



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 297 418 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 K 15/28
C 12 N 5/20
G 01 N 33/577
G 01 N 33/532
A 61 K 39/395

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 07 K / 342 440 0	(22)	02.07.90	(44)	09.01.92
(31)	374,947	(32)	30.06.89	(33)	US

(71) siehe (73)
(72) Hellstrom, Ingegerd, SE; Hellstrom, Karl E., SE; Bruce, Kim F., US; Schreiber, George J., US
(73) Oncogen Limited Partnership, Seattle, Washington 98121, US

(54) Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen Humankarzinome

(55) Verfahren; Herstellung; Antikörper; monoklonale Antikörper; chimäre Antikörper; Antikörperfragmente; Antitumoraktivität; Human-Karzinome; Diagnose; Therapie; pharmazeutische Mittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen Human-Karzinome. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung den monoklonalen Maus-Antikörper BR96; einen chimären Human/Maus-Antikörper mit der Bezeichnung ChiBR96 sowie ein F(ab')₂-Fragment von BR96. Diese Antikörper reagieren mit einem Zellmembranantigen auf der Oberfläche von Human-Karzinomen. Die Antikörper zeigen ein hohes Maß an Selektivität gegenüber Karzinomzellen und besitzen die Fähigkeit zur Vermittlung der ADCC- und CDC-Aktivität. Außerdem werden die erfindungsgemäß hergestellten Antikörper in Karzinomzellen, an welche sie binden, eingeschleust und sind aus diesem Grunde besonders wertvoll für therapeutische Anwendungen wie z. B. als Antikörper-Komponente eines Antikörper-Wirkstoff- oder Antikörper-Toxin-Konjugates. Die Antikörper besitzen außerdem bereits in unmodifiziertem Zustand einen zytotoxischen Effekt, wenn sie in bestimmten Konzentrationen eingesetzt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern und Derivaten davon gegen Humankarzinomzellen, wobei der Antikörper in die Karzinomzellen, mit denen er reagiert, einschleusbar (internalisierbar) ist, die ADCC- und CDC-Aktivität vermittelt, und die Humankarzinomzellen ohne Wirts-Effektorzellen oder Komplement abtötet, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - a) zur Stimulierung der Immunantwort ein Karzinomzellen-Immunogen einem Tier verabreicht;
 - b) zu einem geeigneten Zeitpunkt antigenproduzierende Lymphozyten isoliert;
 - c) die Lymphozyten mit geeigneten Myelomzellen fusioniert, selektioniert und mit einem bestimmten Antigen screenet; und
 - d) positive Myelomzellenklone isoliert, vermehrt und die produzierten Antikörper abtrennt; und gegebenenfalls
 - e) die isolierten Antikörper spaltet und die Fragmente isoliert; oder
 - f) mit Hilfe des zweistufigen Homologen-Rekombinationsverfahren ein rekombinantes, antigenbindendes Protein herstellt; oder
 - g) aus dem gemäß Stufe d) hergestellten Antikörper unter herkömmlichen Bedingungen einen bispezifischen Antikörper herstellt; oder
 - h) ein gemäß einer der Stufen d) bis g) hergestelltes Protein zumindest mit einem funktionellen Teil eines zweiten Proteins mit Antitumoraktivität koppelt; oder
 - i) mit dem Antikörper aus Stufe d) Anti-Idiotyp-Antikörper herstellt.
2. Antikörper oder Fragment davon mit spezifischer immunologischer Reaktivität gegenüber Humankarzinomzellen, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper in die Karzinomzellen, mit denen er reagiert eingeschleust wird, die ADCC- und CDC-Aktivität vermittelt, und die Humankarzinomzellen ohne Wirts-Effektorzellen oder Komplement abtötet.
3. Antikörper nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper ein monoklonaler Maus-Antikörper ist.
4. Antikörper nach Anspruch 3 mit der Bezeichnung BR96, **dadurch gekennzeichnet**, daß er von Hybridomzellen produziert wird die mit der Hinterlegungsnummer HB 10036 bei der ATCC hinterlegt sind.
5. Hybridomzelle HB 10036, hinterlegt bei der ATCC.
6. Rekombinantes Protein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Antigenbindungsregion des monoklonalen Antikörpers gemäß Anspruch 3 umfaßt.
7. Rekombinantes Protein nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein ein chimärer Human/Maus-Antikörper ist.
8. Chimärer Antikörper ChiBR96, **dadurch gekennzeichnet**, daß er von Hybridomzellen produziert wird, die unter der Hinterlegungsnummer HB 10460 bei der ATCC hinterlegt sind.
9. Hybridomzelle HB 10460, hinterlegt bei der ATCC.
10. Rekombinantes Protein nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die antigenbindende Region mit einem zumindest funktionell aktiven Teil eines zweiten Proteins mit Antitumoraktivität gekoppelt ist.
11. Rekombinantes Protein nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß das zweite Protein ein Enzym, Lymphokin, Oncostatin oder Toxin ist.
12. Rekombinantes Protein nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die antigenbindende Region mit einem Antigen reagiert, welches eine Variante des Le^Y-Antigens ist, das ein Epitop umfaßt, welches Fucose α 1-3 enthält.
13. Fab-, F(ab')₂- oder Fv-Fragment des Antikörpers gemäß Anspruch 3.
14. Bispezifischer Antikörper mit einer Bindungsspezifität für zwei verschiedene Antigene, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper gemäß Anspruch 3 an eines dieser Antigene bindet.
15. Bispezifischer Antikörper nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß eines der Antigene eine Variante des Le^Y-Antigens ist, welches ein Epitop umfaßt, das Fucose α 1-3 enthält.
16. Monoklonaler Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, daß dessen antigenbindende Region die immunospezifische Bindung des monoklonalen Antikörpers BR96, produziert durch die Hybridomzellen HB 10036, an dessen Zielantigen kompetitiv inhibiert.
17. Antikörper nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Antigen eine Variante des Le^Y-Antigens ist, welches ein Epitop umfaßt, das Fucose α 1-3 enthält.

18. Rekombinanter Human/Maus-Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, daß dessen antigenbindende Region die immunospezifische Bindung des monoklonalen Antikörpers BR96, produziert durch die Hybridomzellen HB 10036, an dessen Zielantigen kompetitiv inhibiert.
19. Antikörper nach einem der Ansprüche 4 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper unter Ausbildung eines Antikörperkonjugates mit einem therapeutischen Wirkstoff konjugiert ist.
20. Antikörper nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß das therapeutische Mittel ein Antitumorwirkstoff, ein Toxin, ein radioaktiver Stoff, ein zweiter Antikörper oder ein Enzym ist.
21. Immunokonjugatkombination, **dadurch gekennzeichnet**, daß es einen Antikörper gemäß Anspruch 4 oder 8, der mit einem Enzym verbunden ist, welches eine Prodrug in einen cytotoxischen Wirkstoff umwandelt, und die Prodrug umfaßt.
22. Pharmazeutisches Mittel zur Behandlung von Humankarzinomen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine pharmazeutisch wirksame Menge mindestens eines Antikörpers gemäß Anspruch 4 oder 8 umfaßt.
23. Pharmazeutisches Mittel zur Behandlung von Humankarzinomen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine pharmazeutisch wirksame Menge von mindestens einem Antikörperkonjugat gemäß Anspruch 19 umfaßt.
24. Pharmazeutisches Mittel zur Behandlung von Humankarzinomen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine pharmazeutisch wirksame Menge von mindestens einem rekombinanten Protein gemäß Anspruch 10 umfaßt.
25. Verwendung eines Antikörpers gemäß Anspruch 4 oder 8 in einem Verfahren zur Behandlung von Humankarzinomen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man dem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge eines Mittels verabreicht, welches den Antikörper enthält.
26. Verwendung eines Antikörpers gemäß Anspruch 4 oder 8 in einem Verfahren zum Nachweis eines Karzinoms in Humangewebe, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine Gewebeprobe mit dem Antikörper behandelt und die Bindung des Antikörpers an das Gewebe nachweist.
27. Verwendung nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper markiert ist und ein detektierbares Signal erzeugt, wobei das Markierungsmittel ausgewählt ist unter einer Radiomarkierung, einem Enzym, einem Chromophor und einem Fluoreszenzmittel.
28. Verwendung eines Antikörpers gemäß Anspruch 4 oder 8 in einem Verfahren zur Abbildung eines Humankarzinoms, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einem Patienten den Antikörper in einer zur intravenösen Detektion des Antikörpers ausreichenden Menge verabreicht, um den Antikörper im Bereich der Karzinomzellen lokalisieren zu können, und den Antikörper detektiert.
29. Verwendung nach Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper zur Erzeugung eines detektierbaren Signals mit einem Markierungsmittel, ausgewählt unter einer Radiomarkierung, einem Enzym, einem Chromophor und einem Fluoreszenzmittel, markiert ist.
30. Monoklonaler Anti-Idiotyp-Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, daß er mit einem Idiotyp auf dem Antikörper gemäß Anspruch 4 reagiert.
31. Diagnose-Kit, **dadurch gekennzeichnet**, daß er
 - a) einen Antikörper gemäß Anspruch 4 oder 8; und
 - b) ein Konjugat aus einem detektierbaren Markierungsmittel und einem spezifischen Bindungspartner des unter a) bezeichneten Antikörpers umfaßt.
32. Diagnose-Kit nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Markierungsmittel ausgewählt ist unter Enzymen, Radiomarkierungen, Chromophoren und Fluoreszenzmitteln.

Hierzu 27 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen Humankarzinomzellen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Maus-Antikörpers und eines chimären monoklonalen Antikörpers, welcher mit einem Zellmembran-Antigen reagiert, das mit einer großen Vielzahl von Humankarzinomen, wie z. B. den Kolon-, Brust-, Ovarial- und Lungenkarzinomen, assoziiert ist. Der monoklonale Maus-Antikörper besitzt eine hochspezifische Wirkung gegenüber Karzinomen und zeigt keine bzw. nur eine sehr geringe Reaktivität gegenüber normalem Humangewebe oder gegenüber anderen Tumortypen, wie z. B. Lymphomen oder Sarkomen. Die erfindungsgemäßen Antikörper besitzen mehrere zusätzliche Vorteile. Sie werden erstens in den Karzinomzellen, an die sie binden, internalisiert. Die BR96-Antikörper der vorliegenden Erfindung eignen sich daher für therapeutische Anwendungen, wie z. B. als Antikörperkomponente eines Antikörper-Wirkstoff- oder Antikörper-Toxin-Konjugates, wenn eine Internalisierung des Konjugates beabsichtigt ist. Die Antikörper vermitteln zweitens die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität „ADCC“ und die komplement-vermittelte

Zytotoxizität „CDC“. Die Antikörper können drittens in unkonjugierter Form bei ausreichender Konzentration Antigen-positive Tumorzellen abtöten. Die Antikörper eignen sich auch zur Durchführung diagnostischer Verfahren, wie z. B. dem Nachweis von Karzinomen mit Hilfe von In-vitro- oder In-vivo-Methoden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Monoklonale Antikörper gegen menschliche, tumorassoziierte Differenzierungsgene eröffnen die Möglichkeit zum „Targeting“ von verschiedenen Antitumormitteln, wie z. B. Radioisotopen, chemotherapeutischen Wirkstoffen und Toxinen. (Baldwin und Byers [eds.], in „Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy“, London, Academic Press [1985]). Zusätzlich können einige monoklonale Antikörper vorteilhafterweise Tumorzellen mit Hilfe von ADCC oder CDC in Gegenwart von menschlichen Effektorzellen oder Serum abtöten (Hellstrom et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 83: 7059–7063 [1986]). Außerdem gibt es einzelne monoklonale Antikörper, welche eine direkte, von Wirts-Komponenten unabhängige Antitumoraktivität besitzen (Drebin et al., „Oncogene“, 2: 387-394 [1988]).

Man kennt eine Vielzahl monoklonaler, mit Karzinom-assoziierten Antigenen reagierender Antikörper (vgl. z. B. Papsidero, „Recent Progress In The Immunological Monitoring of Carcinomas Using Monoclonal Antibodies“, „Semin. Surg. Oncol.“, 1 (4): 171–181 [1985]; Schlom et al., „Potential Clinical Utility Of Monoclonal Antibodies In The Management Of Human Carcinomas“, „Important Adv. Oncol.“, 170–192 [1985]; Allum et al., „Monoclonal Antibodies In The Diagnosis And Treatment of Malignant Conditions“, „Surg. Ann.“, 18: 41–64 [1986] und Houghton et al., „Monoclonal Antibodies: Potential Applications To The Treatment Of Cancer“, „Semin. Oncol.“, 13 (2): 165–179 [1986]).

Diese bekannten monoklonalen Antikörper binden an eine Vielzahl verschiedener Karzinom-assoziiertes Antigene einschließlich Glycoproteinen, Glycolipiden und Mucinen (vgl. z. B. Fink et al., „Monoclonal Antibodies As Diagnostic Reagents for The Identification And Characterization Of Human Tumor Antigens“, Prog. Clin. Pathol., 9: 121–133 [1984]). Monoklonale Antikörper, welche an Glycoprotein-Antigene auf bestimmten Karzinomtypen binden, sind in folgenden Patenten beschrieben:

US 4 737 579 (monoklonale Antikörper gegen nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom),

US 4 753 894 (monoklonale Antikörper gegen Humanbrustkrebs),

US 4 579 827 (monoklonale Antikörper gegen Humangastrointestinalkrebs) und

US 4 713 352 (monoklonale Antikörper gegen Humanrenalkarzinom).

Der monoklonale Antikörper B72.3, der einer der am meisten untersuchten Antikörper ist, erkennt ein Tumor-assoziiertes Mucin-Antigen mit einem Molekulargewicht von über 1 000 kd, welches auf einer Vielzahl verschiedener Karzinome exprimiert wird. So konnte gezeigt werden, daß B72.3 mit 84% aller Brustkarzinome, 94% der Kolonkarzinome, 100% der Ovarialkarzinome und 96% der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome reagiert (vgl. Johnston, „Applications of Monoclonal Antibodies In Clinical Cytology As Exemplified By Studies With Monoclonal Antibody B72.3“, Acta Cytol., 1 (5): 537–556 [1987] und US-PS 4612282 von Schom et al.). Ein anderer patentierter monoklonaler Antikörper, nämlich KC-4 (vgl. US-PS 4708930) erkennt ein Protein-Antigen von annähernd 400–500 kd, welches auf einer Vielzahl von Karzinomen, wie z. B. dem Kolon-, Prostata-, Lungen- und Brustkarzinom, exprimiert wird. Weder die B72.3- noch die KC-4-Antikörper werden anscheinend in die Karzinomzellen, mit denen sie reagieren, internalisiert.

