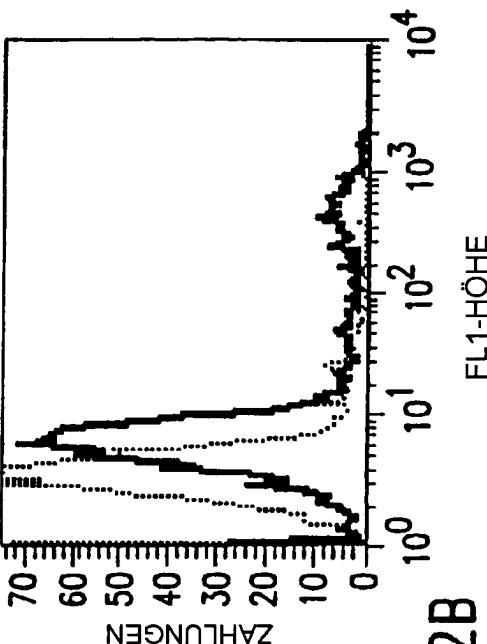


FIG.12B

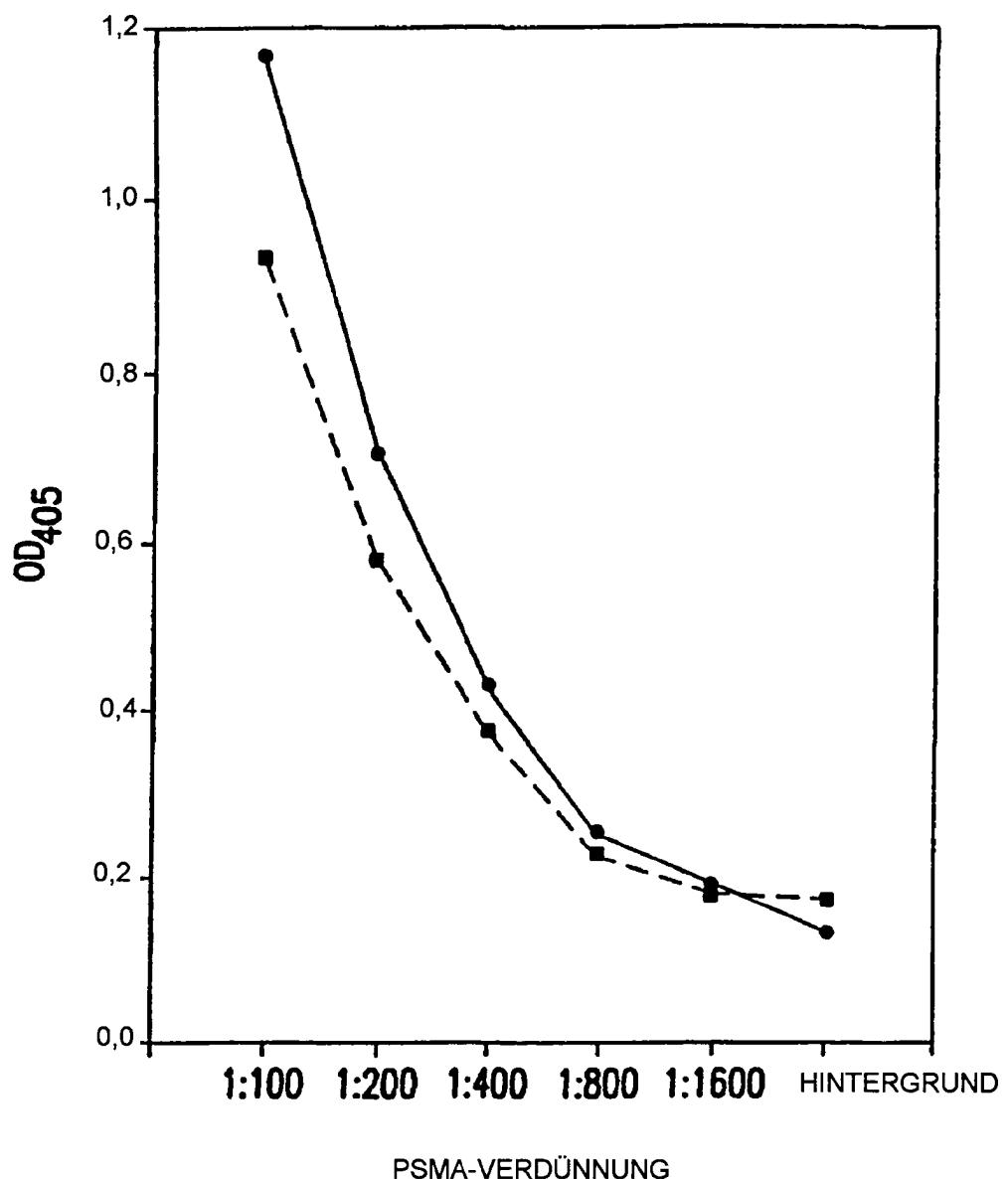


FIG.13

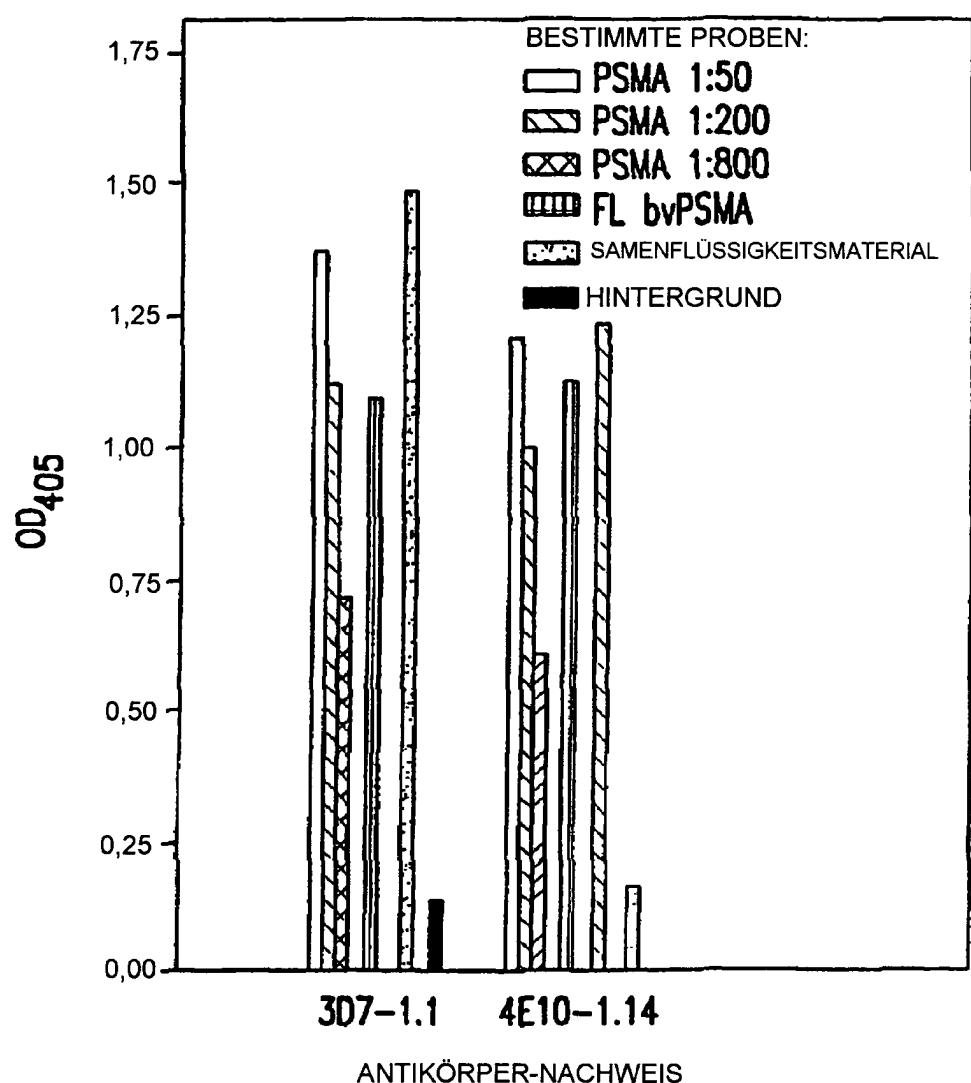


