

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **252 200 A1**

4(51) C 12 N 5/02
A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 293 975 6

(22) 29.08.86

(44) 09.12.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Jantscheff, Peter, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Böttger, Volker, Dipl.-Biol.; Micheel, Burkhard, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Kotzsch, Matthias, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Grossmann, Heinz, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Zotter, Stefan, Dr. sc. med.; Kaiser, Günter, Dr. rer. nat.; Lossnitzer, Arndt, Dr. med.; Schmidt, H. Eberhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen CEA

(57) Ziel der Erfindung ist die Herstellung von spezifischen Antikörpern hoher Spezifität und starker Bindungsfähigkeit in guten Ausbeuten. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannterweise Milzzellen von Mäusen, die mit CEA immunisiert wurden, mit Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die Antikörper-produzierenden Hybridzellen selektiert, die CEA- und Spezies-Spezifität der Antikörper durch immunologische Tests an Granulozyten von gesunden Personen sowie nichthumanen Spezies absichert, die spezifischen Hybridome selektiert und erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper durch Kultivierung oder nach Transplantation einsetzt. Die spezifischen Hybridome wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie (Liste 1986) unter folgenden Nummern hinterlegt D11-A/B10; B4-E/D8; B4-E/A4; D11-D/G2; B4-A/H11; B4-B/B9; B4-C/G5; D11-A/D11; D14-H/D11; D11-C/C11; B4-F/C3; B4-A/F12; B4-C/F3; B4-E/A10. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinisch-biologische Grundlagenforschung und die medizinische Diagnostik.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **252 200 A1**

4(51) C 12 N 5/02
A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 293 975 6 (22) 29.08.86 (44) 09.12.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Jantscheff, Peter, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Böttger, Volker, Dipl.-Biol.; Micheel, Burkhard, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Kotzsch, Matthias, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Grossmann, Heinz, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Zotter, Stefan, Dr. sc. med.; Kaiser, Günter, Dr. rer. nat.; Lossnitzer, Arndt, Dr. med.; Schmidt, H. Eberhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen CEA

(57) Ziel der Erfindung ist die Herstellung von spezifischen Antikörpern hoher Spezifität und starker Bindungsfähigkeit in guten Ausbeuten. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannterweise Milzzellen von Mäusen, die mit CEA immunisiert wurden, mit Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die Antikörper-produzierenden Hybridzellen selektiert, die CEA- und Spezies-Spezifität der Antikörper durch immunologische Tests an Granulozyten von gesunden Personen sowie nichthumanen Spezies absichert, die spezifischen Hybridome selektiert und erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper durch Kultivierung oder nach Transplantation einsetzt. Die spezifischen Hybridome wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie (Liste 1986) unter folgenden Nummern hinterlegt D11-A/B10; B4-E/D8; B4-E/A4; D11-D/G2; B4-A/H11; B4-B/B9; B4-C/G5; D11-A/D11; D14-H/D11; D11-C/C11; B4-F/C3; B4-A/F12; B4-C/F3; B4-E/A10. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinisch-biologische Grundlagenforschung und die medizinische Diagnostik.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Zur PS Nr. 252 200

ist eine Zweitschrift erschienen.

(Patent (beschränkt) aufrechterhalten nach § 12 Abs. 3 ErstrG)

Erfindungsanspruch:

Das Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen CEA durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit CEA, Fusion ihrer Milzzellen mit Myelomzellen in der Zellkultur, Selektion der Antikörper-produzierenden Hybridome, Bestimmung ihrer CEA- bzw. Spezies-Spezifität, Auswahl der spezifischen Hybridome und ihre Kultivierung bzw. Transplantation auf Mäuse in der Aszitesform, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Spezies-Spezifität der reaktiven Antikörper durch immunologische Tests an Granulozyten von gesunden Menschen und nichthumanen Spezies bestimmt wird und zur Kultivierung bzw. Transplantation die Klone

D11-A/B10
B4-E/D8
B4-E/A4
D11-D/G2
B4-A/H11
B4-B/B9
E4-C/G5
D11-A/D11
D14-H/D11
D11-C/C11
B4-F/C3
B4-A/F12
B4-C/F3
B4-E/A10

eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen CEA und/oder CEA-ähnlichen Molekülen und zum Nachweis solcher Moleküle auf Zellen oder im Serum des Menschen sowie nichthumaner Spezies. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinisch-biologische Grundlagenforschung und die medizinische Diagnostik.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Das CEA (karzinoembryonales Antigen) ist ein Glykoprotein (MW ~ 180000), das in einer großen Zahl von Tumoren des Menschen auftreten kann, und in den Fällen, in denen es von den Tumoren sezerniert wird, im Serum der entsprechenden Tumorträger in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden kann (S. von Kleist, Das karzinoembryonale Antigen (CEA)-Biologische Grundlagen und klinische Anwendung, Stuttgart-New York, 1983).

