

(11) Número de Publicação: **PT 1064303 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/705 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1999.03.18**

(30) Prioridade(s): **1998.03.18 US 44668**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.01.03**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.05.09**
062/2007

(73) Titular(es):

MEDAREX, INC.
707 STATE ROAD, SUITE 206 PRINCETON, NJ
08540-1437 **US**

(72) Inventor(es):

GERALD, P. MURPHY **US**
ALTON L. BOYNTON **US**
ERIC H. HOLMES **US**
WILLIAM THOMAS TINO **US**

(74) Mandatário:

LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO PARA O DOMÍNIO EXTRACELULAR DO ANTIGÉNIO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DA PROSTATA**

(57) Resumo:

RESUMO

**"ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO PARA O DOMÍNIO
EXTRACELULAR DO ANTIGÉNIO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DA
PROSTATA"**

A presente invenção relaciona-se com anticorpos monoclonais que se ligam ao domínio extracelular do抗énio de membrana específico da próstata (PSMA), com as linhas celulares de hibridomas que produzem os anticorpos, e com os métodos de utilização de tais anticorpos, para o diagnóstico e tratamento do cancro. Em particular, são exemplificados trinta e cinco anticorpos monoclonais reactivos com o PSMA expressado na superfície da célula. Adicionalmente, a presente invenção relaciona-se com uma nova proteína variante do PSMA (PSM'), detectada por um número de anticorpos da invenção. A actividade de hidrolase do PSMA e do PSM', permite que seja utilizado um ensaio imunoenzimático para a sua detecção.

DESCRIÇÃO

**"ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO PARA O DOMÍNIO
EXTRACELULAR DO ANTIGÉNIO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DA
PROSTATA"**

1. ÁREA DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com anticorpos monoclonais que se ligam ao domínio extracelular do antigénio de membrana específico da próstata (PSMA), com as linhas celulares de hibridomas que produzem os anticorpos, e com os métodos de utilização de tais anticorpos, para o diagnóstico e tratamento do cancro. Em particular, relaciona-se com um antícorpo monoclonal gerado contra um péptido sintético substancialmente homólogo de uma parte da região terminal carboxílica do PSMA, antícorpo esse que reage com o PSMA expressado na superfície de células tumorais e no soro de doentes com o cancro da próstata. Adicionalmente, relaciona-se com trinta e quatro anticorpos monoclonais gerados contra uma preparação membranar do carcinoma prostático, e em que os anticorpos também reagem com o PSMA expressado na superfície celular. A presente invenção relaciona-se também com uma nova proteína variante (PSM') do PSMA detectada pelos anticorpos.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O cancro da próstata é a segunda principal causa de morte por cancro entre os homens. De facto, o cancro da próstata é o cancro não cutâneo mais diagnosticado no homem Americano. O número de homens diagnosticados com cancro da próstata está em crescimento constante, em resultado do aumento da população de homens mais velhos, bem como do crescente conhecimento da doença que leva ao seu diagnóstico mais precoce (Parker et al., 1997, CA Cancer J. for Clin. 47:5-28). Projecta-se que mais de 334.500 homens sejam diagnosticados com cancro da próstata em 1997, e que aproximadamente 41.800 mortes, irão resultar da doença. Durante a vida de um homem, o risco de desenvolver cancro da próstata é de cerca de 1 para 5, para os Caucasianos, e de 1 para 6 para os Afro-Americanos. Os grupos de alto risco são representados por aqueles uma história familiar de cancro da próstata ou Afro-Americanos. Ao longo da vida mais de 2/3 dos homens diagnosticados com cancro da próstata irão morrer da doença (Wingo et al., 1996, CA Cancer J. for Clin. 46:113-25). Além disso, muitos dos pacientes que não sucumbem ao cancro da próstata necessitam de tratamento contínuo para aliviar sintomas tais como a dor, a perdas de sangue, e obstrução urinária. Portanto, o cancro da próstata representa também uma importante causa de sofrimento e de aumento nos gastos com os cuidados de saúde (Catalona, 1994, New Eng. J. Med. 331:996-1004).

O PSMA é uma proteína com um peso molecular de 120 kDa expressada nos tecidos da próstata e que foi originalmente identificada pela através da reactividade com um anticorpo monoclonal designado 7E11-C5 (Horoszewicz et al., 1987, Anticancer Res. 7:927-935; U.S. Pat. No. 5,162,504). O PSMA foi obtido numa forma purificada (Wright et al., 1990, Antibody Immunoconjugates and Radio Pharmaceuticals 3:Abstract 193) e caracterizado como uma proteína transmembranar de tipo II, possuindo uma identidade de sequência com o receptor da transferrina (Israeli et al. 1994, Cancer Res. 54:1807-1811) e com actividade de NAALADase (Carter et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:749-753). Ainda mais importante é o facto de o PSMA ser expresso em quantidades aumentadas no cancro da próstata, e de soro destes doentes serem também detectáveis níveis elevados de PSMA (Horoszewicz et al., 1987, supra; Rochon et al., 1994, Prostate 25:219-223; Murphy et al., 1995, Prostate 26:164-168; and Murphy et al., 1995, Anticancer Res. 15:1.473-1479). Foi clonado um cDNA codificante do PSMA (Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53:227-230), e que produz duas espécies de ARNm processados alternativamente: uma espécie de ARNm contendo 2.653 nucleótidos que codifica o PSMA, e uma segunda espécie de ARNm contendo 2.387 nucleótidos referido como PSM' (Su et al., 1995, Cancer Res. 55:1441-1443). Anteriormente à presente invenção, não era sabido se o PSM' codificava um produto proteíco ou se existia apenas como uma espécie de ARNm não translaccionado, uma vez que o produto proteíco do PSM' nunca tinha sido detectado.

Um relatório recente de Carter et al. (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93:749-753) mostra um elevado grau de identidade entre as 1428 bases que representam uma porção do cDNA do PSMA cDNA e da sequência de cDNA da proteína dipeptidase acídica N-acetilatada "alpha-linked" (NAALADase). A NAALADase possui actividade enzimática sobre o neuropéptideo N-acetilaspartil glutamato, para originar glutamato e N-acetyl aspartato. Este relatório demonstra que a actividade de NAALADase é inerente à proteína PSMA, mas que a parte catalítica do PSMA não foi identificada. A actividade de NAALADase foi observada em células em LNCaP que expressavam o PSMA, mas não em células PC3 que não expressavam o PSMA. A transfecção do cDNA do PSMA em células PC3 produziu actividade de NAALADase e a presença do PSMA nestas células.

A diferença entre o ADNc do PSMA e do PSM' é a falta das regiões codificantes dos domínios transmembranar e intracelular, contendo os nucleótidos #1-171 da SEQ ID NO:2 ou os aminoácidos #1-57. O PSMA é descrito como uma proteína de membrana de tipo II e é sabido que o domínio catalítico funcional das proteínas de membrana de tipo II está situado na região extracelular C-terminal da molécula (DeVries, et al., 1995, J. Biol. Chem., 270:8712-8722).

O ARNm do PSM' é encontrado em maiores quantidades nos tecidos normais da próstata, quando comparado com os tecidos da próstata de doentes com

hiperplasia benigna ou cancro da próstata (Su et al., 1995, supra). Em contraste, o ARNm do PSMA encontra-se em níveis mais elevados em doentes com cancro da próstata, em comparação com doentes sem cancro da próstata (Su et al., 1995, supra). Esta diferença observada é consistente com os níveis proteicos séricos de PSMA previamente descritos (Horoszewicz et al., 1987, supra; Rochon et al., 1994, supra; Murphy et al., 1995, supra; e Murphy et al., 1995, supra). Estabelecendo esta ligação, um nível elevado de PSMA no soro de doentes com cancro da próstata, tem sido correlacionado com a progressão da doença em oposição à remissão, e pode ser utilizado como um marcador de prognóstico (Murphy et al., 1995, supra).

O epítopo reconhecido pelo anticorpo monoclonal 7E11-C5 foi mapeado aos primeiros 6 aminoácidos da região intracelular N-terminal do PSMA (Troyer et al., 1995, Urol. Oncol. 1:29-37) (FIGURA 1). A imunocitoquímica electrónica, utilizando o 7E11-C5 localizou o seu epítopo no citoplasma, e especificamente na face interna da membrana plasmática (Troyer et al., 1994, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 35:283, Abstract 1688). Para além disso, em testes *in vitro*, o anticorpo monoclonal 7E11-C5 cora apenas células fixadas e permeabilizadas (Horoszewicz et al., 1987, supra), o que está de acordo como mapeamento do epítopo 7E11-C5 no domínio N-terminal ou intracelular do PSMA. Enquanto o 7E11-C5 é útil para detectar o cancro da próstata *in vivo*, o que presumivelmente expõe o seu epítopo através de necrose e/ou apoptose, um anticorpo monoclonal específico

para o domínio extracelular do PSMA iria permitir uma detecção mais eficiente do PSMA na superfície da célula cancerosa. Adicionalmente, o anticorpo monoclonal 7E11-C5 não reconhece o PSM', uma vez que o PSM' não possui o domínio intracelular do PSMA, com base na sequência do seu transcripto de ARNm.

A citação ou identificação de qualquer referência nesta secção ou em qualquer outra secção desta submissão, não deve ser tomada como uma assumpção de que tal referência está disponível na arte anterior à da presente invenção.

MURPHY G P ET AL ("Measurement of prostate-specific membrane antigen in the serum with a new antibody" PROSTATE, vol. 28, nº 4, 1996, páginas 266-271) revelam um anticorpo monoclonal anti-PSMA/PSM' produzido pelo hibridoma 3F5.4G6, que se liga a um epítopo linear na região extracelular do PSMA, que se estende entre os resíduos de aminoácidos 716-723 e discutem a sua utilidade na detecção do PSMA em doentes com cancro da próstata.

A WO97/35616 revela também o hibridoma 3F5.4G6 e os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas 3D7-1.1 e 4E10-1.14, sendo que os dois últimos anticorpos se ligam também aos epítopos lineares na região extracelular do PSMA/PSM', que se estende entre os resíduos de aminoácidos 134-437 e sendo capaz de se ligar a células vivas que expressam o PSMA.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com anticorpos monoclonais específicos para o domínio extracelular do antigénio do antigénio de membrana específico da próstata (PSMA), com as linhas celulares de hibridomas que produzem os anticorpos, e com os métodos de utilização de tais anticorpos, para o diagnóstico e tratamento do cancro, bem como com a proteína variante do PSMA conhecido como PSM', reconhecida por tais anticorpos.

A invenção baseia-se, em parte, na descoberta dos requerentes, dos anticorpos monoclonais que reconhecem o domínio extracelular do PSMA. Foi gerado um anticorpo pela imunização de um ratinho com um péptido C-terminal do PSMA, que possui a sequência de aminoácidos ESKVDPSK (SEQ ID NO: 1). O anticorpo reage com as proteínas PSMA e PSM' em lisados de células tumorais e no soro de doentes com cancro da próstata. Adicionalmente, cora células tumorais vivas intactas, confirmando a sua especificidade para o domínio extracelular da proteína PSMA ou PSM'. O anticorpo detecta também PSM' em fluidos seminais humanos, e este PSM' apresenta actividade de NAALADase. Foram também gerados, como exemplo, anticorpos monoclonais contra uma preparação de membranas de carcinoma prostático. Estes anticorpos reagem com o domínio extracelular do PSMA, incluindo o PSMA nativo isolado por purificação de imunoafinidade e o PSMA recombinante produzido por tecnologia de ADN recombinante. A maior parte destes anticorpos reagem também com o PSM'.

Os anticorpos da invenção são úteis, em combinação com um anticorpo direcionado para o domínio intracelular do PSMA num ensaio de captura com dois locais, para detectar a presença de PSMA numa amostra de teste. Além disso, os anticorpos aqui revelados podem ser utilizados num ensaio de captura com dois locais, para detectar a presença de PSM' numa amostra de teste.

A presente invenção engloba uma ampla variedade de utilizações, mas não se limitando ao desenvolvimento de um imunoensaio para detectar ou definir a fase do cancro da próstata num doente, a imagiologia de um cancro da próstata primário e/ou metastático *in vivo*, as utilizações terapêuticas dos anticorpos, incluindo utilizações dos anticorpos conjugados com um agente citotóxico ou quimioterapêutico; e a construção e utilização de fragmentos de anticorpos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados ou anticorpos bifuncionais.

Alguns anticorpos aqui descritos são apenas para efeitos de antecedentes e/ou para colocar a invenção dentro do contexto.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIGURA 1. Sequências de aminoácido deduzidas dos antigénios PSMA e PSM' (SEQ ID NO:2) (Israeli et al., 1994 Cancer Res. 54:1807-1811). O ARNm do PSM' não contém o terminal 5' do PSMA, que iria codificar os primeiros 57

aminoácidos (primeira linha da a sequência de aminoácido) e começa presumivelmente no aminoácido 58. No entanto, antes da presente invenção, o PSM' nunca tinha sido identificado na sua forma de proteína. A região sublinhada é o domínio transmembranar putativo e a região a negrito (aminoácido #716-723 da SEQ ID NO:2) é um péptido seleccionado para o desenvolvimento do anticorpo monoclonal

FIGURA 2. Demonstração do anticorpo monoclonal 3F5.4G6 (um subclone derivado a partir do hibridoma primário 3F5) a a sua reactividade com a proteína presente no lisado de LNCaP, com peso molecular de 120 kDa correspondente ao PSMA. O "Western blot" foi desenvolvido com o anticorpo secundário HRP-anti-IgG. Coluna 1=lisado de LNCaP sondado com 7E11-C5; Coluna 2= lisado de LNCaP sondado com 3F5.4G6.

FIGURA 3. Demonstração por "western blot" do PSMA no soro de doentes com cancro da próstata (grau D2) utilizando anticorpos monoclonais 3F5.4G6 (Colunas 3 e 4) e 7E11-C5 (Colunas 1 e 2) como controlo.

FIGURA 4. Ensaio de "Western blot" de lisados de LNCaP utilizando anticorpos monoclonais 7E11-C5 (Coluna 1) e 3F5.4G6 (Coluna 2) e revelado com o anticorpo secundário HRP-anti-IgM. Tanto o 7E11-C5 como o 3F5.4G6 reconheceram uma proteína com peso molecular de 120 kDa. Adicionalmente, o 3F5.4G6 reconhece também uma proteína com 105-110 kDa de peso molecular correspondente à forma proteica prevista do PSM'. Deve ser notado que o 7E11-C5 não reconheceu o PSM' porque o epítopo do anticorpo monoclonal 7E11-C5 não foi encontrado no PSM'. O anticorpo 3F5.4G6 reconhece a porção C-terminal da proteína (aminoácido #716-723 da SEQ ID

NO:2), que corresponde ao domínio extracelular do PSMA e do PSM'.

FIGURA 5. Demonstração de que os anticorpos monoclonais 7E11-C5 e 3F5.4G6 reconheceram uma proteína idêntica mas que o 3F5.4G6 reconheceu uma proteína adicional correspondente ao PSM'. O lisado de LNCaP foi inicialmente imunoprecipitado com o anticorpo monoclonal 7E11-C5, e o material imunoprecipitado separado em geles de SDS, e sondados num ensaio de "Western blot", com os anticorpos monoclonais 7E11-C5 (colunas 1-4) ou 3F5.4G6 (Colunas 5-8). As colunas 1 e 5 eram o em bruto; As colunas 2 e 6 eram lisado LNCaP pré-limpo; As colunas 3 e 7 eram material que imunoprecipitou com o anticorpo monoclonal 7E11-C5; e as colunas 4 e 8 eram proteínas deixadas no lisado LNCaP previamente imunoprecipitado. O anticorpo 7E11-C5 imunoprecipitou uma proteína de 120 kDa (Coluna 3), que foi também reconhecida pelo 3F5.4G6 (Coluna 7). No entanto, após a imunoprecipitação com 7E11-C5, uma segunda proteína foi reconhecida pelo 3F5.4G6 (Coluna 8) que não foi precipitada pelo 7E11-C5 (Coluna 4), e que correspondeu ao PSM'. Portanto, o 7E11-C5 não reconhece o PSM'.

FIGURA 6. Demonstração de que os anticorpos monoclonais 7E11-C5 e 3F5.4G6 reconheceram uma proteína idêntica de 120 kDa. O PSMA de um lisado de LNCaP foi imunoprecipitado por um anticorpo monoclonal 3F5.4G6, as proteínas no imunoprecipitado foram separadas num gel de SDS, transferidas para Immobilon-P e sondadas num "Western blot" com o anticorpo monoclonal 7E11-C5. Coluna 1=lisado

controlo de LNCaP e sondado com 7E11-C5; Coluna 2=imunoprecipitação 3F5.4G6.

FIGURA 7A & B Demonstração por análise FACS do reconhecimento de células LNCaP vivas, pelo anticorpo monoclonal 3F5.4G6, ilustrando a ligação do anticorpo ao domínio extracelular do PSMA. A FIGURA 7A representa o controlo sem nenhum anticorpo primário; e a FIGURA 7B representa células LNCaP incubadas com 100 µg/ml de 3F5.4G6 antes da análise FACS. O desvio para a direita indica a ligação do anticorpo a células LNCap vivas.

FIGURA 8. Demonstração da reactividade do anticorpo monoclonal 3F5.4G6 com PSM' isolado e purificado a partir de fluido seminal. A coluna 1 é o lisado LNCaP e a coluna 2 é PSM' purificado a partir de fluido seminal. As proteínas foram separadas em geles de SDS poliacrilamida e transferidas para papel Immobilon P e sondadas com o anticorpo monoclonal 3F5.4G6 através de procedimentos de "Western blot". A proteína purificada a partir de fluido seminal e representada na coluna 2 tem um peso molecular de 90kDa, o que é provável que seja um produto não-glicosilado ou parcialmente glicosilado do PSM', tendo um peso molecular de 105-110 kDa.

FIGURA 9. Demonstração da reactividade dos anticorpos monoclonais 3D7-1.1 e 4E10-1.14 com o PSMA nativo e três fragmentos de PSMA. Microplacas de 96 poços foram revestidas com with PSMA nativo ou com um dos três fragmentos polipeptídicos do PSMA expressados em bactérias, e reagidos com sobrenadantes de hibridoma numa ELISA. Enquanto todos os três anticorpos testados mostraram uma

ligação comparável ao PSMA nativo, o 3D7-1.1 e 4E10-1.14 reagiram fortemente com um fragmento correspondente a um epítopo no domínio extracelular do PSMA.

FIGURA 10. Análise de "Western blot" do PSMA utilizando anticorpos monoclonais 3D7-1.1. Coluna 1=lisado LNCaP; Coluna 2=lisado PC-3; Coluna 3=PSMA purificado por imunoafinidade.

FIGURA 11. Análise de "Western blot" do PSMA com extensão total expressado em baculovírus. O PSMA recombinante foi submetido a electroforese em gele de SDS-PAGE, "electroblotted" e sondado com várias preparações de anticorpos.