Monoklonale Antikörper, welche mit Glycolipid-Antigenen reagieren, die mit Tumorzellen assoziiert sind, sind ebenfalls bekannt. Beispielsweise beschreibt Young et al., „Production Of Monoclonal Antibodies Specific For Two Distinct Steric Portions Of The Glycolipid Ganglio-N-Triaosylceramide (Asialo GM₂)“, J. Exp. Med., 150: 1008–1019 [1979] die Herstellung von zwei monoklonalen Antikörpern mit einer spezifischen Wirkung gegenüber Asialo GM₂, einem Zelloberflächenglycosphingolipid-Antigen, welches als Marker für BALB/c V3T3-Zellen verwendet wird, welche mit dem Kirsten-Maus-Sarkomavirus transformiert sind. (Vgl. Kniep et al., „Gangliotriaosylceramide [Asialo GM₂] A Glycosphingolipid Marker For Cell Lines Derived From Patients With Hodgkin's Disease“, J. Immunol., 131 (3): 1591–1594 [1983] und US-PS 4507391 [monoklonaler Antikörper gegen Humanmelanom]).

Anderer, mit Glycolipid-Antigenen auf Karzinomzellen reagierende monoklonale Antikörper wurden beschrieben von Rosen et al., „Analysis Of Human Small Cell Lung Cancer Differentiation Antigens Using A Panel Of Rat Monoclonal Antibodies“, Cancer Research, 44: 2052–2061 (1984) (monoklonale Antikörper gegen kleinzelligen Humanlungenkrebs), Varki et al., „Antigens Associated with a Human Lung Adenocarcinoma Defined by Monoclonal Antibodies“, Cancer Research 44: 681–687 (1984) (monoklonale Antikörper gegen menschliche Lungen-, Magen- und Kolon-Adenokarzinome und Melanome) und US-PS 4 579 827 (monoklonale Antikörper gegen Humankolon-Adenokarzinom). Man vergleiche auch Hellstrom et al., „Antitumor Effects Of L6, An IgG2a Antibody That Reacts With Most Human Carcinomas“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7059–7063 (1986), worin der monoklonale Antikörper L6 beschrieben wird, welcher ein Kohlehydrat-Antigen erkennt, das auf der Oberfläche von nicht-kleinzelligen Humanlungenkarzinomen, Brustkarzinomen und Kolonkarzinomen exprimiert wird.

Es besteht ein großer Bedarf an weiteren monoklonalen Antikörpern mit hoher spezifischer Raktivität gegenüber der Hauptmenge von Zellen der verschiedenen Karzinome, da die Antigen-Heterogenität vieler Karzinome in Diagnose oder Therapie häufig die Verwendung einer Vielzahl verschiedener monoklonaler Antikörper gegen den gleichen Tumor erfordert.

Insbesondere bei der Therapie besteht ein weiterer Bedarf an sogen. internalisierbaren (internalizing) Antikörpern, d. h. Antikörper, welche durch die Tumorzellen, an die sie binden, leicht aufgenommen werden. Antikörper dieses Typs finden Verwendung in therapeutischen Verfahren unter Anwendung von Antikörper-Wirkstoff- oder Antikörper-Toxinkonjugaten, wobei ein therapeutisches Tumormittel an einen Antikörper gebunden wird, um es auf einen Tumor zu übertragen, an den der Antikörper über ein, mit ihm reagierendes, tumorassoziiertes Antigen bindet und das Antitumormittel im Inneren der Tumorzelle abgibt (vgl. z. B. Embleton et al., „Antibody Targeting Of Anti-Cancer Agents“, in „Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy“, S. 317–344 [Academic Press, 1985]). Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene, die in die Tumorzellen, an die sie binden, nicht internalisierbar sind, eignen sich im allgemeinen nicht zur Herstellung von Konjugaten mit Antitumorwirkstoffen oder Toxinen, da diese ihren Reaktionsort innerhalb der Zelle nicht erreichen können. Für eine therapeutische Verwendung dieser Antikörper sind andere Wege erforderlich.

Mehrere, mit Lymphozyten-Antigenen reagierende, internalisierbare Antikörper sind bekannt. Dagegen sind derartige

Antikörper gegen feste Tumoren selten. Eines der wenigen Beispiele für einen internationalisierbaren Antikörper, der mit Karzinomen reagiert, ist der von Domingo et al. in „Transferrin Receptor As A Target For Antibody-Drug Conjugates“, *Methods Enzymol.*, 112: 238–247 (1985) beschriebene Antikörper. Dieser Antikörper reagiert mit dem Human-Transferrin-Rezeptorglycoprotein, welches auf Tumorzellen exprimiert wird. Da jedoch der Transferrin-Rezeptor auch auf einer Vielzahl normaler Zellen und in großer Menge exprimiert wird, könnte die Verwendung eines Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörpers in einem Antikörper-Wirkstoff- oder Antikörper-Toxinkonjugat zu signifikanten toxischen Effekten gegenüber normalen Zellen führen. Die Anwendbarkeit dieses Antikörpers zur selektiven Zerstörung oder Inhibition von Tumorzellen ist deshalb fraglich. Ein anderer internalisierbarer Antikörper ist BR64 (beschrieben in den US-Patentanmeldungen 289635 und 443696, auf welche hiermit Bezug genommen wird), welcher mit einem großen Spektrum von Humankarzinomen reagiert.

Die Zellfusionstechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Köhler und Milstein, „Nature“ [London] 256: 495 [1975]) ermöglichte die Entwicklung einer Vielzahl von monoklonalen Maus-Antikörpern, welche mit Antigenen, einschließlich früher nicht bekannten Antigenen, reagieren. Monoklonale Maus-Antikörper können jedoch vom menschlichen Immunsystem als fremde Substanzen erkannt und neutralisiert werden, so daß deren Potential in der Humantherapie nicht anwendbar ist. Aus diesem Grunde konzentrierten sich neuere Arbeiten auf die Produktion sogen. „chimärer“ Antikörper durch Einführung von DNA in Säugetierzellen, und Expression der Immunoglobulingene (Oi et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 80: 825 [1983]; Potter et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 81: 7161; Morrison et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“ 81: 6581 [1984]; Sahagan et al., „J. Immunol.“ 137: 1066 [1986]; Sun et al., „Proc. Natl. Acad. Sci.“, 84: 214 [1987]).

Chimäre Antikörper sind Immunglobulinmoleküle, welche einen menschlichen und einen nicht-menschlichen Teil umfassen. Insbesondere ist die Antigen-bindende Region (variable Region) eines chimären Antikörpers nicht-menschlichen Ursprungs (z. B. von einer Maus) und die konstante Region des chimären Antikörpers, der eine biologische Effektorfunktion für das Immunglobulin besitzt, ist menschlichen Ursprungs. Der chimäre Antikörper sollte die Antigen-Bindungsspezifität des nicht-menschlichen Antikörpermoleküls und die Effektorfunktion des Human-Antikörpermoleküls besitzen.

Das Verfahren zur Herstellung chimärer Antikörper umfaßt im allgemeinen folgende Schritte:

- a) Identifizierung und Klonierung des korrekten Gensegmentes, welches für den Antigen-bindenden Teil des Antikörpermoleküls codiert; dieses Gensegment (bekannt als VDJ [Variable, Diversity und Joining-Regionen bei schweren Ketten] oder als VJ [Variable, Joining-Regionen bei leichten Ketten] oder als V-Segment [Variable Region]) kann entweder als cDNA oder in genomischer Form vorliegen;
- b) Klonierung des Gensegmentes, das für die konstante Region oder den gewünschten Teil davon codiert;
- c) Ligierung der variablen Region mit der konstanten Region, so daß der komplette chimäre Antikörper in einer transkribierbaren und translitierbaren Form codiert vorliegt;
- d) Ligierung dieser Konstruktion mit einem Vektor, der einen selektierbaren Marker und Genkontrollregionen, wie z. B. Promotoren, Enhancer und poly(A)-Additionssignale, enthält;
- e) Amplifizierung dieses Konstruktes in Bakterien;
- f) Einführung dieser DNA in eukaryotische Zellen (Transfektion), am häufigsten in Säugetier-Lymphozyten;
- g) Selektion von Zellen, welche den selektierbaren Marker exprimieren;
- h) Screening auf Zellen, welche den gewünschten chimären Antikörper exprimieren; und
- k) Testen des Antikörpers auf geeignete Bindungsspezifität und Effektorfunktionen.

Antikörper mit mehreren unterschiedlichen Antigen-Bindungsspezifitäten wurden mit Hilfe dieser Anleitung zur Erzeugung chimärer Proteine manipuliert (z. B. Anti-TNP: Boulianne et al., „Nature“, 312: 643 [1984] und Antitumor-Antigene: Sahagan et al., „J. Immunol.“, 137: 1066 [1986]). In ähnlicher Weise wurden mehrere verschiedene Effektorfunktionen durch Bindung neuer Sequenzen an die für die Antigen-bindende Region codierende Sequenz erzeugt. Einige davon waren Enzyme (Neuberger et al., „Nature“, 312: 604 [1984]), konstante Regionen von Immunglobulinen einer anderen Spezies und konstante Regionen einer anderen Immunglobulinkette (Sharon et al., „Nature“, 309: 364 [1984]; Tan et al., „J. Immunol.“, 135: 3565–3567 [1985]).

Die Entdeckung der homologen Rekombination in Säugetierzellen ermöglicht die Anordnung (Targeting) neuer Sequenzen an spezifischen chromosomalen Loci. Eine homologe Rekombination tritt auf, wenn kultivierte Säugetierzellen exogene DNA in chromosomale DNA an einem chromosomalen Ort integrieren, der zu den Plasmidsequenzen homologe Sequenzen enthält (Folger et al., „Mol. Cell. Biol.“, 2: 1372–1387; Folger et al., „Symp. Quant. Biol.“, 49: 123–138 [1984]; Kucherlapati et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 81: 3153–3157 [1984]; Lin et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 82: 1391–1395 [1985]; de Saint Vincent et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 80: 2002–2006 [1983]; Shaul et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 82: 3781–3784 [1985]). Die homologe Rekombination innerhalb von Zellen ermöglicht die Modifikation von endogenen Genen in situ. Es wurden Bedingungen gefunden, bei denen die chromosomale Sequenz dadurch modifiziert werden kann, daß man in die Zelle eine Plasmid-DNA einführt, welche ein zum Ziel-Locus homologes DNA-Segment und ein Segment mit neuen Sequenzen mit der gewünschten Modifikation enthält (Thomas et al., „Cell“, 44: 419–428 [1986]; Smithies et al., „Nature“, 317: 230–234 [1985]; Smith et al., „Symp. Quant. Biol.“, 49: 171–181 [1984]). Eine homologe Rekombination zwischen chromosomaler Säugetierzellen-DNA und exogener Plasmid-DNA kann zur Integration des Plasmids oder zu einer Substitution eines Teils der chromosomalen Sequenzen durch die homologen Plasmidsequenzen führen. Dadurch kann man die gewünschte neue Sequenz im endogenen Ziel-Locus anordnen.

Das Verfahren zur homologen Rekombination wurde mit Hilfe von Genen mit dominanter Selektion untersucht (wie z. B. NEO und HPRT, bei wenigen Zelltypen) (Song et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 84: 6820–6824 [1987]; Rubinitz und Subramani, „Mol. Cell Biol.“, 6: 1608–1614 [1986] und Liskay, „Cell“, 35: 157–164 [1983]). Kürzlich wurden Verfahren zur Modifizierung von Antikörpermolekülen und zur Produktion chimärer Antikörpermoleküle mit Hilfe homologer Rekombination zum Steuern (target) der Genmodifikation beschrieben (Fell et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 86: 8507–8511 [1989]; US-Patentanmeldungen 243873 und 468035, auf welche hiermit Bezug genommen wird).

Der direkteste Weg zur klinischen Anwendung von monoklonalen Antitumorantikörpern beinhaltet deren Verabreichung in unmodifizierter Form, wobei man monoklonale Antikörper verwendet, welche in vitro sowie in Tiermodellen eine Antitumoraktivität besitzen. Die meisten monoklonalen Antikörper gegen Tumor-Antigene haben jedoch selbst keine

Antitumoraktivität, doch kennt man bestimmte monoklonale Antikörper, welche eine komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) vermitteln, d. h. die Humantumorzellen in Gegenwart von Humanserum als Komplement-Quelle töten (vgl. z. B. Hellstrom et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 82: 1499–1502 [1985]). Andere Antikörper besitzen eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) zusammen mit Effektorzellen, wie z. B. den Human-NK-Zellen oder den Makrophagen. Zum Nachweis der ADCC- und CDC-Aktivität werden monoklonale Antikörper auf ihre lytische Aktivität gegenüber kultivierten, ⁵¹Cr-markierten Tumor-Zielzellen während einer 4stündigen Inkubationszeit getestet.

Die Zielzellen (target cells) werden mit ⁵¹Cr markiert und 4 h bei einer Kombination aus Effektorzellen (in Form von Humanlymphozyten, gereinigt unter Verwendung eines Lymphozyten-Trennmediums) und Antikörpern ausgesetzt, die man in Konzentrationen von 0,1 µg/ml bis 10 µg/ml hinzugibt. Die Freisetzung von ⁵¹Cr aus den Zielzellen wird als Maß für die Tumorzellen-Lyse (Zytotoxizität) bestimmt. Kontrollwerte werden durch Inkubation von Zielzellen allein oder zusammen mit Lymphozyten oder monoklonalen Antikörpern bestimmt. Die Gesamtmenge von ⁵¹Cr, die freigesetzt werden kann, wird bestimmt und ADCC wird berechnet als der Prozentsatz abgetöteter Zielzellen nach Behandlung mit monoklonalem Antikörper in Kombination mit Effektorzellen im Vergleich zu inkubierten Zielzellen ohne Zugabe. Die Bestimmung von CDC erfolgt in Übereinstimmung zur ADCC-Bestimmung, mit der Ausnahme, daß Humanserum als Komplement-Quelle (1:3 bis 1:6 verdünnt) anstelle von Effektorzellen zugegeben wird.

Monoklonale Antikörper mit ADCC- und CDC-Aktivität finden therapeutische Anwendung, da sie häufig eine in vivo-Antitumoraktivität besitzen. Antikörper ohne ADCC- und CDC- in vitro-Aktivität sind andererseits in vivo im allgemeinen unwirksam; es sei denn, sie werden als Träger für Antitumormittel verwendet. Die Fähigkeit eines monoklonalen Antikörpers zur Aktivierung des Wirts-Komplementsystems kann ein Hinweis auf den therapeutischen Nutzen sein, aber nicht nur, weil Tumorzellen abgetötet werden können, sondern auch, weil die Blutversorgung von Tumoren erhöht werden kann, so daß die Aufnahme von Wirkstoffen erleichtert wird (Hellstrom et al., „Immunological Approaches to Tumor Therapy: Monoclonal Antibodies, Tumor Vaccines, and Anti-Idiotypes“, in „Covalently Modified Antigens and Antibodies in Diagnosis and Therapy“, Quash & Rodwell, eds., Marcel Dekker, S. 15–18 [1989]). Von den monoklonalen Maus-Antikörpern zeigen üblicherweise die IgG 2a- und IgG 3-Isotypen eine ADCC- und CDC-Aktivität. Durch Antikörper, die sowohl ADCC- als auch CDC-Aktivität besitzen, werden mit hoher Selektivität lediglich Tumorzellen abgetötet, an welche sie binden und es ist ziemlich unwahrscheinlich, daß diese toxische Effekte bedingen, wenn sie unspezifisch in Lunge, Leber oder anderen Organen zurückgehalten werden. Im Vergleich zu radiomarkierten Antikörpern oder bestimmten Arten von Immunokonjugaten kann sich das erwähnte Verhalten dieser Antikörper als Vorteil erweisen.