In diesen Fällen, es handelt sich dabei in erster Linie um Tumoren des Magen-Darm-Traktes, eignet sich das CEA deshalb als Tumormarker. Der CEA-Gehalt im Serum (Wert von >40 ng/ml werden als pathologisch angesehen, Normalwerte liegen <10 ng/ml) hat Bedeutung für die Beurteilung des Ausmaßes der Erkrankung und für die Beurteilung des Risikos eines Rezidivs nach der Therapie.

Für den CEA-Nachweis werden spezifische Antikörper benötigt. Da CEA jedoch zu einer Familie sehr ähnlicher kreuzreagierender Glykoproteine gehört (die bekanntesten sind das NCA, nicht-spezifisch kreuzreagierendes Antigen, das NCA-2, nichtspezifisch kreuzreagierendes Antigen-2 und das BGP-I, Gallenglykoprotein I), die keine Tumormarker sind, führt jede Immunisierung gegen CEA auch zur Bildung von Antikörpern gegen kreuzreagierende Antigene (P. Burtin, M. J. Escibano, in: Oncodevelopmental Markers — Biologic, Diagnostic and Monitoring Aspects, S. 315, Hrsg. W. H. Fishman, New York 1983).

Die Herstellung spezifischer Antiseren ist deshalb ein langwieriger und arbeitsaufwendiger Prozeß. Außer beim Menschen wurden das CEA oder CEA-ähnliche Moleküle bisher in nichthumanen Primaten, in Ratten und in Mäusen mit entsprechenden Antiseren nachgewiesen (D. E. Haagensen et al., J. Natl. Cancer Inst. 1982, **69**, 1073; A. J. Lawson et al., in: Carcino-embryonic Proteins, Vol. II, S. 47, Hrsg. F. G. Lehmann, Amsterdam-New York-Oxford, 1979; M. Saito et al., Japan. J. Exp. Med. 1980, **50**, 197).

Monoklonale Antikörper (MoAk) gegen CEA wurden erstmalig 1980 hergestellt und sind seitdem von zahlreichen Arbeitsgruppen beschrieben worden (R. S. Accolla et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell-Hybridomas, S. 209, Hrsg. L. J. Hämmerling et al., Amsterdam 1981; F. Grunert et al., Oncodev. Biol. Med. 1982, **3**, 191; A. Hedin et al., Mol. Immunol. 1982, **19**, 1641; F. Buchegger et al., Immunol. lett. 1982, **5**, 85; C. M. Haskell et al., in: Monoclonal Antibodies, p. 275, Hrsg. B. D. Boss et al., Orlando 1983; M. Herlyn et al., Hybridoma 1983, **2**, 329; K. Imai et al., J. Immunol. 1984, **132**, 2992; R. Muraro et al., Cancer Res. 1985, **45**, 5769;). Von der amerikanischen Firma HYBRITTECH wird ein monoklonaler Anti-CEA-Antikörper kommerziell vertrieben. Weiterhin existieren kommerzielle Testbestecks zum CEA-Nachweis, einige auch auf der Basis monoklonaler Antikörper (u. a. von der Firma ABBOTT).

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper erfolgte im allgemeinen durch Immunisierung von Mäusen mit gereinigtem CEA und anschließender Fusion der Antikörper-produzierenden Zellen mit Myelomzellen nach den bekannten Techniken (G. Köhler und C. Milstein, Nature 1975, 256, 495). Die Selektion Antikörper-produzierender Hybridome erfolgte entsprechend der Reaktivität mit CEA. Die Spezifität wurde durch entsprechende Tests mit menschlichen Geweben, Zellen oder Präparationen abgeklärt, die kreuzreagierende Antigene enthalten.

Im allgemeinen wird eine Reaktion mit humanen Granulozyten als Indikator für die Kreuzreaktivität eines MoAk und damit die CEA-Unspezifität dieses Antikörpers angesehen. Die meisten der bisher beschriebenen monoklonalen anti-CEA-Antikörper zeigen eine solche Kreuzreaktivität und nur wenige können als annähernd CEA-spezifisch angesehen werden. Auch die beschriebenen MoAk gegen CEA erwiesen sich in weiteren Untersuchungen als nicht spezifisch für CEA und auch nicht Mensch-spezifisch.

