

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 551 085

②1 N° d'enregistrement national : **84 05576**

⑤1 Int Cl⁴ : C 12 N 5/00, 15/00; A 61 K 39/395; G 01 N 33/574.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 9 avril 1984.

③0 Priorité : JP, 8 avril 1983, n°s 61917/83, 61919/83 et 61922/83.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 9 du 1^{er} mars 1985.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA. — JP.

⑦2 Inventeur(s) : Makoto Yoshimura, Eiji Inoguchi, Kenichi Saito, Yasuhiko Kobayashi, Tomoko Chiku, Kenichi Matsunaga, Takayoshi Fujii et Chikao Yoshikumi.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Plasseraud.

⑤4 Anticorps contre le cancer humain de la prostate.

⑤7 Un anticorps monoclonal spécifique vis-à-vis de l'antigène de surface d'une cellule cancéreuse humaine de la prostate est produit par un hybridome entre une cellule produisant un anticorps et un myélome. L'anticorps est utile pour l'identification et/ou la classification du cancer humain de la prostate et pour un agent pour le traitement du cancer humain de la prostate.

FR 2 551 085 - A1

D

Anticorps contre le cancer humain de la prostate

La présente invention concerne le cancer humain de la prostate, plus particulièrement un anticorps spécifique vis-à-vis de l'antigène de surface du cancer de la prostate humain qui peut être produit par une cellule obtenue par fusion entre une cellule capable de produire un tel anticorps et une cellule capable de proliférer de façon permanente in vitro par repiquage, la cellule obtenue par fusion étant désignée par la suite sous le nom d'"hybridome".

Actuellement, il y a beaucoup de gens qui souffrent de cancers et un grand nombre de personnes meurent de cancers, aussi c'est un problème social des plus importants. En dépit de gros efforts de la part de nombreux chercheurs dans tous les domaines de la science, aucun procédé de traitement primaire d'un cancer n'a été trouvé jusqu'à présent. Au Japon, la moitié ou plus de la totalité des morts par des cancers sont causées par le cancer gastrique, le cancer du poumon ou le cancer du foie, d'autres sortes de cancer, cependant, tendent à augmenter à mesure que le mode de vie change au Japon, par exemple le cancer rectal ou la tumeur maligne des organes urinaires comprenant le cancer de la prostate qui concerne l'objet de la présente invention.

Les procédés de traitement de tels cancers consistent principalement en opérations chirurgicales en combinaison avec de la radiothérapie, de la chimiothérapie et/ou de l'immunothérapie. De tels procédés sont, cependant, limités dans une certaine mesure au traitement du cancer anaphase ou du cancer progressif. Ainsi, un diagnostic

précoce et un traitement précoce sont importants dans tous les cas. Dans ces conditions, un procédé rapide, hautement fiable pour l'identification et/ou le diagnostic de la cellule cancéreuse et/ou du tissu cancéreux est fortement requis.

Des recherches nombreuses et extensives ont été faites sur un antigène spécifique concernant un cancer qui est présent à la surface de la cellule cancéreuse. En particulier, un tel antigène de surface a été confirmé dans l'étude utilisant des animaux expérimentaux. Au contraire, une approche suffisante n'a pas été faite pour le cancer humain. D'après les connaissances présentes, un tel antigène de surface d'un cancer comprend par exemple (1) un antigène présent seulement de manière autologue (même souche) seulement, (2) un antigène présent habituellement dans les mêmes sortes de tumeurs, ou (3) un antigène présent également dans des tumeurs d'autres organes ou même des cellules normales de même que des cellules des tumeurs en question.

Un procédé immunologique utilisant un antisérum du même ou de différents type(s) est généralement utile pour l'analyse d'un antigène. Pour préparer un tel antisérum qui peut être utilisé pour reconnaître les trois sortes d'antigènes mentionnés ci-dessus, il est nécessaire de répéter le procédé d'absorption de l'antisérum. Une diminution du titre de l'anticorps s'ensuit inévitablement avec une telle procédure et l'antisérum résultant ne peut pas être utilisé dans la pratique. De plus, si on peut obtenir l'antisérum souhaitable, il est presque impossible de reproduire le même antisérum ayant la même spécificité. Dans ces circonstances, un nouveau moyen est requis pour l'identification des antigènes liés au cancer et des antigènes spécifiques du cancer à la surface d'une cellule cancéreuse.

L'un de ces moyens a été développé par Köhler et

Nilstein en 1975, Nature, 256, 495 (1975), c'est-à-dire la technique de fusion des cellules pour préparer un anticorps monoclonal. La technique de fusion des cellules répond aux exigences telles que celles mentionnées ci-dessus et on a
5 signalé récemment des sous-groupes d'anticorps de lymphocytes et monoclonaux humains contre l'antigène de surface de cellules leucémiques humaines ou de mélanome humain.

Généralement, bien qu'on puisse obtenir un anticorps monoclonal spécifique par une telle technique de fusion de cellules, l'antigénicité d'une cellule cancéreuse
10 varie suivant les diverses cellules cancéreuses et par conséquent on ne peut pas prédire actuellement si on va obtenir réellement un excellent anticorps ayant la spécificité désirée. En ce qui concerne les cellules cancéreuses
15 humaines, on n'a signalé jusqu'ici que peu de cellules cancéreuses spéciales comme décrit ci-dessus. En particulier, aucune publication n'a été faite sur le cancer de la prostate humain. Bien entendu, n'importe quel anticorps contre le cancer de la prostate n'est pas réellement utilisable
20 actuellement.

Les inventeurs de la présente invention ont fait de gros efforts pour rechercher un procédé pour préparer un anticorps monoclonal contre l'antigène de surface d'une cellule humaine du cancer de la prostate et ont abouti à
25 l'invention selon laquelle on peut obtenir un tel anticorps avec une haute spécificité, un titre élevé et une faible concentration en contaminants à partir d'un hybridome entre une cellule capable de produire un anticorps contre une cellule du cancer humain de la prostate (désignée quelque-
30 fois par la suite sous le nom de "cellule productrice d'anticorps anti-cancer de la prostate", ou simplement "cellule productrice d'anticorps" et une cellule capable de repiquage in vitro permanent (désignée quelquefois par la suite sous le nom de "cellule repiquée"). Les présents
35 inventeurs ont également découvert qu'un tel anticorps est

utile pour la classification et/ou l'identification d'une cellule du cancer humain de la prostate. L'anticorps peut être également utile pour fournir un traitement efficace du cancer humain de la prostate.

- 5 Un objet de la présente invention est de fournir un procédé pour la préparation d'un anticorps spécifique de l'antigène de surface d'une cellule du cancer humain de la prostate.

- 10 Un autre objet de l'invention est de fournir un anticorps anti-cancer de la prostate hautement spécifique et un procédé de préparation de celui-ci par la technique de la fusion de cellules.

Un objet de l'invention est de fournir un hybridome capable de produire un tel anticorps.

- 15 Un autre objet de l'invention est de fournir un procédé de classification et/ou d'identification des cellules du cancer de la prostate humain à l'aide de l'anticorps de l'invention.

- 20 Encore un autre objet de la présente invention est de fournir un agent pharmaceutique pour le traitement du cancer de la prostate humain, lequel agent contient l'anticorps de l'invention comme composant efficace.

- 25 La présente invention a également pour objet de fournir un dérivé utile d'un tel anticorps efficace dans l'utilisation pour la classification et/ou l'identification des cellules du cancer de la prostate humain et le traitement du cancer humain de la prostate.

- 30 D'autres objets et les avantages remarquables de la présente invention seront évidents pour les experts dans l'art à partir des descriptions détaillées suivantes sur les modes de réalisation non limitatifs, spécifiques.

- 35 Le procédé de préparation d'un anticorps anti-cancer de la prostate de la présente invention consiste à préparer un hybridome à partir d'une cellule productrice de l'anticorps anti-cancer de la prostate et une cellule

repiquée, en particulier de myélome, et à récupérer l'anticorps sécrété par l'hybridome.

Le procédé de l'invention va être décrit dans la suite avec plus de détails.

5 A. PREPARATION DE LA CELLULE PRODUCTRICE D'ANTICORPS.

Dans la présente invention, la cellule productrice d'anticorps anti-cancer de la prostate peut être obtenue à partir de n'importe quelle espèce animale y compris l'homme. Une immunisation de l'animal n'est pas
10 essentielle bien qu'une telle immunisation préliminaire puisse remarquablement améliorer l'efficacité de récupération de l'hybridome désirable.

Lorsque l'origine d'une telle cellule est humaine, toute personne ayant un antécédent de cancer de la prostate ou un titre élevé de sérum contre la cellule du cancer de la prostate peut être choisie. Ou bien encore,
15 on peut obtenir une telle cellule à partir d'un corps vivant immunisé avec un immunogène. L'immunogène peut être une cellule cancéreuse per se, une cellule qui est traitée avec du glutaraldéhyde, de la mitomycine ou de la chaleur
20 et de ce fait ne peut pas proliférer, ou l'antigène de surface séparé d'une cellule cancéreuse par un traitement approprié avec par exemple une enzyme et purifiée.

