

Den foreliggende opfindelse angår monoklonale antistoffer mod antigener fra humane carcinomaceller, en fremgangsmåde til fremstilling deraf, anvendelse af de monoklonale antistoffer samt membranassocierede antigener fra 5 carcinomaceller fra humant epitel.

Teknikken til immunisering med definerede, isolerede antigener og produktionen af antistoffer imod sådanne antigener er kendt. Det er også kendt at immunisere med urensset antigenmateriale og selektere de antistoffer, der erkender 10 en bestemt komponent i en sådan antigenblanding.

Ved et forsøg på at inducere sådanne antistoffer er det lykkedes at selektere monoklonale antistoffer, der under ikke-reducerende betingelser reagerer med følgende proteinantigener: antigen 1: Molekylvægt (MW) $33 \text{ kD} \pm 3$, antigen 2: 15 MW $134 \text{ kD} \pm 3$, antigen 3: MW $80 \text{ kD} \pm 3$, antigen 4: $55 \text{ kD} \pm 3$, antigen 5: $60 \text{ kD} \pm 3$, antigen 6: $54 \text{ kD} \pm 3$, antigen 7: $260 \text{ kD} \pm 3$, antigen 8: ikke bestemmelig, antigen 9: ikke bestemmelig, antigen 10: MW $143 \text{ kD} \pm 3$, $119 \text{ kD} \pm 3$, antigen 11: MW 178 ± 3 , antigen 12: MW ikke bestemmelig, antigen 20 13: MW $34 \text{ kD} \pm 3$, antigen 14: MW $195 \text{ kD} \pm 3$, antigen 15: MW $44 \text{ kD} \pm 7$, antigen 16: MW $43 \text{ kD} \pm 3$, antigen 17: MW $130 \text{ kD} \pm 3$.

De på antigenerne 1-17 af antistofferne 1-17 erkendte epitoper er følsomme på forskellig måde overfor en behandling 25 med dithiothreitol (50 mmol/liter, 2 timer, 37°C). Epitoperne på Ag1, 2 og 15 forandres ved ovennævnte behandling, epitoperne på Ag4, 10 og 14 forbliver uændret.

In vitro specificiteterne af antistofferne 1-17 er anført i tabel I.

30 De monoklonale antistoffer ifølge opfindelsen er ejendommelige ved, at de bindes til et membranassocieret antigen fra carcinomaceller fra humant epitel, hvor antigenerne er valgt blandt et antigen (Ag1) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis $33 \pm 3 \text{ kD}$, et antigen (Ag2) med en molekylvægt på 35 tilnærmelsesvis $134 \pm 3 \text{ kD}$, et antigen (Ag3) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis $80 \pm 3 \text{ kD}$, et antigen (Ag4) med en

molekylvægt på tilnærmelsesvis 55 ± 3 kD, et antigen (Ag5) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 60 ± 3 kD, et antigen (Ag6) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 54 ± 3 kD, et antigen (Ag7) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 260 ± 3 kD, et antigen (Ag8) med en ikke bestemmelig molekylvægt, et antigen (Ag9) med en ikke bestemmelig molekylvægt, et antigen (Ag10) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 143 ± 3 kD og 119 ± 3 kD, et antigen (Ag11) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 178 ± 3 kD, et antigen (Ag12) med en ikke bestemmelig molekylvægt, et antigen (Ag13) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 34 ± 3 kD, et antigen (Ag14) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 195 ± 3 kD, et antigen (Ag15) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 44 ± 7 kD, et antigen (Ag16) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 43 ± 3 kD eller et antigen (Ag17) med en molekylvægt på 130 ± 3 kD, hvilke antistoffer med de i tabel I angivne cellelinier udviser de specifikke reaktionsmønstre og er fremstillet ved immunisering af pattedyr med humane, in vitro dyrkede cellelinier, celleekstrakter eller ekstrakter fra humane væv.

Antigenet ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved, at det er et membranassocieret antigen fra carcinomaceller fra humant epitel, og at det har en molekylvægt på 33 ± 3 kD (Ag1) eller 134 ± 3 kD (Ag2), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 80 ± 3 kD (Ag3), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 55 ± 3 kD (Ag4), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 60 ± 3 (Ag5), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 54 ± 3 kD (Ag6), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 260 ± 3 kD (Ag7), en ikke bestemmelig molekylvægt (Ag8), en ikke bestemmelig molekylvægt (Ag9), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 143 ± 3 kD og 119 ± 3 kD (Ag10), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 178 ± 3 kD (Ag11), en ikke bestemmelig molekylvægt (Ag12), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 34 ± 3 kD (Ag13), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 195 ± 3 kD (Ag14), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 44 ± 7 kD (Ag15), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 43 ± 3 kD (Ag16) eller en molekylvægt på 130 ± 3 kD (Ag17) og med specificitet for de monoklonale antistof-

fer ifølge opfindelsen.