Da die bisher erhaltenen MoAk offensichtlich nicht allen Anforderungen genügen, werden in zahlreichen Laboratorien intensive Bemühungen zur Herstellung weiterer CEA-spezifischer MoAk unternommen. Hierzu scheinen auch weitere Verfahren zur Absicherung der CEA-Spezifität und der Mensch-Spezifität der MoAk erforderlich.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, CEA-reaktive monoklonale Antikörper hoher Spezifität und starker Bindungsfähigkeit in guten Ausbeuten herzustellen. Diese Antikörper sollen zum Aufbau einer Testbestecke, für immunhistologische Tests und evtl. für einen In-vivo-Lokalisation oder auch Therapie geeignet sind und müssen deshalb möglichst CEA- und Mensch-spezifisch sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen CEA ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannter Weise Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit CEA immunisiert wurden, mit X63-Ag.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert und die erhaltenen Hybridzellen in Mikrottestplatten aussät. Die Antikörper-produzierenden Klone werden mit einem Festphasen-Radioimmunttest nachgewiesen und ausselektiert. Für den Test wird Anti-Maus Immunglobulin an PVC (Tablettenfolie) gebunden, danach erfolgt eine Inkubation mit dem Kulturüberstand und anschließend mit radioaktiv markiertem (¹²⁵J) CEA. Die CEA-reaktiven Hybridzellklone werden ausgewählt, in weiteren Tests auf die Bindungseigenschaften der produzierten MoAk hin untersucht und danach erfindungsgemäß in der Zellkultur bzw. auf Mäusen in der Aszitesform zur Antikörpergewinnung weitervermehrt.

Die für die erfindungsgemäße Antikörperproduktion eingesetzten Hybridzellklone wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie (Liste 1986) unter folgenden Nummern hinterlegt:

D11-A/B10
B4-E/D8
B4-E/A4
D11-D/G2
B4-A/H11
B4-B/B9
B4-C/G5
D11-A/D11
D14-H/D11
D11-C/C11
B4-F/C3
B4-A/F12
B4-C/F3
B4-E/A10

Zur Charakterisierung der Eigenschaften der erhaltenen monoklonalen Antikörper wird die Klasse bzw. Subklasse, die Epitopspezifität sowie die CEA-Spezifität bestimmt.

Zur Ermittlung der CEA-Spezifität werden Radioimmuntests bzw. immunhistologische Tests mit Zellen durchgeführt, die CEA bzw. kreuzreagierende Antigene enthalten. Eine wichtige Aussage liefert die Abklärung der Reaktivität mit Granulozyten von gesunden Personen. Diese Zellen enthalten kreuzreagierende CEA-ähnliche Antigene, die keine Tumormarker darstellen. Ein wichtiger Bestandteil der Erfindung besteht in der Selektierung der Spezies-spezifität der erhaltenen monoklonalen Antikörper durch radioimmunologische oder immunhistologische Untersuchungen an Zellen nichthumaner Spezies. Granulozyten verschiedener Affenspezies enthalten hohe Konzentrationen kreuzreagierender CEA-ähnlicher Antigene (E. Engvall et al., Brit. J. Cancer 1976, 34, 347).

Diese Antigene sind auch im Serum dieser Tiere vorhanden. Eine Reaktion mit diesen Zellen bedeutet demzufolge, daß der jeweilige monoklonale Antikörper nicht Spezies- und nicht CEA-spezifisch ist.

Die Erfindung ermöglicht die Herstellung zahlreicher monoklonaler Antikörper gegen CEA, die nach obigen Kriterien als Spezies-spezifisch und nicht reaktiv mit CEA-ähnlichen kreuzreagierenden Antigenen und damit als CEA-spezifisch anzusehen sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Monoklonale Antikörper gegen CEA

Hybrid- zell- linie	Epitop- spezi- fität	Ig- Klasse	Reaktion mit CEA u. CEA- haltigen Zellen	Granulozyten von Mensch	Schim- panse	Mu- ka- ken
D11-A/B10	a ₁	IgG1	+++	+++	+++	+++
B4-E/D8	a ₂	IgG1	++	-	?	-
B4-E/A4	d	IgG1	++	++	++	(+)
D11-D/G2	d ₁	IgG1	++	-	-	(-)
B4-A/H11	e	IgG1	++	++	++	(+)
B4-B/B9	e	IgG1	++	+	++	-
B4-C/G5	e	IgG1	++	+	?	-
D11-A/D11	f	IgG1	++	++	++	-
D14-H/D11	f	IgG1	+++	+++	+++	++
D11-C/C11	g	IgG1	++	-	-	-
B4-F/C3	h	IgG1	++	-	?	-
B4-A/F12	i	IgG2a	++	?	?	-
B4-C/F3	?	IgM	++	+++	?	++
B4-E/A10	?	IgG2a	+	-	?	-

Ein Vergleich mit WP A 61 K/262 2288 zeigt, daß mit vorliegender Erfindung eine genauere Charakterisierung der Eigenschaften der monoklonalen Antikörper durchgeführt werden kann und eine größere Palette an MoAk gegen CEA erhalten wird. Unter den MoAk befinden sich, im Gegensatz zu den im WP A 61 K/262 2288 beschriebenen MoAk, entsprechend der immunhistologisch nicht nachweisbaren Reaktion mit Granulozyten von Menschen bzw. Affen mehrere Antikörper, die unterschiedliche Epitope erkennen und die als CEA-spezifisch anzusehen sind (B4-E/D8, D11-D/G2, D11-C/C11, B4-F/C3, B4-E/A10).