Sehr wenige Antikörper sind in der Lage, Tumorzellen selbst, d. h. ohne Hilfe von Effektorzellen oder dem Komplementsystem (wie bei der ADCC oder der CDC) abzutöten. Ein derartiger Antikörper ist BR96, da er direkt bei Antikörperkonzentrationen von etwa 10 µg/ml oder darüber Zellen abtöten kann. Derartige Antikörper sind von besonderem Interesse, da sie mit einigen für das Überleben neoplastischer Zellen zentralen Ereignissen (Mechanismen) wechselwirken können.

Hieraus wird verständlich, daß ein Antikörper, der ein hohes Maß an Selektivität gegenüber einer Vielzahl von Karzinomen zeigt, der selbst Antitumoraktivität besitzt und von Tumorzellen internalisiert werden kann, von großem Nutzen für die Tumorthherapie sein kann.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von neuartigen Antikörpern, welche gegen Humankarzinome wirken.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung neuartiger Antikörper gegen Humankarzinome bereitzustellen.

Durch die vorliegende Erfindung werden internalisierbare Antikörper mit hoher Selektivität gegenüber mehreren Humankarzinomen bereitgestellt. Die neuartigen Antikörper mit der Bezeichnung BR96-Antikörper sind monoklonale Maus-Antikörper sowie chimäre Antikörper, welche an ein Zellmembranen binden, das auf Humankarzinomzellen gefunden wird. Die Antikörper zeigen eine hohe Reaktivität gegenüber Karzinomzellen, wie z. B. gegenüber Brust-, Lungen-, Kolon- und Ovarialkarzinomen, und besitzen keine oder nur eine geringfügige Reaktivität gegenüber normalen Humanzellen oder anderen Tumortypen, wie z. B. Lymphomen und Sarkomen. Außerdem werden die erfindungsgemäßen Antikörper in die Karzinomzellen, an die sie binden, eingeschleust und können dort ihrerseits, d. h. in nicht-konjugierter Form und ohne Hilfe von Effektorzellen oder dem Komplementsystem, Tumorzellen abtöten. Die BR96-Antikörper sind daher von besonderem Nutzen bei therapeutischen Anwendungen, wie z. B. zur Reaktion mit Tumorzellen sowie in Konjugaten als zelselektive Träger für verschiedene Mittel mit Antitumorwirkung, wie z. B. chemotherapeutischen Wirkstoffen, Toxinen, Modifikatoren der Immunantwort, Enzymen und Radioisotopen. Die Antikörper können als Komponente von verschiedenen immunokonjugathaltigen Antikörper-Wirkstoff- und Antikörper-Toxinkonjugaten verwendet werden, falls eine Internalisierung des Konjugates bevorzugt wird. Weiterhin können nach Radiomarkierung Radioisotope an Tumoren abgegeben werden. Die BR96-Antikörper können auch in unveränderter Form therapeutisch vorteilhaft wirken. Außerdem werden die Antikörper in diagnostischen In-vitro- oder In-vivo-Verfahren zum Nachweis von Karzinomen verwendet.

Kurze Figurenbeschreibung

Fig. 1 zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus in die DNA von 3396-Brustkarzinomzellen, welche mit einem BR96-RA-Immunotoxin bei verschiedenen Konzentrationen, wie in Beispiel 3, unten, beschrieben, behandelt werden. BR6-RA ist ein internalisierbarer Antikörper, und wird als negative Kontrolle eingesetzt, da er nicht an die 3396-Zellen bindet.

- Fig. 2: zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus in die DNA von 2707-Lungenkarzinomzellen, welche mit einem BR96-RA-Immunotoxin bei unterschiedlichen Konzentrationen, wie in Beispiel 3, unten, beschrieben, behandelt werden. BR96-RA ist ein internalisierbarer Antikörper, der ebenfalls an die 2707-Zellen bindet.
- Fig. 3: zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus in die DNA von HCT 116-Kolonkarzinomzellen, welche mit einem BR96-RA-Immunotoxin bei unterschiedlichen Konzentrationen, wie in Beispiel 3, unten, beschrieben, behandelt werden. BR96 bindet nicht an die HCT 116-Zellen.
- Fig. 4: zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus in DNA von C-Kolonkarzinomzellen, welche mit BR96-RA-Immunotoxin bei unterschiedlichen Konzentrationen, wie in Beispiel 3, unten, beschrieben, behandelt werden. BR96-RA bindet nicht an die C-Zellen; L6-RA bindet an die C-Zellen, dringt jedoch nicht in diese ein.
- Fig. 5: zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus in DNA von 3347-Kolonkarzinomzellen, welche mit einem BR96-RA-Immunotoxin bei unterschiedlichen Konzentrationen gemäß folgendem Beispiel 3 behandelt werden. BR96 bindet nicht an diese Zellen, während BR96 an die Zellen bindet.
- Fig. 6: zeigt die Ergebnisse einer FACS-Analyse der Zytotoxizität anhand von Propidiumjodid-gefärbten 3396-Brustkarzinomzellen, 2987-Lungenkarzinomzellen und 3619-Kolonkarzinomzellen gemäß folgendem Beispiel 4.
- Fig. 7: zeigt die Einflüsse von BR96 auf die Zellproliferation verschiedener Zelllinien gemäß folgendem Beispiel 4.
- Fig. 8: zeigt den Einfluß von BR96 auf das Zellwachstum verschiedener Zelllinien, bestimmt durch eine Färbemethode gemäß folgendem Beispiel 4.
- Fig. 9: veranschaulicht die Ergebnisse von Tests zur Bestimmung der ADCC-Aktivität von BR96 gemäß folgendem Beispiel 5.
- Fig. 10: beschreibt die Ergebnisse von Tests zur Bestimmung der CDC-Aktivität von BR96 gemäß folgendem Beispiel 6.
- Fig. 11: zeigt ein Balkendiagramm der Ergebnisse aus Reaktivitätsuntersuchungen von BR96 gegenüber Glycolipiden gemäß folgendem Beispiel 7.
- Fig. 12: zeigt ein Balkendiagramm von Ergebnissen aus Reaktivitätstests mit BR96 gegen Neoglycoproteinen gemäß folgendem Beispiel 7.
- Fig. 13: zeigt eine graphische Darstellung der Bindungsaktivität von BR96 F(ab')₂-Fragmenten, im Vergleich zu ganzen monoklonalen BR96-Antikörpern in einem ELISA unter Verwendung eines Ziegen-Anti-Kleiche-Kette-Nachweisreagens gemäß folgendem Beispiel 8.
- Fig. 14: ist eine graphische Darstellung der Bindungsaktivität von BR96 F(ab')₂-Fragmenten, verglichen mit ganzen monoklonalen BR96-Antikörpern in einem ELISA unter Verwendung eines Peroxidase-konjugierten Protein-A-Nachweisreagens gemäß folgendem Beispiel 8.
- Fig. 15: zeigt das Diagramm des Vektors p γ HC-D, der in dem Elektroporationsverfahren gemäß folgendem Beispiel 9 verwendet wird.
- Fig. 16: zeigt die Darstellung des Vektors pSV₂gpt/C_K, der in dem Elektroporationsverfahren gemäß folgendem Beispiel 9 verwendet wird.
- Fig. 17: ist die graphische Darstellung von Ergebnissen des Konkurrenzbindungstests (competition binding assay), der die Bindung des erfindungsgemäßen monoklonalen BR96-Maus-Antikörpers mit der Bindung des erfindungsgemäßen, chimären BR96-Antikörpers gemäß folgendem Beispiel 9 vergleicht.
- Fig. 18: zeigt die Ergebnisse einer FACS-Analyse der Zytotoxizität erfindungsgemäßer Antikörper gegenüber 3396-Brustkarzinomzellen gemäß folgendem Beispiel 10.
- Fig. 19: zeigt die Ergebnisse von FACS-Analysen der Zytotoxizität von erfindungsgemäßen Antikörpern gegenüber 2987-Humanlungenadenokarzinomzellen gemäß folgendem Beispiel 10.
- Fig. 20: zeigt die Ergebnisse von FACS-Analysen der Zytotoxizität von erfindungsgemäßen Antikörpern gegenüber MCF-7-Zellen gemäß folgendem Beispiel 10.
- Fig. 21: zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus in die DNA von 3396-Brustkarzinomzellen, welche mit einem Maus-BR96-RA-Immunotoxin und chimärem (Chi)BR96-RA bei unterschiedlichen Konzentrationen gemäß folgendem Beispiel 10 behandelt wurden.
- Fig. 22: zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus in die DNA von 3630-Brustkarzinomzellen, welche mit Maus-BR96-RA-Immunotoxin und ChiBR96-RA bei unterschiedlichen Konzentrationen gemäß folgendem Beispiel 10 behandelt wurden.
- Fig. 23: ist eine graphische Darstellung der Antitumorwirkungen von unmodifiziertem BR96 auf die Tumorzelllinie H2987 gemäß folgendem Beispiel 11.
- Fig. 24: zeigt ein Balkendiagramm, welches die Abwesenheit von Tumoren am Ende einer Behandlung von Tieren mit BR96 gemäß folgendem Beispiel 11 veranschaulicht.
- Fig. 25: zeigt die Dosis-Effekte von BR96-Antikörpern nach Implantation von H2707-Zellen, bestimmt durch das Tumolvolumen gemäß folgendem Beispiel 11.
- Fig. 26: veranschaulicht die Einflüsse der Behandlung mit F(ab')₂-Fragmenten und chimärem BR96 nach Implantation von 2707-Zellen durch Bestimmung des Tumolvolumens gemäß folgendem Beispiel 11.
- Fig. 27: veranschaulicht die Abwesenheit von Tumoren nach Behandlung mit unterschiedlichen BR96-Antikörperdosen, verglichen mit den Einflüssen von F(ab')₂-Fragmenten und chimärem BR96 gemäß folgendem Beispiel 11.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden detaillierten Beschreibung weiter veranschaulicht.

Die Erfindung betrifft neuartige Antikörper mit hoher Spezifität gegenüber Karzinomzellen. Insbesondere reagieren die Antikörper mit mehreren Karzinomen, wie z. B. dem Brust-, Lungen-, Ovarial- und Kolonkarzinom und zeigen keine bzw. nur eine geringfügige Reaktivität gegenüber normalem Humangewebe oder anderen Tumortypen, wie z. B. Sarkomen oder Lymphomen. Die BR96-Antikörper können zur Isolierung und Charakterisierung des Antigens, an das sie binden, verwendet werden. Die BR96-Antikörper können somit als Sonde zur Identifizierung und Charakterisierung des erkannten Epitops sowie zur weiteren Definition des Zellmembran-Antigens, mit dem sie reagieren, verwendet werden (vgl. z. B. Nudelman et al., „Characterization of Human Melanoma-Associated Ganglioside Antigen Defined By A Monoclonal Antibody, 4.2“, J. Biol. Chem., 257 [1] 12752-12756 [1982] und Hakomori, „Tumor Associated Carbohydrate Antigens“, Ann. Rev. Immunol., 2: 103-126 [1984]). Vorläufige Epitop-Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper BR96 wiesen darauf hin, daß das Antigen auf den Karzinomzellen, an welches der BR96-Antikörper bindet, eine fucosylierte Variante des Lewis-Y-Antigens ist. Das Lewis-Y-(Le^Y)-Antigen wurde von Abe et al., J. Biol. Chem., 258: 8934 (1983); Lloyd et al., „Immunogenetics“ 17: 537 (1983); Brown et al.,

„Biosci. Rep.“, 3: 163 (1983); Hellstrom et al., „Cancer Res.“, 46: 3917 (1986) beschrieben. Das fucosylierte Lewis-Y-Antigen wurde von Abe et al., „Cancer Res.“, 46: 2639–2644 (1986) beschrieben.

Der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper kann mit Hilfe von bekannten und von Köhler und Milstein erstmals beschriebenen Hybridoma-Techniken hergestellt werden (vgl. Köhler und Milstein, „Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Pre-Defined Specificity“, *Nature*, 256: 495–497 [1975]. Vgl. auch Brown et al., „Structural Characterization Of Human Melanoma-Associated Antigen p97 with Monoclonal Antibodies“, *J. Immunol.*, 127 [2]: 539–546 [1981]; Brown et al., „Protein Antigens Of Normal And Malignant Human Cells Identified By Immunoprecipitation With Monoclonal Antibodies“, *J. Biol. Chem.*, 255: 4980–4983 [1980]; Yeh et al., „Cell Surface Antigens Of Human Melanoma Identified By Monoclonal Antibody“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76[6]: 297–231 [1979] und Yeh et al., „A Cell-Surface Antigen Which is Present In The Ganglioside Fraction And Shared By Human Melanomas“, *Int. J. Cancer*, 29: 269–275 [1982]).

Diese Techniken umfassen die Injektion eines Immunogens (z. B. Zellen oder Zellextrakte, welche das Antigen tragen oder gereinigtes Antigen) in ein Tier (z. B. eine Maus, um zu einer gewünschten Immunantwort (d. h. Antikörper) in diesem Tier zu führen. Nach ausreichender Zeit erhält man Antikörper produzierende Lymphozyten, entweder aus der Milz, den Lymphknoten oder dem peripheren Blut dieses Tiers. Vorzugsweise isoliert man die Lymphozyten aus der Milz. Die Milz-Lymphozyten werden mit einer Myelomzelllinie fusioniert, üblicherweise in Gegenwart eines Fusionsmittels, wie z. B. Polyethylenjglykol (PEG). Hierzu kann man jede beliebige Myelomzelllinie als Fusionspartner unter Standardbedingungen verwenden. Beispiele hierfür sind die P3-NS 1/1 A₄-1, P3-x63-Ag8.653 oder Sp 2/O Ag 14 Myelomlinien. Diese Myelomlinien erhält man von der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, Maryland.