L'immunogène utilisé dans l'immunisation peut
25 être mélangé avec un adjuvant tel que l'adjuvant complet ou incomplet de Freund. L'immunogène peut être administré par tout moyen classique tel que des injections sous-cutanées, intrapéritonéales, intraveineuses, intradermiques et intramusculaires. Une injection sous-cutanée ou intrapéri-
30 tonéale peut être préférable. Il est possible qu'une seule immunisation soit possible bien que l'immunisation puisse être effectuée de façon répétée plusieurs fois avec un intervalle de temps approprié par exemple de une à cinq semaines. En mesurant le titre de l'anticorps dans le sé-
35 rum de l'animal immunisé, on peut utiliser l'animal dont

le titre a été suffisamment élevé pour obtenir la cellule productrice d'anticorps, ce qui a pour effet d'améliorer l'efficacité des opérations suivantes. La cellule préférable est extraite de l'animal le 3ème-5ème jour après l'immunisation finale. La cellule productrice de l'anti-

5 corps est un plasmocyte ou un lymphocyte qui est une cellule précurseur de celui-ci et peut provenir de n'importe quel site du corps, généralement la rate, un ganglion lymphatique, le sang périphérique ou toute combinaison de

10 ceux-ci.

B. FUSION DES CELLULES.

Une cellule qui peut être conservée de façon permanente par repiquage in vitro peut être toute cellule appropriée qui peut être fusionnée avec la cellule produc-

15 trice d'anticorps pour donner un hybridome capable de produire un anticorps désiré. L'une de ces cellules qui est préférable est une cellule leucémique telle qu'une cellule de myélome. Une telle cellule peut provenir de n'importe quelle espèce telle que l'homme, le rat, la souris, etc.

20 La cellule qui est dépourvue d'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) ou de thymidine kinase (TK) est préférable du fait que de telles cellules parentes ne peuvent pas se développer dans un milieu sélectif.

Un exemple de lignée de cellules préférable est

25 la lignée GM-1500-6TG-A1-2 ou RPM18226 dérivée de l'homme ou P3-X63-Ag8, P3/NSI/1-Ag4-1, Sp2/O-Ag14, X63-Ag8.653, etc, dérivée de la souris.

Il est préférable d'utiliser une cellule productrice d'anticorps et une cellule repiquée, les deux provenant des mêmes espèces, bien que ce ne soit pas essentiel, aux plans de l'efficacité de la fusion, de la stabilité des propriétés des cellules obtenues par fusion et de la facilité de culture in vivo de celles-ci. En particulier, lorsqu'on utilise la lignée de cellules P3-X63-Ag8,

35 P3-NSI/1-Ag4-1, Sp2/O-Ag14 ou X63-Ag8.653 comme cellule

repiquée, on peut utiliser de préférence une souris BALB/c consanguine ou sa souris hybride.

Pour la fusion, on peut utiliser un accélérateur tel que le virus Sendai (HVJ) et du polyéthylèneglycol, en particulier, on peut utiliser de préférence le polyéthylène 1000, 1540, 2000, 4000 ou 6000. La fusion des cellules peut être réalisée dans une solution contenant environ 30 à 55 % d'un tel polyéthylèneglycol. En outre, le diméthylsulfoxyde peut être présent dans la solution.

10 C. PREPARATION DE L'HYBRIDOME.

Dans la solution après la fusion, sont présents, en plus de la cellule obtenue par fusion, la cellule parente productrice d'anticorps restante et la cellule parente repiquée. La première ne peut pas survivre pendant la culture in vitro ultérieure tandis que la dernière peut se propager avec l'hybridome désiré. Il est par conséquent préférable ou même nécessaire d'éliminer la cellule repiquée de la solution contenant les cellules mélangées. Pour cela, on utilise de préférence la cellule dépourvue de HGPRT ou de TK comme cellule parente repiquée et les cellules mélangées contenant les cellules parentes sont cultivées dans un milieu de sélection contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine après la fusion des cellules, ce qui permet la croissance sélective de l'hybridome désiré uniquement. Ou bien encore, la cellule repiquée parente, lorsqu'elle n'est pas une cellule manquant de HGPRT ou de TK, peut être traitée avec de l'émétine et de l'actinomycine D avant la fusion des cellules. La cellule parente ne peut pas proliférer avec un tel traitement et par conséquent on peut choisir facilement l'hybridome désiré à partir des cellules mélangées.

Les hybridomes ainsi obtenus contiennent généralement deux ou plusieurs clones, par conséquent ceux-là peuvent ne pas avoir tout à fait les mêmes propriétés.

35 Pour les séparer en clones individuels, le clonage peut

être nécessaire et même désiré lorsqu'un anticorps est susceptible d'être requis. Le clonage est également efficace du point de vue de la prévention du changement de population qui peut souvent se produire dans une culture à long terme d'un système avec un certain nombre de clones mélangés. Le clonage peut être réalisé par culture à dilution limitante, par culture sur gelose molle ou par culture sur gel de fibrine. On peut également utiliser un trieur de cellules activées fluorescentes pour trier les cellules dans le clonage. Le clonage peut être utilisé également pour séparer les cellules aberrantes possibles apparaissant pendant la longue culture et pour conserver les cellules qui ont les mêmes propriétés que l'hybridome d'origine.

L'hybridome de la présente invention dans la phase de croissance logarithmique peut être maintenu en suspension pendant une longue période sous une forme congelée et à raison de $1 - 10 \times 10^6$ par ml en suspension dans un sérum bovin foetal contenant 5 % (v/v) de diméthylsulfoxyde. Le procédé de congélation est réalisé de préférence à une vitesse de refroidissement de -1°C par minute. Il est préférable de conserver l'hybridome à -80°C ou plus bas.

L'hybridome congelé, conservé, est décongelé de préférence aussi rapidement que possible. Si les cellules sont lavées avec un milieu destiné à éliminer le diméthylsulfoxyde immédiatement après dissolution, les cellules peuvent être mises en suspension dans un milieu classique et peuvent être cultivées. Lorsqu'après décongélation, il ne reste qu'une petite quantité de cellules survivant et se développant, il faut ajouter des cellules de rate de souris, etc.

D. PREPARATION ET RECUPERATION DE L'ANTICORPS.

Pour la préparation de l'anticorps, l'hybridome producteur d'un anticorps anti-cancer de la prostate est

cultivé in vitro ou in vivo.

Dans la culture in vitro, on peut choisir un bouillon nutritif approprié à l'hybridome de la présente invention, par exemple, le milieu RPMI 1640 qui contient
5 10 % (v/v) de sérum bovin foetal, du β -mercaptoéthanol
 5×10^{-5} M, 1 mM de pyruvate de sodium et des antibiotiques,
ou bien, le milieu MEM de Eagle modifié de Dulbecco (désigné ci-après par D-MEM) qui contient 4,5 g/l de glucose
à la place du milieu RPMI 1640. Une concentration initiale
10 en cellules appropriée à la prolifération peut être en
général de l'ordre de 10^5 par ml tout en pouvant dépendre
de chaque hybridome, et la concentration en cellules pendant la culture va de préférence jusqu'à 2×10^6 par ml.

Dans la culture in vivo, l'hybridome est trans-
15 planté dans un corps vivant et développé sous la forme solide ou dans des ascites. On prélève dans le corps vivant un fluide corporel, de préférence du sérum ou de l'ascite, pour récupérer l'anticorps sécrété par l'hybridome. La solution brute de l'anticorps obtenue peut contenir comme
20 impuretés (contaminants) diverses substances issues du corps vivant hôte, néanmoins elle est plus remarquable que la solution d'anticorps obtenue in vitro à cause de la concentration plus élevée de l'anticorps désiré. Lorsque l'hybridome est transplanté intrapéritonéalement, on
25 peut administrer du pristane (2,6,10,14-tétraméthylpentadécane) intrapéritonéalement avant la transplantation, de préférence 3 à 9 semaines avant la transplantation. Ce traitement peut augmenter le rendement de la solution brute d'anticorps mais n'est pas essentiel. Comme hôte,
30 un animal de la même espèce et du même sang que l'animal duquel la ou les cellule(s) parente(s) provient (proviennent) est préférable et dans ce cas l'hybridome peut se développer dans l'animal même s'il n'a pas été traité spécialement. Lorsque les sérotypes de l'histocompatibilité des antigènes coïncident les uns les autres entre
35

l'hybridome et l'hôte, l'hôte est nécessairement traité au préalable en lui administrant par exemple un anticorps anti-lymphocyte ou par irradiation avec des rayons X. Les cellules commencent à se développer à partir de 1 à 3 semaines après la transplantation.

Dans la culture in vitro ou in vivo de l'hybridome pour la sécrétion des anticorps, une substance radioactive telle que la leucine et la lysine marquée par un radio-isotope peut être ajoutée au milieu ou administrée à l'hôte. Un tel traitement peut donner un anticorps ayant la même structure chimique que l'anticorps non marqué et contenant la substance radioactive dans une molécule.