Coluna 1= branco;

Coluna 2 = meio controlo (20% FCS em RPMI 1640;

Coluna 3= anticorpo monoclonal 3D7-1.1;

Coluna 4= anticorpo monoclonal 3D7-1.2;

Coluna 5= anticorpo monoclonal 3D7-1.3;

Coluna 6= anticorpo monoclonal 3D7-1.7;

Coluna 7= anticorpo monoclonal 3D7-2.7;

Coluna 8= anticorpo monoclonal 4E10 (original);

Coluna 9= anticorpo monoclonal 4E10-1.3;

Coluna 10= anticorpo monoclonal 4E10-1.14;

Coluna 11 = branco;

Coluna 12 = branco;

Coluna 13=7 anticorpo monoclonal E11-C5.

FIGURA 12 A-D Demonstração por análise FACS do reconhecimento de células LNCaP vivas pelos anticorpos monoclonais 3D7-1.1 e 4E10-1.14, ilustrando a ligação do anticorpo ao domínio extracelular do PSMA. A FIGURA 12A

representa células LNCaP incubadas com 4E10-1.14. A FIGURA 12B representa células PC-3 incubadas com 4E10-1.14. A FIGURA 12C representa células LNCaP incubadas com 3D7-1.1. A FIGURA 12D representa células PC-3 incubadas com 3D7-1.1. Os diferentes padrões de desvio para a direita na FIGURA 12A e 12C sugerem que os dois anticorpos podem reconhecer diferentes epítopos do PSMA.

FIGURA 13. Detecção do PSMA por uma ELISA de "two-site capture" utilizando dois anticorpos monoclonais contra distintos epítopos do PSMA. O PSMA purificado por imunoafinidade e diluído em série foi adicionado a microplacas de 96 poços revestidas com 7E11-C5 e detectado por incubação com sobrenadantes de 3D7-1.1 ou 4E10-1.14. A absorbância a 405 nm foi medida num leitor de microplacas. A linha com os círculos representa o anticorpo monoclonal D7-1.1. A linha com os quadrados representa o anticorpo monoclonal 4E10-1.14.

FIGURA 14. Detecção do PSMA numa variedade de amostras biológicas através de ELISA "two-site capture" utilizando os anticorpos monoclonais 3D7-1.1 e 4E10-1.14.

FIGURA 15. Detecção de PSMA purificado por imunoafinidade, diluído em série em soro humano normal através de ELISA "two-site capture" utilizando os anticorpos monoclonais 307-1.1 e 4E10 1.14.

FIGURA 16. Detecção de PSMA através de um ELISA "two-site capture" alternativo. O PSMA purificado por imunoafinidade e diluído em série foi adicionado a microplacas de 96 poços revestidas com 3D7 1.1 e detectado através de incubação com 7E11-C5 biotinilado (40 µg/ml),

seguida de estreptavidina conjugada com peroxidase de rabanete. A absorbância a 405 nm foi medida num leitor de microplacas. O 7E11-C5 foi biotinilado utilizando os kits de Biotinilação "E-Z link" (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante.

FIGURA 17. Análise de "Western blot" de lisados celulares e de várias fracções de um fragmento semi-purificado de PSMA (correspondente aos aminoácidos 134 a 750 da extensão total do PSMA, SEQ ID NO:2, expressado como uma inserção de 1,9 kb num sistema de expressão de baculovirus) sondado como sobrenadante de uma cultura de tecidos do hibridoma 4E10-1.14. A identificação do produto da proteína da construção de 1,9 kb (aminoácidos 134-750 do PSMA, SEQ ID NO:2) está indicada pela seta

Coluna 1=Marcadores; Coluna 2= lisado celular bruto de LNCaP; Coluna 3= "pellet" viral, isto é, o "pellet" 100.000 xg de células SF9 infectadas com baculovirus expressando o fragmento de PSMA com 1.9 kb; Coluna 4= fracção sobrenadante 100,000 xg de células lisadas SF9 infectadas com expressando o fragmento de PSMA com 1,9 kb; Coluna 5= Fluído da fracção apresentada na Coluna 4 após passagem através de uma matriz Ni-NTA; Coluna 6=eluição com 0,5M NaCl da matriz Ni-NTA; Coluna 7=eluição com 1M imidazole, pH 7,6 da matriz Ni-NTA; Coluna 8= Fluído da fracção apresentada na Coluna 4 após passagem através de uma matriz Ni-NTA; Coluna 9= eluição com 0,5M NaCl da matriz Ni-NTA; e Coluna 10 = eluição com 1M imidazole, pH 7,6 da matriz Ni-NTA. De notar também, na Coluna 2 a reactividade do

anticorpo monoclonal 4E10-1.14 com o PSMA nativo de extensão total expressado em células LNCaP.

FIGURA 18. "Western blot" de lisados brutos de células SF9 infectadas com um baculovirus contendo, quer uma inserção irrelevante, quer uma inserção de 1,9 kb codificando uma porção do PSMA (aminoácidos 134-750 do PSMA de extensão total, SEQ ID NO:2) sondado com o anticorpo 7E11-C5. Colunas 1,2= Marcadores de Peso Molecular; Coluna 3= vírus irrelevante infectado com lisado de células SF9; Coluna 4=lisado de células SF9; e Coluna 5=inserção de 1,9 kb do PSMA contendo virus infectado com o lisado SF9. É de notar que as bandas positivas para o 7E11-C5 foram observadas com quaisquer produtos proteicos presentes nas células SF9, ou com aqueles infectados com qualquer um dos vírus.

FIGURA 19. "Western blot" do PSMA e do PSM' obtidos a partir de células LNCaP, fluido seminal humano e soro humano, sondados com o anticorpo monoclonal 3D7-1.1. Coluna 1=lisado celular de LNCaP; Coluna 2=PMSA purificado por imunoafinidade com 7E11-C5 a partir de células LNCaP; Coluna 3=fluido seminal humano; e Coluna 4= soro humano masculino. Estão indicadas as posições do PSMA e do PSM'

FIGURA 20. Representação em diagrama dos fragmentos de PSMA e de PSM expressados como proteínas bacterianas de fusão. O PSMA de extensão total é definido como os aminoácidos 1 até 750 da SEQ ID NO:2. Ao PSM' faltam-lhe os primeiros 57 aminoácidos, que contêm também o domínio transmembranar (TM, resíduos 20 até 43) da proteína. Os fragmentos de PSMA utilizados são compostos pelos

aminoácidos 1 até 173, pelos aminoácidos 134 até 437, e pelos aminoácidos 438 até 750, como indicado na figura e na SEQ ID NO:2. Os anticorpos encontram-se listados abaixo da região da proteína correspondente à localização aproximada dos seus epítopos de ligação. A parte inferior da figura lista 3 anticorpos, que foram descobertos como sendo capazes de ligar apenas às conformações nativas da proteína e à proteína não-desnaturada ou aos fragmentos da proteína. Com base em experiências de imunocitoquímica e de citometria de fluxo com células vivas, estes epítopos mapeiam-se no domínio extracelular, entre os aminoácidos 44 até 750 da SEQ ID NO:2.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com anticorpos monoclonais específicos para o domínio extracelular do PSMA, com os métodos de utilização de tais anticorpos e de uma variante truncada da proteína, PSM', identificada por tais anticorpos. Apesar de os procedimentos e métodos específicos aqui descritos serem exemplificados utilizando um péptido C-terminal, uma preparação de membrana tumoral expressando o PSMA ou o PMSA purificado, para imunizar ratinhos, são meramente ilustrativos para a prática da invenção. Os procedimentos e técnicas análogas são igualmente aplicáveis a uma variedade de animais hospediros imunizados contra o PSMA sob a forma de proteína, péptidos,抗igénios da superfície celular e preparações da membrana em bruto.

5.1. LINHAGENS CELULARES DE HIBRIDOMAS E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Numa materialização especificada, a título de exemplo, na Secção 6, *infra*, um péptido sintético derivado da região C-terminal do PSMA, foi utilizado como imunogénio. Os resultados mostram que um anticorpo designado 3F5.4G6, se liga ao domínio extracelular do PSMA, que se encontra exposto à superfície de células vivas de cancro da próstata e no soro de doentes com cancro da próstata. Adicionalmente, os exemplos de trabalho nas Secções 7 e 8, *infra*, demonstram a produção de anticorpos monoclonais adicionais, direccionados para o domínio extracelular do PSMA, depois da imunização de animais com uma preparação de membranas tumorais que expressavam o PSMA. Neste enquadramento, as células cancerosas tais como as LNCaP, que expressam o PSMA, células hospedeiras transfectadas com a sequência codificante do PSMA, o PSMA purificado, o PSM' ou os péptidos do domínio extracelular do PSMA, podem ser utilizados como imunogénios para desencadear uma resposta imune em animais hospedeiros, para dar origem a anticorpos monoclonais específicos para o domínio extracelular do PSMA.

As células somáticas como o potencial para produzir anticorpos e, em particular linfócitos-B, são adequadas para fusão com uma linhagem de mieloma de células-B. Estas células produtoras de anticorpos, que se encontram na fase de divisão de plasmablasto, entram em fusão preferencialmente. As células somáticas podem ser

obtidas a partir de nódulos linfáticos, do baço e do sangue periférico de animais confrontados com o antigénio, sendo que as células linfáticas de escolha dependem, em larga medida, da sua utilidade empírica no sistema de fusão particular. Uma vez confrontados ou hiperimunizados, os animais podem ser utilizados como fonte de linfócitos produtores de anticorpos. Os linfócitos de ratinho dão origem a uma percentagem mais elevada de fusões estáveis com as linhagens de mielomas de ratinho abaixo descritas. De estes são preferidos os ratinhos BALB/c. No entanto para preparar células produtoras de anticorpos podem também ser utilizadas como hospedeiros, outras estirpes de ratinhos, coelhos, hamsters ovelhas e rãs. Conforme revisto por Goding (in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp. 60-61, Orlando, Fla., Academic Press, 1986), a utilização de linfócitos de rato pode oferecer várias vantagens.

Alternativamente, células somáticas humanas capazes de produzir anticorpos, especificamente linfócitos-B, são adequadas para fusão com linhagens celulares de mielomas. Apesar de poderem ser utilizados linfócitos-B de biopsias individuais de baço, das amígdalas ou nódulos linfáticos, os linfócito-B de sangue periférico, mais acessíveis, são preferidos. Os linfócitos podem ser derivados de doentes diagnosticados com carcinomas da próstata. Adicionalmente, células S humanas podem ser imortalizadas directamente pelo vírus Epstein-Barr (Cole et

al., 1995, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

As linhagens celulares de mieloma adequadas para utilização em procedimentos de fusão para produção de hibridomas, são preferivelmente não-produtoras de anticorpos, tendo elevada eficiência de fusão, e deficiências enzimáticas que as tornam incapazes de crescer em certos meios selectivos, que suportam o crescimento dos hibridomas desejados. Os exemplos destas linhagens celulares de mieloma que podem ser utilizada para a produção de híbridos celulares de fusão da invenção, incluem P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4.1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XXO Bul, todas derivadas de ratinho; as R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.34 IR983F e 4B210 derivadas de rato e as U-266, GM1500-GRG 2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, todas derivadas do homem (Goding *in* Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp. 65-66, Orlando, Fla., Academic Press, 1986; Campbell, *in* Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques *in* Biochemistry and Molecular Biology Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elseview, 1984).

Os métodos para gerar híbridos de células de baço ou nódulos linfáticos, e células de mieloma produtoras de anticorpos, compreendem normalmente a mistura de células somáticas com células de mieloma, numa proporção de 2:1 (apesar de a proporção poder variar entre cerca de 20:1 até cerca de 1:1), respectivamente, na presença de um agente ou

agentes (químicos ou eléctricos) que promovem a fusão de membranas celulares. É muitas vezes preferido que o mesmo animal sirva como fonte das células somáticas e de mieloma utilizadas no procedimento de fusão. Os métodos de fusão foram descritos por Kohler e Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497; 1976, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519), e por Gefter et al. (1977, *Somatic Cell Genet.* 3:231-236). Os agentes promotores da fusão utilizados por aqueles investigadores foram o vírus de Sendai e o polietileno glicol (PEG), respectivamente. Os métodos de fusão revistos por Goding (1986, in *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., pp. 71-74, Orlando, Fla., Academic Press), incluindo os acima, bem como a fusão induzida electricamente são também adequados para gerar anticorpos monoclonais da invenção.

Os procedimentos de fusão produzem normalmente híbridos viáveis numa frequência muito baixa, cerca 1×10^{-6} a 1×10^{-8} de células somáticas. Por causa da baixa frequência de obtenção de híbridos viáveis, é essencial ter meios de seleccionar os híbridos celulares de fusão, de entre as restantes células que não sofreram fusão, em particular as células de mieloma que não sofreram fusão. É também normalmente necessário um meio de detectar os hibridomas produtores de anticorpos desejados, de entre os outros híbridos celulares de fusão.

Geralmente, as células de fusão são cultivadas e meios selectivos, por exemplo, o meio HAT contendo

hipoxantina, aminopterina e timidina. O meio HAT permite a proliferação de células híbridas e previne o crescimento de células de mieloma que não sofram fusão que normalmente continuariam a se dividir indefinidamente. A aminopterina bloqueia a síntese de novo, da purina e da pirimidina, através da inibição da produção de tetrahidrofolato. A adição de timidina ultrapassa o bloqueio na síntese de pirimidina, enquanto a hipoxantina é incluída no meio, de maneira a que as células inibidas sintetizem purina, utilizando a via de recuperação de nucleótidos. As células de mieloma empregues são mutantes aos quais lhe falta a hipoxantina fosforribosil transferase (HPRT), e que não podem portanto utilizar a via de recuperação de nucleótidos. No híbrido sobrevivente, o linfócito B fornece a informação genética para a produção desta enzima. Uma vez que os linfócitos B, têm eles próprios um tempo de vida limitado em cultura (aproximadamente duas semanas), as únicas células que podem proliferar em meio HAT, são os híbridos formados a partir de células de mieloma e baço.

Para facilitar o rastreio dos anticorpos secretados pelos híbridos e para prevenir os híbridos individuais de suplantarem os restantes, a mistura da fusão entre o mieloma e os linfócitos B é diluída em meio HAT e cultivada em múltiplos poços de microplacas. Em duas ou três semanas, quando os clones híbridos se tornam visíveis microscopicamente, o fluido sobrenadante dos poços individuais contendo os clones híbridos, é submetido a ensaio quanto ao anticorpo específico. O ensaio deve ser

sensível, simples e rápido. As técnicas de ensaio incluem os rádioimunoensaios, os imunoensaios enzimáticos, os ensaios de citotoxicidade, os ensaios de placas, os ensaios de imunoligação "dot" e outros semelhantes.

Depois de os híbridos celulares de fusão terem sido seleccionados e clonados em linhagens celulares individuais produtoras de anticorpos, cada linhagem celular pode ser propagada por uma de duas maneiras normalizadas. Uma amostra de hibridoma pode ser injectada num animal histocompativel do tipo que foi utilizado para fornecer as células somáticas e de mieloma para a fusão inicial. Os animais injectados desenvolvem tumores que secretam o anticorpo monoclonal específico produzido pelo híbrido celular de fusão. Os fluidos corporais do animal, tais como o soro o líquido ascítico, podem ser drenados para fornecer os anticorpos monoclonais em concentrações altas. Alternativamente, as linhagens celulares individuais podem ser propagadas *in vitro*, em frascos de cultura laboratorial; o meio de cultura, que contém também elevadas concentrações de um único anticorpo monoclonal específico, pode ser colhido por decantação, filtração ou centrifugação.

Para além da tecnologia de hibridomas, os anticorpos monoclonais específicos para o domínio extracelular do PSMA podem ser produzidos através de outros métodos bem conhecidos na arte. Por exemplo, podem ser utilizadas abordagens moleculares utilizando tecnologia de apresentação por fagos, para expressar as regiões variáveis

do anticorpo que ligam ao PSMA (U.S. Pat. Nos. 5,223,409; 5,403,484 e 5,571,698).

Os anticorpos monoclonais ou os fragmentos purificados dos anticorpos monoclonais, que possuem pelo menos uma região de ligação ao antigénio incluem, tais como, Fv, F(ab')₂, fragmentos Fab (Harlow and Coluna, 1988, Antibody, Cold Spring Harbor), anticorpos de cadeia única (U.S. Pat. No. 4,946,778), anticorpos quiméricos ou humanizados (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851; Newuberger et al., 1984 Nature 81:6851) e regiões determinantes de complementaridade (CDR), podem ser preparados através de procedimentos convencionais. A purificação dos anticorpos ou dos fragmentos pode ser alcançada através de uma variedade de métodos conhecidos daqueles com perícia, incluindo, a precipitação com sulfato de amónia ou sulfato de sódio, seguido por diálise contra solução salina, cromatografia de troca iónica, cromatografia de afinidade ou imunoafinidade, bem como por filtração em gele, electroforese de zona, etc. (ver Goding in, monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp 104-126, Orlando, Fla, Academic Press).

5.2. CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONALIS E PSM'

Utilizando as técnicas genericamente descritas na Secção 5.1 supra, e ilustradas nas secções 6-8, infra, foram seleccionadas trinta e cinco linhagens celulares hibridomas, por causa da sua produção de anticorpos

monoclonais específicos para o domínio extracelular do PSMA. A presente invenção engloba os anticorpos monoclonais exemplificados nas Secções, 6, 7 e 8, infra, bem como outros anticorpos monoclonais que se liguem especificamente ao domínio extracelular do PSMA e PSM', incluindo particularmente quaisquer anticorpos que inibam competitivamente a ligação de qualquer um ou mais de um dos acima referidos, anticorpos contra o PSMA, como avaliado num imunoensaio enzimático, radioimunoensaio ou qualquer outro imunoensaio de ligação competitiva.

O anticorpo 3F5.4G6 é um anticorpo IgM isotípico que se liga especificamente ao PSMA expressado em lisados celulares de cancro da próstata e na superfície celular de células de cancro da próstata, bem como no soro obtido a partir de doentes com carcinoma da próstata. Além disso, o 3F5.4G6 também se liga especificamente ao PSM'. O epítopo do PSMA reactivo ao 3F5.4G6-é extracelular, C-terminal e distinto do reconhecido pelo 7E11-C5 (Horoszewicz et al., Anticancer Res. 7:927-936), que está associado à membrana no citoplasma das células. Os anticorpos 3D7-1.1 e 4E10-1.14 são também anticorpos IgM e ligam-se ao PSMA expressado em lisados celulares de cancro da próstata e na superfície celular. Estes anticorpos podem ser utilizados para detectar quer o cancro da próstata e tumores metastáticos, tais como as metástases ósseas do cancro da próstata. Além disso, foram gerados trinta e dois anticorpos do isotipo IgG e que são específicos para os epítopos ao longo do domínio extracelular do PSMA. Os

anticorpos do isotipo IgG activam a citólise mediada pelo complemento e ligam-se às células fagocíticas através da sua região Fc. Além disso o seu tamanho e estabilidade mais reduzidos podem permitir, uma melhor penetração do que a IgM nos tecidos, *in vivo*.

Durante o desenvolvimento de uma resposta de um anticorpo, as células produtoras de anticorpos, secretam primeiro os isotipo IgM que muda eventualmente para IgG. Estes eventos de mudança de classe ocorrem através de rearranjos no ADN, nas regiões constantes dos genes, de tal modo que seja mantida a mesma especificidade para o antigénio. Os diferentes isotipos de anticorpos possuem funções efectoras diferentes. Por exemplo, o IgM e todas as subclasses de IgG, excepto a IgG4, se podem fixar ao complemento aquando da ligação do anticorpo. Em contraste, a IgE liga-se a mastócitos, numa reacção alérgica para desencadear a libertação de histamina.