Die resultierenden Zellen, welche die gewünschten Hybridome enthalten, werden anschließend in einem selektiven Medium, wie z. B. dem HAT-Medium, in dem nicht fusionierte parenterale Myeloma- oder Lymphozytenzellen gegebenenfalls absterben, gezüchtet. Es überleben ausschließlich Hybridomzellen, die dann unter limitierenden Bedingungen gezüchtet werden, wobei man isolierte Klone erhält. Den Überstand der Hybridome testet man auf Anwesenheit von Antikörpern der gewünschten Spezifität, beispielsweise mit Hilfe von Immunoassay-Techniken, unter Verwendung des zur Immunisierung eingesetzten Antigens. Positive Klone können dann unter limitierenden Verdünnungsbedingungen subkloniert und die produzierten monoklonalen Antikörper isoliert werden. Die mit Hilfe dieses Verfahrens hergestellten Hybridome können *in vitro* oder *in vivo* (in Aszitesflüssigkeit) unter Verwendung von aus dem Stand der Technik bekannten Techniken vermehrt werden (vgl. allgemein Fink et al., *supra* auf Seite 123, Fig. 6–11). Üblicherweise verwendete Verfahren zur Reinigung der monoklonalen Antikörper umfassen Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustauscher-Chromatographie und Affinitäts-Chromatographie (vgl. z. B. Zola et al., „Techniques For The Production And Characterization Of Monoclonal Hybridoma Antibodies“, in *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques And Applications*, Hurell [ed.], S. 51–52 [CRC Press 1982]). Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird ein erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper mit der Bezeichnung BR96 mit Hilfe der im folgenden beschriebenen Hybridoma-Techniken unter Verwendung einer Brustkrebszelllinie 3396 als Immunogen hergestellt. Das BR96-Hybridom, hergestellt gemäß der folgenden Beschreibung, welches BR96-Antikörper produziert, wurde am 22. Februar 1989 bei der ATCC hinterlegt und besitzt folgende Bezeichnung:

BR96 ATCC Registriernummer: HB 10036.

Der Antikörper BR96 gehört zur IgG3-Unterklasse. Der Antikörper zeigt eine hohe Spezifität gegenüber Karzinomzellen verschiedener Organtypen, wie z. B. gegenüber Brust-, Lungen-, Kolon- und Ovarialtumoren, sowie gegenüber kultivierten Zelllinien verschiedener Brust-, Lungen- und Kolonkarzinome. Außerdem bindet der BR96-Antikörper nicht an andere Tumorzelltypen, wie z. B. den T-Zellen-Lymphomzelllinien, CEM und MOLT-4, der B-Zellen-Lymphomzelllinie P3HR-1 oder Melanomzelllinien. Der BR96-Antikörper ist in Antigen positiven Tumorzellen internalisierbar, wirkt toxisch gegenüber Antigen positiven Tumorzellen, vermittelt die ADCC- und CDC-Aktivität und ist überraschenderweise alleine, d. h. in unmodifizierter Form, zytotoxisch. Die BR96-Antikörper erkennen offensichtlich ein Le^y-Antigen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden F(ab')₂-Fragmente der monoklonalen BR96-Antikörper durch Pepsin-Abbau des gereinigten BR96, wie im folgenden beschrieben, hergestellt (Nisonoff et al., „The Antibody Molecule“, Academic Press, New York [1975]). Die Bindung des F(ab')₂-Fragmentes an Tumorzellen (3396) und MCF7-Zellen kann mit der Bindung des vollständigen monoklonalen BR96-Antikörpers verglichen werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der erfindungsgemäße chimäre (Maus/Mensch) Antikörper mit Hilfe des zweistufigen homologen Rekombinationsverfahrens gemäß der Beschreibung von Fell et al. in „*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*“, 86: 8507–8511 (1989) und der US-Patentanmeldung 243873 und der US-Patentanmeldung 468035 hergestellt. Auf die Lehre dieser Dokumente wird hiermit in vollem Umfang Bezug genommen. Dieses zweistufige Verfahren beinhaltet die Verwendung eines Zielvektors, der für die Human-IgGγ1-Schwere Kette codiert, zur Transfektion einer Maus-Hybridom-Zelllinie, welche den monoklonalen Maus-Antikörper BR96 exprimiert (Hybridom-Zelllinie ATCC Nr. HB 10036). Hierbei erhält man ein Hybridom, das einen chimären BR96-Antikörper exprimiert, der die Human-IgGγ1-Schwere Kette enthält. Dieses Hybridom wird anschließend mit einem Zielvektor transfiziert, der die DNA enthält, welche für die Human-Kappa (K)-Leichte Kette codiert, wobei man ein Maus-Hybridom erhält, das einen chimären BR96-Antikörper exprimiert, welcher die Human-IgGγ1-Schwere Kette und die Human-K-Leichte Kette enthält. Die Zielvektoren zur Transfektion der Hybridomzellen sind der pHγ1 HC-DD₄-Vektor, verdaut mit Xba 1-Enzym (Oncogen, Seattle, WA) und der mit Hind III verdaute pSV₂gpt/C_λ-Vektor (Oncogen, Seattle, WA).

Das chimäre BR96-Hybridom, hierin bezeichnet als ChiBR96, das gemäß folgender Beschreibung hergestellt wird und den chimären Human-Maus-Antikörper BR96 produziert, wurde am 23. Mai 1990 bei der ATCC wie folgt hinterlegt:

ChiBR96 ATCC Registriernummer: HB 10460.

Nach Identifizierung des Hybridoms, welches den chimären Antikörper produziert, wird das Hybridom kultiviert und die gewünschten chimären Moleküle werden aus dem Überstand der Zellkultur mit Hilfe bekannter Verfahren zur Isolierung monoklonaler Antikörper isoliert.

Der hierin verwendete Ausdruck „BR96-Antikörper“ umfaßt ganze, intakte polyklonale und monoklonale Antikörper, wie z. B. den monoklonalen BR96-Maus-Antikörper, der von den Hybridomen ATCC Nr. HB 10036 produziert wird, sowie chimäre Antikörpermoleküle, wie z. B. chimäre BR96-Antikörper, die durch Hybridome ATCC Nr. 10460 produziert werden. Der eben

erwähnte Ausdruck „BR96-Antikörper“ umfaßt außerdem jedes Fragment davon, das die aktive, Antigen bindende Region des Antikörpers, wie z. B. Fab-, F(ab')₂- und Fv-Fragmente enthält, das mit Hilfe des Standes der Technik hergestellt werden kann (vgl. z. B. Rouseau et al., „Optimal Conditions For The Preparation of Proteolytic Fragments From Monoclonal IgG of Different Rat IgG Subclasses“, in *Methods Enzymol.*, 121: 663–669 [Academic Press 1986]). Der erfindungsgemäße BR96-Antikörper umfaßt außerdem Fusionsproteine.

Außerdem zeigt der erfindungsgemäße BR96-Antikörper keinerlei immunohistologisch nachweisbare Anbindung an normales Humangewebe der Hauptorgane, wie Niere, Milz, Leber, Haut, Lunge, Brust, Kolon, Gehirn, Schilddrüse, Herz, Lymphknoten und Ovarien. Außerdem reagiert der Antikörper nicht mit Peripherblutleukozyten. BR96-Antikörper zeigen ein geringfügiges Bindungsvermögen gegenüber einigen Zellen in Mandeln und Hoden und binden an azinöse Zellen der Pankreas sowie an Epithelzellen in Magen und Ösophagus. Der BR96-Antikörper ist somit den meisten bekannten Antitumor-Antikörpern aufgrund des hohen Maßes an Spezifität gegenüber Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen überlegen (vgl. z. B. Hellstrom et al., „Immunological Approaches To Tumor Therapy: Monoclonal Antibodies, Tumor Vaccines, And Anti-Idiotypes“, in *Covalently Modified Antigens And Antibodies In Diagnosis And Therapy*, Quash/Rodwell [eds.], S. 1–39 [Marcell Dekker, Inc. 1989] und Bagshawe, „Tumour Markers – Where Do We Go From Here“, *Br. J. Cancer*, 48: 167–175 [1983]).

Die vorliegende Erfindung umfaßt außerdem Antikörper, welche an die gleiche antigene Determinante, wie die BR96-Antikörper binden können und mit den Antikörpern um diese Bindungsstelle konkurrieren. Diese umfassen Antikörper, die die gleiche Antigen-Spezifität wie der BR96-Antikörper besitzen, sich jedoch in der Herkunftsspezies, dem Isotyp, der Bindungsaffinität oder den biologischen Funktionen (z. B. Zytotoxizität) unterscheiden. Beispielsweise können unter Verwendung von rekombinanten „class-switching“ und Fusionstechniken, die aus dem Stand der Technik bekannt sind (vgl. z. B. Thammana et al., „Immunoglobulin Heavy Chain Class Switch From IgM to IgG In A Hybridoma“, *Eur. J. Immunol.*, 13: 614 [1983]; Spira et al., „The Identification Of Monoclonal Class Switch Variants By Subselection And ELISA Assay“, *J. Immunol. Meth.*, 74: 307–315 [1984]; Neuberger et al., „Recombinant Antibodies Possessing Novel Effector Functions“, *Nature*, 312: 604–608 [1984] und Oi et al., „Chimeric Antibodies“, *Biotechniques*, 4 [3]: 214–221 [1986]), Klasse, Isotyp und andere Varianten des erfindungsgemäßen Antikörpers mit der Antigen-Bindungsregion des BR96-Antikörpers konstruiert werden. Auf diese Weise können andere chimäre Antikörper oder andere rekombinante Antikörper (z. B. Fusionsproteine, worin der Antikörper mit einem zweiten Protein, wie z. B. einem Lymphokin oder einem tumorinhibierenden Wachstumsfaktor kombiniert ist), welche die gleiche Bindungsspezifität wie der BR96-Antikörper besitzen, erfindungsgemäß hergestellt werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Anti-Idiotyp-Antikörper des erfindungsgemäßen BR96-Antikörpers. Diese Anti-Idiotyp-Antikörper können unter Verwendung des BR96-Antikörpers und der Fragmente davon als Immunogen hergestellt werden und eignen sich zu diagnostischen Zwecken beim Nachweis der humoralen Antwort auf Tumoren sowie in therapeutischen Anwendungen, wie z. B. in einem Vakzin zur Induktion einer Anti-Tumorantwort in Patienten (vgl. z. B. Nepom et al., „Anti-Idiotypic Antibodies And The Induction Of Specific Tumor Immunity“, in *Cancer And Metastasis Reviews*, 6: 487–501 [1987]).

Der erfindungsgemäße BR96-Antikörper eignet sich auch zu diagnostischen Anwendungen (in vitro und in vivo) zum Nachweis von Humankarzinomen, welche ein Antigen besitzen, auf das die Antikörper spezifisch reagieren. Die diagnostischen In-vitro-Menschen umfassen den immunohistologischen Nachweis von Tumorzellen (z. B. in Humangewebe, Zellen oder entfernten Tumoren) oder den serologischen Nachweis von tumorassoziierten Antigenen (z. B. in Blutproben oder anderen biologischen Flüssigkeiten).

Die immunohistologischen Techniken beinhalten die Anfärbung einer biologischen Probe, wie z. B. einer Gewebeprobe, mit dem BR96-Antikörper der vorliegenden Erfindung und die Überprüfung auf Vorliegen eines Antikörper-Antigen-Komplexes in der Probe. Die Bildung derartiger Antikörper-Antigen-Komplexe in der Probe weisen auf das Vorliegen von Krebszellen in dem Gemisch hin. Der Nachweis des Antikörpers in der Probe kann mit Hilfe bekannter Techniken, wie z. B. immunoenzymatischen Techniken, wie der Immunoperoxidase-Färbetechnik oder der Avidin-Biotin-(ABC-) Technik oder den Immunofluoreszenztechniken (vgl. z. B. Ciocca et al., „Immunohistochemical Techniques Using Monoclonal Antibodies“, *Meth. Enzymol.*, 121: 562–579 [1986]; Hellstrom et al., „Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma“, *Cancer Research*, 46: 3917–3923 [1986] und Kimball [ed.], *Introduction To Immunology* [2. Auflage], S. 113–117 [Macmillan Pub. Co., 1986]) erfolgen. Beispielsweise wurde die Immunoperoxidase-Färbetechnik wie im folgenden Beispiel 2 beschrieben, angewendet, um die Reaktivität des BR96-Antikörpers gegenüber Lungen-, Brust-, Kolon- und Ovarialkarzinomen und die geringe Reaktivität des Antikörpers gegenüber normalen Gewebeproben zu zeigen.

Serologische Diagnostiktechniken umfassen den Nachweis und die Quantifizierung von tumorassoziierten Antigenen, welche in das Serum oder andere biologische Flüssigkeiten von Patienten, die an Karzinomen erkrankt sind, sezerniert oder „abgegeben“ wurden. Diese Antigene können in den Körperflüssigkeiten mit Hilfe bekannter Techniken, wie z. B. dem Radioimmunoassay (RIA) oder Enzymgebundenen Immunsorptionsassays (ELISA) nachgewiesen werden, wobei ein Antikörper, der mit dem abgegebenen Antigen reagiert, zum Nachweis auf Vorliegen des Antigens in einer Flüssigkeitsprobe verwendet wird (vgl. z. B. Uotila et al., „Two-Site Sandwich ELISA With Monoclonal Antibodies To Human AFP“, *J. Immunol. Methods*, 42: 11 [1981] und Allum et al., supra auf Seite 48–51). Diese Tests können daher unter Verwendung der hierin beschriebenen BR96-Antikörper zum Nachweis von Glycolipid-Antigenen in einer biologischen Flüssigkeit verwendet werden, mit welchen die BR96-Antikörper reagieren, und dienen somit zum Nachweis von Humankarzinomen in Patienten. Es ist somit ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen BR96-Antikörper in den meisten Tests, welche eine Antigen-Antikörperreaktion beinhalten, verwendet werden können. Diese Tests umfassen beispielsweise standardisierte RIA-Techniken, sowohl in flüssiger als auch in fester Phase, als auch ELISA-Tests, Immunofluoreszenz-Techniken und andere immunozytochemische Tests (vgl. z. B. Sikora et al. [eds.], „*Monoclonal Antibodies*“, S. 32–52 [Blackwell Scientific Publications 1984]).

Die vorliegende Erfindung umfaßt außerdem Diagnose-Kits zur Durchführung der oben beschriebenen Tests. Gemäß einer Ausführungsform umfaßt ein Diagnose-Kit den monoklonalen BR96-Antikörper, Fragmente davon, Fusionsproteine oder chimäre Antikörper gemäß vorliegender Erfindung sowie ein Konjugat aus einem spezifischen Bindungspartner für den BR96-Antikörper und einer Markierung zur Erzeugung nachweisbarer Signale. Die Reagenzien können auch Hilfsmittel, wie z. B. Puffer und Proteinstabilisatoren (Polysaccharide), enthalten. Ein Diagnose-Kit kann außerdem gegebenenfalls andere Komponenten zur Signalerzeugung enthalten, wie z. B. Mittel, welche die Wechselwirkung mit dem Untergrund reduzieren, Kontrollreagenzien und Vorrichtungen oder Behältnisse zur Durchführung des Tests. Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfaßt ein Diagnose-Kit ein Konjugat des erfindungsgemäßen BR96-Antikörpers mit einem Label (Markierung), mit dem ein nachweisbares Signal erzeugt werden kann. Die oben erwähnten Hilfsmittel können ebenfalls vorliegen.