Les anticorps de la présente invention peuvent être utilisés tels quels dans la solution d'anticorps brute, ou bien ils peuvent être purifiés pour l'utilisation par n'importe quel procédé classique pour l'immunoglobuline, par exemple, par fractionnement par le sulfate d'ammonium ou par chromatographie par échange d'ions, ou par chromatographie par affinité avec la protéine A ou l'antigène. De tels anticorps purifiés peuvent être utilisés indépendamment ou en mélange.

Selon le procédé de préparation de l'anticorps anti-cancer de la vessie de la présente invention, l'inconvénient lié aux procédés classiques peut être nettement surmonté. L'hybridome de l'invention peut être repiqué et on peut le faire proliférer substantiellement de manière permanente à la fois in vitro et in vivo. En outre, l'hybridome peut produire un anticorps contre un déterminant antigénique spécifique. L'anticorps produit, par conséquent, peut avoir une spécificité monoclonale, est un anticorps vis-à-vis de l'antigène de surface d'une cellule du cancer de la prostate et se compose essentiellement d'une seule espèce moléculaire. Le procédé de la présente invention permet la production d'une quantité nécessaire de l'anticorps dépendant de la demande, la suppression de la dis-

persion entre les lots et de plus la préparation d'une solution contenant l'anticorps ayant un titre élevé. De plus, le procédé n'exige pas une absorption difficile qui a été classiquement inévitable. Par ailleurs, on peut uti-
5 liser un antigène non purifié tel qu'une cellule per se sans difficulté dans le procédé et même on peut obtenir dans un tel cas l'anticorps hautement spécifique. Une réactivité aussi élevée avec un antigène de l'anticorps permet une identification rapide d'une cellule de cancer
10 de la prostate avec une haute fiabilité sans passer par les procédés classiques difficiles. De plus, étant donné la pureté élevée de l'anticorps, les réactions allergiques dues aux contaminants contenus inévitablement dans la préparation classique se produisent rarement, permettant son
15 utilisation comme remède contre le cancer de la prostate.

Le procédé de classification et/ou d'identification de la présente invention peut être appliqué à un sujet de toute origine. Par exemple, on peut utiliser des matériaux cliniques tels que l'urine, un lymphocyte ou autre
20 tissu bioptique obtenus à partir d'un patient souffrant éventuellement d'un cancer de la prostate du point de vue clinique.

Dans l'identification, un réactif contenant l'anticorps de la présente invention est mis en contact
25 avec un sujet contenant des cellules de cancer de la prostate. Elle peut utiliser commodément la microscopie d'immunofluorescence, l'immunoélectromicroscopie, le test de liaison radioactif, l'immunotest enzymatique, etc. En microscopie d'immunofluorescence directe, on peut utiliser
30 commodément l'anticorps de l'invention après l'avoir marqué avec un colorant fluorescent tel que la fluorescéine et la rhodamine. L'autre forme commode de l'anticorps de l'invention peut être une forme marquée avec une substance de marquage telle que la ferritine pour une immunoélectro-
35 microscopie, une forme marquée avec un radio-isotope tel

que ^{125}I et ^{131}I pour un test de liaison radioactif ou une forme marquée avec une enzyme telle que la peroxydase et la phosphatase alcaline pour un immunotest enzymatique. Bien entendu, on peut réaliser un procédé indirect à l'aide d'un anticorps secondaire ou de son produit de liaison comme substitut, par exemple on peut utiliser un anticorps anti-cancer de la prostate humain avec l'avidine comme anticorps secondaire. Egalement, une partie de l'anticorps obtenue par clivage restrictif avec un traitement chimique et/ou enzymatique tel que F(ab')_2 peut être utilisée à la place de l'anticorps per se. Des dérivés et des produits de restriction aussi variés sont utiles pour le procédé de classification et/ou d'identification de l'invention et par conséquent sont inclus dans le cadre de la présente invention.

L'anticorps, ses dérivés et ses produits de restriction peuvent être mélangés pour l'utilisation si c'est nécessaire. De plus, le réactif pour la classification et/ou l'identification de l'invention peut encore contenir un support ou un diluant classiquement utilisé.

La présente invention concerne également un agent curatif (remède) pour le traitement du cancer de la prostate.

On peut considérer que le mécanisme curatif par les anticorps de la présente invention accélère une réaction de fixation complémentaire et l'attaque du macrophage et/ou d'autres immunocytes contre les cellules cancéreuses lorsque l'anticorps administré se lie avec l'antigène de surface de la cellule cancéreuse.

L'anticorps de la présente invention peut être administré per se indépendamment ou en mélange. Lorsque l'anticorps est combiné chimiquement avec un agent anticancer tel que le chlorhydrate de mitomycine et de doxorubicine ou une toxine telle que la ricine, on peut obtenir plus d'avantages. Dans ce cas, on peut considérer que

le mécanisme est tel que l'agent anti-cancer ou la toxine peuvent attaquer les cellules cancéreuses lorsque l'anticorps administré se lie à l'antigène de surface de la cellule cancéreuse, ayant pour résultat une plus faible toxicité de l'agent anti-cancer ou de la toxine que lorsqu'il est utilisé seul. Une fraction de l'anticorps obtenue par division restrictive par un traitement chimique ou enzymatique, par exemple $F(ab')_2$, peut être également utilisée pour l'agent de guérison de l'invention à la place de l'anticorps per se. Dans ce cas, on peut éviter une possibilité qu'a le tissu d'un hôte de pouvoir être affecté par une détérioration due à une réaction de fixation complémentaire non spécifique, etc. Ces dérivés (produits de combinaison avec un agent anti-cancer ou avec une toxine) et ces produits de restriction peuvent être utilisés soit indépendamment soit en mélange comme agent curatif de la présente invention.

Pour évaluer la toxicité aiguë des anticorps, de ses dérivés et des produits de restriction, on a administré l'agent curatif de l'invention à trois groupes (de 10 animaux chacun) de souris IRC ; premièrement en une quantité de 2 g/kg par voie orale, deuxièmement en une quantité de 400 mg/kg par voie intrapéritonéale et troisièmement en une quantité de 200 mg/kg par voie intraveineuse, et aucune mort n'a été observée pendant 14 jours. L'agent de guérison de l'invention peut donc être utilisé sans danger comme remède contre le cancer de la prostate humain.

L'agent pharmaceutique de l'invention peut être administré par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse, de préférence par injection sous-cutanée ou intramusculaire. L'agent de guérison peut être administré par voie orale étant donné qu'une partie de l'agent administré peut être absorbé par la voie intestinale tout en retenant la structure comme anticorps, ce qui a été confirmé par les présents inventeurs.

On peut préparer une préparation injectable en dissolvant ou en mettant en suspension par exemple 10 mg de l'anticorps ou de son dérivé avec 50 mg de mannitol dans 10 ml d'eau distillée, en stérilisant de n'importe
5 quelle manière classique, en la divisant en fractions de 2 ml chacune pour la mettre dans des ampoules et en lyophilisant. Le produit obtenu sera dissous ou mis en suspension dans une solution saline au moment de l'utilisation. Une préparation injectable peut contenir en plus de l'anti-
10 corps un support, un diluant, un tampon, un stabilisant, un agent isotonique, etc, ces agents étant connus de ceux qui sont spécialistes dans l'art. On peut préparer la préparation injectable sous n'importe quelle forme d'injection, sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse. On peut
15 préparer un agent administrable par voie orale par n'importe quel procédé classique et l'introduire dans un médicament entérique. Une quantité unitaire de l'agent de guérison de l'invention peut dépendre principalement des symptômes, et va généralement de 0,001 mg à 10 g par jour par kg
20 de poids corporel chez un animal tel que la souris et de 0,01 à 3 000 mg par jour par kg de poids corporel chez l'homme.

La présente invention va être illustrée par les exemples non limitatifs suivants.

25 EXEMPLE 1 : PREPARATION D'UN ANTICORPS CONTRE UNE CELLULE DU CANCER HUMAIN DE LA PROSTATE.

A. IMMUNISATION ET FUSION DE CELLULES.

(1) PREPARATION DE LA CELLULE IMMUNOGENE : On a fait incu-
ber une lignée de cellules de cancer humain de la prostate
30 8 PC 93 (2×10^5), obtenue par repiquage in vitro pendant une longue période, à 37°C dans un environnement humide contenant 5 % de CO₂ dans un milieu de sel de Earle de MEM de Eagle (désigné ci-après par MEM) contenant 10 % (v/v) de sérum bovin foetal et du sulfate de kanamycine (concentration finale 60 mg/l) dans une boîte de culture (Falcon
35

3003, Becton-Dickinson, USA). Après trois jours de culture, on a exfolié les cellules en force et on a éliminé le liquide surnageant par centrifugation. On a lavé ensuite les cellules avec une solution saline tamponnée de phosphate (PBS, pH 7,2) en centrifugeant et on les a mises en suspension dans du milieu PBS. On a obtenu environ 2×10^6 cellules dans le récipient de culture.