As linhagens celulares de hibridoma produzem também variantes de mudanças de classe durante a cultura a longo termo. Em particular, os anticorpos monoclonais que mudam de IgM para IgG ou IgG₁ para IgG_{2a}, foram seleccionados pela sua elevada afinidade pela proteína A, o que facilita a sua purificação. Qualquer variante de mudança de classe pode ser seleccionada quanto a uma função efectora particular (Spira et al., 1985, em *Hibridoma Technology in the Biosciences and Medicine*, ed. Springer, pp. 77-88, Plenum Press, NY; Harlow and Coluna, 1988

Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory). No caso dos anticorpos exemplificados, uma vez que alguns deles são do isotipo IgM, é desejável seleccionar também variantes IgG que possuam a mesma especificidade para o antigénio, o que pode ser mais útil para certos fins, *in vitro* ou *in vivo*. A presente invenção engloba variantes de IgG dos anticorpos monoclonais da invenção, incluindo o 3F5.4G6, 3D7-1.1 e o 4E10-1.14.

As secções 6-8, infra, mostram que os anticorpos exemplificados reconhecem uma proteína com peso molecular de 120 kD. Em particular, a maior parte destes anticorpos reconhece também uma proteína com peso molecular de 105-110 kDa em lisados celulares de tumor da próstata. Enquanto que a proteína de 120 kDa é também reconhecida pelo antícorpo 7E11-C5, a proteína de peso molecular inferior, é apenas detectada pelos anticorpos da invenção. Portanto, a proteína de 105-110 kDa representa o produto de um ARNm, conhecido como PSM'. No entanto, antes da presente invenção, a PSM' proteína nunca foi referida; e pensava-se que se tratava de um ARNm não-translacionado. Uma vez que se presume que a sequência de aminoácidos do PSM' não tem tanto as regiões citoplasmáticas e transmembranares do PSMA, como deduzido a partir da sua sequência de ARN, é consistente que o 7E11-C5 não iria reagir com este produto, por causa da sua especificidade relativamente a um epítopo intracelular. Em contraste, os anticorpos específicos para o domínio extracelular do PSMA também reconhecem o PSM'.

5.3. SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE ANTICORPOS MONOCLONAIOS ESPECÍFICOS PARA O PSMA

Numa outra materialização da invenção, as linhagens celulares de hibridoma exemplificadas, podem ser utilizadas para produzir composições que compreendam um local de ligação ao抗原 ou variantes de anticorpos, compreendendo um local de ligação ao anticorpo ou que combinem as regiões variáveis ou hipervariáveis murínicas, com as regiões constantes humanas, ou regiões constantes e variáveis contíguas, isto é, anticorpos quiméricos humanizados, bem como os anticorpos humanizados que retenham apenas CDRs de ligação ao抗原 do anticorpo original em associação com regiões humanas contíguas (ver, Waldmann, 1991, Science 252: 1657, 1662, particularmente 1658-59 e as referências aí citadas). É expectável, que tais anticorpos tenham uma imunogenicidade reduzida, quando administrados *in vivo*, em aplicações de diagnóstico, profiláticas ou terapêuticas de acordo com a invenção.

Ainda numa outra materialização, a invenção engloba a utilização de linhagens celulares de hibridomas como fonte de ADN ou ARNm, codificantes dos genes da imunoglobulina activada re-arranjados, que podem ser isolados, clonados, através de técnicas de ADN recombinante, e transferidos para outras células, para a produção de fragmentos de ligação ao抗原, específicos para o domínio extracelular do PSMA. Pelo isolamento do ADN rearranjado e pela preparação de ADNc a partir do ARNm das

linhagens celulares de hibridoma da invenção, pode ser obtida uma sequência livre de intrões.

Para ilustração, e não como meio de limitação, pode ser preparada uma biblioteca de imunoexpressão e rastreada quanto a fragmentos de ligação do PSMA e PSM', como se segue (Ver, Huse et al., 1989, Sci. 246:1275-1281; Mullinax et al., 1990, Proc. Natl Acad. Sci. USA 87:8045-8099). O ARN total pode ser purificado (por exemplo, utilizando kits disponíveis comercialmente) e convertido em ADNc utilizando um iniciador oligo (dT) para a cadeia leve (L) e um iniciador específico para a cadeia pesada utilizando a transcriptase reversa. A amplificação pela reacção em cadeia da polimerase (PCR) das sequências da cadeia H e L pode ser feita separadamente com conjuntos de pares de iniciadores. Os iniciadores a montante pode ser concebidos para hibridizar com sequências parcialmente conservadas nas regiões "leader" e/ou "framework" de V_H or V_L , e os iniciadores a jusante podem ser concebidos para hibridizar com as sequências do domínio constante. Tais iniciadores iriam conservar a totalidade da cadeia L e disponibilizar cadeias H correspondentes ao Fd da IgG, e conservando as ligações dissulfídicas H-L. Os fragmentos do AND de L e H, amplificados por PCR, são então digeridos e ligados separadamente em vectores das cadeias H e L. Estes vectores contêm uma sequência "pelB leader", um local de ligação ao ribossoma e codões de terminação. A partir de vectores disponíveis comercialmente podem ser preparados vectores de fagos lambda, adequados para expressão em *E.*

coli (ImmunoZAP L, ImmunoZAP H; Stratocyte, La Jolla, Calif.). O ADN recombinante de fago ligado é incorporado num bacteriofago com um extracto de empacotamento, *in vitro*, e utilizado para infectar *E. coli*. A biblioteca de imunoexpressão assim criada é rastreada quanto a fragmentos de ligação ao抗原, utilizando o PSMA, o PSM' ou um péptido derivado. Os clones positivos podem ser rastreados e identificados como descrito por Mullinax et al. (supra).

5.4. UTILIZAÇÕES DOS ANTICORPOS E DE PREPARAÇÕES DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA O DOMÍNIO EXTRACELULAR DO PSMA

Apesar de os procedimentos e métodos específicos aqui descritos serem exemplificados utilizando os anticorpos monoclonais da invenção, são apenas ilustrativos para a prática da invenção. Os fragmentos purificados de anticorpos monoclonais possuindo pelo menos uma porção da região de ligação ao抗原, incluindo os fragmentos Fv, F(ab')2, Fab, os anticorpos de cadeia simples, os anticorpos quiméricos ou humanizados ou CDRs, podem ser utilizados nos procedimentos e métodos abaixo descritos, de acordo com a presente invenção.

5.4.1 APLICAÇÕES IMUNOHISTOLÓGICAS E IMUNOCITOLÓGICAS

Os anticorpos monoclonais da presente invenção podem ser utilizados para detectar células do carcinoma da próstata em espécimes histológicos e citológicos, e em particular, para distinguir tumores malignos de tecidos

normais e de tumores não-malignos. Os espécimes de tecidos podem ser corados pelos anticorpos e a sua ligação detectada por um segundo anticorpo conjugado com um marcador tal como a peroxidase, a fluoresceína, fosfatase alcalina, e semelhantes.

Além disso, técnicas de imunofluorescência podem utilizar os anticorpos monoclonais da presente invenção para examinar tecido humano, células e espécimes de fluidos corporais. Num protocolo típico, lâminas contendo secções criostáticas congeladas de amostras de tecidos biológicos não fixados ou esfregaços citológicos que são secos ao ar, fixados com formalina ou acetona, e incubados com a preparação do anticorpo monoclonal numa câmara humidificada à temperatura ambiente.

As lâminas são então lavadas e adicionalmente incubadas com uma preparação de anticorpo direcccionado contra o anticorpo monoclonal, normalmente algum tipo de imunoglobulina anti-ratinho se os anticorpos monoclonais utilizados são derivados da fusão de linfócitos do baço de ratinho com uma linhagem celular de mieloma de ratinho. Esta imunoglobulina anti-ratinho é marcada com um composto, por exemplo rodamina ou isotiocianato de fluoresceína, que fluorescem a um comprimento de onda particular. O padrão de marcação e as intensidades da amostra são então determinados por microscopia de fluorescência e opcionalmente registadas fotograficamente.

Como uma outra alternativa, podem ser utilizadas a análise computorizada da imagem de fluorescência ou citometria de fluxo, para analisar espécimes de tecido ou células esfoliadas, isto é, preparações de células isoladas de biopsias por aspiração ou de tumores da próstata utilizando os anticorpos monoclonais da invenção. Os anticorpos monoclonais da invenção são particularmente úteis na quantificação células tumorais vivas, isto é, preparações de células isoladas de biopsias por aspiração ou de tumores da próstata através análise computorizada da imagem de fluorescência ou com um citómetro de fluxo. Os anticorpos da invenção são particularmente úteis nos ensaios para diferenciar tumores benignos de tumores malignos da próstata, uma vez que o PSMA ao qual os anticorpos monoclonais se ligam, é expressado em quantidades aumentadas pelos tumores malignos. A percentagem populacional de células positivas para o PSMA, isoladamente ou em conjunção com a polidia de AND destas células, pode, adicionalmente fornecer informação prognóstica muito útil, através da disponibilização de indicador precoce da progressão da doença.

Ainda numa outra materialização alternativa, os anticorpos monoclonais da presente invenção podem ser utilizados em combinação com outros anticorpos da próstata conhecidos, para disponibilizar informação relativa ao fenótipo maligno de um carcinoma da próstata.

5.4.2 APLICAÇÕES IMUNOSEROLÓGICAS

A utilização dos anticorpos monoclonais da invenção pode ser estendida ao rastreio de fluidos biológicos humanos, quanto à presença dos determinantes antigénicos específicos reconhecidos. A avaliação imunoserológica *in vitro*, de fluidos biológicos recolhidos de doentes permite o diagnóstico não-invasivo de cancros. A título de ilustração, os fluidos corporais humanos, tais como o fluido prostático, o fluido seminal o sangue total, o soro ou a urina podem ser colhidos de um doente e avaliados quanto ao epítopo específico, quer como抗igénio libertado ou ligado à membrana em células na amostra de fluido, utilizando anticorpos monoclonais específicos para o domínio extracelular do PSMA e PSM, em ensaios normalizados de radioimunoensaio ou imunoensaios acoplados a enzima, imunoensaios acoplados a enzima de ligação competitiva, "dot blot" ou "Western blot", ou outros ensaios conhecidos na arte.

Adicionalmente, pode ser desenvolvido um ensaio de diagnóstico mais sensível para a proteína PSMA ou PSM' proteína, através da utilização de anticorpos monoclonais direcionados para epítotos não-sobreponíveis no PSMA e PSM'. Os anticorpos específicos para as extremidades opostas do PSMA, tais como o 7E11-C5 e os anticorpos da invenção, são particularmente adequados para utilização em tal ensaio. A este respeito, um anticorpo pode ser ancorado a uma substrato para capturar o PSMA ou PSM' num fluído

biológico, enquanto que o outro anticorpo é utilizado para detectar o抗原 ligado ao anticorpo. Além disso, uma vez que a expressão do PSMA e PSM' se encontra aumentada no cancro da próstata e nos tecidos normais da próstata, respectivamente, os anticorpos que distinguem estas duas formas podem ser utilizados para disponibilizar uma maneira mais exacta para monitorizar a regressão do tumor versus a progressão, depois do tratamento. Uma vez que a maior parte dos anticorpos da invenção reconhecem ambas as formas, mas que o 7E11-C5 apenas se liga ao PSMA, estes anticorpos pode ser utilizados em conjunção ara determinar os níveis precisos de cada forma num doente, correlacionando assim as suas quantidades com a carga tumoral. Por exemplo, o 7E11-C5 pode ser utilizado como um anticorpo ancorado, num ensaio de captura de dois locais, e qualquer um dos outros anticorpos específico para o domínio extracelular, pode ser utilizado como um anticorpo de detecção para quantificar o PSMA. Por outro lado, qualquer combinação de dois anticorpos específicos para o domínio extracelular do PSMA, pode ser utilizado num ensaio de captura de dois locais semelhante, para medir especificamente as concentrações totais de PSM' e PSMA. Uma simples subtracção do PMSA, do total dos PSMA e PSM', quantifica especificamente o PSM'.

Além da detecção do domínio extracelular do PSMA e PSM', através de um anticorpo monoclonal em tecidos e fluidos corporais, as medições da actividade enzimática da NAALADase, podem ser utilizadas para quantificar o domínio extracelular do PSMA e/ou PSM' em tecidos e/ou fluidos corporais.

Por exemplo, os níveis tecidulares podem ser determinados pela homogeneização de tecidos através de solubilização por detergente, sedimentação do material insolúvel por centrifugação medição da actividade de NAALADase no sobrenadante remanescente. De igual modo, a actividade de NAALADase em fluidos biológicos pode também ser medida, sedimentando primeiro o material celular por centrifugação e executando um ensaio enzimático típico da actividade de NAALADase no sobrenadante.

Os protocolos de ensaios da actividade de NAALADase que se aproveitam as especificidades de ligação do anticorpo, podem também ser aplicados. Por exemplo, superfícies sólidas revestidas quer com 7E11-C5, ou com os anticorpos da invenção, podem ser utilizados para capturar a proteína PSMA ou PSM', para detecção utilizando o ensaio enzimático de NAALADase. Assim, isto pode ser utilizado para detectar e quantificar diferencialmente a proteína PSMA de extensão total e a PSM', num espécime, uma vez que um anticorpo específico para o domínio extracelular se liga tanto ao PSMA a ao PSM', enquanto que o 7E11-C5 apenas se ligaria ao PSMA.

Podem também ser aplicados ensaios enzimáticos de NAALADase mais convenientes, recorrendo-se das propriedades de reacção da desidrogenase do glutamato (Frieden, 1959, J. Biol. Chem., 234:2891). Neste ensaio, o produto da reacção da enzima NAALADase é o ácido glutâmico. Isto deriva da clivagem, catalisada pela enzima, do N-acetilaspartil-glutamato para originar ácido N-acetilaspártico e ácido

glutâmico. O ácido glutâmico, numa etapa que requer NAD(P)⁺, origina 2-oxoglutarato mais NAD(P)H, numa reacção catalisada pela glutamato desidrogenase. O progresso da reacção pode ser fácil e convenientemente medido pela mudança na absorvância a 340 nm devido á conversão de NAD(P)⁺ em NAD(P)H. Deste modo, podem ser alcançadas melhorias ao ensaio de actividade de NAALADase, aplicáveis a um formato de fase sólida com anticorpos de captura imobilizados. Deste modo, podem ser realizados múltiplos ensaios simultaneamente, num leitor de microplacas com base mudança na absorvância a 340 nm, antes e depois da adição de NAD⁺ or NADP⁺. Não se restringiria a ensaios em fase sólida, uma vez que com este tipo de ensaio de actividade de NAALADase, seriam também possíveis ensaios em solução de soro, por exemplo.

Podem também ser preparados kits contendo os anticorpos monoclonais da invenção ou fragmentos deles derivados, para o diagnóstico *in vitro*, para o prognóstico e/ou monitorização do carcinoma da próstata, através de métodos imunohistológicos, imunocitológicos e imuno-serológicos acima descritos. Os componentes dos kits podem ser acondicionados quer em meio aquoso, quer na forma liofilizada. Quando os anticorpos monoclonais (ou fragmentos deles derivados) são utilizados nos kits, sob a forma de conjugados nos quais é acoplada uma parte marcadora, tal como uma enzima ou ião metálico, os componentes de tais conjugados podem ser disponibilizados quer sob uma forma totalmente conjugada, ou sob a forma de

intermediários ou componentes separados a serem conjugados pelo utilizador do kit.

Um kit pode compreender um transportador a ser compartmentalizado para nele receber, em confinamento rigoroso, um ou mais meios contentores ou séries de contentores tais como tubos de ensaio, ampolas, frascos, garrafas, seringas, ou semelhantes. Um primeiro destes contentores ou série de contentores pode conter o anticorpo monoclonal (ou fragmento dele derivado) o PSMA ou PSM'. Um segundo contentor ou série de contentores pode conter um marcador ou um intermediário marcador-ligante capaz de se ligar ao anticorpo primário (ou fragmento dele derivado), PSMA ou PSM'.

5.4.3 UTILIZAÇÕES NO DIAGNÓSTICO IN VIVO, PROFILÁTICAS E TERAPÊUTICAS

Os anticorpos monoclonais desta invenção, ou os fragmentos deles derivados são particularmente úteis para apontar células de cancro da próstata *in vivo*. Podem ser utilizados para localização e monitorização de tumores, bem como para a terapia do carcinoma primário da próstata e metástases. Para estas aplicações *in vivo*, é preferível utilizar anticorpos monoclonais purificados ou fragmentos purificados dos anticorpos monoclonais que possuam pelo menos uma parte da região de ligação ao antigénio, incluindo tais como Fv, F(ab')₂, fragmentos Fab (Harlow e Coluna, 1988, Antibody Cold Spring Harbor), anticorpos de

cadeia simples (U.S. Pat. No. 4,946,778), anticorpos químéricos ou humanizados (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851; Newuberger et al., 1984 Nature 81:6851), CDR, e semelhantes. A purificação dos anticorpos ou fragmentos pode ser alcançada através de uma variedade de métodos conhecidos dos peritos incluindo, precipitação pelo sulfato de amónia ou sulfato de sódio seguida por diálise contra solução salina, cromatografia de troca iónica, cromatografia de afinidade ou imunoafinidade, bem como por filtração em gele, electroforese de zona, etc, etc. (ver Goding in, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp 104-126, Orlando, Fla, Academic Press).

Para utilização na detecção *in vivo* e/ou na monitorização do carcinoma da próstata, os anticorpos monoclonais purificados podem ser ligados covalentemente, quer directamente ou por intermédio de um ligante, a um composto que serve como grupo repórter para permitir a imagiologia de tecidos ou órgãos específicos, depois da administração e localização dos conjugados ou complexos. Uma variedade de diferentes tipos de substâncias pode servir como grupo repórter, incluindo tais como, corantes radiopacos, metais radioactivos e isótopos não-metálicos, compostos fluorogénicos, compostos fluorescentes, isótopos emissores de positrões, metais não-paramagnéticos, etc.

Para utilização na terapia *in vivo* do carcinoma da próstata, os anticorpos monoclonais purificados podem

ser utilizados isolados, ligados covalentemente, quer directamente ou por intermédio de um ligante, a um composto que mata e/ou inibe a proliferação das células ou tecidos malignos, após a administração e localização dos conjugados. Quando o anticorpo é utilizado isolado por si só, pode mediar a destruição do tumor através da fixação do complemento ou da toxicidade celular dependente do anticorpo. Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado em combinação com um fármaco quimioterapêutico para resultar num efeito terapêutico sinérgico (Baslya e Mendelsohn, 1994 Breast Cancer Res. and Treatment 29:127-138). Uma variedade de diferentes tipos de substâncias pode ser directamente conjugada ao anticorpo para utilizações terapêuticas, incluindo metais radioactivos e isótopos não metálicos, fármacos quimioterapêuticos, toxinas, etc. (Vitetta e Uhr, 1985, Annu. Rev. Immunol. 3:197).