Der erfindungsgemäße BR96-Antikörper eignet sich auch zu diagnostischen In-vivo-Anwendungen zum Nachweis von Humankarzinomen. Ein derartiger Ansatz umfaßt den Nachweis eines Tumors in vivo mit Hilfe von Tumordarstellungstechniken. Hierbei wird der BR96-Antikörper mit einem geeigneten Abbildungsreagens, welches ein nachweisbares Signal produziert, markiert. Beispiele von anwendbaren Abbildungsreagenzien sind Radiolabel, wie z. B. ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{125}I , ^3H und ^{14}C , Fluoreszenzlabel, wie z. B. Fluorescein und Rhodamin und Chemilumineszenzstoffe, wie Luciferin. Der Antikörper kann mit derartigen Substanzen mit Hilfe bekannter Techniken markiert werden. Vgl. z. B. Wensel und Meares, „Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy“, Elsevier, New York (1983) für die Radiomarkierung von Antikörpern (vgl. auch Colcher et al., „Use of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice“, Meth. Enzymol., 121: 802–806 [1986]).

Im Falle radiomarkierter Antikörper wird der Antikörper dem Patienten verabreicht. Der Antikörper sammelt sich im Bereich des Tumors an, der das mit dem Antikörper reagierende Antigen trägt und wird in vivo mit Hilfe bekannter Techniken, wie z. B. durch radionukleares Scanning unter Verwendung einer Gammakamera oder durch Emissionstomographie (vgl. z. B. Bradwell et al., „Developments In Antibody Imaging“ in „Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy“, Baldwin et al. [eds.], S. 65–85 [Academic Press 1985]) nachgewiesen. Der Antikörper wird dem Patienten in einem pharmazeutisch verträglichen Träger, wie z. B. Wasser, Saline, Ringers Lösung, Hanks Lösung oder in nichtwäßrigen Trägern, wie z. B. nichtflüssigen Ölen, verabreicht. Der Träger kann außerdem Substanzen enthalten, welche die Isotonität und die chemische Stabilität des Antikörpers fördern (wie z. B. Puffer oder Konservierungsmittel). Die Antikörperformulierung wird beispielsweise intravenös in einer Dosis verabreicht, die ausreicht, um eine hinreichende Gammaemission zur Visualisierung des Tumorbereiches zu ermöglichen. Es sollte außerdem genügend Zeit zwischen der Verabreichung des Antikörpers und dem Nachweis liegen, um eine Ansammlung im Bereich des Tumors zu gewährleisten. Zur allgemeinen Diskussion von Tumorabbildungstechniken siehe Allum et al., supra. Die Eigenschaften des BR96-Antikörpers:

- a) sehr hohe Spezifität gegenüber Tumorzellen;
- b) Internalisierbarkeit;
- c) selbständige Toxizität gegenüber Antigen positiven Tumorzellen, d. h. in unmodifizierter Form, und in geeigneten Konzentrationen; und
- d) CDC- und ADCC-Aktivität

weisen auf eine Vielzahl von therapeutischen In-vivo-Applikationen hin. Der BR96-Antikörper kann alleine zum Targeting und Abtöten von Tumorzellen in vivo verwendet werden. Der Antikörper kann außerdem in Verbindung mit einem geeigneten therapeutischen Mittel zur Behandlung von Humankarzinomen verwendet werden. Beispielsweise kann der Antikörper in Kombination mit herkömmlichen oder standardisierten Behandlungsverfahren, wie z. B. der Chemotherapie, Strahlentherapie, verwendet werden. Er kann auch mit einem therapeutischen Wirkstoff oder Toxin oder mit einem Lymphokin oder einem tumorinhibierenden Wachstumsfaktor verbunden oder konjugiert sein, um das therapeutische Mittel im Bereich des Karzinoms freizusetzen. Konjugierungs-Techniken für derartige therapeutische Mittel an Antikörper sind bekannt (vgl. z. B. Arnon et al., „Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy“, in „Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy“, Reisfeld et al. [eds.], S. 243–256 [Alan R. Liss, Inc. 1985]; Hellstrom et al., „Antibodies For Drug Delivery“ in Controlled Drug Delivery“, [2. Ausgabe], Robinson et al. [eds.], S. 623–653 [Marcel Dekker, Inc. 1987]; Thorpe „Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review“ in „Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications“, Pinchera et al. [eds.], S. 475–506 [1985] und Thorpe et al., „The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates“, Immunol. Rev., 62: 119–158 [1982]). Der erfindungsgemäße BR96-Antikörper eignet sich besonders zur Verwendung als therapeutisches Konjugat, da er in den Karzinomzellen, an die er bindet, allmählich angereichert (internalisiert) wird und somit das therapeutische Mittel am intrazellulären Wirkungsort freisetzen kann.

Der BR96-Antikörper kann auch mit hochenergetischer Strahlung, wie z. B. einem Radioisotop, wie ^{131}I , kombiniert werden, was bei einer Lokalisierung im Bereich des Tumors zu einem Abtöten mehrerer Zellschichten führt (vgl. z. B. Order, „Analysis Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy“ in „Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy“, Baldwin et al. [eds.], S. 303–316 [Academic Press 1985]). Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann der BR96-Antikörper mit einem zweiten Antikörper konjugiert werden, wobei man ein Antikörper-Heterokonjugat zur Behandlung von Tumorzellen erhält (vgl. US-Patent 4676980).

Weitere therapeutische Anwendungen für den BR96-Antikörper umfassen die Konjugation oder Verbindung (beispielsweise durch DNA-Rekombinationstechniken) mit einem Enzym, welches zur Umwandlung einer Prodrug in einen zytotoxischen Wirkstoff befähigt ist, sowie die Verwendung dieses Antikörper-Enzymkonjugates in Kombination mit der Prodrug zur Umsetzung der Prodrug zu einem zytotoxischen Wirkstoff im Bereich des Tumors (vgl. z. B. Senter et al., „Anti-Tumor Effects Of Antibody-alkaline Phosphatase“; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4842–4846 [1988]; „Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitomycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates“, „Cancer Research“ 49: 5789–57892 [1989] und Senter, „Activation of Prodrug by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy, FASEB J. 4: 188–193 [1990]). Eine weitere therapeutische Anwendungsmöglichkeit für die BR96-Antikörper umfaßt deren Verwendung, entweder in Gegenwart von Komplement oder als Teil eines Antikörper-Wirkstoff- oder Antikörper-Toxin-Konjugates, zur Entfernung von Tumorzellen aus dem Knochenmark von Krebspatienten. Hierbei wird autologes Knochenmark ex vivo durch Behandlung mit dem Antikörper gereinigt, und das Knochenmark wird dem Patienten per Infusion verabreicht (vgl. z. B. Ramsay et al., „Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies“, J. Clin. Immunol., 8[2]: 81–88 [1988]).

Außerdem können die erfindungsgemäßen, oben beschriebenen chimären oder rekombinanten BR96-Antikörper therapeutisch verwendet werden. Beispielsweise kann ein Fusionsprotein, welches wenigstens die antigenbindende Region des BR96-Antikörpers in Verbindung mit wenigstens einem funktionell aktiven Teil eines zweiten Proteins mit Antitumoraktivität, wie z. B. einem Lymphokin oder Oncostatin, enthält, zur In-vivo-Behandlung von Humankarzinomen verwendet werden. Außerdem können aus dem Stand der Technik bekannte Rekombinationstechniken zur Konstruktion von bispezifischen Antikörpern verwendet werden, worin eine der Bindungsspezifitäten der des Antikörpers BR96 entspricht (vgl. z. B. US-Patent 4474893).

Schließlich können Anti-Idiotyp-Antikörper des BR96-Antikörpers therapeutisch zur aktiven Tumorimmunisierung und Tumorthherapie verwendet werden (vgl. z. B. Hellstrom et al., „Immunological Approaches To Tumor Therapy: Monoclonal Antibodies, Tumor Vaccines, And Anti-Idiotypes“, in „Covalently Modified Antigens And Antibodies In Diagnosis And Therapy“, supra, S. 35–41).

Daraus wird ersichtlich, daß die vorliegende Erfindung pharmazeutische Mittel, Kombinationen und Verfahren zur Behandlung von Humankarzinomen umfaßt. Beispielsweise umfaßt die vorliegende Erfindung pharmazeutische Mittel zur Verwendung bei der Behandlung von Humankarzinomen. Diese Mittel umfassen eine pharmazeutisch wirksame Menge eines BR96-Antikörpers und eines pharmazeutisch verträglichen Trägers. Die Mittel können den BR96-Antikörper entweder in unmodifizierter Form, konjugiert mit einem therapeutischen Mittel (z. B. Wirkstoff, Toxin, Enzym oder zweiten Antikörper) oder in rekombinanter Form (z. B. chimärer oder bispezifischer BR96) enthalten. Die Mittel können außerdem andere Antikörper oder Konjugate zur Karzinombehandlung (z. B. ein Antikörper-Cocktail) enthalten.

Die erfindungsgemäßen Antikörperzusammensetzungen können durch herkömmliche Verabreichungsweisen, wie z. B. intravenös, intraperitoneal, oral, intralymphatisch oder direkt in den Tumor verabreicht werden. Eine intravenöse Verabreichung wird bevorzugt.

Die erfindungsgemäßen Antikörperzusammensetzungen können in unterschiedlichen Dosierungsformen, wie z. B. flüssigen Lösungen oder Suspensionen, Tabletten, Pillen, Pulvern, Suppositorien, polymeren Mikrokapseln oder Mikrovesikeln, Liposomen, sowie als injizierbare oder durch Infusion verabreichbare Lösungen vorliegen. Welche Form jeweils bevorzugt ist, hängt von der Art der Verabreichung und der therapeutischen Anwendung ab.

Die Antikörperzusammensetzungen enthalten vorzugsweise herkömmliche, pharmazeutisch verträgliche Träger und Hilfsstoffe, wie z. B. Humanserumalbumin, Ionenaustauscher, Aluminiumoxid, Lecithin, Puffersubstanzen, wie Phosphate, Glycin, Sorbinsäure, Kaliumsorbat, und Salze oder Elektrolyte, wie z. B. Protaminsulfat.

Die wirkungsvollste Verabreichungsart und Dosierungsform des erfindungsgemäßen Mittels ist abhängig von Schwere und Verlauf der Erkrankung, der Gesundheit des Patienten und dessen Ansprechen auf die Behandlung sowie von der Beurteilung und der Behandlung des Arztes. Dementsprechend wird die Dosierung des Mittels auf den einzelnen Patienten abgestimmt. Eine wirksame Dosis des antikörperhaltigen Mittels kann erfindungsgemäß im Bereich von etwa 1 bis etwa 2000 mg/m² liegen. Die folgenden Beispiele dienen dem besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung. Diese Beispiele dienen der Veranschaulichung, ohne jedoch den Schutzzumfang dieser Erfindung zu beschränken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Herstellung der monoklonal BR96-Antikörper

Der erfindungsgemäße monoklonale BR96-Antikörper wird unter Verwendung der bereits früher beschriebenen Hybridomafusionstechniken (M. Yeh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, [1979], supra und Yeh et al., Int. J. Cancer [1982], supra) hergestellt.

Eine 3 Monate alte BALB/c-Maus wird mit Hilfe eines Immunogens immunisiert, welches aus kultivierten Zellen eines Humanbrustadenokarzinoms mit der Bezeichnung 3396 oder H 3396 isoliert wurde (aus dem Adenokarzinom der Brust eines Patienten, kultiviert bei Oncogen, Seattle, Washington). Der Maus werden fünfmal Injektionen verabreicht: Die Maus erhält viermal eine intraperitoneale Injektion und eine subkutane Injektion, aufgeteilt auf vier Stellen der Maus. Beim fünften Mal erhält die Maus lediglich eine intraperitoneale Injektion. Die Gesamtzahl der injizierten Zellen je Verabreichung beträgt etwa 10⁷ Zellen. Drei Tage nach der letzten Immunisierung entfernt man die Milz und suspendiert die Milzzellen in RPMI-Kulturmedium. Die Milzzellen werden anschließend mit P3-x63-Ag8.653-Mausmyelomzellen in Gegenwart von Polyethylenglykol (PEG) fusioniert und die Zellsuspension wird in Mikrotiterplatten in selektivem HAT-Medium, wie von Yeh et al. (s. oben) beschrieben, gezüchtet (vgl. auch Köhler und Milstein, „Nature“, 256:495-497 [1975] und „Eur. J. Immunol.“, 6:511-519 [1976]). Das Gemisch wird überimpft, um Kulturen niedriger Dichte zu erhalten, die aus einzelnen fusionierten Zellen oder Klonen bestehen.

Den jeweiligen Überstand dieser Hybridomzellenkulturen testet man anschließend auf direkte Bindungsaktivität gegenüber der Brustkrebszelllinie 3396 und einer Fibroblasten-Zelllinie, hergestellt durch Hautbiopsie, unter Verwendung eines ELISA-Tests in Anlehnung an die Beschreibung von Douillard et al., „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For Screening Monoclonal Antibody Production Using Enzyme-Labeled Second Antibody“, Meth. Enzymol., 92:168-174 (1983).

In diesem Test wird das Antigen (mit dem der gescreente Antikörper reagiert) auf Mikrotiterplatten immobilisiert und anschließend mit den Überständen der Hybridome inkubiert. Enthält ein Überstand den gewünschten Antikörper, so bindet der Antikörper an das immobilisierte Antigen und wird nachgewiesen durch Zugabe eines Antiimmunglobulin-Antikörper-Enzymkonjugates und eines Substrats für das Enzym, wodurch eine meßbare Änderung der optischen Dichte bewirkt wird. In den vorliegenden Untersuchungen werden Brustkrebszellen oder Fibroblasten-Kontrollzellen in Gewebeskulturplatten (96 Kammern, Costar Cambridge, MA) verteilt und über Nacht in einem feuchten, 37°C warmen Inkubator (5% CO₂) inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit 100 µl frisch hergestelltem 1%igem Glutaraldehyd bei einer Endkonzentration in den Kammern von 0,5% fixiert und 15 min bei Zimmertemperatur inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit 1X phosphatgepufferter Saline (PBS). Die Zellen werden anschließend 30 min mit 5%igem Rinderserumalbumin (BSA) in PBS geblockt (blocked) und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Überstände der Hybridom-Kulturen werden in einer Menge von 100 µl/Kammer hinzugegeben, die Kammern werden 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen. Als nächstes gibt man Ziegen-Antimaus-Meerrettichperoxidase (Zymed, CA), verdünnt in 0,1%iger BSA und PBS in einer Konzentration von 100 µl/Kammer hinzu. Das Reaktionsgemisch wird entweder 1 h bei Zimmertemperatur oder 30 min bei 37°C inkubiert, und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend gibt man o-Phenylendiamin (OPD) hinzu (100 µl/Kammer) und inkubiert die Platten bei Zimmertemperatur im Dunkeln 5-45 min. Die Antikörperbindung an die Zellen wird durch eine Farbveränderung in den Kammern, die innerhalb von 10-20 min auftritt, nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von H₂SO₄ (100 µl/Kammer) gestoppt und die Absorption in einem Dynatech (Alexandria, VA) Mikroelisa-Autoreader bei 490 nm abgelesen.