(2) CULTURE DU MYELOME : On a cultivé une lignée de cellules de myélome de souris Sp2/O-Ag14 (10^5 par ml) dans du D-MEM contenant 10 % (v/v) de sérum bovin foetal, 1 mM d'acide pyruvique, 2 mM de glutamine et 60 mg/l de sulfate de kanamycine par repiquage tous les trois jours. On a ajusté la cellule à une concentration en cellules de $2,5 \times 10^5$ par ml le jour précédant la fusion des cellules suivantes et on l'a cultivée dans le milieu mentionné ci-dessus.

(3) IMMUNISATION AVEC DES CELLULES 8 PC 93 : Les cellules 8 PC 93 (10^7 cellules) obtenues en (1) ci-dessus et mises en suspension dans 0,5 ml de PBS ont été injectées par voie intrapéritonéale à des souris femelles BALB/c (NIHON CHARLES LIVER, JAPON, âgées de 9 semaines) deux fois avec un intervalle de temps de trois semaines environ pour l'immunisation.

(4) FUSION DES CELLULES : On a effectué la fusion des cellules selon le procédé de Köhler et Milstein (Immunotests ; Clinical Laboratory Techniques pour l'éd. de 1980 par Nakamura R.M. et al., E.S. Alan R. Liss, Inc., N.Y. 1980, p. 301-324).

Le quatrième jour après l'immunisation finale, on a tué les souris pour extraire la rate. La rate a été détachée, passée à travers un tamis de 150 mailles, centrifugée à 400 x g et on a ajouté du tampon tris-HCl (tris-(hydroxyméthyl)aminométhane 0,017 M, pH 7,65) contenant 0,747 % de chlorure d'ammonium aux cellules précipitées pour éliminer les érythrocytes et on a récupéré les cellules par centrifugation (400 x g). Après avoir ajouté du MEM

aux cellules, on a effectué la centrifugation à 400 x g et on a mis encore les cellules en suspension dans du MEM frais. Après avoir répété ce procédé de lavage trois fois, on a finalement mis les cellules en suspension dans
5 du MEM.

Les cellules Sp2/O-Ag14 ont été exfoliées du récipient de culture en pipettant et ont été transférées dans un tube à centrifugation. Après centrifugation (400 x g), les cellules récupérées ont été mises en suspension
10 dans du MEM, centrifugées (400 x g) pour éliminer le sérum et mises une nouvelle fois en suspension dans du MEM.

La cellule de rate (10×10^7) et la lignée Sp2/O-Ag14 (2×10^7) ont été mélangées, pipettées avec soin et centrifugées (400 x g). Après avoir rejeté le liquide
15 surnageant, on a détaché le précipité en frappant doucement le tube à centrifugation. Aux cellules détachées, on a ajouté 0,6 ml d'une solution de polyéthylèneglycol (PEG 1000) à 30 % (v/v) dans du MEM maintenu à 37°C. Après avoir
20 remué doucement, on a laissé reposer la solution à la température ambiante pendant 5 minutes. La centrifugation a été effectuée à 7 x g pendant 2 minutes et on a ajouté progressivement 5 ml de MEM. Après avoir agité doucement,
on a effectué la centrifugation (400 x g) à la température ambiante pendant 5 minutes. On a écarté le liquide surnageant,
25 geant, on a ajouté 5 ml de MEM au précipité, centrifugé de la même manière que mentionné ci-dessus et on a éliminé le liquide surnageant.

Aux cellules précipitées, on a ajouté 5 ml de milieu D-MEM contenant 10 % de sérum bovin foetal, 2 mM de
30 glutamine, du β -mercaptol 5×10^{-5} M, 60 mg/l de sulfate de kanamycine et encore du glucose à 4,5 g/l (désignée ci-après par milieu D-MEM-FBS). Après avoir pipeté, on a ajouté 40 ml de D-MEM-FBS à la suspension de cellules
résultante (10 ml). On a inoculé chaque fraction de 25 ml
35 dans un récipient de culture de 25 cm² (C-25100, Corning,

USA) et on l'a laissée incuber dans une ambiance humide contenant 5 % de CO₂ à 37°C pendant la nuit, conditions d'incubation qui ont toujours été utilisées dans les procédures suivantes.

- 5 Le jour suivant l'inoculation, on a transféré la culture dans un tube de centrifugation après l'avoir pipetée doucement, et on l'a centrifugée à 400 x g. Après avoir éliminé le liquide surnageant, la boulette de cellules a été mise en suspension dans 60 ml de D-MEM-FBS contenant de l'hypoxanthine 1×10^{-4} M, de l'aminoptérine 4×10^{-7} M et de la thymidine $1,6 \times 10^{-5}$ M (milieu HAT).
10 La suspension (0,1 ml) a été placée dans chaque godet d'une plaque à 96 godets (Falcon 3072, Becton-Dickinson, USA) et cultivée pendant une semaine. Après une culture
15 d'une semaine dans du milieu HAT, on a ajouté 25 µl de milieu HT (milieu HAT sans aminoptérine) tous les 2 ou 3 jours.

B. SELECTION ET CROISSANCE DE L'ANTICORPS PRODUISANT L'HYBRIDOME.

- 20 On a utilisé un immunotest enzymatique en phase solide pour examiner la production de l'anticorps contre les cellules 8 PC 93 dans le liquide surnageant de chaque godet la seconde semaine après la fusion des cellules.
 On a fait réagir les cellules 8 PC 93 fixées
25 sur une plaque Falcon 3072, avec 40 µl du liquide surnageant dans chaque godet à la température ambiante pendant 2 heures, on les a lavées avec du PBS, laissées réagir pendant 2 heures avec 100 µl d'anticorps immunoglobuline anti-souris lié à la peroxydase (catalogue N° 3211-0231,
30 Cappel Lab. Inc., USA) qui a été dilué 1000 fois avec du sérum de cheval, et lavées entièrement avec du PBS. 200 µl de tampon de citrate (0,1 M, pH 4,5) contenant 1 mg/ml d'un substrat (o-phénylènediamine) et 0,4 µl/ml d'une solution aqueuse d'eau oxygénée à 31 % ont été ajoutés
35 et laissés réagir pendant 30 minutes jusqu'à coloration.

On a effectué le clonage dans trois godets contenant les anticorps réagissant avec les cellules 8 PC 93 par la méthode de dilution limitante comme suit :

100 hybridomes issus de chacun des trois godets
5 positifs quant à la production de l'anticorps ont été mis en suspension dans du D-MEM-FBS et mélangés avec des cellules de rate obtenues à partir de souris BALB/c de la même manière que celle utilisée lors de la fusion des cellules et ajustés dans du D-MEM-FBS (10^8 cellules). On a
10 ajusté la concentration en cellules à 5×10^6 par ml en ajoutant du D-MEM-FBS et on a inoculé le mélange de cellules dans chaque godet de la plaque à 96 godets (Falcon 3072) en une quantité de 0,2 ml chacun et on l'a cultivé. Le
15 quatorzième jour après l'amorçage de la culture, on a examiné la production de l'anticorps dans chaque godet à l'aide de l'immunotest enzymatique en phase solide mentionné ci-dessus. 38 hybridomes producteurs d'anticorps ont été obtenus y compris 4 hybridomes indiqués dans le tableau 1 ci-dessous.

20 C. PRODUCTION DE L'ANTICORPS (CULTURE IN VITRO) : On a mis en suspension l'hybridome P-001, P-002, P-003, P-004 dans du D-MEM contenant 20 % de sérum bovin foetal, 2 mM de glutamine, 1 mM d'acide pyruvique, 4,5 g/l de glucose, du β -mercaptoéthanol 5×10^{-5} et 50 mg/l de sulfate de kanamycine à une concentration cellulaire de 1×10^5 par ml.
25 On a inoculé la suspension résultante (25 ml) dans un récipient de 75 cm^2 pour la culture du tissu (Corning, USA) et on a fait incubé dans un incubateur à 5 % de CO_2 à 37°C . Le quatrième jour, on a récupéré le liquide surnageant du
30 récipient à l'état de croissance stationnaire. Le nombre de cellules développées était approximativement de 2×10^6 par ml dans chaque hybridome et la teneur en anticorps des liquides surnageants était respectivement de 3,1 (P-001), 2,8 (P-002), 2,8 (P-003) et 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (P-004).

CULTURE IN VIVO : Du 10ème au 30ème jour après injection intrapéritonéale de 0,5 ml de pristane, on a inoculé à des souris BALB/c par voie intrapéritonéale, 5×10^6 de chaque hybridome T-001 à T-004, développé in vitro. Deux ou trois
5 semaines après, on a récupéré les ascites et on les a centrifugés à 100 x g, 4°C, 15 minutes pour obtenir le liquide surnageant ascitique en une quantité de 30 ml environ pour chaque hybridome provenant de 10 souris. La teneur en anticorps des liquides surnageants était respectivement de
10 2,5 (P-001), 2,0 (P-002), 1,5 (P-003) et 1,8 mg/ml (P-004).