Antigenerne 4, 8, 9 og 10 er Mycoplasma-antigener, der er til stede på de cellelinier, der er beskrevet i tabellen.

5 Som immunogen til induktion af antistoffer ifølge opfindelsen tjener humane in vitro-kultiverede cellelinier, celleekstrakter eller ekstrakter af humanvæv. Der foretrækkes permanente human-cellelinier, især CaLu-1-, Chago-, Oat 75-, PaTuII- og Bewo-cellelinien. Der kan også anvendes
10 Ag1-Ag17 til fremstilling af antistof 1 - antistof 17.

Pattedyr, fortrinsvis mus, immuniseres intraperitonealt med 1×10^6 - 10^8 celler, fortrinsvis 10^7 celler, fra en sådan cellelinie (dag 0-120, fortrinsvis på dag 0 og 7), og efter 1-150 dage, fortrinsvis på dag 11, fusioneres
15 ture 256, 495-497, 1975) miltcellerne fra sådanne dyr med cellelinien X63 Ag 8653 (The Journal of Immunology 173, 4, 1548-1550, 1979).

De efter 3 uger opståede hybridomer testes for indhold af antistoffer med den ønskede specificitet. I dette tilfælde
20 testes en palette med 30 in vitro-kultiverede cellelinier, humane perifere blodceller og human-knoglemarv ved hjælp af indirekte immunfluorescens (Behring Inst. Mitt. 59, 64-70, 1976) og cellesorteringsanalyse (Acta Cytol. 19, 374-377, 1975) (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77/8, 4914-4917, 1980)
25 for reaktivitet med antistofferne.

Overraskende nok befinder der sig blandt de testede, ovenstående hybridomvæsker nogle, der indeholder antistoffer med ovennævnte interessante specificitet. De hybridomer, der secernerer disse antistoffer, klones ved hjælp
30 af mikromanipulator, og de monoklonale antistoffer, der udvindes fra disse hybridomakloner, benyttes til at karakterisere det antigen, de erkender, immunkemisk. Hertil solubiliseres celle-"geister" (Hybridoma 1, 4, 413-421 (1982)), der udvindes fra vævskulturceller, ved hjælp af detergent
35 og ultracentrifugeres, og den således opnåede antigenblanding opdeles elektrophoretisk under ikke reducerende betingelser

i SDS-polyacrylamidgel (10 g/100 ml acylamid/0,026 g/100 ml bisacrylamid) (Nature, 127, 680-685 (1970)). Derefter overføres alle således opdelte antigener ved hjælp af elektro-
"blotting" fra SDS-gelen til et nitrocellulosefilter (Proc.
5 Natl. Acad. Sci., USA, 76, 4350-4354 (1979)). Derefter sker reaktionen af de antigener, der er immobiliseret på nitrocellulosefilteret, med det specifikke antistof (Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 363, 1133-1140 (1982)). Påvisningen af bindingen af dette antistof sker ved reaktion med ^{125}J -protein A og autoradiografi af filteret. Molekylvægten bestemmes
10 ved sammenligning med kommercielt tilgængelige markeringsstoffer.

En præparativ rensning af de tilsvarende antigener sker affinitetschromatografisk.

15 Nitrocellulosepapir (15 x 15 cm) (Hoppe-Seylers S. Physiol. Chem. 363, 1133-1140 (1982)) inkuberes efter befugtning med en fosfatpufferet kogsaltopløsning (PBS pH-værdi 7,2) med rensset monoklonalt antistof-protein (1 time, 4°C, 30 ml, 1-100 µg protein/ml). Derefter fjernes det ubundne
20 protein ved vask i 500 ml PBS. Efter inkubation af filteret i 1 time ved 40°C i 3 g/100 ml BSA (okseserumalbumin), 0,05 g/100 ml "Tween 20"[®] i PBS pH-værdi 7,2 (blokering) inkuberes filteret i 1 time ved 4°C efter tre gange vask med
25 PBS med urensede celleekstrakter, der er opløst i 0,5% natriumdeoxycholater, 20 mM phenylmethylsulfonylfluorid i PBS.