Es ist zu bemerken, daß dieser Test unter Verwendung intakter Zellen oder mit Hilfe des gereinigten, gelösten Antigens oder mit Zellextrakten als immobilisiertes Antigen durchgeführt werden kann. Bei Verwendung von löslichem Antigen oder Zellextrakten als Antigen wird das Antigen anfangs in einer Menge von 50 µl/Kammer in PBS verteilt und man inkubiert die Platten über Nacht bei Zimmertemperatur vor Beginn des Tests. Intakte Zellen können als Antigen entweder frisch oder nach Fixierung verwendet werden. In jedem Fall werden die Zellen in einer Menge von 10⁴ Zellen in 100 µl/Kammer im Kulturmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C in einem Inkubator (5% CO₂) inkubiert.

Hybridome, die Antikörper produzieren, welche an die Brustkrebszelllinie und nicht an die Humanfibroblastenzellen binden, werden somit selektiert und in einem FACS-Zellsortiergerät auf Peripherblutleukozyten (PBLs), wie im folgenden Beispiel 2

beschrieben, getestet. PBLs-negative Hybridome werden kloniert, *in vitro* vermehrt und weiter auf Antikörperspezifität getestet. Diejenigen Hybridome, welche einen mit Humanbrustkrebs reagierenden Antikörper produzieren, werden rekloniert, gezüchtet (expanded) und in pristan-primed 3 Monate alte BALB/c-Mäuse injiziert, in denen sie als Aszitestumoren wachsen. Führt man dieses Verfahren durch, so erhält man die Hybridomzelllinie BR96, die man kloniert und Mäusen injiziert, um einen Aszitestumor zu erhalten. Wie oben bereits erwähnt, wurde das BR96-Hybridom bei der ATCC hinterlegt. Monoklonale BR96-Antikörper werden aus dem Aszites durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem, rekombinantem Protein A (Repligen, Cambridge, MA) gereinigt. Geklärte Aszitesflüssigkeit verdünnt man mit dem gleichen Volumen Bindungspuffer (1 M Kaliumphosphat, pH 8) und trägt das Gemisch auf eine Protein A-Säule auf, die vorher mit dem Bindungspuffer äquilibriert wurde. Die Säule wäscht man sorgfältig mit Bindungspuffer und eluiert den Antikörper anschließend mit 50 mM Phosphorsäure, pH 3. Die gereinigte Antikörperfraktion neutralisiert man mit 1 M Tris, pH 9 und dialysiert anschließend gegen phosphatgepufferte Saline. Gereinigter BR96 wird anschließend steril filtriert und im gekühlten oder gefrorenen Zustand aufbewahrt.

Beispiel 2

Charakterisierung des monoklonalen BR96-Antikörpers

Isotypbestimmung

Zur Bestimmung der durch das BR96-Hybridom produzierten Immunglobulinklasse werden folgende Techniken eingesetzt:

(a) Ouchterlony Immunodiffusion

Ein Teil des Überstandes der Hybridomzellen wird in das Mittelloch einer (25%igen) Agarplatte gegeben. Monospezifische Kaninchen-Antimaus Ig-Isotyp-Antikörper (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) gibt man in die äußeren Löcher und inkubiert die Platte 24–28 h bei Zimmertemperatur. Anschließend werden die Präzipitationslinien abgelesen.

(b) ELISA-Isotypisierung

Dynatech Immulon-Platten (96 Kammern) werden mit Ziegen-Anti-Maus-Ig-Antikörpern (1 µg/ml Konzentration, 50 µl/Kammer in PBS) beschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die Platten werden mit PBS/Tween 20 (0,05%) gewaschen und 1 h bei Zimmertemperatur mit Medium (100 µl/Kammer) 1 h geblockt. Nach erneutem Waschen der Platten gibt man den Überstand von BR96-Hybridomzellen hinzu und inkubiert 1 h bei Zimmertemperatur. Nach Waschen mit PBS mit einem Gehalt von 2% Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert man die Platten 30 min bei 37°C mit monospezifischen Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Isotyp-Antikörpern, gekoppelt mit Peroxidase (Zymed, South San Francisco, CA). Nach einem weiteren Waschschrift inkubiert man mit 1 mg/ml OPD und 0,03% H₂O₂ in 0,1 M Citratpuffer, pH 4,5. Die optische Dichte bestimmt man auf einem Dynatec ELISA-Plattenmeßgerät bei 360 nm. Mit Hilfe dieses Verfahrens bestimmt man für die monoklonalen BR96-Antikörper den Isotyp IgG3.

Charakterisierung des monoklonalen BR96-Antikörpers

Der BR96-Antikörper zeigt ein hohes Maß an Reaktivität gegenüber einer Vielzahl von Karzinomtypen, dagegen lediglich eine geringe Reaktivität gegenüber normalen Zellen. Dies konnte auf experimentellem Weg unter Verwendung von immunohistologischen Untersuchungen an gefrorenen Gewebsschnitten sowie mit Hilfe von Bindungsstudien unter Verwendung intakter, kultivierter Zellen gezeigt werden.

Immunohistologie

Die Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik von L. A. Sternberger, beschrieben in „Immunochemistry“, S. 104–169 (John Wiley & Sons, New York, 1979) und modifiziert von H. J. Garrigues et al., „Detection Of A Human Melanoma-Associated Antigen, p97, In Histological Sections of Primary Human Melanomas“, Int. J. Cancer, 29:511–515 (1982) wurde in den immunohistologischen Untersuchungen eingesetzt. Das Zielgewebe für diese Tests erhält man auf operativem Weg und durch Einfrieren innerhalb von 4 h nach der Entfernung in Isopentan, vorgekühlt in flüssigem Stickstoff. Die Gewebeproben werden in flüssigem Stickstoff oder bei –70°C bis zu deren Verwendung aufbewahrt. Die gefrorenen Schnitte werden vorbereitet, luftgetrocknet, mit Aceton behandelt und erneut getrocknet (Garrigues et al, supra). Die zur histologischen Bestimmung verwendeten Schnitte färbt man mit Hematoxylin an. Um unspezifischen Untergrund zu verringern, werden die Schnitte mit normalem Humanserum (1/5 verdünnt in PBS) vorinkubiert (vgl. Garrigues et al, supra). Maus-Antikörper, Kaninchen-Anti-Maus-IgG und Maus-PAP verdünnt man in einer Lösung von 10%igem normalem Humanserum und 3%igem Kaninchenserum. Kaninchen-Anti-Maus-IgG (Sternberger-Meyer Immunochemicals, Inc., Jaretsville, MD) verwendet man in einer Verdünnung von 1/50. Maus-PAP-Komplexe (Sternberger-Meyer Immunochemicals, Inc.) mit einem Gehalt von 2 mg/ml an speziell gereinigtem PAP verwendet man in einer Verdünnung von 1/50.

Das Färbeverfahren besteht aus einer Behandlung von Schnittserien mit entweder spezifischem Antikörper, d. h. BR96, oder einem Kontrollantikörper über eine Dauer von 2,5 h, aus einer 30minütigen Inkubation, der Schnitte bei Zimmertemperatur mit Kaninchen-Anti-Maus-IgG, 1/50 verdünnt, und einer anschließenden 30minütigen Behandlung der Schnitte bei Zimmertemperatur mit Maus-PAP-Komplex, 1/50 verdünnt. Nach jeder Antikörperbehandlung wäscht man die Schnitte zweimal mit PBS.

Die immunohistochemische Reaktion erfolgt durch Zugabe von frisch hergestelltem, 0,5%igem 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) und 0,01 % H₂O₂ in 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6, innerhalb von 8 min (vgl. Hellstrom et al., J. Immunol., 127:157–160 [1981]).

Eine weitere 20minütige Behandlung mit einer 1%igen OsO₄-Lösung in destilliertem Wasser intensiviert die Färbung. Die Schnitte spült man mit Wasser, entwässert in Alkohol, reinigt mit Xylol und überführt die Schnitte auf Glasscheiben. Parallele Schnitte werden mit Hematoxylin gefärbt.

Die Scheiben werden codiert bewertet, wobei eine unabhängige Person die codierten Proben überprüft. Typische Schnitte werden unter Verwendung einer Differentialinterferenz-Kontrastoptik (Zeiss-Nomarski) photographiert. Das Maß der Antikörperfärbung wird wie folgt bewertet:

0 (keine Reaktivität), + (wenige schwach positive Zellen), ++ (wenigstens ein Drittel der Zellen positiv), +++ (überwiegende Anzahl der Zellen positiv), ++++ (annähernd alle Zellen stark positiv). Da die Unterschiede zwischen einer + und einer 0

Färbung weniger deutlich waren, als zwischen einer + und einer ++ Färbung, wurde eine mit ++ oder darüber bewertete Färbung als positiv bewertet. Sowohl neoplastische Zellen als auch Stromazellen wurden in den Tumorproben beobachtet. Die aufgenommene Färbung stammt von den Tumorzellen, da die Stromazellen nicht angefärbt oder sehr viel schwächer als Tumorzellen angefärbt werden.

Folgende Tabelle I zeigt die Ergebnisse der immunohistologischen Färbung von verschiedenen Tumortypen und normalen Geweben unter Verwendung von BR96 monoklonalen Antikörpern. Der Tabelle ist deutlich zu entnehmen, daß die BR96-Antikörper mit einer Vielzahl von Humankarzinom-Typen reagieren, mit Sarkomzellen nicht reagieren und nur vereinzelt Reaktivität gegenüber Melanomzellen zeigen. Außerdem zeigen sie nur eine begrenzte Reaktivität mit sämtlichen getesteten normalen Humangewebsproben. Die einzige, für normale Zellen nachgewiesene, Reaktivität bestand in der Bindung an eine kleine Unterpopulation von Zellen in den Mandeln und im Hoden sowie an azinösen Zellen der Pankreas und an Epithelzellen von Magen und Speiseröhre.

Tabelle I

Immunoperoxidase-Färbung von Humantumoren und normalen Gewebetypen mit monoklonalem BR96-Antikörper

Gewebe-Typ	Anzahl (positiv)/Anzahl (getestet)
Tumor	
Lungenkarzinom (nicht-kleinzellig)	14/17
Brustkarzinom	17/19
Kolonkarzinom	15/18
Ovarialkarzinom	4/4
Endometrium-Karzinom	2/2
Melanom	2/5
Sarkom	0/5
Magenkarzinom	2/2
Pankreaskarzinom	2/2
Esophaguskarzinom	2/2
Zervikalkarzinom	2/2
Normales Gewebe	
Lunge	0/7
Milz	0/5
Brust	0/2
Kolon	0/7
Niere	0/7
Leber	0/5
Gehirn	0/2
Herz	0/3
Haut	0/2
Schilddrüse	0/2
Nebenniere	0/1
Eierstock	9/2
Lymphknoten	0/2
Lymphozytenpellet	0/4
Pankreas	2/2 (nur azinare Zellen waren positiv)
Uterus	0/7
Retina	0/1
Hoden	2/2 (nur kleine Unterpopulation von Zellen war positiv)
Tonsille (Mandeln)	2/2 (nur kleine Unterpopulation von Zellen war positiv)
Magen	2/2 (Epithelzellen positiv)
Esophagus (Speiseröhre)	2/2 (Epithelzellen positiv)

Die Bindung der BR96-Antikörper an verschiedene kultivierte Zelllinien wurde ebenfalls untersucht. Die Antikörperbindung an die Zelloberfläche von intakten, kultivierten Zellen wurde entweder mit Hilfe eines Direktbindungstests mit ¹²⁵I-markiertem Antikörper gemäß der Beschreibung von Brown et al., „Quantitative Analysis Of Melanoma-Associated Antigen p97 In Normal And Neoplastic Tissues“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:539–543 (1981) oder durch direkte Immunofluoreszenz unter Verwendung eines Coulter Epics C Fluorescenc Activated Cell Sorters (FACS) II (Hellstrom et al., Cancer Res., 46:3917–3923 [1986]) bestimmt.

Zur Bindungsanalyse unter Verwendung eines FACS Cell Sorters wurden 2×10^5 bis 1×10^6 kultivierte Zellen in 15% fötalem Rinderserum (FBS) in IMDM-Medium (Gibco, NY) auf ein Gesamtvolumen von 500 µl/Gefäß aufgeteilt. Die Zellen zentrifugiert man 1,5 min mit einer Serumzentrifuge (Serofuge) und entfernt den Überstand. Man gibt 100 µl monoklonale BR96-Antikörper (10 µl/ml) zu jedem Gefäß hinzu, dessen Inhalt gemischt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert wird. Das Reaktionsgemisch wäscht man dreimal mit 500 µl 15%igem FBS/IMDM durch 1,5minütige Zentrifugation in einer Serofuge (nach dem dritten Waschgang werden die Gefäße abgetupft [blotted]). Anschließend gibt man 50 µl eines optimierten FITC-konjugierten Ziegen-Antimaus-IGG-Antikörpers (Tago, Burlingame, CA), 1:25 verdünnt in 15%igem FBS/IMDM zu jedem Gefäß hinzu, mischt das Reaktionsgemisch und inkubiert 30 min. Man wiederholt den Waschschritt und resuspendiert nach Abtupfen der Gefäße jedes Pellet in 200–500 µl PBS. Jede Probe wird in einem Coulter Epics C FACS gemessen und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)

wird bestimmt. Aus dem MFI-Wert wird das lineare Fluoreszenäquivalent (LFE) bestimmt. Der LFE-Wert jedes Testansatzes wird durch den LFE-Wert einer negativen Kontrolle geteilt, so daß man ein Verhältnis der jeweiligen Leuchtkraft von Zellen erhält, welche mit spezifischen bzw. Kontrollantikörpern gefärbt wurden. Die Bindungsdaten sind in folgender Tabelle II zusammengefaßt:

Tabelle II
FACS-Analyse der Bindung von BR96 an verschiedene Typen suspendierter Zellen

Zelllinie		Verhältnis (10 µg/ml)
Brustkarzinom	3396	54
Brustkarzinom	MCF-7	38
Brustkarzinom	3630	22
Brustkarzinom	3680	22
Lungenkarzinom	2987	15
Lungenkarzinom	2707	30
Lungenkarzinom	2964	2
Lungenkarzinom	3655-3	18
Kolonkarzinom	RCA	34
Kolonkarzinom	3619	22
Kolonkarzinom	3347	5
Kolonkarzinom	HCT 116	1
Kolonkarzinom	CB 5	27
Kolonkarzinom	C	30
Kolonkarzinom	3600	16
Ovarialkarzinom	3633-3	11
Melanom	2669	1
Melanom	3606	1
Melanom	3620	1
T-Zellenlymphomlinie	CEM	1
T-Zellenlymphomlinie	MOLT-4	1
B-Zellenlymphomlinie	PRHR 1	1
Peripherblutleukozyten		1

Wie der Tabelle II zu entnehmen ist, reagieren die monoklonalen BR96-Antikörper mit Brust-, Lungen- und Kolonkarzinomzelllinien, jedoch nicht mit Melanomzelllinien oder mit T- oder B-Lymphomlinien und außerdem nicht mit normalen Peripherblutleukozyten. Eine „Scatchard“-Analyse unter Verwendung von radiomarkierten Antikörpern weist darauf hin, daß die ungefähre Assoziationskonstante (K_a) für BR96 bei $3,6 \times 10^6$ Antigenstellen/Zelle im Falle der 3396-Zelllinie (welche BR96 bindet) beträgt.