FIG.14

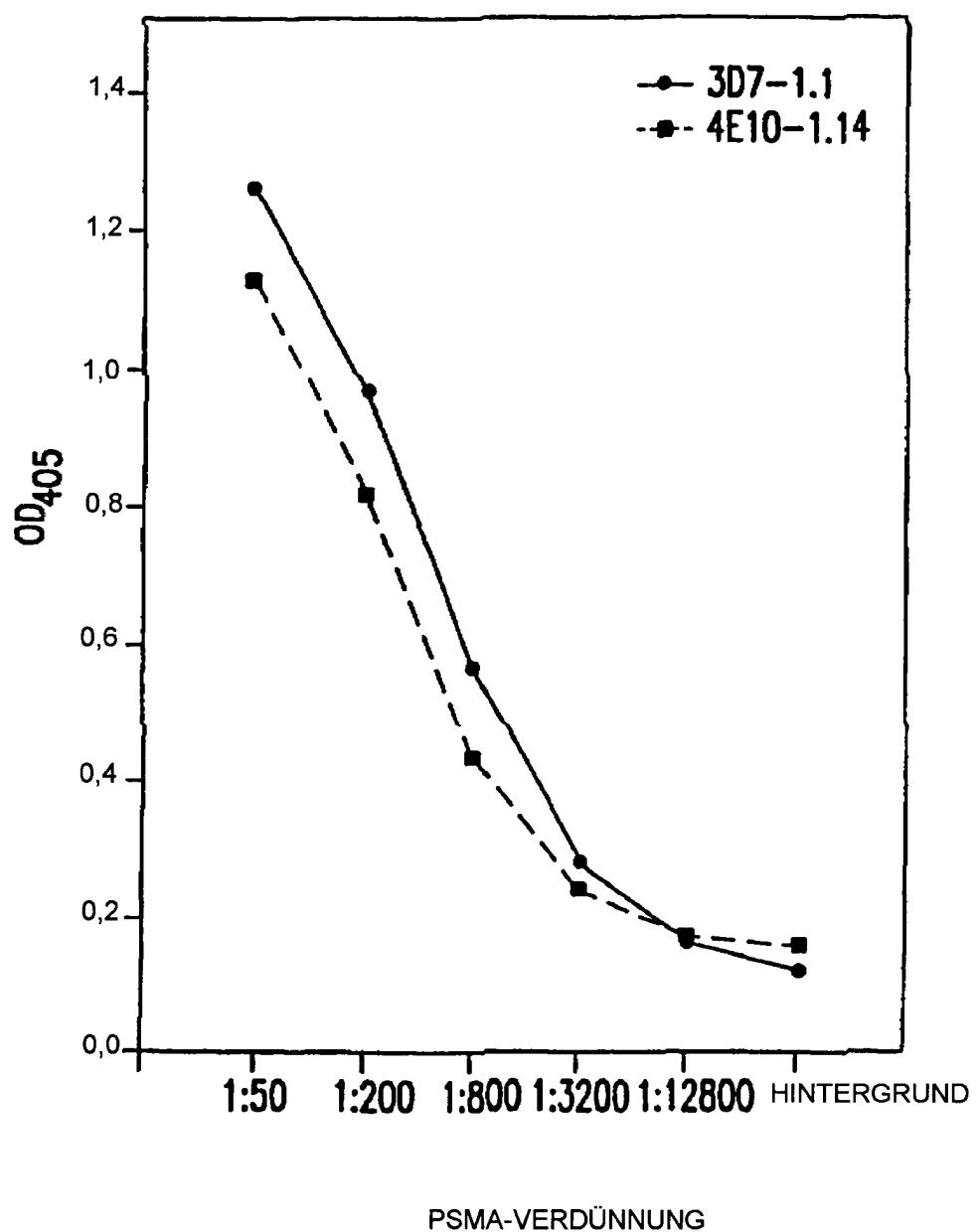