De acordo com uma materialização alternativa, p terapia *in vivo* do carcinoma da próstata, os anticorpos monoclonais da presente invenção podem ser modificados para se apresentarem sob a forma de um anticorpo bi-funcional ou bi-específico, isto é, um anticorpo que tem uma região de ligação ao anticorpo específica para o domínio extracelular do抗igénio de membrana específico da próstata, região de ligação ao anticorpo específica para uma célula efectora que tem actividade tumoricida ou inibidora da actividade do tumor. As duas regiões bi-específicas do anticorpo estão, ou quimicamente ligadas ou podem ser expressadas por uma células modificada por engenharia genética, para produzir o

anticorpo bi-específico. (Ver genericamente, Fanger et al., 1995 Drug News & Perspec. 8(3):133-137). As células efectoras que possuem actividade tumoricida incluem, mas não estão limitadas às células-T citotóxicas (principalmente células CD8⁺), células "natural killer", etc. Uma quantidade efectiva de um antícorpo bi-específico de acordo com a invenção, é administrado a um doente com cancro da próstata e o antícorpo bi-específico mata ou inibe a proliferação das células malignas após a localização em locais de tumores primários ou metastáticos portadores do PSMA.

Os métodos para preparação dos conjugados de anticorpos, dos anticorpos da invenção (ou fragmentos deles derivados) são úteis para a detecção, monitorização e/ou terapia são estando descritos nas U.S. Pat. Nos. 4,671,958; 4,741,900 e 4,867,973.

Os anticorpos e os fragmentos de anticorpo de ligação ao抗原, podem também ser conjugados com uma proteína ou péptido heterólogos, ou por conjugação química ou tecnologia de ADN recombinante. A proteína quimérica resultante possui a especificidade de ligação ao抗原 do anticorpo e a função da proteína heteróloga. Por exemplo, um polinucleótideo codificante da região de ligação ao抗原 específica para o domínio extracelular do PSMA, pode ser geneticamente fusionado com uma sequência codificadora para a cadeia zeta do receptor da célula T. Depois de expressar esta construção em células T, as células

T são expandidas *ex vivo* e introduzidas por infusão num doente com cancro da próstata. As células T que expressam esta proteína quimérica são especificamente direcionadas para tumores que expressam o PSMA como o resultado da especificidade de ligação do anticorpo, provocam a morte da célula tumoral. Alternativamente, um anticorpo é fusionado com uma proteína que induz a migração de leucócitos ou que tem uma afinidade para atrair outros compostos ao local do tumor. Uma proteína específica deste tipo é a estreptavidina. A ligação de um anticorpo conjugado com estreptavidina, a uma célula tumoral pode ser seguida pela adição de um fármaco, toxina ou radioisótopo biotinilado, para provocar a morte específica do tumor.

Podem ser preparados kits para utilização *in vivo*, com estes métodos localização e terapia de tumores, contendo os anticorpos monoclonais (ou fragmentos deles derivados) conjugados com quaisquer uns dos tipos das substâncias acima. Os componentes dos kits podem ser acondicionados quer em meio aquoso, quer na forma liofilizada. Quando os anticorpos monoclonais (ou fragmentos deles derivados) são utilizados nos kits, sob a forma de conjugados nos quais é acoplada uma parte marcadora ou uma parte terapêutica, tal como um ião metálico radioactivo ou parte com um fármaco terapêutico, os componentes de tais conjugados podem ser disponibilizados quer sob uma forma totalmente conjugada, ou sob a forma de intermediários ou componentes separados a serem conjugados pelo utilizador do kit.

6. EXEMPLO: PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA O PEPTÍDEO PSMA

6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 PREPARAÇÃO DO PEPTÍDEO IMUNIZADOR

O péptido PSMA #716-723

(NH₂-ESKVDPSK-) (SEQ ID NO: 1) foi acoplado à hemocianina de lapa (KLH) como transportador, utilizando o método de Pierce (Rockford, Ill.). O complexo do péptido KLH foi emulsionado em adjuvante incompleto de Freund (Sigma, St. Louis, Mo.) contendo 1 mg/ml de muramil-dipeptídeo (MDP, Pierce, Rockford, Ill.) numa concentração final de 250 µg/ml. A preparação emulsionada do antigénio foi armazenada a 4°C.

6.1.2 IMMUNIZATION

Fêmeas de ratinho BALB/c foram imunizadas subcutaneamente com 0,1 ml complexo peptídeo-transportador emulsionado, a cada catorze dias durante um período de seis semanas. Os ratinhos foram sangrados e o seu soro foi testado, num radioimunoensaio específico para o péptido (RIA), quanto à presença de anticorpos anti-peptídeo. Os ratinhos que tiveram resultado positivo para anticorpos anti-peptídeo com um título de 1:1.000 ou superior, foram utilizados como dadores num protocolo de fusão. Três dias antes da fusão, os ratinhos foram imunizados

intraperitonealmente com 50 µg do complexo peptídeo-KLH dissolvido em solução salina.

6.1.3 FUSÃO CELULAR

Três dias depois do reforço final com o mesmo complexo peptídeo-KLH, o baço de um ratinho BALB/c, foi removido assepticamente e foi preparada uma suspensão de células isoladas. Os glóbulos vermelhos foram lisados por choque osmótico e os linfócitos restantes foram suspensos em meio RPMI-1640. Os linfócitos do baço foram misturados com células de mieloma P3X63Ag8U.1 (X63) (CRL 1597, da ATCC, Rockville, Md.) numa razão de 10:1 (100×10^6 linfócitos do baço: 10×10^6 células de mieloma X63). A fusão dos linfócitos do baço com as células X63 foi feita pelo método de Galfre e Milstein (1981, Methods in Enzymology, Vol. 73, Immunochemical Techniques, Part B). As células de hibridoma foram seleccionadas pela inclusão de aminopterina no meio de cultura celular (RPMI-1640-20% soro bovino fetal).

6.1.4 RASTREIO DE HIBRIDOMAS PRIMÁRIOS

Foram retirados cinquenta microlitros (μ l) do sobrenadante das culturas celulares individuais de hibridomas, e testados num RIA específico para péptidos, quanto à presença de anticorpos específicos de péptidos. Brevemente, os sobrenadantes foram adicionados a poços de uma microplaca de 96 poços Pro-Bind (Falcon), que tinha

sido previamente revestida com péptido acoplado a albumina sérica (BSA) a 50 µg/ml. Depois de uma noite em incubação a 4°C, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-0,1% BSA. A cada poço foram adicionados cinquenta microlitros de uma diluição 1:500 IgM e IgG (ICN) de coelho anti-ratinho, e as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas quatro vezes como acima, e a cada poço foram adicionados 50 µl da ¹²⁵I-Proteína. As placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e lavadas 4 vezes como acima. As placas foram expostas a película autorad (Kodak, X-OMAT) durante a noite e reveladas. Os poços positivos foram seleccionados e as células expandidas em meio de cultura para testes adicionais.

6.1.5 RASTREIO POR "WESTERN BLOT"

Os sobrenadantes dos poços positivos e expandidos foram testados num ensaio de "Western blot", para anticorpos anti-PSMA. Os lisados da linhagem celular tumoral LNCaP (CRL 1740 da ATCC, Rockville, Md.), um tumor da próstata que expressa o PSMA, foram sujeitos a uma corrida em gele de SDS-poliacrilamida durante 90 minutos a 175 volts. As proteínas submetidas a electroforese foram sujeitas a "electroblot" para uma membrana Immobilon-PTM, e a membrana foi bloqueada através de uma incubação ao longo da noite com 5% BLOTO em tampão salino Tris. A membrana foi colocada num aparelho "Bio-Rad multi-screen" (Bio-Rad) e aproximadamente 650µl do sobrenadante do hibridoma foram

pipetados para poços individuais. A membrana foi incubada durante 90 minutos à temperatura ambiente e o "blot" foi lavado 5 vezes com tampão salino Tris 0,5% Tween-20 (TBS-T). O "blot" lavado foi incubado com uma diluição de 1:5.000 de IgG anti-ratinho de cabra, marcada com peroxidase (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.) durante 1 hora à temperatura ambiente. O "blot" foi lavado 5 vezes como acima e incubado durante 1 minuto com 2 ml do substrato quimioluminescente LumiGLO™ (KPL, Gaithersburg, Md.). O "blot" foi exposto a película "autorad" e revelado. Os poços de hibridoma positivos (reactividade anti-PSMA) foram identificados e seleccionados para desenvolvimento adicional.

6.1.6 CLONAGEM POR DILUIÇÃO LIMITANTE

Os poços positivos de hibridomas primários identificados pela sua reactividade com o PSMA no ensaio de "Western blot" acima descrito, foram clonados por diluição limitante. As células foram ajustadas a 1 célula/ml em meio de cultura celular completo, contendo timócitos singénicos como células de nutrição de população. A suspensão de células foi dispensada nos poços de uma placa de 96 poços em aliquotas de 200µl. Depois de 7-10 dias de cultura, eram visíveis as colónias de células. Os poços contendo colónias isoladas foram colhidos e as células foram expandidas em placas de 24 poços (culturas de 1,5 ml). Os sobrenadantes das células clonais foram recolhidos e testados para anticorpos anti-PSMA no ensaio de "Western blot" acima

descrito. Os clones positivos foram expandidos e congelados em azoto líquido.

6.1.7 GERAÇÃO DE FLUIDO ASCÍTICO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS

Ratinhos BALB/c foram preparados com 0,4 ml de "pristine" intraperitonealmente, 7-10 dias antes da injecção de 10×10^6 células de hibridoma. O fluido ascítico contendo o anticorpo monoclonal foi drenado a intervalos periódicos e armazenado a 4°C. O anticorpo monoclonal foi purificado a partir do fluido ascítico utilizando o kit de purificação de IgM "ImunoPure™" da Pierce (Rockford, Ill.).

6.1.8 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE PSMA

Aproximadamente 10×10^6 células tumorais LNCaP foram incubadas com 1 ml tampão de lise NP-40 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris) durante 30 minutos a 4°C. O lisado foi centrifugado a 12.000 rpm e o sobrenadante resultante foi pré-clarificado por incubação com 50 µl de soro normal de rato durante 30 minutos, seguido pela adição de 60 µl de uma suspensão a 20% de esferas de agarose de IgM anti-rato. Depois de incubação durante 1 hora a 4°C, a preparação foi centrifugada para remover as esferas e o sobrenadante resultante foi levado a reagir com o anticorpo monoclonal 3F5.4G6. Foram adicionadas quantidades variáveis do anticorpo monoclonal 3F5.4G6 (2,5, 5, e 10 µg), a três replicados dos lisados e incubados durante 1 hora a 4°C.

Foram adicionados cem microlitros de uma suspensão a 10% de esferas de agarose de IgM anti-ratinho (Sigma) e os lisados foram incubados durante mais uma hora 4°C. Os lisados foram centrifugados a 12.000 rpm e as esferas de agarose foram lavadas três vezes com o tampão de lise NP-40. Às esferas, foram adicionados trinta microlitros de tampão de electroforese de amostras, e foram aquecidas durante dez minutos a 95°C. As esferas foram centrifugadas brevemente a 12.000 rpm e o tampão das amostras foi colocado num gelo SDS-poliacrilamida. Depois da electroforese, as amostras foram submetidas a "electroblot" como acima descrito, e foi feito um "western blot" utilizando o anticorpo monoclonal 7E11-C5, específico para o PSMA como anticorpo repórter.

6.1.9 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram primeiro lavadas com tampão fosfato salino (PBS). Foi adicionada uma solução (2ml para um frasco de 75 cm²) de Versene (0,2 g EDTA.4Na/L). A maior parte da solução de Versene foi removida por aspiração, antes da incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos. Foi adicionado PBS e as células foram retiradas por pipetagem. As células foram lavadas duas vezes com PBS, e contadas. Foram incubadas em gelo, quinhentas mil a um milhão de células, com 50 µl de anticorpo primário durante 30 minutos, seguido por duas lavagens com PBS. As células foram subsequentemente incubadas em gelo com 50 µl do anticorpo secundário marcado com FITC (IgG de cabra anti-ratinho para o 7E11-C5 ou IgM de cabra anti-ratinho para o

4G6) durante 30 minutos. O anticorpo secundário em excesso foi retirado das células com PBS. Foi analisada a fluorescência com um citómetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, Calif.). Os detritos celulares foram excluídos da população de células analisadas com base nos perfis de dispersão frontal e lateral.

6.1.10 ENSAIOS DO SORO POR "WESTERN BLOT"

As amostras de soro foram diluídas 1:7 em tampão de lise (1% Triton X-100, 50 mM HEPES, 10% glicerol, 15 mM MgCl₂, 1 mM AEBSF, 1 mM EGTA). O lisado de LNCaP foi diluído a 1:35 em tampão de lise. As amostras diluídas foram então combinadas numa razão de 2:3 com tampão de amostra (tampão redutor SDS). As amostras (20 µl) foram corridas em SDS-PAGE 8,5% (concentração final de proteína de 93 mg por amostra, conforme determinado utilizando o "Protein Assay" Bio-Rad), e as proteínas separadas foram transferidas para membrana de PVDF durante uma hora a 90 volts. As membranas foram então bloqueadas durante a noite com 5% leite-TBS. No dia seguinte, as membranas foram sondadas com 3 µg/ml de anticorpo 7E11-C5 em TBS-T durante uma hora, lavadas 5 vezes durante cinco minutos em TBS-T, e sondadas com 167 ng/ml de um anticorpo secundário de ovelha anti-ratinho marcado com peroxidase de rábano em TBS-T durante 30 minutos. Novamente, as membranas foram lavadas cinco vezes cada em TBS-T, e as membranas reveladas utilizando "Chemiluminescent Substrate Kit" (Kirkegaard &

Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.) (Rochon et al., 1994, The Prostate 25:219-223).

Os "blots" foram visualizados por exposição com uma película de raios-X, revelando uma banda de proteína com aproximadamente 120 kD. A imagem do "blot" foi digitalizada com um scanner "Microtek ScanMaker IIHR", e as intensidades de banda medidas por análise "análise realizada num computador Macintosh Quadra 605, o programa de imagem de domínio público do NIH (escrito por Wayne Rasband no "U.S. National Institutes of Health" e disponível a partir da Internet no ftp anónimo em zippy.nimh.nih.gov ou num "floppy disk" do NTIS, S285 Port Royal Rd., Springfield, Va. 22161, part number PB93-504868)". Todas as amostras dos doentes foram avaliadas contra uma amostra de um dador saudável normal, e uma amostra de doente com cancro da próstata com elevado PSMA, a partir do mesmo "Western blot" como controlos padrão.

6.1.11 DETECÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DO PSM'

Foram colhidos cem ml de sémen humano a partir de dadores pagos, segundo as orientações da OMS para ensaios de fertilidade. O material celular foi sedimentado por centrifugação a 10.000 rpm durante 30 minutos, e o sobrenadante cuidadosamente retirado e dialisado durante a noite contra duas mudanças de tampão Tris 20 mM Tris, pH 7,6. O dialisado foi centrifugado novamente a 10.000 rpm e carregado numa coluna de "DEAE sephacryl" que foi

previamente lavada com tampão Tris 20 mM, pH 7,6. A coluna carregada foi então novamente lavada com 500 ml do mesmo tampão e as proteínas separadas pela aplicação de um gradiente de tampão Tris 20 mM a 200 mM de tampão Tris pH 7,6. Foram colhidas fracções de 5 ml. A presença de PSMA em cada fracção foi determinada por "Western dot blot" utilizando o anticorpo monoclonal 7E11-C5. As fracções contendo a proteína reactiva com 7E11-C5, foram agrupadas e precipitadas utilizando sulfato de amónio a 70%. As proteínas precipitadas foram sedimentadas por centrifugação a 10.000 rpm durante 30 minutos, e então ressuspendidas em um litro de tampão Tris 200 mM pH 7,6. As proteínas solubilizadas foram então dialisadas durante a noite contra duas mudanças de tampão Tris 20 mM, pH 7,6. O material dialisado foi então carregado numa coluna pré-lavada "Sephacryl", e as proteínas eluídas, tendo sido colhidas fracções de três ml. Foi realizado um "Western dot blot" na proteína eluída utilizando o anticorpo monoclonal 3F5.4G6. As fracções 88-96 foram positivas e cada uma destas fracções foi testada, quanto à pureza, por electroforese em gele de SDS poliacrilamida.

6.2. RESULTADOS

De modo a gerar anticorpos monoclonais contra o domínio extracelular do PSMA, foram analisadas várias regiões da proteína, no que diz respeito à sua hidrofilicidade relativa com base no método de Hopp e Woods (1983, Mol. Immunol. 20:483-489).

A Tabela 1, abaixo, ilustra a hidrofilicidade relativa de vários péptidos analisados. Em particular, foi sintetizado um péptido possuindo a sequência ESKVDPSK (Glu-Ser-Lys-Val-Asp-Pro-Ser-Lys) (SEQ ID NO: 1), correspondente aos resíduos de aminoácidos 716-723 da SEQ ID NO:2 na região C-terminal do PSMA. Adicionalmente, para produzir anticorpos contra o domínio extracelular, puderam ser utilizadas outras porções do domínio extracelular, como mostrado na Tabela 1 ou o próprio domínio extracelular inteiro. Em contraste, dois péptidos de aminoácidos correspondentes aos resíduos #44-58 e resíduo #196-213 da SEQ ID NO:2 induziram respostas de antícorpo anti-peptídeo, que não ligaram ao PSMA nativo.

TABELA 1

Hidrofilicidade relativa dos péptidos do PSMA	
PEPTÍDEO (aminoácido #)	HIDROFILICIDADE RELATIVA
63-69	1,41
183-191	1,24
404-414	1,45
479-486	1,5
716-723	1,39

Antes da imunização, o peptídeo ESKVDPSK (SEQ ID: NO 1) foi primeiro conjugado com KLH como transportador. Os ratinhos foram então imunizados e reforçados com o mesmo material conjugado em intervalos semanais. Os baços dos animais com um título sérico detectável de anti-peptídeo, foram isolados e fusionados com células de mieloma.