Diese Antikörper können demzufolge Anwendung für den Aufbau eines CEA-spezifischen Testbestecks, eine immunologische Lokalisationsdiagnostik in vivo oder auch eine Immuntherapie finden. Darüber hinaus sind sie wertvolle Werkzeuge für die medizinisch-biologische Grundlagenforschung.

Für den Aufbau von diagnostischen Testbestecks haben weitere Eigenschaften der Hybridzellklone bzw. der produzierten monoklonalen Antikörper, die sich aus den unterschiedlichen Tests ergeben, ebenfalls eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung:

So zeigt der kreuzreaktive Antikörper D14-H/D11 im Vergleich zu allen anderen monoklonalen Antikörpern gegen CEA die stärkste Bindungsfähigkeit für ¹²⁵J-markiertes CEA (Affinitätskonstante $K = 2 \times 10^{10} / M$). Die Aszitesflüssigkeit enthält darüber hinaus große Konzentrationen dieses Antikörpers. Bei Verdünnungen von mehr als $1:10^8$ sind noch Antikörper nachweisbar, der Klon gehört deshalb zu den ausgesprochen stark produzierten Hybridzellen. Dieser Antikörper adsorbiert weiterhin sehr gut an Plastmaterial, wodurch eine Grundvoraussetzung zum Aufbau von Festphasen-Immuntests gegeben ist.

Ausführungsbeispiel

- Herstellung der Hybride aus Milzzellen von mit CEA immunisierten Balb/c Mäusen und X63-Ag8.653 Myelomzellen. Fusion, Kultivierung, Klonierung etc. in Anlehnung an die Arbeit von G. Köhler und C. Milstein, Nature 1975, **256**, 495. Die Myelomlinie X63-Ag8.653 wurde von J. F. Kearny et al., J. Immunol. 1979, **123**, 1547 entwickelt.
- Die Selektion Antikörper-produzierender Hybridzellen wurde mit einem Festphasen-Radioimmunttest entsprechend von uns beschriebener Methoden durchgeführt (B. Micheel et al., J. Immunol. Meth. 1981, **46**, 41).
- Die Ermittlung der Epitopspezifität der monoklonalen Anti-CEA-Antikörper erfolgte mit 2 Varianten von Festphasen-Radioimmuntests:
 - Antikörper-Inhibitionstest (Inkubationsschritte: 1. MoAk an fester Phase, 2. Gemisch aus ¹²⁵J-markierten CEA und MoAk)
 - Zwei-Seiten-Bindungstest (Inkubationsschritte: 1. MoAk an fester Phase, 2. CEA-haltiges Serum bzw. Tumormaterial, 3. ¹²⁵J-markierter MoAk).

In beiden Fällen bedeutet eine nichterfolgte Bindung von Radioaktivität an die feste Phase eine Reaktivität der MoAk mit dem gleichen Epitop.
- Die Immunglobulinklassen bzw. -subklassen der monoklonalen Antikörper wurden unter Verwendung entsprechender Kaninchenantisera ermittelt.
- Zur Ermittlung der Reaktivität der CEA-bindenden monoklonalen Antikörper mit kreuzreagierenden CEA-ähnlichen Antigenen wurden radioimmunologische und immunhistologische Untersuchungen an zahlreichen kultivierten Zelllinien sowie isolierten peripheren Blutzellen durchgeführt. Die Zellen wurden für die Tests getrocknet und mit Methanol unter Zusatz von H₂O₂ (zur Inaktivierung zelleigener Peroxidaseaktivität) fixiert. Der immunhistologische Test erfolgte mit folgenden Reaktionsschritten:

1. MoAk gegen CEA, 2. Kaninchen-Anti-Maus-Globulin, 3. MoAk gegen Meerrettich-Peroxidase, 4. Peroxidase und 5. Peroxidase-Nachweisreaktion.

Wichtig für die Abklärung der CEA- bzw. Spezies-Spezifität waren die Tests mit Granulozyten vom Menschen und von verschiedenen Affenspezies.