Ces anticorps ont été administrés à des souris ICR (10 animaux dans chaque groupe) en une quantité de 2 g/kg par voie orale, 400 mg/kg par voie intrapéritonéale ou 200 mg/kg par voie intraveineuse et on a observé les
15 souris pendant 14 jours. On n'a observé aucune mort due à l'anticorps.

Par ailleurs, les formes des hybridomes P-001 à P-004 étaient approximativement sphériques, leurs dimensions étaient de 10-20 μ , la plupart étant de 15 μ environ,
20 et les hybridomes flottaient et adhéraient faiblement à la paroi du récipient.

EXEMPLE 2 : PROPRIETES DE L'ANTICORPS CONTRE LA CELLULE DU CANCER HUMAIN DE LA PROSTATE.

A. COMPARAISON DE LA REACTIVITE AVEC D'AUTRES CELLULES.

25 On a utilisé l'immunotest enzymatique en phase solide de l'exemple 1 pour examiner les réactivités des liquides surnageants obtenus dans l'exemple 1 avec d'autres cellules repiquées in vitro ; Intestin 407 (lignée de cellules de l'intestin humain foetal), K 562 (lignée de cel-
30 lules leucémiques humaine) et Bri 7 (lignée de cellules lymphocytes du sang périphérique humain), de même que 8 PC 93 (lignée de cellules du cancer de la prostate humaine). Comme on le voit dans le tableau 1 ci-dessous, les anticorps sécrétés par les hybridomes étaient hautement
35 spécifiques vis-à-vis de 8 PC 93.

B. COLORATION DE LA CELLULE PAR LA TECHNIQUE DE L'ANTICORPS FLUORESCENT.

Les cellules 8 PC 93 ont été colorées par la technique de l'anticorps fluorescent indirecte en utilisant l'anticorps sécrété par l'hybridome P-002. A savoir, les cellules 8 PC 93 ont été fixées sur une lamelle de verre sans fluorescence, ont réagi avec le liquide surnageant (50 µl) à 37°C pendant 45 minutes en atmosphère humide et ont été lavées en les traitant pendant 3 à 5 minutes par une solution de PBS contenant 1 % d'albumine de sérum de bovin, 10 mM de HEPES (acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanésulfonique) et 0,1 % de nitrate de sodium, ce procédé de lavage étant répété trois fois. La réaction a encore été réalisée dans les mêmes conditions pendant 45 minutes avec 50 µl d'une solution diluée 20 fois de IgG anti-souris liée à de la fluorescéine (Miles-Yoda Ltd, Israël, Code N° 65-171) et on a réalisé le procédé de lavage de la même manière que mentionné ci-dessus. Après séchage, la solution de glycérine tamponnée au carbonate (0,05 M, pH 9,5, 10 % de glycérine) a été mise de côté et on a placé un couvercle en verre dessus pour faire une observation au moyen du microscope de fluorescence (Olympus, Japon, modèle AH-RFL-LB). On a observé une forte fluorescence à la surface de la cellule 8 PC 93. On a utilisé l'IgG anti-souris liée à la fluorescence après l'avoir soumise six fois à l'absorption avec la cellule 8 PC 93.

C. IDENTIFICATION DES CLASSES D'IMMUNOGLOBULINE.

On a identifié les classes des immunoglobulines des anticorps sécrétés par les hybridomes P-001 à P-004 par l'immunotest enzymatique en phase solide qui utilise l'anti-immunoglobuline (Ig), anti-IgG et anti-IgM (Cappel Lab. Inc, USA, Catalogue N° 3211-0231, 3211-0081, 3211-0201) comme anticorps immunoglobuline anti-souris lié à la peroxydase. Comme on le voit dans le tableau 1 ci-après, tous les anticorps examinés étaient des IgG.

TABLEAU 1

Hybridome	SPECIFICITE				Classe de l' Immunoglobuline
	Cancer hu- main de la prostate 8PC93	Intestin foetal humain I-407	Leucémie humaine K-562	Lymphocyte périphérique humain Bri 7	
P-001	+++	+	+	-	IgG
P-002	++	-	-	-	IgG
P-003	++	-	+	-	IgG
P-004	++	-	-	-	IgG

+ : positif - : négatif

EXEMPLE 3 : IDENTIFICATION DU CANCER DE LA PROSTATE PAR
L'ANTICORPS.

(1) SUJET : Un tissu contenant des cellules de cancer de la prostate obtenu par une opération chirurgicale a été
5 coagulé avec de l'alcool à 95 % enrobé dans de la paraffine pour préparer un échantillon de 4 μ m.

(2) IDENTIFICATION : Les identifications ont été effectuées par une technique d'anticorps fluorescent utilisant des anticorps (liquide surnageant ascitique) sécrétés par
10 l'hybridome P-002.

A savoir, on a ajouté à l'échantillon de tissu 0,1 ml de la solution, diluée 100 fois, de l'anticorps sus-mentionné et on a fait incuber à la température ambiante pendant une heure. Après avoir lavé complètement
15 avec du PBS, on a ajouté 0,1 ml de l'IgG anti-souris liée à de la fluorescéine (Miles, USA) diluée 100 fois et on l'a fait incuber à la température ambiante pendant une heure. Après avoir éliminé par lavage avec du PBS, l'IgG anti-souris lié à la fluorescéine n'ayant pas réagi, on a
20 observé la fluorescence sur chaque échantillon de tissu de sujet de la lamelle de verre au moyen d'un microscope de fluorescence (Olympus Vanox, Olympus, Japon). On n'a observé presque pas de fluorescence sur un tissu normal tandis qu'on a observé une forte fluorescence sur le tissu
25 du cancer de la prostate. Dans le but d'éviter une liaison non spécifique, l'IgG anti-souris liée à la fluorescéine a été traitée préalablement par absorption avec la lignée de cellules 8 PC 93 du cancer de la vessie humain.

EXEMPLE 4 :

30 (1) MARQUAGE PAR LA PEROXYDASE DE L'ANTICORPS SECRETE PAR
L'HYBRIDOME P-002.

On a dissous dans 1 ml d'eau distillée 4 mg de peroxydase de Raifort (Sigma Type VI, Sigma, USA) et on a ajouté 60 μ l d'une solution de Na IO₄ 0,1M préparée immé-
35 diatement avant l'emploi, et on a mélangé à la température

ambiante pendant 20 minutes. On a dialysé la solution résultante pendant toute la nuit contre un tampon à 1 mM d'acétate de sodium (pH 4,4) et on a ajouté 20 µl de solution de carbonate de sodium 0,2 M. Tout de suite après, 5 on a ajouté l'anticorps sécrété par l'hybridome P-002 (liquide surnageant ascitique purifié teneur en protéine de 10 mg) dissous dans 1 ml de tampon de carbonate 0,01 M (pH 9,5) et on l'a maintenu à la température ambiante pendant deux heures tout en agitant. Après réaction, on a 10 ajouté 0,1 ml de solution aqueuse de NaBH₄ fraîchement préparée (4 mg de NaBH₄ dissous dans 1 ml d'eau distillée) et on l'a laissée reposer à 4°C pendant deux heures et dialysée la nuit contre du PBS.

La solution mélangée résultante a été envoyée 15 sur une colonne de Sephadex G-100^(R) (Pharmacia, Suède), éluée avec du PBS et on a récupéré la première fraction dont les absorbances à 280 nm et 403 nm correspondaient entre elles. A 1 ml de la fraction (produit de liaison anticorps-enzyme), on a ajouté 10 mg d'albumine de sérum 20 de lapin pour la dissolution et on l'a conservée à -70°C jusqu'à utilisation.

(2) MARQUAGE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DE L'ANTICORPS
SECRETE PAR L'HYBRIDOME P-002.

5 mg de phosphatase alcaline de type VII (Sigma, 25 USA), dialysée au préalable contre du PBS pour éliminer complètement le sulfate d'ammonium, et 17 mg d'anticorps sécrété par l'hybridome P-002 ont été dissous dans du PBS ramené à un volume total de 1 ml. A la solution résultante, on a ajouté 10 µl d'une solution de glutaraldéhyde à 20 % 30 et on a agité à la température ambiante pendant deux heures. Après réaction, on a envoyé le mélange réactionnel sur une colonne de Sephadex G-200^(R) (Pharmacia, Suède) complété avec du tampon tris-HCl (pH 7,6) et on l'a élué à l'aide du même tampon. On a collecté une fraction de poids molé- 35 culaire élevé, du volume vide au point d'élution de l'IcG,

on lui a ajouté jusqu'à 5 % (v/v) d'albumine de sérum de bovin, on l'a stérilisée par passage sur un filtre millipore (0,22, Millipore, USA) et l'a conservée à 4°C dans le noir jusqu'à utilisation.

5 (3) MARQUAGE PAR LA β -GALACTOSIDASE DE L'ANTICORPS SECRETE PAR L'HYBRIDOME P-002.

L'anticorps sécrété par l'hybridome P-002 a été marqué avec de la β -galactosidase selon le procédé de (2) ci-dessus. La β -galactosidase utilisée était du type Sigma
10 qualité IV (Sigma, USA).