Os rastreios iniciais foram realizados atarvés de ensaios de ligação utilizando o peptídeo ligado a BSA como antigénio. Das culturas individuais de hibridomas foram removidos cinquenta μ l do sobrenadanet da cultura celeular e testados, num rádioimunoensaios específico par ao péptido, quanto à presença de anticorpos específicos para o peptídeo. Brevemente, os sobrenadantes foram adicionados a poços de uma microplaca de 96 poços Pro-Bind, que tinham sido previamente revestidos com um peptid conjugado com albumina sérica bovina (BSA). Depois de uma noite em incubação a 4°C, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS. A cada poço foram adicionados cinquenta microlitros de uma diluição 1:500 IgM e IgG (ICN) de coelho anti-ratinho, e as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas quatro vezes como acima, e a cada poço foram adicionados 50 μ l da 125 I-Proteína. As placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e lavadas 4 vezes como acima. As placas foram expostas a película autorad durante a noite e reveladas. Os poços positivos foram seleccionados e as células expandidas em meio de cultura para testes adicionais. De entre os poços positivos identificados, um hibridoma designado 3F5 foi testada adicionalmente testado num ensaio de "western blot", tendo sido mostrado que o anticorpo que secretava reagia com o PSMA contido nos lisados LNCaP lysates. As células LNCaP foram cultivadas como descrito por Horoszewicz et al. (1983, Cancer Res. 43:1809-1818), e os lisados preparados conforme descrito por Rochon et al. (1994, Prostate 25: 219-223). As céluals do hibridoma 3F5

foram clonadas atarvés de diluição limitante, expandidas em quantidade e re-analisadas num ensaio de "Western blot". Um subclone do anticorpo referido como 3F5.4G6 reagiu com uma a proteína de 120 kDa de peso molecular, nos lisados LNCaP (FIGURA 2). Este anticorpo foi isotipado como uma IgM. Para isotipar os anticorpos monoclonais de ratinho 3F5.4G6, foi usado um "ISOStrip" obtido da Boehringer Mannheim. O anticorpo monoclonal foi diluído 1:100 em PBS e amostra diluída (150 µl) adicionada a um tubo de revelação fornecido como kit e incubado durante 30 segundos à temperatura ambiente e então agitado vigorosamente. A tira de isotipagem foi então inserida no tubo e revelada durante 5 minutos. Surgiu uma banda azul, quer nas secções lambda ou kappa da tira, bem como em qualquer uma das secções de classes ou sub-classes. O anticorpo monoclonal 3F5.4G6 foi identificado como um isotipo IgM.

O anticorpo monoclonal 3F5.4G6 foi adicionalmente testado contra soro recolhido de doentes com cancro da próstata em estadio D2 em progressão, utilizando o anticorpo monoclonal 7E11-C5 como um controlo (FIGURA 3). Ambos os anticorpos identificaram uma banda com cerca de 120 kDa de peso molecular (FIGURA 3). Foi realizado um ensaio adicional de "Western blot" de células LNCaP utilizando o anticorpo monoclonal 3F5.4G6, com um anticorpo secundário específico para IgM (FIGURA 4). Enquanto o anticorpo monoclonal 7E11-C5 reconheceu uma única banda de cerca 120 kDa, isto é, o PSMA, o 3F5.4G6 reconheceu uma

banda de peso molecular semelhante, bem como uma banda com cerca de 105-110 kDa. Esta banda corresponde à forma proteica prevista do PSM', e demonstra a utilidade de um anticorpo que reconhece especificamente o domínio extracelular do PSMA e do PSM'.

A reactividade do 7E11-C5 com uma proteína de 120 kDa, no soro de doenças com cancro da próstata foi específica do anticorpo, e não devida à reactividade não-específica do anticorpo secundário com as proteínas do soro em geral. Num ensaio de "Western blot", o papel Immobilon P contendo as proteínas separadas derivadas das amostras de soro foram reagidas postas quer com o anticorpo monoclonal 7E11-C5 mais o anticorpo secundário acoplado com a HRP, ou com o anticorpo secundário acoplado apenas com a HRP. A película foi exposta durante 1 min. ou sobreposta durante 45 min., de modo a demonstrar a não-reactividade do anticorpo secundário com qualquer outra proteína de 120 kDa no soro. Para detectar o mesmo抗ígeno foi também utilizado, com o 3F5.4G6, o mesmo anticorpo secundário. Portanto o anticorpo monoclonal 3F5.4G6 era específico para o PSMA e PSM'.

A FIGURA 5 confirma que a proteína identificada pelo 7E11-C5 foi também reconhecida pelo anticorpo monoclonal 3F5.4G6. Além disso, o anticorpo monoclonal 3F5.4G6 reconheceu também uma proteína de 105-110 kDa, não detectada pelo anticorpo monoclonal 7E11-C5. Esta proteína de migração rápida corresponde ao PSM'. Quando o lisado

foi primeiro precipitado com o 7E11-C5, e as restantes proteínas sondadas com o 7E11-C5, o anticorpo não detectou nenhuma proteína (Coluna 4). Em contraste, quando o lisado pré-tratado com 7E11-C5, foi sondado com o 3F5.4G6, detectou uma proteína com cerca 110 kDa. A FIGURA 6 mostra que a proteína de 120 kDa, isto é, o PSMA, imunoprecipitado pelo 3F5.4G6, foi também reconhecida pelo 7E11-C5.

As FIGURAS 7A e B demonstram que o anticorpo monoclonal 3F5.4G6 reconheceu células vivas LNCaP, através de análise de FACS, confirmando que o 3F5.4G6 reconheceu o domínio extracelular do PSMA. Um anticorpo que reconheça o domínio extracelular do PSMA é particularmente útil como ferramenta de diagnóstico e/ou terapêutica no cancro da próstata.

Foi feito reagir fluido seminal humano com um anticorpo PSMA-específico e analisado quanto à actividade enzimática. A FIGURA 8 ilustra que proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal 3F5.4G6, na Coluna 2 tem um peso molecular aproximado de 90 kDa. Enquanto que para o PSM' se demonstrou que tinha um peso molecular de 105-110 kDa, em lisados de LNCaP lysates, a proteína de 90 kDa, no fluido seminal era provavelmente um produto parcialmente glicosilado ou parcialmente glicosilado do PSM'. Uma vez que o PSM' contém vários locais de glicosilação, este peso molecular inferior foi o resultado de actividades de glicosidase no fluido seminal. O facto de o PSMA não estar presente nesta preparação purificada, é ilustrado pelo

facto de o 3F5.4G6 ter reconhecido a proteína com peso molecular de 120 kDa (Coluna 1) presente num lisado de células LNCaP, que é o PSMA, mas que não reconheceu uma proteína deste peso molecular na Coluna 2. Além disso, o anticorpo 7E11-C5 não reconheceu a banda de 90 KDa nos fluidos seminais.

Esta preparação purificada de PSM' reconhecida pelo anticorpo monoclonal 3F5.4G6, foi então ensaiada quanto á actividade de NAALADase. Como controlo positivo foi utizado um sobrenadante de alta velocidade, preperado a partir de um lisado LNCaP. A proteína que reagiu positivamente com o anticorpo monoclonal 3F5.4G6 e em consistência com o fato de esta é o PSM', continha uma actividade inerente de NAALADase 16,9 nmol/min./mg de proteína, utilizando o ensaio descrito em Robinson et al. (1987, J. Biol. Chem. 262:14498-14506).

7. EXEMPLO: PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONais CONTRA UMA PREPARAÇÃO DE MEMBRNA CELULAR TUMORAL CONTENDO O PSMA

7.1. MATERIAIS AND MÉTODOS

7.1.1 IMUNIZAÇÃO

As células de carcinoma prostático LNCaP foram obtidas a partir da American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. As membrans de LNCaP foram preparadas a partir de duas placas de 150 mm, pela remoção

das células numa solução de Versene, seguido de centrifugação para sedimentar as células. Foi adicionada água destilada ao sedimentado celular e as células foram homogeneizadas utilizando um homogenizador "Dounce". A suspensão homogeneizada foi centrifugada a 30.000xg, e a a fracção de membranas sedimentadas, utilizadas para imunização.

Foram imunizadas intraperitonealmente fêmeas adultas de ratinhos BALB/c, quatro vezes (intervalos de 2-3 semanas) com a preparação de membranas de LNCaP emulsionada em adjuvante Freund completo. Cinco dias antes da fusão celular, os ratinhos foram reforçados com 50 µg de PSMA em PBS, purificado por imunoafinidade. A fusão celular foi realizada conforme descrito na Secção 6.1.3, supra.

7.1.2 RASTREIO DE HIBRIDOMAS PRIMÁRIOS

Um ensaio com base (ELISA) num ensaio imunoadsorvente acoplado a enzima, em fase sólida, foi empregue para detecção de anticorpos específicos para o PSMA. O PSMA purificado por imunoafinidade, o PSMA de extensão total expressado em Baculovirus, ou proteínas de fusão expressadas bacterianamente, contendo fragmentos do PSMA, foram revestidos em placas de 96 poços Maxi-Sorp (Nunc Immuno, Rochester, N.Y.) com uma incubação durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-0,2% Tween-20, e os restantes locais foram bloqueados com uma solução a 5% de BSA, durante uma hora à temperatura ambiente. Cinquenta

microlitros (μ l) do sobrenadante de culturas de hibridomas, foram adicionados a placas com poços revestidos com PSMA, as placas foram incubadas durante duas horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas como acima, e 50 μ l de uma diluição 1:600 de IgG anti-ratinho de coelho e IgM anti-ratinho de coelho (ICN, Costa Mesa, Calif.), foram adicionados a cada poço. Depois de uma hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas como acima e 50 μ l de uma diluição 1:400 de HRP conjugada com Proteína-A (Sigma, St. Louis, Mo.), foram adicionados a cada poço. Depois de uma hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas como acima, e a cada poço foram adicionados 100 μ l de solução cromogéneo/substrato ABTS (150 mg 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico em 500 ml de ácido cítrico 0,1 M, pH 4,35)/H₂O₂ (10 μ l 30%- H₂O₂ por 10 ml de solução ABTS). As placas foram lidas num leitor de microplacas, e a OD405 foi medida. As células de hibridomas produtoras dos sobrenadantes com valores de OD de 0,05 acima do ruído de fundo, foram clonadas por diluição limitante e submetidas a análises adicionais.

Para a captura do PSMA em fase sólida, a ensaio acima mencionado, foi modificado do seguinte modo: Cinquenta microlitros de uma solução a 40 μ g/ml do anticorpo monoclonal anti-PSMA 7E11-C5, em tampão de ligação 0,1 M NaHCO₂, pH 8,2, foram adicionados a poços de uma placa Maxi-Sorp e deixados aderir durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas e bloqueadas como acima.

Cinquenta microlitros do PSMA purificado por imunoafinidade, diluídos em série, foram adicionados a placas revestidas com 7E11-C5, e as placas foram incubadas durante duas horas à temperatura ambiente. Depois de lavagem exaustiva, 50 µl do sobrenadante não-diluído do sobrenadante da cultura de hibridomas clone 3D7-1.1 ou 4E10-1.14, foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas durante 90 minutos à temperatura ambiente. Depois de lavagem como acima, os poços foram sondados com 50 µl de uma diluição a 1:1.000 de IgM anti-ratinho de cabra conjugada com peroxidase, e incubados durante uma hora à temperatura ambiente. Depois de lavagem exaustiva, 100 µl de ABTS/H₂O₂, foram adicionados a cada poço e as placas foram lidas num leitor de microplacas, como descrito acima.

7.1.3 PURIFICAÇÃO DO PSMA POR IMUNOAFINIDADE

Dezasseis mililitros de células LNCaP compactadas foram homogeneizados em 5 volumes de 25 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (Sigma, St. Louis, Mo.) por dois golpes de um homogeneizador Potter-Elvehjem, seguido por mistura durante a noite a 4°C. O extracto foi centrifugado a 100.000xg durante 1 hora, e o sedimentado re-extraiido como anteriormente. Os sobrenadantes combinados foram misturados, no frio durante a noite com "7E1 I-C5-Immunobeads" (Pierce, Rockford, Ill.) (volume do leito de resina 3-5 ml). As esferas foram centrifugadas, lavadas exaustivamente com tampão de homogeneização e deitadas numa coluna. As esferas foram lavadas novamente com tampão de

homogeneização adicional contendo 1% NP-40, seguido por uma lavagem adicional com tampão contendo 1% Triton X-100R (Aldrich, Milwaukee, Wis.). As esferas lavadas foram eluídas com tampão glicina 1,00 mM, pH 2,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100R, em fracções de 2 ml. A eluição de proteína foi monitorizada a OD280.

As fracções contendo proteína foram analisadas por geles de SDS-PAGE, utilizando revelação por prata e "Western blotting". Em preparações típicas, a banda proteíca de 120 kDa correspondente à reactividade com 7E11-C5 num "Western blot", era 60-80% pura. Um rendimento aproximado, a partir de 16 ml de células compactadas, foi de 1 miligrama de proteína PSMA. O detergente da preparação PSMA foi removido atarvés de passagem da solução numa coluna de "Extractigel" (Pierce). A proteína foi liofilizada e dialisada exaustivamente com PBS, antes de ser utilizada em imunização ou rastreio de hibridomas.

7.1.4 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A capacidade dos anticorpos monoclonais reconhecerem epítopos do PSMA externos ou extracelulares foi avaliada por citometria de fluxo. As células LNCaP (expressoras do PSMA) e as células PC-3 (não-expressororas do PSMA) foram colhidas frescas a partir de frascos de cultura de tecidos, sendo preparada uma suspensão de células isoladas. Foram ressuspensos, aproximadamente um milhão de células em 1 ml de sobrenadante não-diluído de cultura

de tecidos clones de hibridoma, 3D7-1.1 ou 4E10-1.14, e incubados no gelo durante duas horas. As células foram lavadas duas vezes com PBS-0,1% BSA, 0,01% azeto de sódio, ressuspensionadas em 100 µl de uma diluição a 1:100 de IgM anti-ratinho de coelho conjugada com FITC (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, Pa.), e incubadas em gelo durante mais 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes como acima, ressuspensionadas em 500 µl de tampão de lavagem e analisadas quanto à marcação de fluorescência pelo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, Calif.) com software de aquisição "CellQuest".

7.1.5 ANÁLISE POR "WESTERN BLOT"

Os sobrenadantes de cultura de tecidos dos clones de hibridomas 3D7-1.1 e 4E10-1.14, foram testados num ensaio de "Western blot" quanto à reactividade com o PSMA. A análise de "Western blot" foi realizada seguindo o protocolo de Pelletier e Boynton (1994, J. Cell. Physiol. 158:427-434). Brevemente, os lisados das células LNCaP e PC-3, PSMA purificado por imunoafinidade, ou PSMA de extensão total expresso em Baculovirus foram submetidos a electroforese em gele de 8,5% SDS-PAGE, e as proteínas separadas foram "electroblotted" para membrana de PVDF durante uma hora a 90 volts. As membranas foram bloqueadas durante a noite em 5% BLOTTTO e incubadas durante 90 minutos com 20 ml de sobrenadante não-diluido da cultura de tecidos do clone apropriado. O sobrenadante foi removido, os "blots" foram lavados cinco vezes com TBS-0,5% Tween-20

(TBS-T), e sondados com uma diluição a 1:5,000 de anticorpo secundário IgM anti-ratinho de cabra conjugado com peroxidase (Jackson), durante uma hora à temperatura ambiente. A membrana foi lavada cinco vezes with TBS-T, revelada com o kit de substrato quimioluminescente (KPL, Gaithersburg, Md.), e visualizado por exposição a película de raio-X (Kodak).

7.1.6 PREPARAÇÃO DO PSMA RECOMBINANTE ATRAVÉS DO SISTEMA DE EXPRESSÃO EM BACULOVIRUS

Uma inserção contendo a totalidade da sequência codificante do PSMA (Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53:227 230) foi clonada a partir de uma biblioteca humana Lambda pDR2 (Clontech, Palo Alto, Calif.) utilizando sondas específicas para a sequência do gene. A inserção foi excisada deste vector através de digestão com SmaI e SspI e clonada no vector de transferência pAcHLT-C (Pharmingen, San Diego, Calif.) de acordo com as instruções do fabricante. A co-transfecção do vector de transferencia com o AND viral linearizado BacPAK6 (Clontech), originou um vírus codificando a proteína PSMA na extensão total contendo uma cauda de poli-histidina e o N-terminal da proteína a ser utilizada no isolamento da proteína através da ligação a uma coluna Ni-NTA-column. A proteína PSMA foi produzida através do isolamento de partículas recombinantes de baculovirus purificadas em placa, amplificando e infectando células Sf9, numa multiplicidade de infecção de cerca de 1:2, na presença de meio SFM II (Gibco-BRI,

Gaithersburg, Md.) suplementado com 5% FES (Hyclone, Logan, Utah). Depois de uma incubação de 48 horas, as células infectadas foram colhidas e lisadas em 1% CHAPS, recuperadas por Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Chatsworth, Calif.), com eluição por imidazole, segundo as instruções do fabricante. O produto final foi dializado exaustivamente contra PBS.

7.2. RESULTADOS

Foram gerados anticorpos monoclonais contra membranas de carcinoma protático contendo PSMA. Dois clones de hibridoma, 3D7-1.1 e 4E10-1.14, foram seleccionados através de um imunoensaio de fase sólida, utilizando PSMA nativo purificado por imunoafinidade, a partir de células LNCaP e de fragmentos de PMSA expressados em bactérias, correspondentes às regiões dos aminoácidos 1-173, 134-437, e 438-750. Os sobrenadantes dos clones de hibridoma 3D7-1.1 e 4E10-1.14, demonstraram ligação comparável ao PSMA nativo, quando comparado com o anticorpo 7E11-C5 (FIGURA 9). A ligação de fundo à BSA, não-específica foi essencialmente comparável para as três preparações de anticorpos.

Quando foi testada a especificidade de ligação ao epítopo, o anticorpo monoclonal 7E11-C5 ligou-se ao fragmento dos aminoácidos 1-173, que contém o domínio intracelular, N-terminal, do PSMA. Apesar de o 3D7-1.1 4E10-1.14 apresentarem uma ligação modesta a este

fragmento, estes dois anticorpos monoclonais demonstraram a ligação mais forte ao fragmento dos aminoácidos 134-437 do PSMA, que faz parte do domínio extracelular do PSMA (FIGURA 9). Uma vez que este fragmento é parte do PSM', estes anticorpos reagem também com o PSM'.

O Sobrenadante do clone de hibridoma 3D7-1.1 foi adicionalmente testado num ensaio de "Western blot" contra os lisados das células LNCaP e PC-3, e PSMA purificado por imunoafinidade. A FIGURA 10 mostra que o 3D7-1.1 reage com uma banda de 120 kDa presente nas células LNCaP cells (Coluna 1) mas não nas células PC-3 (Coluna 2). Ambas as Colunas 1 e 2 apresentam reactividade que foi, mais provavelmente devida, a uma ligação não-específica do reagente do anticorpo secundário. A Coluna 3, contendo o PSMA purificado por imunoafinidade, mostra uma banda principal de 120 kDa, quando sondada com o anticorpo monoclonal 3D7-1.1. Foram também obtidos dados semelhantes de "Western blot" com o sobrenadante do clone 4E10-1.14, apesar de o fundo não-específico do "blot" ser muito maior do que com o 3D7-1.1. Assim, tanto o 3D7-1.1 como o 4E10-1.14 reagem com a banda de 120 kDa presente nas células LNCaP e com o PSMA purificado por imunoafinidade.

O PSMA de extensão total expressado em Baculovirus foi submetido a electroforese num gele de SDS-PAGE e "electroblotted" numa membran de PVDF. O "blot" foi inserido num "Mini-Protean II Multi-Screen" (Bio-Rad), sondado com uma variedade de preparações de anticorpos e

revelado por "western blot". A FIGURA 11 mostra que os anticorpos monoclonais 3D7-1.1 e 4E10-1.14 reagiram com uma banda proteica que correspondia à mesma banda ligada pelo anticorpo monoclonal 7E11-C5.