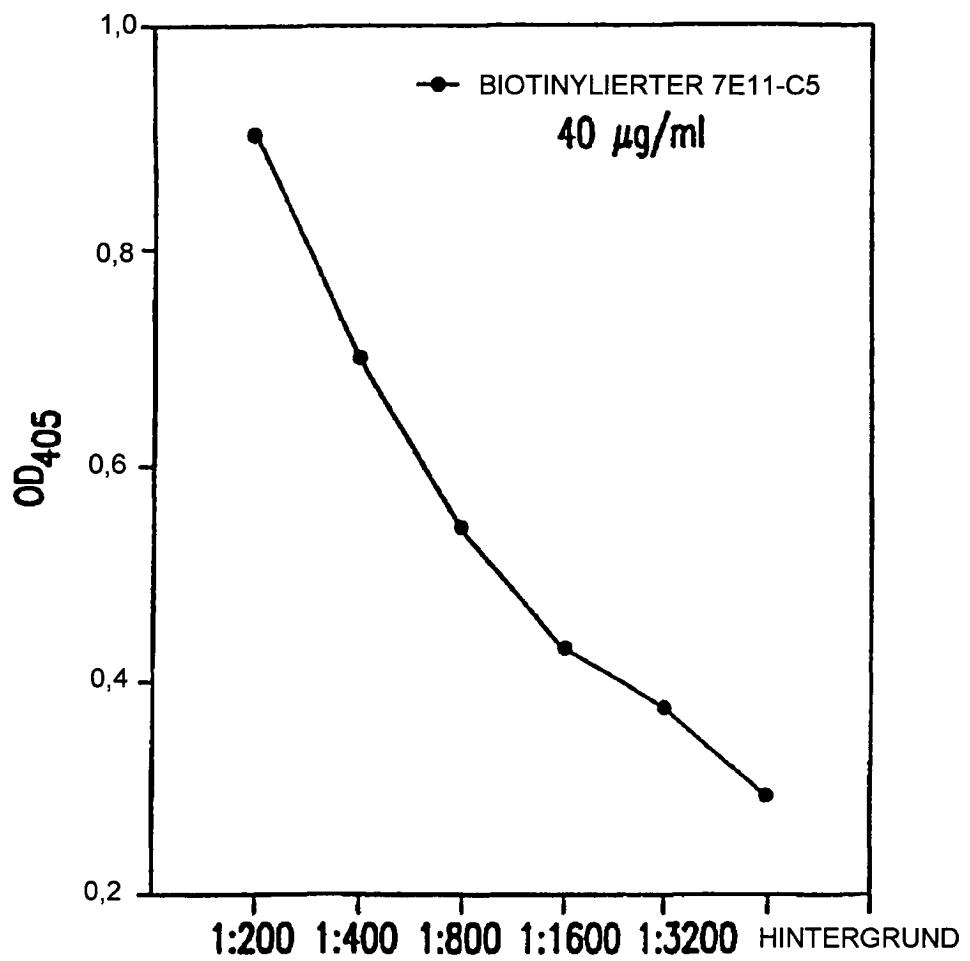
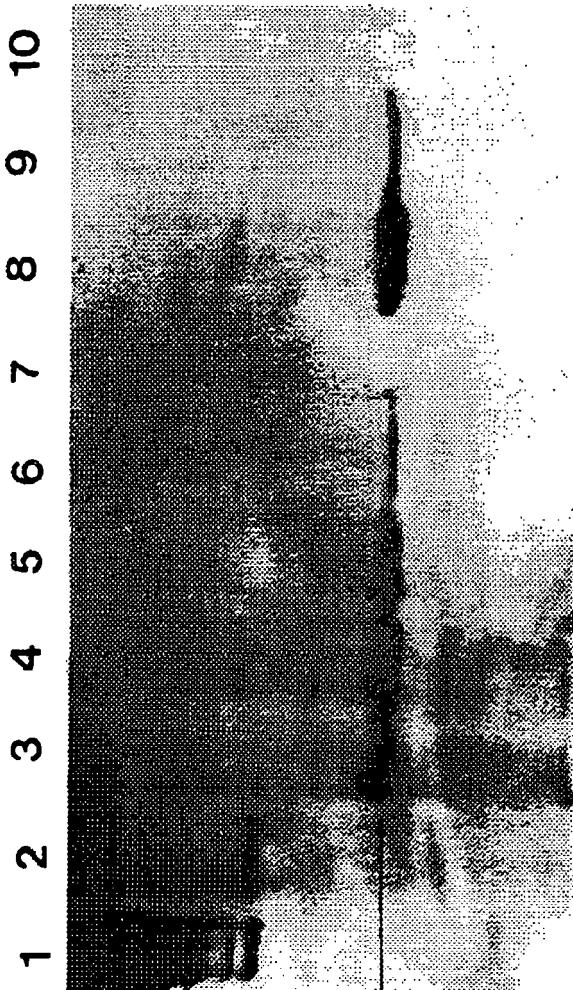