(4) MARQUAGE PAR I¹²⁵ DE L'ANTICORPS SECRETE PAR L'HYBRIDOME P-002.

A 10 μ l de solution de NaI¹²⁵ à 100 mCi/ml (exempt de support, Amersham, USA), on a ajouté 50 μ l de la solution
15 d'anticorps sécrété par l'hybridome P-002 (liquide surnageant ascitique purifié, teneur en protéine de 1,0 mg/ml), et 30 μ l de tampon phosphate 0,5 M (pH 7,2) contenant 0,30 mg/ml de chloramine T et on a mélangé avec soin. 15 secondes après, on a ajouté 100 μ l de PBS saturé avec de la L-
20 tyrosine et on a mélangé tout de suite. On a chromatographié le mélange résultant sur une colonne chargée avec de l'Amberlite IRA 400 et on l'a élué avec du PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin. La fraction éluee a été
récupérée et conservée à 4°C jusqu'à utilisation. L'activité spécifique du produit marqué était de 1,0 μ Ci par mg
25 de protéine d'anticorps.

(5) MARQUAGE PAR LA FLUORESCÉINE DE L'ANTICORPS SECRETE PAR L'HYBRIDOME P-002.

A 1 ml de solution de l'anticorps sécrété par
30 l'hybridome P-002 (liquide surnageant ascitique purifié) à une concentration de 10 mg/ml, on a ajouté 0,1 ml de tampon carbonate 0,5 M (pH 9,3), on a ajouté encore 0,1 mg de poudre d'isothiocyanate de fluorescéine et on a agité à 4°C pendant 6 heures sans faire barboter. Immédiatement
35 après réaction, on a envoyé le mélange réactionnel sur une

colonne Sephadex G-25^(R) (Pharmacia, Suède) pour éliminer les substances de bas poids moléculaire n'ayant pas réagi et on a obtenu la fraction de poids moléculaire élevé désirée. Le produit obtenu a été conservé à 4°C dans le noir jusqu'à utilisation.

(6) MARQUAGE PAR LA TETRAMETHYLRHODAMINE DE L'ANTICORPS SECRETE PAR L'HYBRIDOME P-002.

A 1 ml de solution à 10 mg/ml de l'anticorps sécrété par l'hybridome P-002 (liquide surnageant ascitique purifié), on a ajouté 0,1 ml de tampon carbonate de tétraméthylrhodamine-isothiocyanate et on a agité à 4°C pendant 20 heures sans barbotage. Après réaction, le mélange réactionnel a été immédiatement envoyé sur une colonne Sephadex G-25^(R) (Pharmacia, Suède) pour éliminer les substances de bas poids moléculaire n'ayant pas réagi et on a obtenu la fraction de poids moléculaire élevé désirée. Le produit a été conservé à 4°C dans le noir avant utilisation.

(7) MARQUAGE PAR LA BIOTINE DE L'ANTICORPS SECRETE PAR L'HYBRIDOME P-002.

1 mM de d-biotine (244 mg) (Walko Pure Chemical Industries, Ltd., Japon) et 1,5 mM de N-hydroxysuccinimide (173 mg) (Eastam Kodak, USA) ont été dissous dans un mélange de 8 ml de diméthylsulfoxyde (Walko Pure Chemical Industries, Ltd., Japon) et de 5 ml de 1,2-diméthoxyéthane (Nakarai Chemical, Japon). A la solution résultante, on a ajouté une solution de 206 mg (1 mM) de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (Kanto Chemical, Japon) dans 0,5 ml de 1,2-diméthoxyéthane et on laisse réagir à 4°C pendant la nuit. Le précipité résultant a été séparé par filtration pour obtenir un filtrat. On a éliminé sous vide le solvant contenu dans le filtrat et on a dissous le matériau huileux résiduel dans 10 ml de dichlorométhane (Walko Pure Chemical Industries, Ltd., Japon) et on a refroidi à 4°C. On a ajouté 10 ml d'une solution de NaHCO₃ 0,1 M (4°C) et on a agité pour bien mélanger. On a éliminé la phase dichlorométhane

résultante, on a ajouté 10 ml de NaHCO_3 0,1 M et puis 10 ml d'eau distillée à 4°C, et on a répété encore ces procédures. On a ajouté la phase dichlorométhane résultante à de la poudre anhydre de sulfate de sodium (Koizumi Chemical, Japon) pour la déshydrater. On a séparé la poudre par filtration et on a ajouté progressivement du m-hexane au filtrat à rendre trouble. On a refroidi la solution à -20°C, on a placé le cristal précipité dans un dessiccateur pour éliminer le solvant et le faire sécher. On a obtenu le produit, l'ester de biotine-N-hydroxysuccinimide.

On a dissous la biotine-N-hydroxysuccinimide dans du diméthylsulfoxyde et on a ajusté la concentration à 1 mg/ml. On a mélangé la solution (60 µl) avec 1 ml de solution de l'anticorps sécrété par l'hybridome T-006 (liquide surnageant ascitique purifié, teneur en protéine de 1 mg/ml) et on l'a fait réagir à la température ambiante pendant 4 heures. Après réaction, la solution a été dialysée contre du PBS à 4°C pendant trois jours. Pour cela, le liquide de dialyse a été changé trois fois. Le dialysat (solution dans le tube à dialyse) a été conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

EXEMPLE 5 : IDENTIFICATION DU CANCER DE LA PROSTATE PAR DES ANTICORPS MARQUES.

(1) SUJET : Des tissus contenant le cancer humain de la prostate ont été obtenus lors d'opérations chirurgicales. A savoir, les tissus bruts de 5 x 5 x 2 mm de dimensions ou moins sont fixés tout en agitant à 4°C pendant 6 heures dans un liquide de fixation PLP (tampon de phosphate de sodium, pH 6,2, contenant 0,01 M de NaIO_4 , 0,075 M de lysine et 3 % de paraformaldéhyde). Les tissus fixés ont été lavés en les traitant avec du PBS contenant 10 % de sucrose (4°C, pendant la nuit), du PBS contenant 15 % de sucrose (4°C, 6 heures), du PBS contenant 20 % de sucrose (4°C, 6 heures) et ensuite dans du PBS contenant 20 % de sucrose et 10 % de glycérine (4°C, une heure) successivement.

Après avoir été lavé, le tissu a été enrobé, congelé dans de l'éthanol-glacé sec et soumis à un cryostat pour obtenir un specimen congelé de 10 μ m.

(2) METHODE D'IDENTIFICATION : On a placé l'échantillon
5 congelé sur une lame porte-objet revêtue d'albumine de sérum bovin et on l'a séché. Après avoir été lavé trois fois avec du PBS à 4°C pendant 5 minutes, on a fait réagir l'échantillon avec de l'acide periodique 0,005 M à la température ambiante pendant 10 minutes. Après avoir lavé trois fois
10 avec du PBS maintenu à 4°C, on a traité l'échantillon à la température ambiante pendant 10 minutes avec du PBS contenant 10 % de sérum de cheval. On a placé sur l'échantillon à l'aide d'une pipette capillaire la solution de l'anticorps diluée 10 fois, issue de l'hybridome P-002
15 par de la peroxydase, de la phosphatase alcaline, de la fluorescéine, de la rhodamine ou de la biotine préparée dans l'exemple 4 et on l'a fait réagir à la température ambiante pendant 45 minutes et ensuite lavé cinq fois avec du PBS à 4°C. L'échantillon obtenu a été identifié de la
20 manière suivante.

(a) METHODE DE L'ANTICORPS FLUORESCENT : Dans les anticorps marqués par la rhodamine et par la fluorescéine, l'échantillon a été noyé dans la glycérine et observé sous un microscope à fluorescence (Olympus Vanox, Olympus, Japon).
25 Dans l'anticorps marqué à la biotine, une goutte d'avidine à 5 μ g/ml liée à de la fluorescéine (Funakoshi Yakuhin, Japon) a été ajoutée sur l'échantillon et on l'a faite réagir à 37°C pendant 1 heure. Après avoir lavé cinq fois avec du PBS, l'échantillon qui a réagi a été noyé
30 dans la glycérine et examiné sous un microscope à fluorescence (Olympus Vanox, Olympus, Japon).

(b) IMMUNOTEST ENZYMATIQUE : Dans l'anticorps marqué à la peroxydase, on a fait réagir l'échantillon avec un tampon de tris-HCl 0,1 M (pH 7,6) contenant 0,02 ml/ml de H_2O_2
35 à 1 % et 0,5 mg/ml de 3,3-diaminobenzidine-HCl à la tem-

pérature ambiante pendant 10 minutes. Après réaction, on a lavé l'échantillon qui a réagi avec du PBS, à 4°C, trois fois, et avec de l'eau distillée une fois. Après l'avoir coloré avec du tampon véronal-acétate (pH 4,0) contenant
5 1 % de vert de méthyle, l'échantillon a été déshydraté par l'éthanol, dialysé par du xylol, enrobé dans du baume et on a observé la couleur (brun) au microscope.