As células LNCaP e PC-3 foram marcadas com sobrenadantes de clones dos hibridomas 3D7-1.1 e 4E10-1.14 e analisados por citometria de fluxo. Ambos os anticorpos marcaram células LNCaP não fixadas, vivas, mas não marcaram células PC-3 (FIGURA 12A-D). Estes resultados confirmam que estes dois anticorpos reagem com epítopos no domínio extracelular da molécula de PSMA. Para além disso, o desvio distinto na marcação com LNCaP que é observado com o anticorpo monoclonal 4E10-1.14, comparado com o patamar observado com o 3D7-1.1, sugere que estes dois anticorpos reconhecem epítopos diferentes nesta região particular da molécula de PSMA.

Foi desenvolvido um ELISA de captura de dois locais, para o PSMA, utilizando o anticorpo monoclonal 7E11-C5 como reagente de captura de PSMA, e os anticorpos monoclonais 3D7-1.1 e 4E10-1.14 como anticorpos repórter ou de detecção. Uma vez que estes anticorpos reconhecem diferentes epítopos na molécula de PSMA (7E11-C5 reactivo como os 6 aminoácidos do terminal N; 3D7-1.1 e 4E10-1.14 reactivo com a sequência na região dos aminoácidos 134-475), emparelham efectivamente no ensaio de captura de dois locais. Utilizando PSMA purificado por imunoafinidade diluído em série como antigénio de teste, os sobrenadantes

do 3D7-1.1 e do 4E10-1.14 foram capazes de detectar o PSMA, após a captura em placas de 96 poços revestidas com 7E11-C5 (FIGURA 13). Adicionalmente, o PSMA purificado partir de células LNCaPs e o fluido seminal, foram testados bem como uma preparação em bruto do PSMA de extensão total expressado em baculovirus (FIGURA 14). Foram observadas leituras significativas a OD₄₀₅, para o antígeno PSMA controlo, para o fluido seminal, e para a preparação de PSMA em baculovirus. Quando o PSMA purificado foi diluído em soro humano normal de fêmea, e as amostras analisadas utilizando um ensaio de captura de dois locais, os mesmos anticorpos detectaram também o PSMA (FIGURA 15). Portanto, o ensaio de captura de dois locais desenvolvido com anticorpos monoclonais direcionados para diferentes partes do PSMA, detectaram o PSMA numa variedade de origens, num modo específico para o antígeno.

Um ELISA alternativo de captura de dois locais para o PSMA, foi desenvolvido utilizando o anticorpo monoclonal 3D7-1.1 como reagente de captura do PSMA e o anticorpo monoclonal 7E11-C5 como anticorpo repórter ou de detecção. O PSMA purificado por imunoafinidade e diluído em série, foi utilizado como antígeno de teste, capturado em placas revestidas com 3D7-1.1 e detectado utilizando o anticorpo monoclonal 7E11-C5 biotinilado. Os resultados são apresentados na FIGURA 16. A FIGURA 16 demonstra que os anticorpos monoclonais, tais como o 3D7-1.1 ou 4E10-1.14, que ligam especificamente ao domínio extracelular do PSMA, são úteis num ELISA de captura de dois locais, para o PSMA.

[0095] A utilidade do 3D7-1.1 para a captura do PSMA indica que um outro imunoensaio alternativo, que se baseie exclusivamente no domínio extracelular da proteína PSMA irá ser útil. Tal ensaios, que utilize dois anticorpos específicos para o domínio extracelular, para captura e detecção, iria também ser capaz de detectar o PSM', por causa da localização deste epítopo na proteína. Assim, qualquer ensaio que utilize o 7E11-C5 para a captura e detecção iria excluir especificamente o PSM'. Um exemplo de um ensaio específico para o PSM', iria incluir a captura do PSMA e PSM', por um anticorpo tal como o 3D7-1.1, ou qualquer um dos anticorpos monoclonais específicos para o domínio extracelular do PSMA, em testes em paralelo. A detecção subsequente utilizando o 4E10-1.14 para o PSMA e PSM' totais, e o 7E11-C5 para apenas iria permitir obter a quantidade de PSM', por intermédio de uma simples subtração. A partir destes dados, é derivada uma razão de PSM' para PSMA, que terá relevância no diagnóstico, na perspectiva da referência por Su et al., Cancer Res., 55:1441-1443 (1995).

Su mostra que o transcripto que codifica o PSMA, é detectado preferencialmente em doentes com cancro da próstata (comparado com homens normais), apesar de Su não apresentar nenhuma demonstração que o transcripto do PSMA ser de facto, nestes doentes, traduzido em proteína. Adicionalmente, Su mostra que o transcripto do que codifica o PSM' é detectado preferencialmente em homens normais (comparado com doentes de cancro da próstata), apesar de Su

nunca ter detectado qualquer proteína PSM'. Os presentes inventores, neste pedido, demonstram que a proteína PSMA se encontra aumentada em tecidos e/ou fluidos corporais de doentes com cancro da próstata (comparado com homens normais), e que a proteína PSM' se encontra aumentada em tecidos e/ou fluidos corporais de homens normais (comparado com doentes de cancro da próstata). Assim, de acordo com a presente invenção, a razão de PSM' para PSMA, irá ter utilidade em diagnóstico ou prognóstico, para a avaliação clínica de doentes com cancro da próstata.

Um fragmento de PSMA correspondente aos aminoácidos 34 a 750 do PSMA com extensão total, foi expressado num sistema de expressão de baculovírus como uma inserção de 1,9 kb. O fragmento de PSMA expressado em baculovírus é muito semelhante ao PSM' (que corresponde aos resíduos 58-750 do PSMA com extensão total), excepto no facto de os 76 aminoácidos adicionais do domínio extracelular do PSMA não estarem presentes na zona N-terminal do fragmento. A análise de "Western blot" de vários fragmentos de PSMA semi-purificados e de lisados celulares de LNCaP foi revelada com o anticorpo monoclonal 4E10-1.14 como sonda. Os resultados são apresentados na FIGURA 17.

A análise de "Western blot" de lisados em bruto de células SF9 infectadas com um baculovírus contendo uma inserção irrelevante ou a inserção de 1.9 kb codificante fragmento de PSMA, isto é, os aminoácidos 134-750 PSMA com extensão total, foi revelada com o anticorpo monoclonal

7E11-C5 como sonda. Os resultados são apresentados na FIGURA 18.

A FIGURA 17 indica que os anticorpos tal como o 4E10-1.14, que são específicos para o domínio extracelular do PSMA são capazes de se ligarem a um produto proteico muito semelhante à PSM' expressado em baculovirus. Em contraste, a FIGURA 18 indica que esta não é uma propriedade antícorpo monoclonal 7E11-C5 devida à especificidade para o epítopo (ver a reactividade negativa do 7E11-C5 com o fragmento de PSMA em baculovirus na FIGURA 18). O fragmento da proteína PSM expressado em baculovirus é idêntico ao PSM' (que corresponde aos resíduos 58-750 do PSM de extensão total), excepto no facto de lhe faltarem os 76 aminoácidos adicionais do domínio N-terminal, os quais se encontram todos no domínio extracelular. Uma vez que a especificidade para o epítopo, quer do 3D7-1.1 como do 4E10-1.14, é mapeada numa região do domínio extracelular contida tanto no PSM' como nos aminoácidos 134-750 do fragmento do PSMA (ver FIGURA 9), ambos os anticorpos iriam apresentar a propriedade inerente de se ligarem ao PSM' nativo, uma propriedade não-partilhada pelo 7E11-C5.

O antícorpo monoclonal 3D7-1.1 foi utilizado como sonda num "Western blot" com PSMA derivado de células LNCaP, bem como com soro humano e fluido seminal, que é também sabido que contêm PSMA. Os resultados estão apresentados na FIGURA 19.

Uma banda correspondente ao PSMA e que migra até cerca de 120 Kd, está presente em todas as fracções. Além disso, uma segunda banda de migração mais rápida de peso molecular entre 90 a 100 Kd, foi também observada no soro e no fluido seminal, conforme revelado pelo anticorpo 3D7-1.1. Esta banda de migração mais rápida não é observada em "Western blots" de soro, utilizando o anticorpo 7E11-C5 (ver Holmes et al., 1996, The Prostate, Supple. 7:25-29). Esta banda proteíca de migração mais rápida, reactiva com o 3D7-1.1 é muito provavelmente o PSM', presente nos fluidos biológicos.

8. EXEMPLO: PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONIAIS DO ISOTIPO IgG CONTRA O PSMA

8.1. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1.1 IMUNIZAÇÃO

Ratinhos BALB/c A/J foram imunizados intraperitonealmente com membrana LNCaP e em adjuvante completo de Freund, seguida por uma imunização subsequente (em intervalos de 2-3 semanas) com membranas celulares em adjuvante incompleto de Freund, e três reforços de 50 µg de PSMA em PBS, purificado por imunoafinidade. O PSMA foi purificado de acordo com o método descrito na Secção 7.1.3, supra. Cinco dias depois do último reforço, foi feita a fusão celular.

8.1.2 IMUNOCITOQUÍMICA

As células LNCaP foram crescidas em lâminas de vidro para imunocitoquímica, que com células viáveis quer com células fixadas. As células foram fixadas com 4% paraformaldeído-PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas com 1% BSA-PBS, arrefecidas bruscamente durante 10 minutos em 50 mM NH₄Cl em PBS, e lavadas em BSA-PBS. As células fixadas foram permeabilizadas com 0,075% Triton X-100 em 1% BSA-PBS durante 2 minutos à temperatura ambiente.

O anticorpo primário bem como o sobrenadante da cultura (+0,075% Triton X-100 para células fixadas) foram adicionados durante 60 minutos a 4°C, para células viáveis ou à temperatura ambiente para células fixadas. Após tratamento com o anticorpo primário, as células viáveis foram fixadas em metanol frio durante 20 minutos. O anticorpo secundário anti-ratinho de cabra, conjugado com FITC (diluído a 1:100 em 1% BSA-PBS + 0,075% Triton X-100 para células fixadas) foi incubado durante 60 minutos e lavado exaustivamente com 1% BSA-PBS. As lâminas foram montadas com glicerol e analisadas por microscopia de fluorescência.

8.2. RESULTADOS

A imunização de animais com PSMA derivado da membrana e purificado por imunoafinidade, resultou em

títulos serológicos aumentados após cada injecção. As fusões celulares foram realizadas utilizando células de baço de animais que tinham títulos séricos numa diluição em excesso de 1:100,000. Os hibridomas foram rastreados por ELISA de fase sólida como PSMA de extensão total e comparados quanto á reactividade com proteínas de fusão expressadas em bactérias, contendo porções da proteína PSMA conforme descrito na Secção 7.1.2, supra, excepto que para seleccionar anticorpos do isotipo IgG, e ter sido utilizada uma IgG reagente secundária anti-ratinho. Para além disso a reactividade do antícorpo foi avaliada por análise de "Western blot", Análise Cítométrica de Fluxo e ELISA em "sandwich" utilizando o antícorpo 4E10-1.14 como antícorpo de captura um antícorpo secundário IgG anti-ratinho de coelho, conjugado com peroxidase.

Foram realizados imunoensaios de fase sólida para determinar a localização aproximada do epítopo de ligação para cada antícorpo monoclonal IgG obtido. Os resultados estão sumariados na Tabela 2, que inclui a classe de isotipo para cada antícorpo. De entre um total de 32 anticorpos testados, foi descoberto que múltiplos anticorpos ligavam ao fragmento PSMA, e que todos os anticorpos ligavam ao PSMA nativo. Dois anticorpos, 3C2 e 3C4, reagiram tanto com o fragmento 1-173 e com o 134-437 do PSMA, sugerindo quer os seus epítopos se encontram na região de sobreposição destes fragmentos. Três anticorpos 3C6, 4D4 e 1G9 ligaram apenas o PSMA nativo, sugerindo que estes anticorpos reconhecem uma conformação proteíca nativa

que não está presente em nenhum dos fragmentos desnaturados do PSMA. Dois outros anticorpos, 3G6 e 3F6, também não ligaram aos fragmentos de PSMA, mas foram capazes de ligar ao PSMA desnaturado em "Western blots".

TABELA 2

Especificidade de Ligação e Isotipo dos Anticorpos específicos para o PSMA, para o PSMA nativo e para os Fragmentos do PSMA

Anticorpo	PSMA Nativa	1-173	134-437	437-750	Isotipo^a
3E11	+	+	-	-	IgG2b
3F6	+	-	-	-	IgG2b
3G6	+	-	-	-	IgG2b
2E4	+	fraco	-	-	IgG2a
3C2	+	+	+	-	IgG2a
3C4	+	+	+	-	IgG2a
3C9	+	-	+	-	IgG1
2C7	+	-	+	-	IgG1
2D4	+	-	+	-	IgG2b
4C8G8	+	-	+	-	IgG2b
2C4	+	-	+	-	IgG1
4C11	+	-	+	-	IgG1
1D11	+	-	+	-	IgG2b
4E8	+	-	+	-	IgG2b
2G5	+	-	+	-	IgG2b
4E6	+	-	+	-	IgG1
1F4	+	-	+	-	IgG1
1G3	+	-	-	+	IgG2a
4C8B9	+	-	-	+	IgG2a
2E3	+	-	-	+	IgG2a
3D8	+	-	-	+	IgG2a
4F8	+	-	-	+	IgG2a
3D2	+	-	-	+	IgG2a
1G7	+	-	-	+	IgG2a
3D4	+	-	-	+	IgG2a
3C6	+	-	-	-	IgG1
4D4	+	-	-	-	IgG1

1G9	+	-	-	-	IgG1
5G10	+	-	+	-	IgG1
5E9	+	-	+	-	IgG1
4D8	+	+	-	-	IgG2b
3E6	+	+	-	-	IgG1

^aA especificidade do isotipo foi determinada utilizando testes "IsoStrip" (Boehringer-Mannheim) para determinação de isotipos de anticorpos murínicos, que foram executados segundo as instruções do fabricante.

A análise de "Western blot" foi realizada PSMA de uma variedade de origens, isto é, células LNCaP, PSMA recombinante expressado em baculovírus, e fluido seminal. Os resultados indicam genericamente uma forte ligação do anticorpo ao PSMA de todas as origens, e reactividade negativa a lisados de células PSMA negativas PC-3 cells. Em alguns casos, (anticorpos 3E11, 2E4, 3G6, e 3F6), não foi observada nenhuma reactividade em relação ao PMSA expressado em baculovírus, apesar de ter sido observada uma forte reactividade com o PMSA derivado de LNCaP e de fluido seminal. Presumivelmente, isto foi devido a diferenças na cripticidade dos epítopos do anticorpo nesta região, talvez como resultado da presença da substituição da polihistidina N-terminal na proteína expressada baculovírus.

Os trinta e três anticorpos monoclonais podem ser agrupados como base na sua capacidade de ligarem a uma banda proteíca de migração rápida com 100 kDa, presente nos lisados celulares de LNCaP. Foram também realizados "Western blots" utilizando um lisado celular de LNCaP

desprovido de PSMA de extensão total através da ligação a "7E11.C5-Immunobeads". Os resultados confirmam a ligação ao PSM' para todos aos anticorpos específicos para os fragmentos 134-437 e 438-750 do PSMA. Para além disso os anticorpos 3C2 e 3C4, que eram os mais reactivos com os aminoácidos 1-173 do fragmento também ligam ao PSM'. Isto indica ainda que o epítopo da proteína para estes está incluído no PSM', e provavelmente no região de sobreposição entre os fragmentos 1-173 e 134-437.

Estes resultados sugerem que os anticorpos 2E4 e 3E11 são específicos para epítopos contidos entre os primeiros 57 aminoácidos, uma vez que nenhum se liga à banda proteica correspondente ao PSM'. No entanto, não foi observada reactividade com estes dois anticorpos, relativamente a um péptido correspondente à porção intracelular PMSA de extensão total. Para além disso estes anticorpos são capazes de ligação a células não-fixadas, em análise FACS, indicando que não podem ser específicos para epítopos contidos no domínio transmembranar da proteína. Portanto, os anticorpos 2E4 e 3E11 devem ligar-se a epítopos contidos dentro do domínio extracelular do PSMA, mais provavelmente entre os resíduos 44 e 57. Esta mesma análise indica que os anticorpos 3E6 e 4D8 (que se ligam ao fragmento 1-173 do PSMA, mas não ao fragmento 134-437), são específicos para uma porção da proteína PSMA entre aproximadamente os resíduos 57-134, uma vez que ambos os anticorpos se ligam à proteína PSM', em "Western blot".

A análise de FACS utilizando este painel de anticorpos mostra marcação positiva das células LNCaP que expressam o PSMA. Os maiores desvios foram observados com os anticorpos 3C6, 1G3, 3C9, 3C4, 3G6, 3F6, 3E11, 1D11, 3D8, 1G9 e 4D4. Presumivelmente, pelo menos alguma da variabilidade na extensão da marcação celular com estes anticorpos, é devida a efeitos da glicosilação ao longo de 10 potenciais locais de ligação-N, que estão distribuídos na porção mais próxima da porção C-terminal da proteína.

A imunocitoquímica foi realizada tanto em células vivas como em células fixadas utilizando este painel de anticorpos. De modo geral, a intensidade da marcação das células vivas espelhou os resultados obtidos por citometria de fluxo. A marcação das células fixadas foi também semelhante com algumas exceções, como abaixo discutido.

O anticorpo anti-PSMA 7E11.C5 é específico para os primeiros 6 aminoácidos do PSMA, e está localizado na face intracelular da membrana plasmática. A marcação por imunocitoquímica de células LNCaP vivas com o 7E11.C5 foi negativa, enquanto com as células fixadas foi forte. Assim, este resultado demonstra a integridade das células LNCaP vivas utilizadas na imunocitoquímica, relacionando a incapacidade dos anticorpos em atravessarem a membrana plasmática de células vivas. Foi observada uma forte marcação de células LNCaP vivas pelos anticorpos 3C6, 4D4, e 1G9, indicando que se ligam a epítopos distribuídos extracelularmente. Com estes anticorpos foi observada uma

marcação fraca ou negativa em células fixadas, confirmando que estes anticorpos reconhecem conformações nativas da proteína que são destruídas por desnaturação ou fixação da proteína. Estes três anticorpos podem ser particularmente úteis para o diagnóstico *in vivo* e terapia de tumores, incluindo a imagiologia de tumores.

Foi desenvolvido uma ELISA em "sandwich" que foi revelada utilizando o anticorpo IgM 4E10-1.14 como reagente de captura seguido para cada IgG para a detecção. Foi observada uma resposta linear sensível à concentração de antigénio, independentemente do anticorpo usado para a detecção.

Em conclusão, foram seleccionados um total de trinta e dois anticorpos monoclonais IgG com especificidade para o PSMA. Os anticorpos ligam epítopos distribuídos pelo domínio extracelular do PSMA. A FIGURA 20 summariza a distribuição das especificidades anticorpo-epítopo destes anticorpos. Três anticorpos são específicos para epítopos mais complexos relacionados com conformações da proteína nativa. Todos os anticorpos IgG específicos para a porção do que engloba os resíduos 134-750 também ligam ao PSM'.