Diese Daten zeigen, daß der monoklonale Antikörper BR96 Zelloberflächenantigene erkennt, die in hohem Maß (bis zu 10^6 Molekülen/Zelle) bei einem Großteil der Humankarzinome exprimiert werden.

Beispiel 3

Internalisierung von monoklonalen BR96-Antikörpern in Karzinomzellen

Hierbei bestimmt man die Internalisierung von monoklonalen BR96-Antikörpern in Antigen-positiven Karzinomzellen. Gemäß einem Verfahren konjugiert man BR96 mit einem Toxin (Ricin-A-Kette), wobei man das Immunotoxin BR96-RA erhält, dessen Internalisierung durch Karzinomzellen bestimmt wird. Die Aufnahme des Konjugates durch Karzinomzellen weist man nach, indem man bestimmt, in welchem Maße die Tumorzellen durch die Ricin-A-Kette abgetötet werden.

Die Konjugation des Antikörpers mit dem Toxin wird wie folgt durchgeführt: Man behandelt eine deglycosylierte Ricin-A-Kette (Inland Labs, Austin, TX) (vgl. Blakey et al., *Cancer Res.*, 47:947-952 [1987]) mit Dithiothreitol (5 mM) und führt anschließend eine Gelfiltration über G-25 Sephadex unter Verwendung von PBS, pH 7,2, als Elutionsmittel durch. Das Produkt gibt man in einem molaren Verhältnis von 2:1 zu dem Antikörper in PBS hinzu, nachdem, vorher der Antikörper mit N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP) (Pierce, Rockford, IL) gemäß dem Verfahren von Lambert et al., *J. Biol. Chem.*, 260:12035-12041 (1985) modifiziert wurde. Die Reaktion erfolgt innerhalb von 12-24 h bei Zimmertemperatur. Die Lösung verdünnt man anschließend mit 1 Volumen H_2O . Unkonjugierten Antikörper entfernt man mit Hilfe von Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) (vgl. Knowles et al., *Anal. Biochem.*, 160:440-443 [1987]).

Man eluiert das Konjugat und überschüssige Ricin-A-Kette bei hoher Salzkonzentration ($10 \times$ PBS) und reinigt anschließend über Sephacryl-300 (Pharmacia) unter Verwendung von PBS als Elutionsmittel. Das hierbei erhaltene Konjugat ist frei von ungebundenen monoklonalen Antikörpern und Ricin-A-Ketten und besteht überwiegend aus 1:1-Addukten.

Die Internalisierung von BR96-RA durch verschiedene Karzinomzelllinien wird anschließend mit Hilfe eines „Thymidinaufnahme-Inhibitionstests“ bestimmt. In diesem Test stellt die Inhibition des 3H -Thymidin-Einbaus in die DNA von Karzinomzellen (d. h. die Inhibition der Zellproliferation) ein Maß für den zytotoxischen Effekt von BR96-RA auf die Zellen dar und ist somit ein Maß für die Internalisierung des Immunotoxins in den Zellen.

Für diesen Test werden Karzinomzellen in Mikrotiterplatten (96 Kammern, 2×10^4 Zellen/Kammer) in 100 µl IMDM-Medium mit 15% fötalem Kälberserum (FCS) ausplattiert. Die Platten inkubiert man 12-18 h bei 37°C, um die Zellen anhaften zu lassen. Anschließend wird das Medium entfernt. Die Platten hält man auf Eis. Das BR96-RA-Immunotoxin (100 µl) gibt man in seriellen Verdünnungsreihen (log 10), beginnend bei einer Endkonzentration von 10 µg/ml bis zu 0,01 µg/ml zu den Zellen hinzu. Das Reaktionsgemisch inkubiert man 4 h im Eis. Die Platten wäscht man, gibt 200 µl Medium hinzu und inkubiert nochmals 18 h bei 37°C. Anschließend gibt man 50 µl 3H -Thymidin hinzu (1 µCi/Kammer) und inkubiert die Platten 6 h bei 37°C in einem Inkubator

(5% CO₂). Die Testplatten werden anschließend 1 h bei -70°C eingefroren und 15 min in einem Geltdrockner aufgetaut. Man überführt die Zellen auf Glasfaserfiltern (Filterstreifen Nr. 240–241, Cambridge Technology) in Kunststoffszintillationsgefäßen unter Verwendung eines „PHD-Zellernters“. Man gibt 3 ml einer Szintillationsflüssigkeit hinzu und mißt die Gefäße in einem Beckman LS 3891 Beta-Szintillationszähler (Zählzeit je Probe 1 min).

Die graphische Auftragung der prozentualen Inhibition des Thymidin-Einbaus gegen die Immunotoxin-Konzentration für jede getestete Zelllinie ist in den Fig. 1 bis 5 dargestellt. In jedem Test wird eine Kontrollmessung durchgeführt. Die Testergebnisse geben den prozentualen ³H-Thymidin-Einbau, bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen, wieder.

Fig. 1 zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus von Zellen der Brustkarzinomzelllinie 3396 durch Internalisierung von BR96-RA. Ähnliche Ergebnisse erhält man mit der Lungenkarzinomzelllinie 2707 (Fig. 2) und der Kolonkarzinomzelllinie C (Fig. 4). BR96-RA wird durch die Zelllinie HCT 116, einer Humankolonkarzinomzelllinie, welche BR96 nicht bindet, nicht internalisiert (Fig. 3). Fig. 5 zeigt keine Internalisierung von BR96-RA durch 3347, einer Kolonkarzinomzelllinie, welche BR96 nicht bindet. Dagegen wird BR6-RA, welches an die 3347-Zellen bindet, internalisiert. Diese Untersuchung demonstriert somit nicht nur die Internalisierung des BR96-Antikörpers, sondern auch die Selektivität der Internalisierung von BR96-Antikörpern durch Antigen-positive Karzinomzellen.

Beispiel 4

Cytotoxizität von unmodifiziertem monoklonalem Antikörper BR96

Um die unerwartete Beobachtung, daß der monoklonale Antikörper BR96 selbst (d. h. in unmodifiziertem Zustand) einen zytotoxischen Effekt in einem FACS-Test zeigt, weiterzuforschen, werden drei verschiedene Experimente durchgeführt. Um die Wirkung des Komplementsystems im Serum auszuschließen, werden sämtliche eingesetzte Seren durch Hitzebehandlung inaktiviert (30 min bei 56°C). Zusätzlich werden einige der Experimente mit FACS-Analysen (im folgenden beschrieben) unter Verwendung von Zellen durchgeführt, die in serumfreiem Medium gezüchtet wurden und in Abwesenheit von Serum getestet werden.

Erstens, man behandelt lebende, suspendierte Zellen verschiedener Antigen-positiver Karzinomzelllinien (3396, 2987, 3619) mit dem monoklonalen Antikörper BR96. Die Zellen (5×10^5) inkubiert man in Eis 30 min mit 100 µl BR96 oder einem monoklonalen Kontrollantikörper bei einer Konzentration von 60, 30, 15, 7,5 oder 3,8 µg/ml im Kulturmedium (IMDM, 15% FBS). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Kulturmedium suspendiert man die Zellen in 500 µl Medium und färbt durch Zugabe des Farbstoffes Propidiumjodid an, welcher abgestorbene Zellen anfärbt (Krishan, Cell Biol., 66:188 [1975] und Yeh, J. Immunol. Methods, 43:269 [1981]). Aus einer Stammlösung (1 mg/ml in 70% Alkohol) gibt man 5 µl Farbstoff zu den Zellproben, inkubiert 15 min in Eis, wäscht einmal und suspendiert schließlich in 500 µl Medium. Die Zellen werden in einem Coulter Epics C FACS gemessen, wobei die abgestorbenen Zellen anhand ihrer roten Fluoreszenz identifiziert werden. Die Analyse erfolgt anhand eines Zweiparameter-Displays mit logarithmischer Vorwärts-Lichtstreuung im horizontalen Display und logarithmischer roter Fluoreszenz im vertikalen Display. Berechnungen der Zellgröße gegen die Lebensfähigkeit der Zellen erhält man durch Anwendung des Coulter Epics C Quadstat-Programms. Tumorzellen, welche BR96 binden, sowie Tumorzellen, welche BR96 nicht binden, werden parallel untersucht. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 gezeigt. Fig. 6 veranschaulicht, daß eine Inkubation mit BR96 die Zellen aller drei Antigen-positiver Karzinome schnell abtötet. Unbehandelte und Antigen-negative Zellen werden nicht abgetötet.

Zweitens, man behandelt Tumorzellen (3396, 3630, 2987, 3619 und HCT 116) mit BR96 (oder mit einem monoklonalen Kontrollantikörper) 18 h bei 37°C in einer Mikrotiterplatte (96 Kammern) unter Verwendung von 3×10^3 Zellen/Kammer in 150 µl IMDM-Medium, welches FBS enthält (66 h). Anschließend gibt man 50 µl ³H-Thymidin hinzu (1 µCi/Kammer) und inkubiert die Platte 6 h bei 37°C. Anschließend wird mindestens 1 h bei -70°C eingefroren und in einem Geltdrockner 15 min aufgetaut. Die Zellen werden auf Glasfaserfilter übertragen. Der Tritium-Thymidin-Test, wird – wie im vorhergegangenen Beispiel beschrieben – durchgeführt, mit der Ausnahme, daß Zellen und Antikörper bei 37°C inkubiert werden. Fig. 7 zeigt die Ergebnisse. BR96 bedingt eine Inhibition des [³H]Thymidin-Einbaus in die Antigen-positiven Zelllinien. Dieser Effekt war dosisabhängig. Die Antigen-negative Zelllinie HCT 116 wird durch BR96 nicht beeinflusst.

Drittens, unter Verwendung einer Modifikation des Verfahrens von Linsley et al., „Identification and characterization of cellular receptors for growth regulator, Oncostatin M“, J. Biol. Chem., 264:4282–4289 (1989) wird ein Wachstumsinhibitionstest durchgeführt. Zellen von vier verschiedenen Zelllinien (HCT 116, 2987, 3396 und 3630) werden in einem Volumen von 0,1 ml IMDM mit 15% fötalem Rinderserum (FBS) in Mikrotiterplatten (96 Kammern) vorgelegt (3×10^3 Zellen) und zur Ablagerung 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend gibt man unterschiedliche Konzentrationen des unveränderten monoklonalen Antikörper BR96 in einem Volumen von 0,1 ml hinzu und inkubiert 72 h bei 37°C. Anschließend entfernt man das Kulturmedium und färbt die Zellen mit Kristallviolett (0,1% in 20% Methanol) 30 min an und wäscht dreimal mit PBS. Den gebundenen Farbstoff isoliert man durch Zugabe einer 0,1 M Lösung von Natriumcitrat (0,1 ml), pH 4,2, in 50% Ethanol. Proben werden dreifach auf einem ELISA-Ablesegerät, welches die Absorption in Gegenwart von BR96 und die Absorption von unbehandelten Proben mißt, getestet. Die Ergebnisse dieses Versuchs ergeben die prozentuale Inhibition des Zellwachstums. Fig. 8 veranschaulicht die Ergebnisse. Die Ergebnisse dieses Tests stimmen mit den Ergebnissen des Thymidin-Einbautests überein (Fig. 7).

Beispiel 5

ADCC-Aktivität des BR96-Antikörpers

Die Bestimmung der ADCC-Aktivität des monoklonalen Antikörpers BR96 erfolgt gemäß der Beschreibung von Hellstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:1499–1502 (1985). Zum Nachweis der Tumorzellenlyse (Zytotoxizität) wird ein Kurzzeit-⁵¹Cr-Freisetzungstest durchgeführt, welcher die Freisetzung von ⁵¹Cr bestimmt (Cerrotini et al., Adv. Immunol. 18:67–132 (1974)). Peripherblutlymphozyten von gesunden Menschen werden mit Hilfe von Ficoll-Hypaque (Hellstrom et al., Int. J. Cancer, 27:281–285 [1981]) getrennt, um Effektorzellen bereitzustellen, die einer 5%igen natürlichen Killerzellenreaktivität gegenüber SK-MEL-28-Zellen entsprechen. Zellen (10^6) werden durch Inkubation mit 100 µCi (1 Ci = 37 Gbq) ⁵¹Cr während 2 h bei 37°C markiert, anschließend dreimal gewaschen und im Medium resuspendiert. Die markierten Zellen (2×10^4 Zellen je Kammer in 20 µl) werden auf Microtiter V-Bottom Platten (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) übertragen. Dann gibt man den gereinigten Antikörper BR96 (10 µg/ml, 1 µg/ml und 0,1 µg/ml) hinzu, gefolgt von 2×10^5 Lymphozyten je Kammer in 100 µl. Das Gemisch inkubiert man 2–4 h und zentrifugiert die Platten mit 400g. Die Überstände werden entfernt, und die Radioaktivität wird mit Hilfe eines Gamma-Zählers in 100 µl-Proben bestimmt. Man erhält je Gruppe zwei Vergleichswerte; die Abweichung dieser Werte

voneinander war kleiner als 10%. Man führt mehrere „criss-cross“-Experimente durch, worin Lungen- (oder Kolon-)karzinome mit monoklonalem Antikörper BR96 und mit monoklonalem Antimelanom-Antikörper MG-22 (Hellstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1499–1502 [1985]), welcher an die meisten Karzinomzellen nicht bindet, parallel getestet werden. Kontrollwerte umfassen die Inkubation von Zielzellen alleine oder zusammen mit Lymphozyten oder monoklonalen Antikörpern.