Derefter fjernes det ikke-bundne materiale ved hjælp af tre gange vask med PBS. Det specifikt bundne antigen løsnes ved inkubation af filteret i 1-9 M NH_4SCN , fortrinsvis 6 M NH_4SCN , i PBS i 5-30 minutter, fortrinsvis 15 minutter,
30 ved 4°C. Det således rensede antigen kan efter fjernelse af NH_4SCN (gelchromatografisk, dialyse) finde anvendelse som immunogen eller til andre formål.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at pattedyr immuniseres med celler fra en human cel-
35 lelinie dyrket in vitro, en celleekstrakt fra en sådan cel-
lelinie eller en ekstrakt fra et humant væv, miltceller

udtages fra et sådant immuniseret dyr, fusioneres med cel-
lelinie X 63 Ag 8653, hybridomen selektioneres, og det mono-
klonale antistof udvindes.

Opfindelsen angår også anvendelsen af de monoklonale
5 antistoffer ifølge opfindelsen som in vitro-diagnostiske
stoffer og som bærestoffer for farmaceutisk aktive forbin-
delser.

De på grund af deres reaktivitet med Ag1 og Ag2 ka-
rakteriserede monoklonale antistoffer kan anvendes som in
10 vitro-diagnostisk middel til at skelne mellem celler, der
stammer fra fast humant væv, og animalske celler. Endvidere
kan de finde anvendelse som positiv-kontrol for humant væv
i immunhistologien og til at skelne mellem animalske væv.

Forbundet med aktive stoffer kan AK1 til AK17 endvi-
15 dere anvendes til at finde målrettet til virkningsstedet,
f.eks. ved autolog knoglemarvstransplantation. Anvendelsen
af disse antistoffer til påvisning af det tilsvarende antigen
i legemsvæsker udgør en diagnostisk anvendelsesmulighed af
dette antistof. Antistofferne kan anvendes i koncentrationer
20 på 0,01 μ g til 1 mg/ml.

0

Reaktivitet af antistoffer 1-17 på in vitro-celler

| Afprøvede celler | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | |
|-------------------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| <u>Lungetumorcelle-</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | linier | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | CaLu-1 | + | + | | + | | | + | + | + | + | + | + | | | | - | |
| | E-14 | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | |
| | B 109/4 | + | + | | - | + | | | - | - | - | | - | - | | - | - | |
| | A 549 | + | + | | + | | | + | - | - | - | - | | | | | - | |
| 10 | Oat 75 | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + | - | + |
| | SHP-77 | + | + | - | + | | | + | + | + | | - | + | | | | - | |
| | Chago | + | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | |
| | Bro-Ca-Hoff | + | + | - | - | + | | - | - | | + | - | - | | | | - | |
| <u>Pankreastumor-</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | cellelinier | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pa Tu II | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | ± |
| | Pa Tu III | | + | - | + | | - | - | + | - | + | | + | - | | - | - | |
| | MIA-Pa-Ca 2 | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Panc-1 | + | + | - | + | - | + | + | - | | - | - | - | - | - | - | - | |
| 20 | <u>Gynækologiske</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | tumorcellelinier | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Bewo | + | - | + | + | + | + | + | | - | | - | - | + | + | - | + | |
| | HeLa | + | + | | + | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | + | |
| | Pa-1 | + | + | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | |
| 25 | <u>Melanomcelle-</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | linier | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Mel-ULF | + | + | - | + | - | + | + | - | ± | | - | + | - | + | - | + | + |
| | Mel-RPMI | + | + | - | + | - | + | + | - | + | | - | - | - | + | - | + | |
| | Mel-51-2 | + | + | - | + | - | - | - | - | ± | | - | - | - | - | - | + | |
| 30 | Mel-21-C-48 | + | + | - | + | + | - | + | - | + | | + | - | + | ± | - | + | + |
| <u>Ikke beslægtede</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| tumorcellelinier | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ZR-75-1 | + | + | - | | - | + | + | - | | | - | | + | - | - | | |
| 35 | MCF-7 | + | + | - | | + | - | - | - | - | | - | | - | - | - | - | |
| | Mamma-Ca-12 | + | | - | | - | + | + | | | | | | + | - | | | |
| | Colon-Ca-Ax | + | | - | | | | | - | | - | | | - | | | | |

0

+ = signifikant positiv reaktion i det indirekte immunfluorescens-forsøg, i radioimmunforsøg og i den cytofluormetriske analyse.