Dans l'anticorps marqué par la phosphatase alcaline, on a fait réagir l'échantillon avec du tampon tris-
10 HCl 0,2 M (pH 8,5) filtré immédiatement après utilisation) contenant du sulfate de magnésium 0,39 M, 0,2 % de citrate de plomb, 0,6 % d'acide glycérophosphorique et 4 % de sucrose à la température ambiante pendant 10 minutes. Après réaction, l'échantillon ayant réagi a été lavé trois fois
15 avec du PBS maintenu à 4°C et puis une fois avec de l'eau distillée. On a fait réagir ensuite l'échantillon dans une solution à 1 % de sulfure d'ammonium jaune à la température ambiante pendant 5 minutes, on l'a lavé complètement avec
20 du PBS, incorporé dans de la glycérine et on a observé la couleur (brun noir) au microscope.

Ces résultats sont indiqués dans le tableau 2.

25

30

35

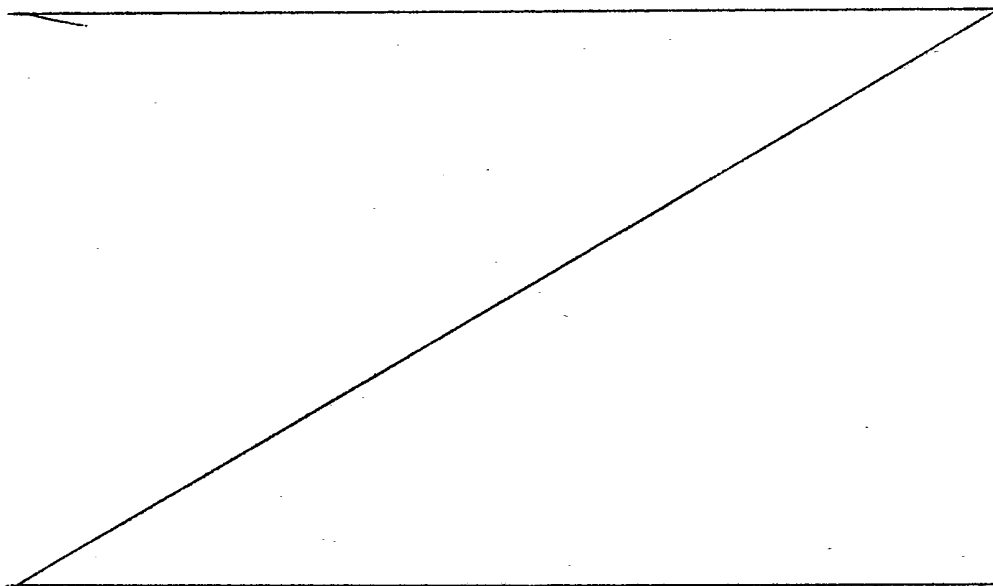


TABLEAU 2

Méthode	Marquage de l'anticorps	Réactivité	
		tissu cancéreux	tissu normal
Procédé de l'an- ticorps fluores- cent	Fluorescéine	+	-
	Rhodamine	+	-
	Biotine	+	-
Immuno- test enzyma- tique	Peroxydase	+1	-
	Phosphatase alcaline	+2	-

+ : fluorescence positive

+1 : observé brun

+2 : observé brun noirâtre

- : négatif

EXEMPLE 6 : IMAGE SCINTIGRAPHIQUE DE LA CELLULE CANCEREUSE
PAR L'ANTICORPS.

Une lignée de cellules 8 PC 93 (1×10^7 cellules) de cancer humain de la prostate a été transplantée par voie sous-cutanée dans la cuisse droite de souris BALB/c nu/nu femelles âgées de 8 semaines (trois animaux dans chaque groupe). 30 jours après, la dimension de la tumeur était de 1 cm^2 ou plus et on a injecté par voie intraveineuse l'anticorps marqué à l' I^{125} sécrété par l'hybridome P-002, préparé dans l'exemple 4, en une quantité unitaire de 35 μCi par souris ou l'IgG de souris marquée à l' I^{125} pour comparaison en une quantité unitaire de 10 μCi par souris. 96 heures après, on a réalisé à l'aide d'une caméra gamma la scintigraphie du corps entier.

On a observé sur la tumeur une remarquable accumulation de radioactivité chez tous les animaux auxquels on avait administré l'anticorps marqué à l'I¹²⁵ de l'invention tandis qu'on a observé moins d'accumulation chez les animaux témoins.

EXEMPLE 7 : MARQUAGE DE L'ANTICORPS PAR LE CHLORHYDRATE DE DOXORUBINE OU DE MITOMYCINE.

Après avoir ajusté à 10,4 mg/ml par addition d'eau distillée, on a ajouté à l'anticorps (liquide surnageant ascitique purifié) issu de l'hybridome P-001, P-002, P-003 ou P-004, 13,0 mg de mitomycine, et ensuite on a ajouté de l'acide chlorhydrique tout en agitant afin d'ajuster le pH de la solution à 4,75 et simultanément 3,7 mg de chlorhydrate de 1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide. Après avoir fait réagir pendant 10, 30 ou 60 minutes, on a arrêté la réaction en ajoutant 2 ml de tampon d'acétate (pH 4,70). On a ensuite dialysé le mélange réactionnel contre 5 litres d'eau distillée à 4°C pendant 72 heures tout en changeant trois fois la solution de dialyse. Après avoir concentré, le dialysat a été envoyé sur une colonne de 1,5 cm de diamètre et 55 cm de hauteur chargée en Sephadex G-25^(R) (Pharmacia, Suède) afin d'éliminer complètement les substances de bas poids moléculaires. Afin d'obtenir le produit de liaison mitomycine-anticorps, la solution résultante a été lyophilisée à -20°C. Les proportions de liaison de la mitomycine dans les produits par mg d'anticorps sont indiqués dans le tableau 3.

Les produits de liaison du chlorhydrate de doxorubicine avec les anticorps ont été obtenus de la même manière que mentionné ci-avant. Les proportions de liaison du chlorhydrate de doxorubicine dans les produits par mg d'anticorps sont indiqués dans le tableau 3.

D'autre part, ces produits de liaison (60 minutes de réaction) d'agent anticancéreux avec l'anticorps ont été administrés à des souris IRC de groupes de 10 animaux cha-

cun en une quantité unitaire de 400 mg/kg par voie orale, 100 mg/kg par voie intrapéritonéale ou 50 mg/kg par voie intraveineuse. Aucun décès n'a été observé pendant 14 jours.

5

TABLEAU 3

Agent anticancéreux	Anticorps	Taux de liaison (µg/mg)		
		10 minutes	30 minutes	60 minutes
mitomycine	dérivé de P-001	4	8	10
	" P-002	3	8	11
	" P-003	4	7	10
	" P-004	4	8	10
chlorhydrate de doxorubicine	dérivé de P-001	4	9	11
	" P-002	4	8	10
	" P-003	3	8	10
	" P-004	4	9	10

EXEMPLE 8 : EFFET ANTITUMEUR IN VITRO DE L'ANTICORPS.

Pour examiner l'effet antitumeur de l'anticorps, ou du produit de liaison avec l'agent anticancéreux préparé dans l'exemple 7, on a utilisé une lignée de cellules 8 PC 93 de cancer de la prostate humain repiquées in vitro. A savoir, on a ajusté les cellules avec du MEM de Eagle contenant 10 % de sérum bovin foetal à une concentration cellulaire de 5×10^4 par ml, on les a placées dans une boîte de pétri en des fractions de 5 ml chacune, et on les a fait incuber à 37°C pendant 24 heures dans un incubateur à 5 % de CO₂. L'anticorps issu de l'hybridome P-004 ou l'anticorps lié à la mitomycine issu de l'hybridome P-004 (produit d'une réaction de 60 minutes) a été ajouté dans la boîte et cultivé ultérieurement. 24 heures après l'addi-

tion du médicament, on a ajouté 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de L-(U- C^{14}) leucine (RCC, USA, radioactivité spécifique de 342 mCi/m mole) au mélange réactionnel et on a fait incubé pendant deux heures. Après culture, on a éliminé le milieu de culture et on a lavé les cellules trois fois avec du PBS (pH 7,2) et on les a refroidies à 0°C, traitées avec une solution d'acide trichloracétique à 5 % et on a transféré les cellules lavées sur un filtre en papier et on les a séchées. On a mesuré la radioactivité incorporée dans la protéine cellulaire à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Packard, USA).

Les résultats sont indiqués dans la figure 1. Dans la figure 1, l'ordonnée représente la quantité de radioactivité (C^{14} -leucine) en pourcentage de la quantité incorporée par le témoin non traité.

Comme on observe dans la figure 1, la concentration indiquant 50 % d'inhibition de l'incorporation de la radioactivité a été diminuée par le produit de liaison de l'anticorps et de la mitomycine par rapport au témoin.