9. DEPOSITO DE LINHAGENS CELULARES

As seguintes linhagens de hibridomas foram depositadas a 12 de Março de 1996, a 11 de Março de 1996 e a 17 de Março de 1996 na "American Type Culture Collection,

12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852", tendo-lhes
sido atribuídos os seguintes números de acesso:

Hibridoma Números de Acesso ATCC

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

A presente invenção não deve ser limitada, no seu âmbito, pelas materializações exemplificadas, que se destinam a servir de ilustração para aspectos únicos da invenção. De facto, várias modificações da invenção além das aqui apresentadas se irão tornar aparentes para aqueles com pericia na arte, com base descrições e figuras que acompanham a invenção. Pretende-se que tais modificações caiam dentro do âmbito das reivindicações anexas.

Listagem das Sequências

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Northwest Biotherapeutics, iNc.

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: MONOCLONAL ANTIBODIES
SPECIFIC FOR THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF PROSTATE-
SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 2

(IV) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇO: Pennle & Edmonds, LLP

(B) RUA: 1155 Avenue of the Americas

(C) CIDADE: New York

(O) ESTADO: NY

(E) PAÍS: USA (F) ZIP: 10036-2811

(v) FORMULÁRIO COMPUTER LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) MEIO: Diskette
- (B) COMPUTADOR: IBM Compatible
- (C) SISTEMA DE OPERAÇÃO: Windows
- (D) SOFTWARE: FastSEQ for Windows Version 2.0b

(vi) DADOS DO ACTUAL PEDIDO:

- (A) PEDIDO NÚMERO:
- (B) DATA DO PEDIDO:
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DO PEDIDO INICIAL:

- (A) PEDIDO NÚMERO: 09/044,668
- (B) DATA DO PEDIDO: 18-MAR-1998

(viii) INFROMAÇÃO SOBRE O PROCURADOR/AGENTE:

- (A) NOME: Baldwin, Geraldine F
- (B) NÚMERO DE REGISTP: 31.232
- (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/CASO: 8511-0013-228

(ix) INFORMAÇÃO SOBRE TELECOMUNICAÇÕES:

- (A) TELEFONE: 650-493-4935
- (B) TELEFAX: 650-493-5556
- (C) TELEX: 66141 PENNIE

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ 10 NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 8 amino ácidos
- (B) TIPO: amino ácido
- (C) FILAMENTOS: único

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: nenhum

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1

Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys
 | |
 I S

2) INFORMAÇÃO PARA SEQID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 750 amino ácidos
- (B) TIPO: amino ácido
- (C) FILAMENTOS: único
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Nenhum

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ 10 NO:2:

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
 1 9 10 18
 Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
 29 28 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 Gln Gly Asp Leu Val Tyr
 165 170 175
 Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp 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 Asn 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	289	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
The 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 Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr		
420	425	430
Glu Trp Ala Gln Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala		
435	440	445
Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Gln 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 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 Gln 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 Thr Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala		

725 730 735
Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
740 745 750

<110> Northwest Biotherapeutics, Inc.

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN

<130> P10985EP

<140> EP 99913932.2

<141> 1999-03-18

<150> PCTIUS99/05864

<151> 1999-03-18

<150> US 09/044,668

<151> 1998-03-18

<160> 2

<170> Palentln Ver. 2.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Resíduos 716-723
of Seq ID No. 2 de aminoácido contendo péptidos

<400> 1

Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys
1 5

<210> 2

<211> 750

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 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 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 Gln 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
 245 250 255 260
 Asn Ile Leu Asn Ile Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
 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 Ilys 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
 Ily Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg
 385 390 395 400
 Ser Phe Gly Thr Leu Lys Ilys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile
 405 410 415
 Val Phe Ala Ser Trp Asp Ala Trp Trp Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr
 420 425 430
 Ile Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala
 435 440 445
 Arg 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 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 Iys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala		
725	730	735
Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala		
740	745	750

REINVINDICAÇÕES

1. Linhagem celular de hibridoma consistindo na 3C6, possuindo o número de acesso ATCC HB12491, 4D4A possuindo o número de acesso ATCC HB12493, ou 1G9 possuindo o número de acesso ATCC HB 12495.

2. Anticorpo monoclonal obtido a partir da referida linhagem celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 1.

3. Anticorpo monoclonal possuindo uma região de ligação ao抗énio que se liga especificamente a um epítopo conformacional do domínio extracelular do PSMA e inibe competitivamente a ligação imunoespecífica de um segundo anticorpo monoclonal ao seu epítopo alvo dentro do domínio extracelular do抗énio específico da membrana da próstata (PSMA), no qual o referido segundo anticorpo está de acordo com a reivindicação 2.

4. Método *in vitro* para detectar a presença da proteína PMSA ou PSM' num espcime biológico, compreendendo o contacto do espcime com um anticorpo monoclonal de acordo com as reivindicações 2 e 3, e a detecção de quaisquer proteínas PMSA ligada ao anticorpo, ou PSM' ligada ao anticorpo.

5. Método da reivindicação 4 no qual o especime é um especime de biopsia ou um fluido corporal.

6. Método da reivindicação 5 no qual o fluido corporal é sangue total, soro, fluido seminal, ou urina.

7. Método qualquer uma das reivindicações 4 a 6, no qual a detecção do PMSA ligado ao anticorpo é feita por um anticorpo secundário específico para o pMSA, ou pela actividade enzimática de NAALADase.

8. Método da reivindicação 7 no qual a actividade de NAALADase é detectada por um aumento de NAD(P)H.

9. Método *in vitro* para detectar a presença do PMSA expressado por células cancerosas, compreendendo o contacto de uma amostra de células com um anticorpo monoclonal de acordo com as reivindicações 2 e 3 e a detecção de quaisquer PMSA ligado ao anticorpo.

10. Método da reivindicação 8 no qual o anticorpo está covalentemente ligado a um marcador.

11. Método da reivindicação 10, no qual o marcador é uma enzima, um corante radiopaco, um isótopo metálico radioactivo, um isótopo não-metálico radioactivo, um composto fluorogénico, um composto fluorescente, um isótopo emissor de positrões, ou um metal não-paramagnético.

12. Utilização de uma quantidade efectiva de um anticorpo monoclonal de acordo com as reivindicações 2 e 3 no fabrico de um medicamento para matar células de cancro da prostáta num doente.

13. Utilização da reivindicação 12 na qual o anticorpo está conjugado com um fármaco, uma toxina, ou um radioisótopo.

14. Utilização da reivindicações 12 e 13 na qual o anticorpo monoclonal é um anticorpo bi-específico, compreendendo adicionalmente uma região de ligação ao抗ígeno específica para uma célula efectora possuidora de actividade tumoricida ou inibidora do tumor.

15. Utilização da reivindicação 14 na qual o anticorpo está conjugado com uma proteína ou peptido heterólogos.

16. Utilização da reivindicação 15 na qual a proteína heteróloga direcciona células tumoricidas para células de cancro da prostáta.

17. Utilização da reivindicação 16 na qual a proteína heteróloga direcciona um composto citotóxico para células de cancro da prostáta.

18. Kit para o diagnóstico, prognóstico ou monitorização do cancro da prostáta, compreendendo um anticorpo monoclonal de acordo com as reivindicações 2 e 3.

19. Kit de acordo com a reinvinicação 18, no qual o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo dele derivado, está acondicionado num meio aquoso ou numa forma liofilizada.

20. Kit de acordo com a reinvinicação 19 que compreendem ainda um segundo anticorpo específico para o PMSA.

21. Kit de acordo com a reinvinicação 19 que compreendem ainda a desidrogenase do glutamato.

Lisboa, 7 de Agosto de 2007

MWNLHETDSAVATARPRWLCAAGALVLAGGFFLLGFLEGWEIKSSNEATNITPKHN
 MIKAFLDELEKAENIKKFLYNTQIPHLAGTEQNFFQLAKQIQQSAWKEFGLDSVELAHYDVL
 LLSYPNKTTHPNYIINEDGNEIFNTSLFEPPPPYYENVSDIVPPFSAFSPQQGMPEGDL
 VYVNYYARTEDFFKLERDMKINGKIVIARYGKVFRGNKVKNAOLAGAKGVILYSDPA
 DYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVORGNIINLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLP
 SIPVHPIGYYYDAOKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVVPYNVGPGBTGNFSTQKVKMHIHS
 TNEVTRYNYVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRSWVFGGIDPQSGAAVHEIVRSFGTLK
 KEGWWRPRTILFASWDAEEFGLGSTEWAENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRV
 DCTPLMYSLVHNLTKELKSPDGEFGKSLYESVTKKSPSPEFSGMPRIISKLGSGNDFE
 VFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVR
 GGMVFELANSIVLPFDRCRDYAVVLRKYADKIYSISMKGPOEMKTYSYSFDLSLFSAVKN
 FTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIGDPLGLPDRPFYRHVIYAPSS
 HNKYAGESESPGYYDALFIDESKWDPSKAWGEVKRQIYVAFTVQAAAETLSEVA