FIG.15



PSMA-VERDÜNNUNG

FIG.16



1,9 kb-Konstrukt

FIG. 17

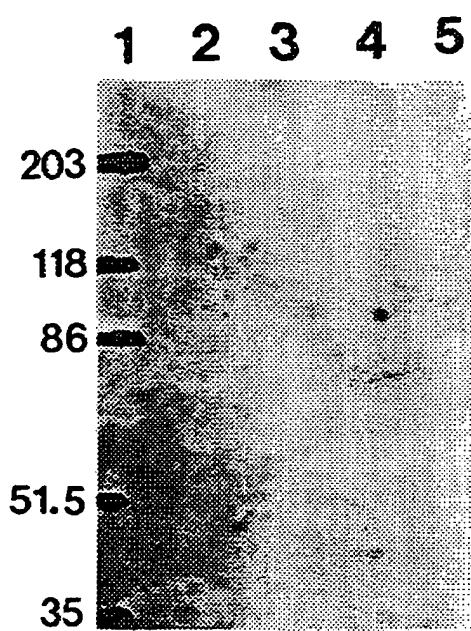


FIG.18

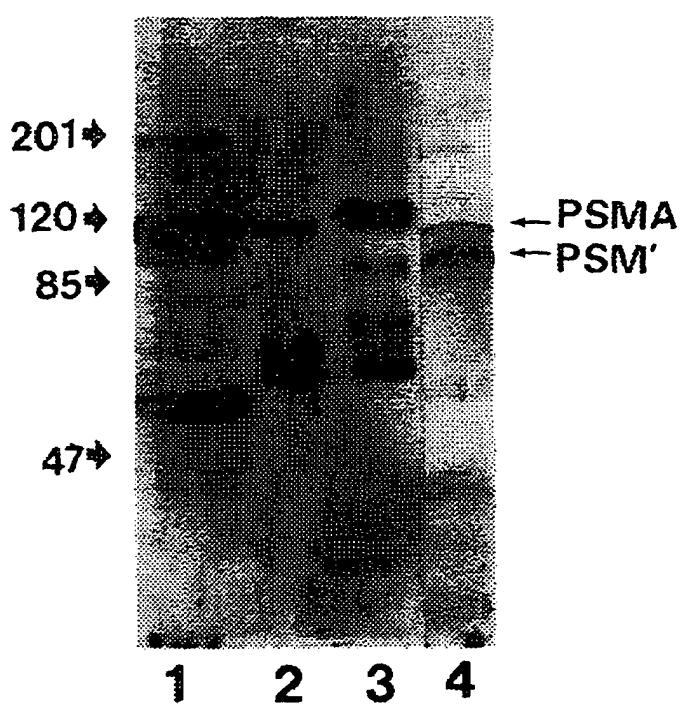


FIG.19

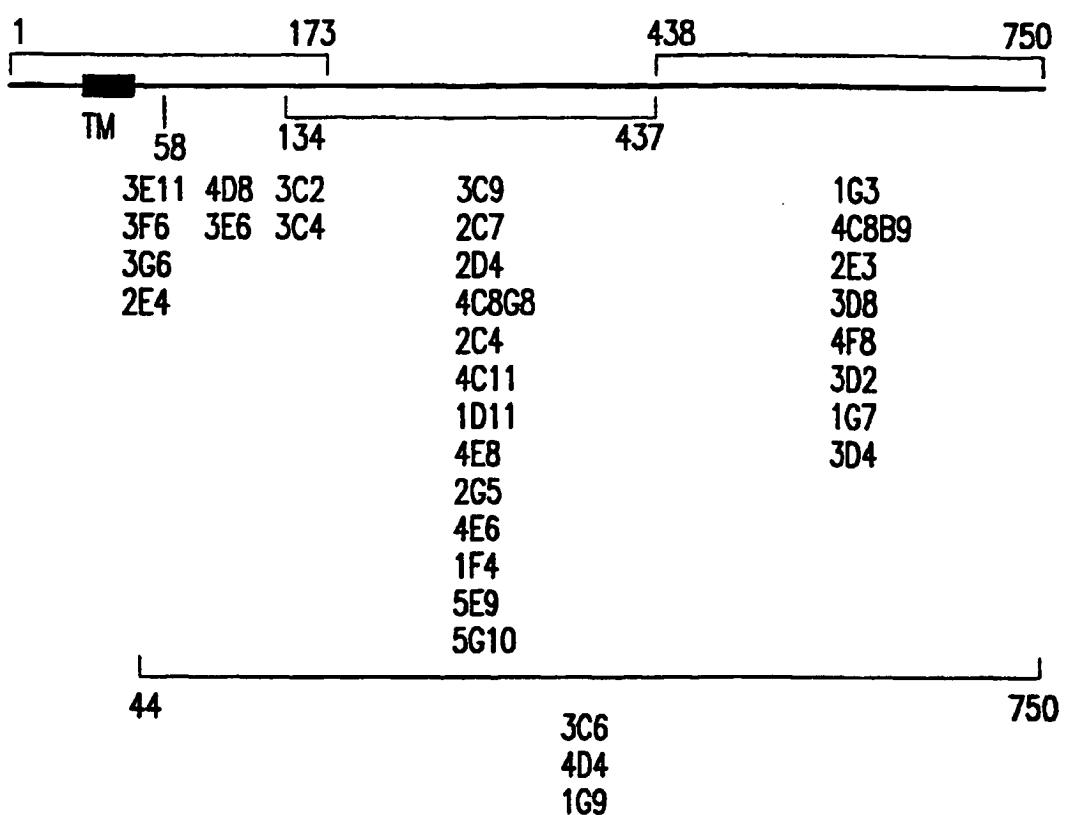


FIG.20