20 EXEMPLE 9 : EFFET ANTITUMEUR IN VIVO DE L'ANTIGENE.

Une lignée de cellules 8 PC 93 (6×10^5 cellules par animal) de cancer de la prostate humain a été transplantée par voie intrapéritonéale à des souris BALB/c nu/nu femelles par groupes de 10 animaux chacun. 5 et 72 heures après, l'anticorps sécrété par l'hybridome P-004 ou le produit de liaison avec la mitomycine de l'anticorps issu de P-004 (produit de réaction de 60 minutes, 50 $\mu\text{g/ml}$ de mitomycine) a été injecté par voie intrapéritonéale aux souris en une quantité unitaire de 500 μg par souris (20 μg de mitomycine par souris) et la proportion de survivants a été observée pendant 60 jours pour estimer l'activité antitumeur du médicament administré.

Les résultats sont indiqués dans la figure 2. Dans la figure 2, l'ordonnée représente le taux de survivant (%) et l'abscisse représente le nombre de jours après

transplantation des cellules tumorales.

Comme on peut observer à partir de la figure 2,
le nombre de jours pour lequel 50 % des animaux survécurent
a été prolongé par le produit de liaison mitomycine-anti-
5 gène. De plus, on a observé aussi la prolongation de la
durée de vie par l'administration de l'antigène seul.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour préparer un anticorps contre l'antigène de surface d'une cellule de cancer de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend la préparation d'un
5 hybridome entre une cellule capable de produire l'anticorps et une cellule qui peut être conservée de façon permanente par repiquage in vitro et la récupération de l'anticorps sécrété par l'hybridome.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel
10 la cellule capable de produire l'anticorps est une cellule de rate, une cellule de ganglion lymphatique, une cellule leucocyte de sang périphérique ou un mélange de celle-ci.
3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la cellule est dérivée d'une souris.
- 15 4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel la souris est une souris BALB/c ou une souris hybride de celle-ci.
5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la cellule qui peut être conservée de manière permanente
20 par repiquage in vitro est une cellule de myélome.
6. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la cellule qui peut être conservée de manière permanente par repiquage in vitro est déficiente en hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase ou en thymidine kinase.
- 25 7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, dans lequel la cellule est dérivée d'une souris.
8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel la cellule est dérivée de la lignée de cellules P3-X63-Ag8, P3/NSI/1-Ag4-1, Sp2/O-Ag14 ou X63-Ag8.653.
- 30 9. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la cellule capable de produire l'anticorps est dérivée d'un animal immunisé avec la cellule de cancer de la prostate humaine.
10. Procédé selon la revendication 1, dans lequel
35 l'hybridome est préparé en présence de polyéthylèneglycol.

11. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'hybridome est cultivé dans un milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine pour la sélection.

5 12. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'hybridome est cloné pour obtenir un clone unique.

13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel le clonage est réalisé par culture de dilution limitante, par culture sur gélose molle ou par culture sur gel
10 de fibrine.

14. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'hybridome est cultivé in vitro pour la sécrétion de l'anticorps.

15 15. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'hybridome est transplanté dans un animal et cultivé in vitro et l'anticorps sécrété est séparé d'un fluide corporel de l'animal.

16. Procédé selon la revendication 15, dans lequel le fluide corporel est le sérum ou l'ascite.

20 17. Procédé selon la revendication 15 ou 16, dans lequel l'animal est une souris.

18. Procédé selon la revendication 17, dans lequel la souris est une souris BALB/c ou une souris hybride de celle-ci.

25 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, dans lequel la cellule du cancer de la prostate humain est la lignée de cellules du cancer de la prostate humain 8 PC 93.

20. Hybridome produisant un anticorps contre
30 l'antigène de surface d'une cellule du cancer de la prostate humain, préparé à partir d'une cellule capable de produire l'anticorps et une cellule qui peut être conservée de façon permanente par repiquage in vitro.

21. Hybridome selon la revendication 20 qui est
35 P-001, P-002, P-003 ou P-004.

22. Anticorps contre l'antigène de surface d'une cellule du cancer de la prostate humain, préparé selon le procédé de la revendication 1.

23. Anticorps selon la revendication 22 qui est
5 sécrété par l'hybridome P-001, P-002, P-003 ou P-004.

24. Réactif pour la classification et/ou l'identification du cancer de la prostate humain, qui contient un ou plusieurs anticorps selon la revendication 22.

25. Réactif selon la revendication 24, qui con-
10 tient de plus un support ou un diluant.

26. Réactif selon la revendication 24, dans lequel le cancer de la prostate humain est la lignée de cellules du cancer de la prostate humain 8 PC 93.

27. Réactif selon la revendication 24 pour l'i-
15 dentification du cancer de la prostate de l'homme ou d'un animal.

28. Dérivé ou produit de restriction de l'anticorps selon la revendication 22.

29. Dérivé selon la revendication 28, dans lequel
20 une substance radioactive, un colorant fluorescent, une enzyme, une substance de marquage pour la microscopie électronique ou un groupe résiduel contenant une structure pour la combinaison secondaire de celui-ci est lié(e) chimiquement à l'anticorps.

30. Produit de restriction selon la revendication 28, qui est obtenu par clivage restrictif de l'anticorps par un traitement chimique ou un traitement enzymatique.

31. Dérivé selon la revendication 29, dans lequel la substance radioactive est ¹²⁵I.

32. Dérivé selon la revendication 29, dans lequel
30 le colorant fluorescent est la fluorescéine ou la rhodamine.

33. Dérivé selon la revendication 29, dans lequel l'enzyme est la peroxydase ou la phosphatase alcaline.

34. Dérivé selon la revendication 29, dans lequel
35 la structure est la biotine.

35. Réactif pour la classification et/ou l'identification du cancer de la prostate humain, qui contient un ou plusieurs dérivés ou produits de restriction selon la revendication 28.

5 36. Réactif selon la revendication 35, qui contient de plus un support ou un diluant.

37. Procédé de classification et/ou d'identification du cancer de la prostate humain avec l'utilisation du réactif selon la revendication 24 ou 35.

10 38. Procédé selon la revendication 37, dans lequel un sujet contenant la cellule de cancer de la prostate humaine est en contact avec le réactif et on utilise la réaction antigène-anticorps.

15 39. Procédé selon la revendication 38, dans lequel le sujet est dérivé de l'homme ou d'un animal.

40. Agent pharmaceutique sous la forme de quantité unitaire pour le traitement du cancer de la prostate humaine contenant un ou plusieurs anticorps selon la revendication 22.

20 41. Agent selon la revendication 40, qui contient de plus un support ou un diluant.

42. Produit de liaison de l'anticorps selon la revendication 22 avec un agent anti-cancer.

25 43. Produit selon la revendication 42, dans lequel l'agent anti-cancer est le chlorhydrate de mitomycine ou de doxorubicine.

44. Agent pharmaceutique pour le traitement du cancer de la prostate humaine contenant un ou plusieurs produits de liaison selon la revendication 42.

30 45. Agent pharmaceutique selon la revendication 40 ou 44, qui est sous la forme d'une préparation injectable.

Fig. 1

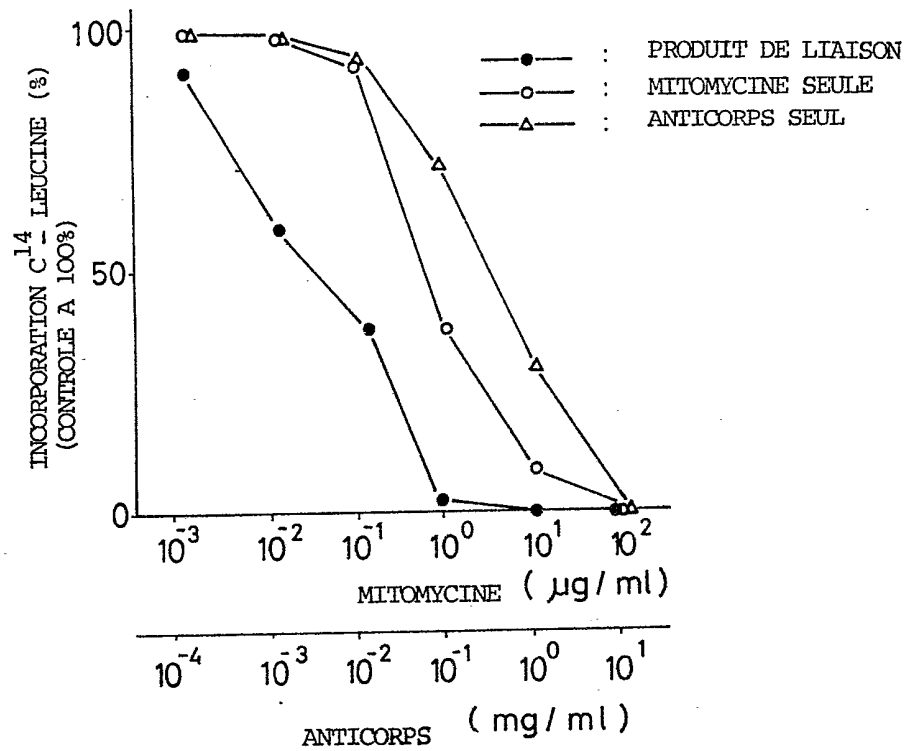


Fig. 2