卷之三

PE1064303

- 2/20 -

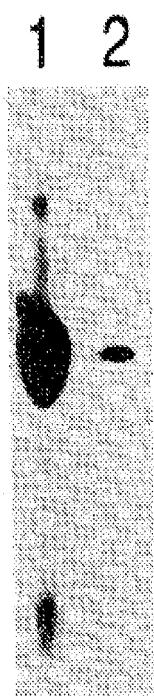


FIG.2

PE1064303

- 3/20 -

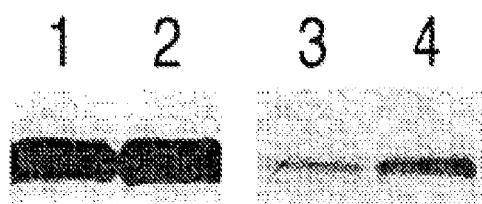


FIG.3

PE1064303

- 4/20 -

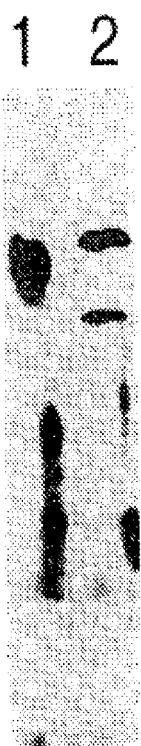


FIG.4

PE1064303

- 5/20 -

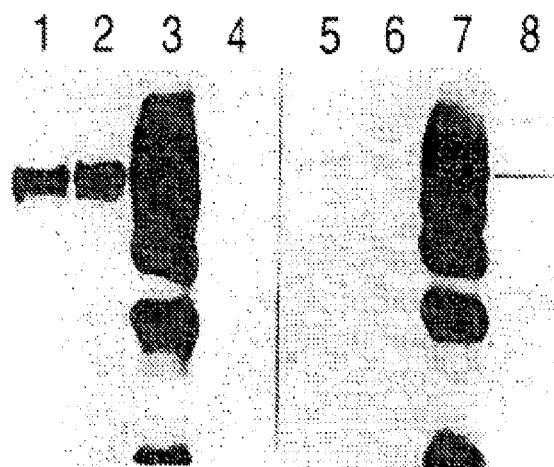


FIG.5

PE1064303

- 6/20 -

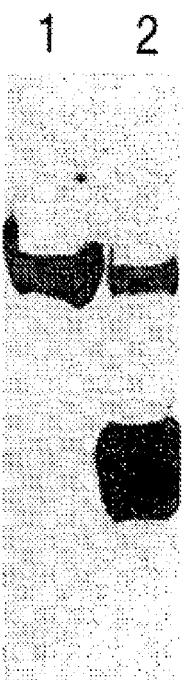


FIG.6

PE1064303

- 7/20 -

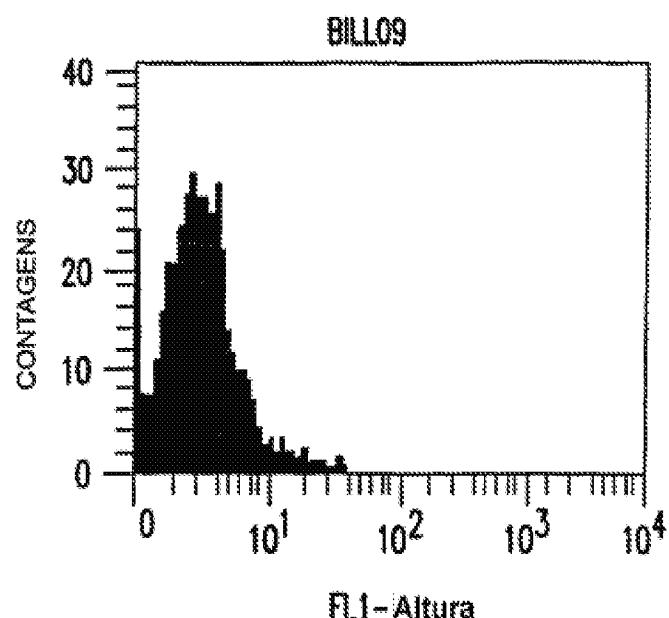


FIG.7A

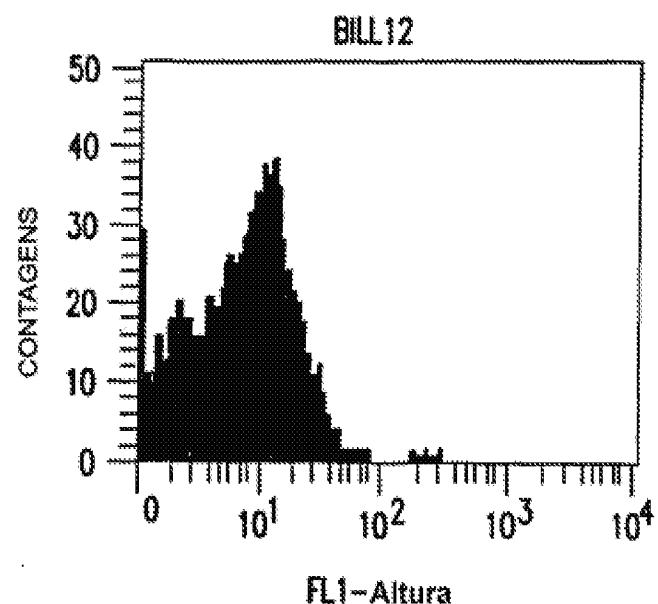


FIG.7B

PE1064303

- 8/20 -

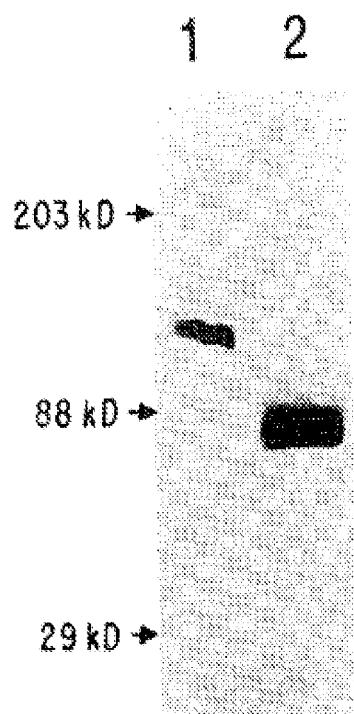


FIG.8

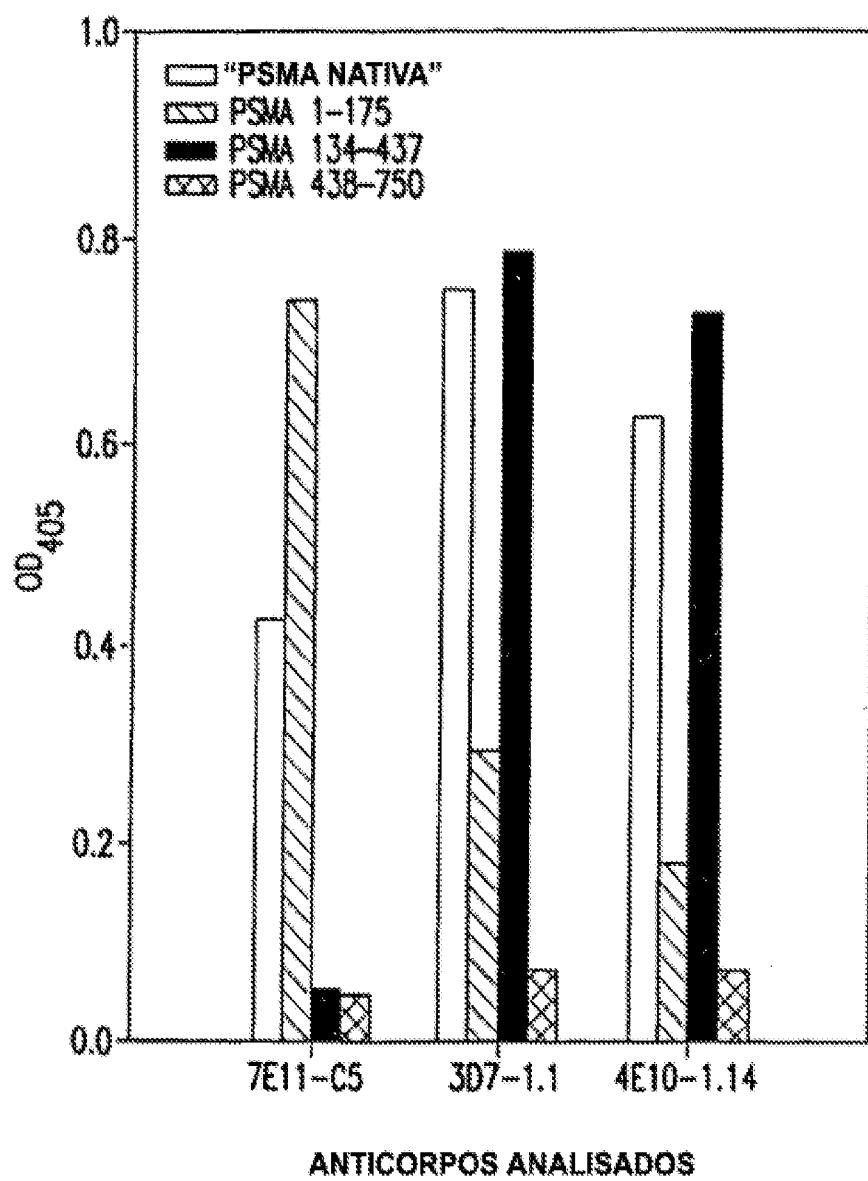


FIG.9

PE1064303

- 10/20 -

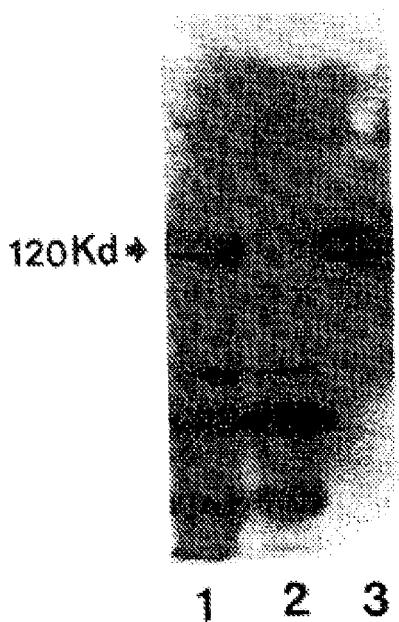


FIG.10

PE1064303

- 11/20 -

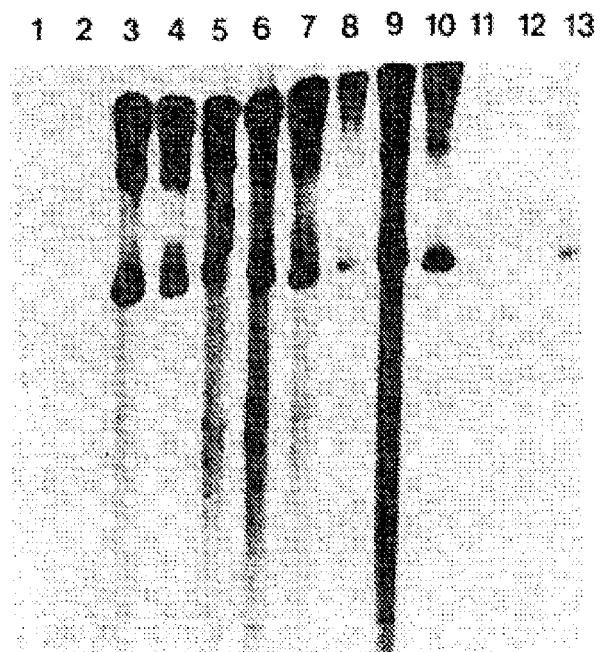


FIG.11

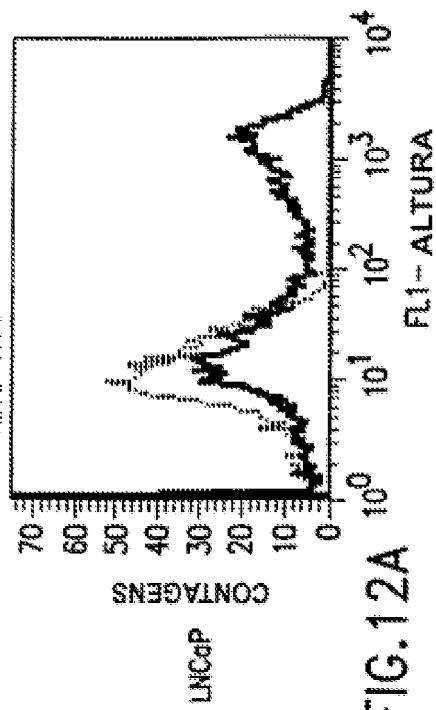
4E10 1.14
LNCap

FIG. 12A

3D7 1.1

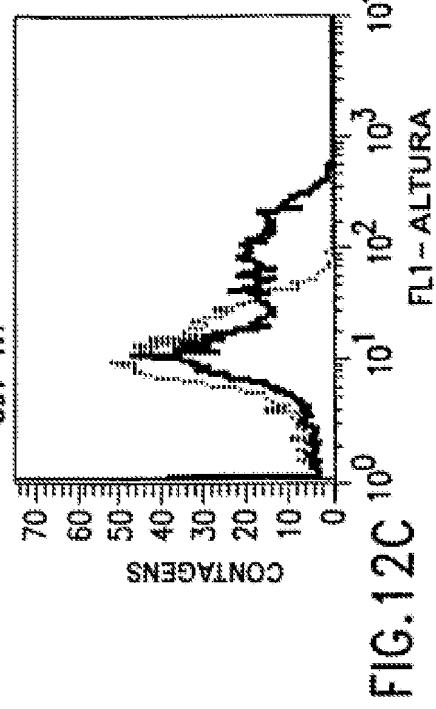


FIG. 12C

PC-3

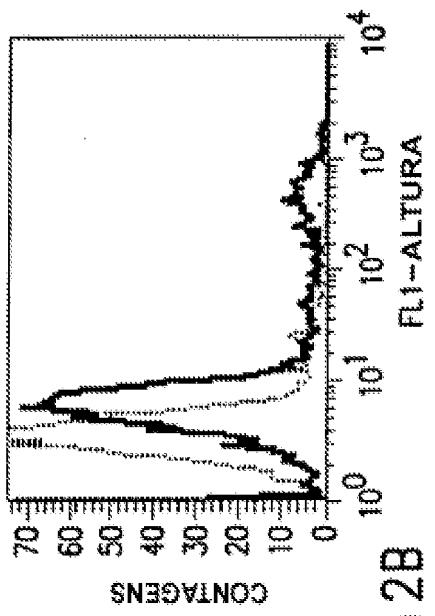


FIG. 12B

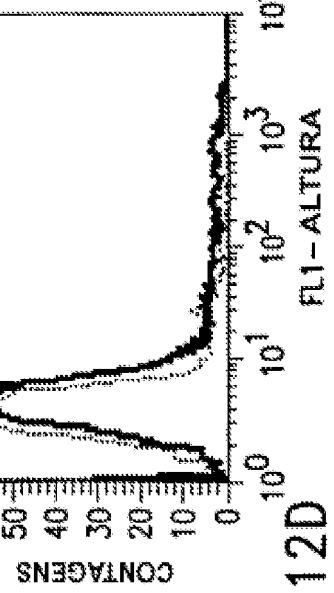
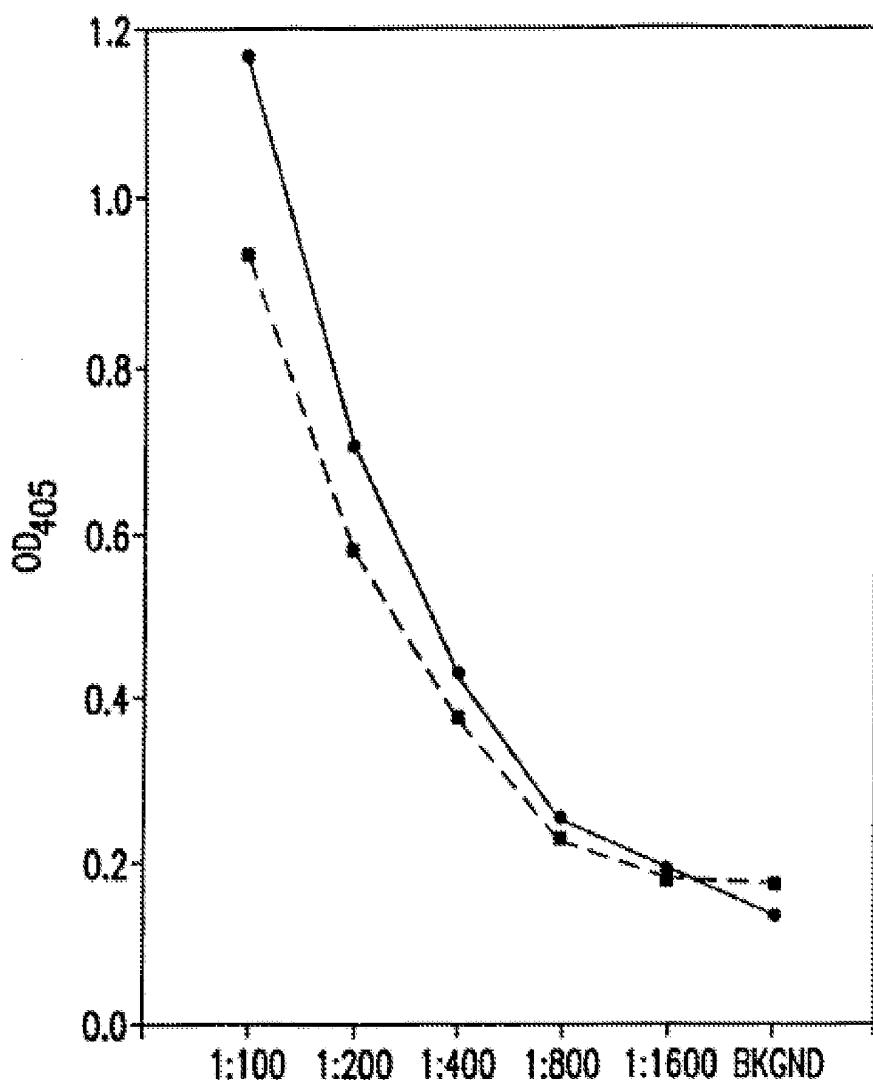


FIG. 12D



DILUIÇÃO DO PSMA

FIG.13

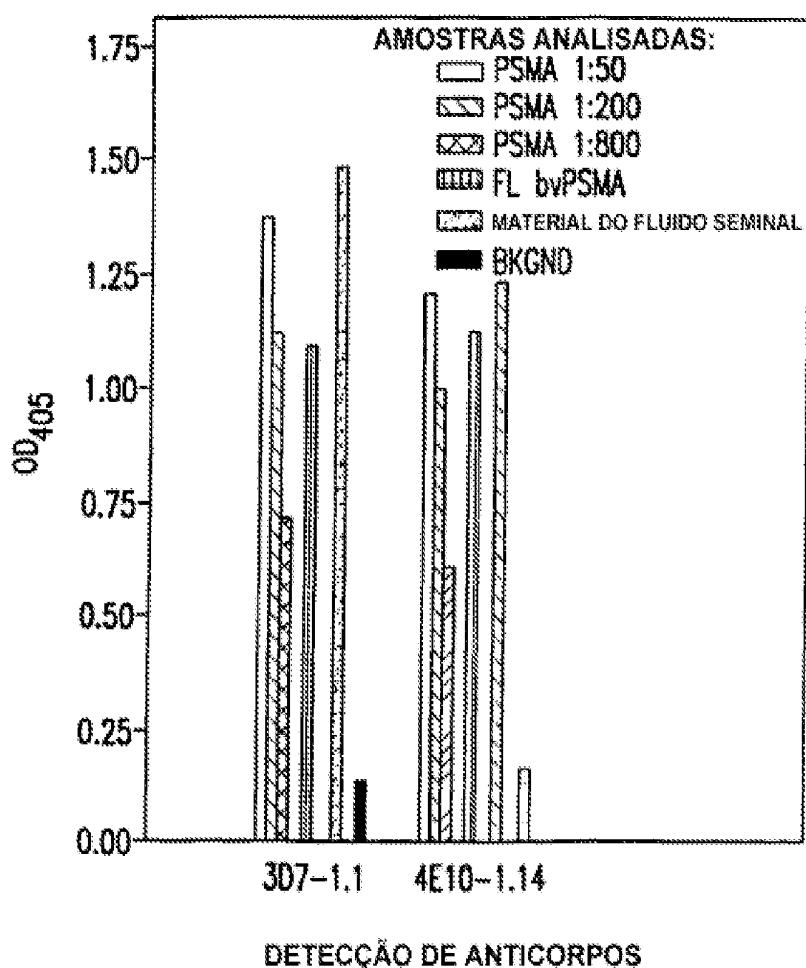


FIG.14

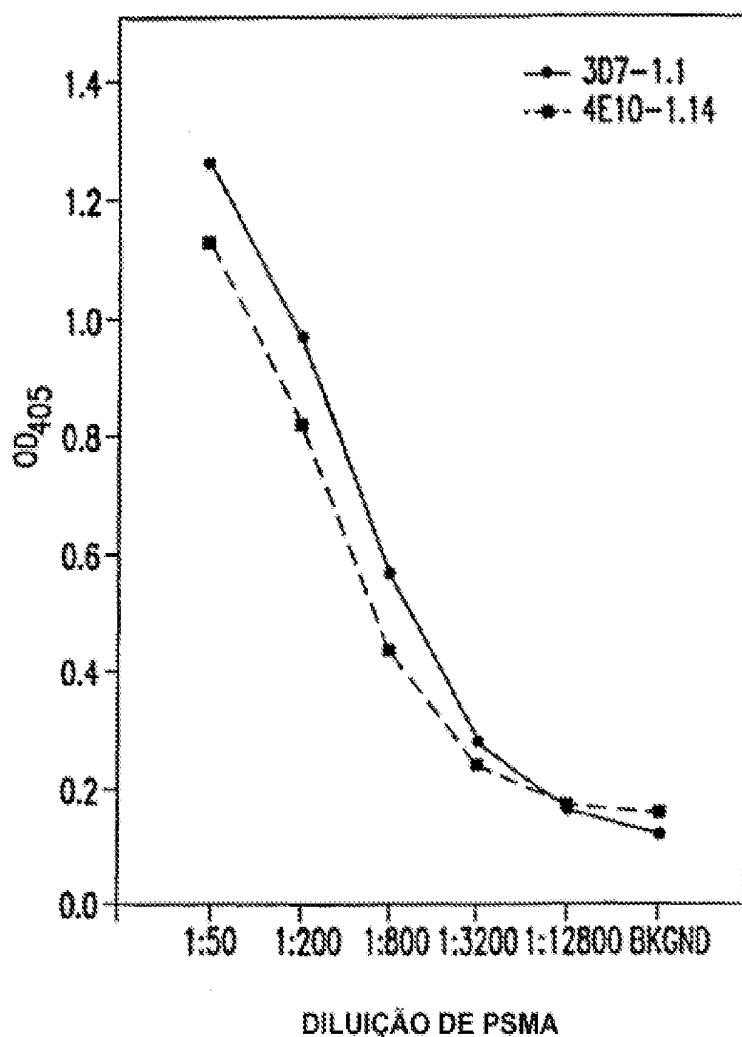


FIG.15

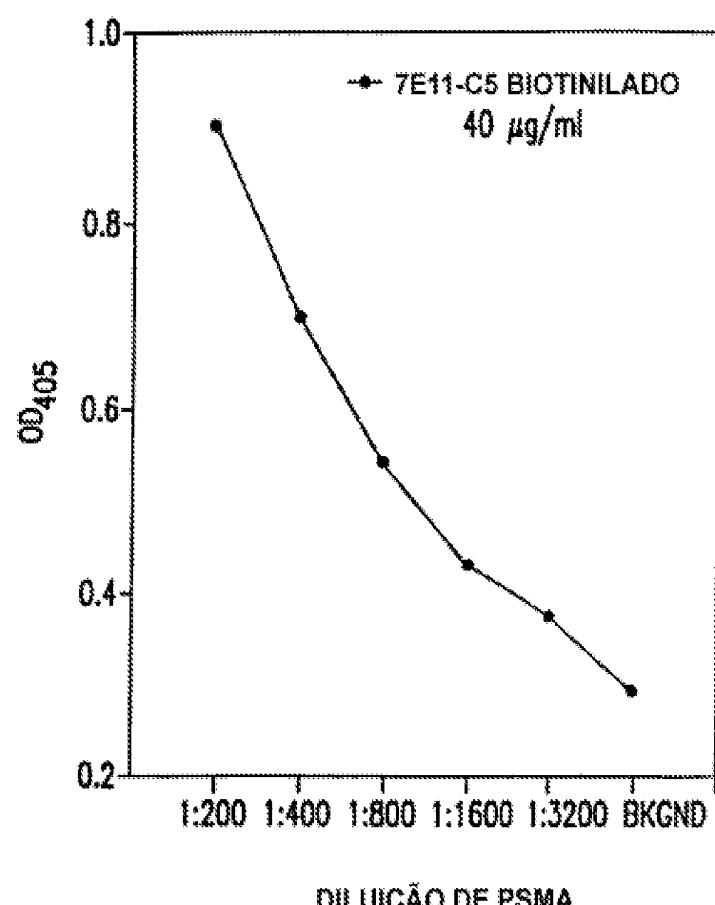


FIG.16

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Construção
de 1,9 Kb

FIG. 17

PE1064303

- 18/20 -

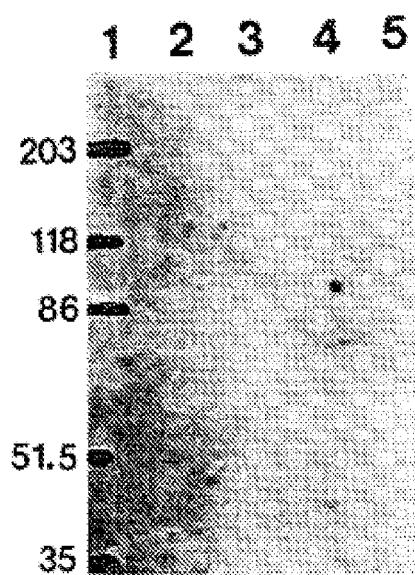


FIG.18

PE1064303

- 19/20 -

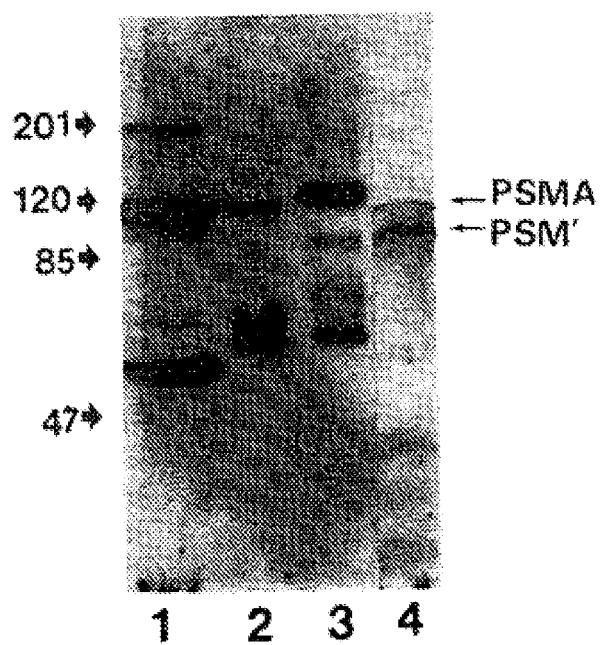


FIG.19

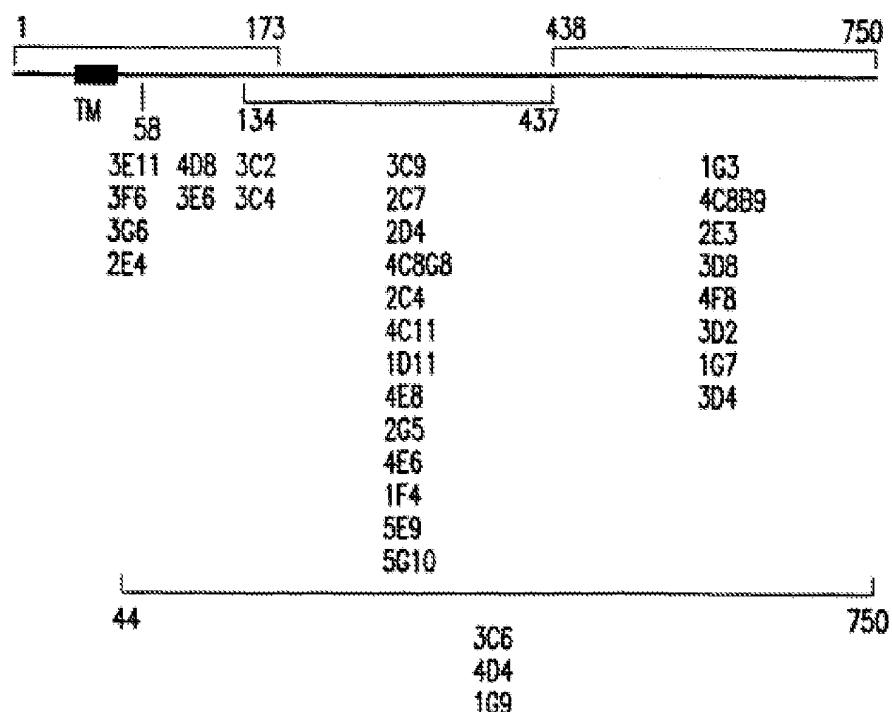


FIG.20