5

+ = svag positiv reaktion med en del af den afprøvede population.

- = ingen signifikant reaktion.

10

15

20

25

30

35

P A T E N T K R A V .

1. Monoklonale antistoffer mod antigener fra humane
carcinomaceller, k e n d e t e g n e t ved, at de bindes
5 til et membranassocieret antigen fra carcinomaceller fra
humant epitel, hvor antigenerne er valgt blandt et antigen
(Ag1) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 33 ± 3 kD, et
antigen (Ag2) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 134 ± 3
10 kD, et antigen (Ag3) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis
 80 ± 3 kD, et antigen (Ag4) med en molekylvægt på tilnærmel-
sesvis 55 ± 3 kD, et antigen (Ag5) med en molekylvægt på
tilnærmelsesvis 60 ± 3 kD, et antigen (Ag6) med en molekyl-
vægt på tilnærmelsesvis 54 ± 3 kD, et antigen (Ag7) med en
molekylvægt på tilnærmelsesvis 260 ± 3 kD, et antigen (Ag8)
15 med en ikke bestemmelig molekylvægt, et antigen (Ag9) med
en ikke bestemmelig molekylvægt, et antigen (Ag10) med en
molekylvægt på tilnærmelsesvis 143 ± 3 kD og 119 ± 3 kD, et
antigen (Ag11) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis $178 \pm$
3 kD, et antigen (Ag12) med en ikke bestemmelig molekylvægt,
20 et antigen (Ag13) med en molekylvægt på tilnærmelsesvis 34
 ± 3 kD, et antigen (Ag14) med en molekylvægt på tilnærmelses-
vis 195 ± 3 kD, et antigen (Ag15) med en molekylvægt på
tilnærmelsesvis 44 ± 7 kD, et antigen (Ag16) med en molekyl-
vægt på tilnærmelsesvis 43 ± 3 kD eller et antigen (Ag17)
25 med en molekylvægt på 130 ± 3 kD, hvilke antistoffer med de
i tabel I angivne cellelinier udviser de specifikke reak-
tionsmønstre og er fremstillet ved immunisering af pattedyr
med humane, in vitro dyrkede cellelinier, celleekstrakter
eller ekstrakter fra humane væv.

30 2. Antigen, k e n d e t e g n e t ved, at det er et
membranassocieret antigen fra carcinomaceller fra humant
epitel, og at det har en molekylvægt på 33 ± 3 kD (Ag1)
eller 134 ± 3 kD (Ag2), en molekylvægt på tilnærmelsesvis
 80 ± 3 kD (Ag3), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 55 ± 3
35 kD (Ag4), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 60 ± 3 (Ag5),
en molekylvægt på tilnærmelsesvis 54 ± 3 kD (Ag6), en mole-

kylvægt på tilnærmelsesvis 260 ± 3 kD (Ag7), en ikke bestemmelig molekylvægt (Ag8), en ikke bestemmelig molekylvægt (Ag9), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 143 ± 3 kD og 119 ± 3 kD (Ag10), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 178 ± 3 kD 5 (Ag11), en ikke bestemmelig molekylvægt (Ag12), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 34 ± 3 kD (Ag13), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 195 ± 3 kD (Ag14), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 44 ± 7 kD (Ag15), en molekylvægt på tilnærmelsesvis 43 ± 3 kD (Ag16) eller en molekylvægt på 130 ± 3 kD (Ag17) 10 og med specificitet for de monoklonale antistoffer ifølge krav 1.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af et monoklonalt antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pattedyr immuniseres med celler fra en human cellelinie dyrket 15 in vitro, en celleekstrakt fra en sådan cellelinie eller en ekstrakt fra et humant væv, miltceller udtages fra et sådant immuniseret dyr, fusioneres med cellelinie X 63 Ag 8653, hybridomen selektioneres, og det monoklonale antistof udvindes.

20 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at den humane cellelinie dyrket in vitro er en permanent cellelinie.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at pattedyrene er mus.

25 6. Anvendelse af et monoklonalt antistof ifølge krav 1 som et in vitro-diagnostisk stof.

7. Anvendelse af et monoklonalt antistof ifølge krav 1 som bærestof for en farmaceutisk aktiv forbindelse.