Die spontane Abgabe wird definiert als die Counts pro Minute (cpm), welche von denjenigen Zielzellen in das Medium abgegeben werden, die weder mit Antikörpern noch mit Lymphozyten behandelt wurden. Die gesamte Abgabe entspricht den von den Zielzellen nach osmotischer Lyse am Ende des Tests freigesetzten Counts. Die prozentuale Zytotoxizität wird wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Experimentell bestimmte Abgabe} - \text{spontane Abgabe}}{\text{gesamte Abgabe} - \text{spontane Abgabe}} \times 100$$

Die Effektorzellen werden dadurch charakterisiert, daß man deren Sensitivität gegenüber einer Inkubation mit Antiserum gegen den Leu-11 b-Oberflächenmarker und Meerschweinchenkomplement unter Verwendung des Verfahrens von Hellstrom et al., in „Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy“, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series, eds. Reisfeld & Sell, Liss, New York, Band 27, S. 149–164 (1985) (auf welche hiermit Bezug genommen ist) bestimmt. Dies erfolgt zur Bestimmung der Expression des Leu-11 b-Markers, der die natürlichen Killerzellen (NK) charakterisiert und der von Lymphozyten exprimiert wird, welche ADCC gegenüber Humanmelanomzellen in Gegenwart des monoklonalen Antikörpers BR96 vermitteln. Die Zytotoxizität durch Effektorzellen allein („natural killer effect“) wurde von den in Fig. 9 gezeigten Daten substrahiert. Die in Fig. 9 gezeigten Ergebnisse für eine Antikörperkonzentration von 10 µg/ml weisen darauf hin, daß BR96 die ADCC-Aktivität vermittelt, wenn dieser in ausreichender Konzentration vorliegt und wenn die Zielzellen eine ausreichende Konzentration des Epitops exprimieren. Die ADCC-Aktivität ist bei Antikörperkonzentrationen zu beobachten, die unterhalb von denjenigen Werten liegen, bei denen der Antikörper selbst zytotoxisch wirkt (üblicherweise im Bereich von 20 µg/ml). Wird der Antikörper BR96 alleine als Kontrollwert verwendet, so ist bei den getesteten Konzentrationen und unter Verwendung des ⁵¹Cr-Tests keine Aktivität zu beobachten (0% killing). Eine ADCC-Aktivität kann nur bei Zelllinien gefunden werden, welche den BR96-Antikörper binden. Dementsprechend werden Zellen von fünf verschiedenen Karzinomzelllinien, welche jeweils BR96 binden, durch ADCC abgetötet, wenn man den monoklonalen Antikörper in Konzentrationen von 0,1 µg/ml oder darüber verwendet. Demgegenüber werden Zellen der sechsten Zelllinie 2964, welche BR96 nicht bindet, nicht abgetötet. Das Erfordernis einer Antikörperbindung zur Bewirkung von ADCC wird außerdem durch die Tatsache belegt, daß beide Karzinome (Zelllinien 3619 und 2987), welche einen anderen Antikörper (L6) binden können, unter der Wirkung von L6 durch ADCC abgetötet werden, während dies bei den anderen nicht der Fall ist. Unter den Testbedingungen bewirkt BR96 alleine lediglich eine Freisetzung von nur 1% der Markierung, auch wenn bei einer Konzentration von 10 µg/ml getestet wird.

Beispiel 6

Fähigkeit von BR96 zur Vermittlung der Complement-Mediated Cytotoxicity (CDC)

Tests zur Bestimmung der Fähigkeit des monoklonalen Antikörpers BR96, Tumorzellen in Gegenwart von Humanserum als Komplementquelle abzutöten (complement-mediated cytotoxicity, CDC) werden in Anlehnung an die ADCC-Tests gemäß Beispiel 5 durchgeführt, mit der Ausnahme, daß 100 µl Humanserum normaler menschlicher Spender als Komplementquelle (1:3 bis 1:6 verdünnt) je Mikrotiter-Kammer anstelle einer Suspension von Effektorzellen hinzugegeben werden. Wie Fig. 10 zeigt, konnte CDC gegenüber Zellen, welche BR96 binden, bei Antikörperkonzentrationen von 0,1–5,0 µg/ml beobachtet werden, während keine CDC-Aktivität gegenüber den BR96-Antigen-negativen Zelllinien HCT 116 und 3347 beobachtet werden konnte. Zellen der Zelllinie 3347 konnten jedoch unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers L6, der an diese Zellen bindet, abgetötet werden. Kontrollversuche beinhalten Tests, in denen BR96 ohne Zugabe von Komplement getestet wurde. Mit Hilfe des ⁵¹Cr-Freisetzungstests konnte für BR96 alleine keine abtötende Wirkung nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, daß BR96 einen zytotoxischen Effekt in Gegenwart von Humanserum und bei Konzentrationen bewirkt, die für sich genommen, nicht zytotoxisch sind (der Kontrollantikörper zeigte keine CDC-Aktivität).

Beispiel 7

Bestimmung der Reaktivität von BR96 gegenüber Glycolipiden und Glycoproteinen

Der BR96-Antikörper wurde auf Reaktivität gegenüber verschiedenen immobilisierten Glycolipid-Antigenen mit bekannter Kohlehydratstruktur und synthetischen Glycoproteinen (sogen. „Neoglycoproteinen“) mit Hilfe eines ELISA-Tests untersucht, wobei gereinigte Glycolipide, Glycoproteine und Antikörper im Überschuß verwendet wurden (Dr. John Magnani, Biocarb, Gaithersburg, MD; Lloyd et al., „Immunogenetics“, 17:537–541 [1983]). Man entfernt Methanol aus den in Mikrotiter-Kammern vorgelegten Glycolipiden (100 ng/Kammer). Synthetische Glycoproteine werden auf die Oberfläche der Kammern durch Inkubation mit Glycoprotein aufgetragen (200 ng in phosphatgepufferter Saline (PBS), pH 7,4/Kammer). Gereinigter BR96 wird bei einer Konzentration von 10 µg/ml in 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, mit 1% BSA getestet. Antikörper aus Aszites werden in einer Verdünnung von 1:100 in dem gleichen Puffer getestet. Bei derart hohen Konzentrationen sind die meisten Bindungswechselwirkungen nachweisbar. Absorptionswerte bestimmt man aus dem Mittelwert von zwei Kammern. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den Fig. 11 und 12 dargestellt, welche eine Reaktion von BR96 mit dem Le^Y-Antigen zeigen. Diese Befunde weisen darauf hin, daß BR96 an eine Variante des Lewis Y (Fuc α 1-2 Gal β 1-4(Fucα 2-3)GlcNAc-Antigens binden kann und daß Fucose α 1–3, gebunden an GlcNAc einen Teil des Le^Y-verwandten Epitops bildet, welches von BR96 erkannt wird. Die hohe Tumorspezifität von BR96 und die Fähigkeit zur Internalisierung (was bisher für monoklonale Antikörper, die mit Le^Y-Antigenen reagieren, noch nicht gezeigt wurde) weisen darauf hin, daß der Antikörper ein komplexes Epitop erkennt, wobei ein Teil davon das Le^Y-Antigen umfaßt.

Beispiel 8

Herstellung und Charakterisierung von BR96 F(ab')₂-Fragmenten

Aus Mäuseaszitesflüssigkeit reinigt man durch Protein A-Affinitätschromatographie Maus-BR96 (IgG₃). Hierzu gibt man Aszites (entfettet) über eine Säule, welche eine Matrix aus immobilisiertem Protein A enthält (RepliGen Corp., Cambridge, MA) und

welches vorher mit 1 M Kaliumphosphat, pH 8,0, äquilibriert wurde. Nach Auftragung der Aszitesflüssigkeit wäscht man die Säule mit Äquilibrierungspuffer, bis kein Protein mehr spektrophotometrisch nachweisbar ist. Der gebundene BR96-Antikörper wird anschließend mit Hilfe von 0,1 M Citratpuffer, pH 3,0, von der Säule eluiert. Unmittelbar nach der Elution neutralisiert man das Eluat mit 1,0 M Tris-Puffer, pH 9,0, bis ein pH-Wert von annähernd 7,0 erreicht wird. Den monoklonalen Antikörper dialysiert man in PBS und konzentriert, bevor man diesen aufbewahrt oder verwendet.

F(ab')₂-Fragmente stellt man durch Verdauen des gereinigten monoklonalen BR96-Antikörpers mit Pepsin her (vgl. Lamoy, „Preparation of F(ab')₂ Fragments from Mouse IgG of Various Subclasses“, Meth. Enzymol., 121:652–663 [1986]). Unumgesetzte Antikörper und Fc-Fragmente werden aus dem Reaktionsgemisch mit Hilfe einer Protein-A-Affinitätsäule abgetrennt. Das erhaltene F(ab')₂-Fragment dialysiert man ausgiebig gegen PBS und filtriert unter sterilen Bedingungen ab.

Die BR96-F(ab')₂-Fragmentpräparationen werden durch Gelpermeations-HPLC, SDS-PAGE und durch ELISA mit der Humanbrustkrebszelllinie 3396 (Oncogen, Seattle, WA) charakterisiert. Die Gelpermeations-HPLC verwendet man zur Bestimmung der Molekülgröße der in den F(ab')₂-Präparationen enthaltenen Proteine. Reproduzierbare Chromatogramme von verschiedenen Präparationen weisen darauf hin, daß 75–80% des Proteins F(ab')₂-Fragmente sind. Kein Protein konnte im Bereich höhermolekularen Materials (ganze BR96-Antikörper oder Proteinaggregate) nachgewiesen werden. Die verbleibenden 20–25% des Proteins werden an Stellen eluiert, die inaktivierten Pepsin und kleineren, an Protein-A nicht-bindenden, Abbauprodukten entsprechen.

SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen wird zur Bestimmung der Molekülgröße im denaturierten Zustand und zur Bestimmung der strukturellen Anordnung der Proteine in den F(ab')₂-Präparationen verwendet. Eine einzelne Hauptbande an der Position für F(ab')₂ (in etwa 100 kdal) ist typischerweise zu beobachten, wobei keine Kontamination durch den unveränderten monoklonalen Antikörper (Bande bei 150 kdal) zu beobachten ist. Banden mit niedrigerem Molekulargewicht (d. h. kleiner als 100 kdal) für inaktiviertes Pepsin und kleineren Abbauprodukten sind vernachlässigbar. Unter reduzierenden Bedingungen erhält man die erwarteten Ergebnisse in Form einer Bandendupletts (Hauptbanden) bei etwa 25 kdal, welches von der leichten Kette und dem verbleibenden Fragment der schweren Kette abgeleitet ist. Es konnte keine Bande für die intakte schwere Kette nachgewiesen werden.

Die funktionelle Aktivität (Bindungsaktivität) des BR96 F(ab')₂-Fragmentes wurde mit den Daten für die intakten BR96-Antikörper in einem ELISA-Test mit Zellen der Zelllinie 3396 als Antigen bestimmt. Die Bindung der intakten BR96-Antikörper oder des F(ab')₂-Fragments an die Zellen wurde mit einem HRP-konjugierten Ziegen-Antimäus-K-Leichte Kette-Reagens bestimmt (vgl. Fig. 13). Auf einer zweiten Platte wurde die Bindung ganzer BR96-Antikörper und die Bindung des F(ab')₂-Fragments unter Verwendung von HRP-konjugiertem Protein A, welches an die intakten Antikörper, jedoch nicht an die F(ab')₂-Fragmente bindet, verglichen (Fig. 14).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß BR96 F(ab')₂ (lot R0201-1663-03, lot 2) Spuren von intaktem BR96-Antikörper enthält. Die Menge dieser Kontamination kann abgeschätzt werden: Sie liegt etwa 8 Dreifachverdünnungsschritte entfernt von der vorliegenden F(ab')₂-Menge und beträgt etwa 0,01%. Die anderen F(ab')₂-Präparationen (lot R9011-1481-48, lot 1) zeigten keine nachweisbare Kontamination durch ganze BR96-Antikörper. Dies weist darauf hin, daß die durch BR96 bedingten Wirkungen durch Bindung der Fab-Region und nicht der Fc-Region erklärt werden können.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die BR96 F(ab')₂-Präparationen vollkommen frei von kontaminierendem, intaktem BR96 IgG sind (bestimmt durch HPLC und SDS-PAGE). Lediglich in einem Fall konnte bei Anwendung der sehr empfindlichen ELISA-Methode eine Kontamination durch ganze BR96-Antikörper nachgewiesen werden. Diese betrug annähernd 0,01 Gew.-%, bezogen auf die Menge des vorliegenden F(ab')₂-Fragmentes.

Beispiel 9

Herstellung und Charakterisierung von chimärem BR96-Antikörper (ChiBR96)

Der erfindungsgemäße chimäre Maus/Humanantikörper BR96 („ChiBR96“) wird durch zweistufige homologe Rekombination hergestellt (vgl. Beschreibung in Fell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8507–8511 [1989] sowie in den US-Patentanmeldungen 243873 und 468035, auf welche hiermit in vollem Umfang Bezug genommen wird).

Human Heavy Chain DNA Transfection

Die Maus-Hybridomzelllinie BR96, ATCC Nr. HB 10036, welche man gemäß obiger Beschreibung erhält (8 × 10⁶ Zellen) wird mit hgama 1/HC-D (hinterlegt bei der Agricultural Research Service Culture Collection [NRRL], Peoria, Illinois, NRRL No. B 18599) (Fig. 15) durch Elektroporation bei 250 V, 960 µFd Kapazitätseinstellung in isotonischer phosphatpufferter Saline (PBS) sowie in Gegenwart von 30 µg/ml des gereinigten 6,2 kb XbaI-Restriktionsfragments des Vektors hgama 1 HC-D transfiziert. Nach 48 h werden die Zellen auf Platten (96 Kammern, 10⁴ Zellen/Kammer) übertragen. Die Selektion nach Neo[®] wird im IMDM-Medium (GIBCO, Grand Island, NY) durchgeführt, welches 10% (v/v) fötales Rinderserum (FBS) und das Antibiotikum Aminoglycosid G418 (GIBCO) (2,0 mg/ml) enthält.

Nachweis von ausgeschiedenem Human IgG (Hu gamma 1)-Antikörper durch ELISA

Kulturüberstände werden unter Verwendung eines „Sandwich“-ELISA-Tests 2 Wochen nach Transfektion gescreent. Ziegen-Anti-Human-IgG, Fc-spezifisch (CALTAG, San Francisco, CA) wurde als Einfang-Antikörper verwendet und Ziegen-α-Human-IgG, Fc-spezifisch, konjugiert mit Meerrettichperoxidase HRP (CALTAG), wurde als Antikörper zum Nachweis von gebundenem Human-IgG verwendet. Zellen aus HuIgG-positiven Kammern werden durch Verdünnung subkloniert und die verdünnten Klone werden mit ELISA zum Nachweis von Human-IgGgamma 1 mit Hilfe des bereits beschriebenen Verfahrens getestet. Diejenigen Klone, welche Human-IgGgamma 1 enthalten, werden mit ELISA zum Nachweis der Maus-IgG3-schweren Kette gescreent. Ziegen-Antimäus-IgG3 (Southern Biotechnology Assoc., Inc., Birmingham, AL) wird als Einfang-Antikörper und der Ziegen-Antimäus-Antikörper, konjugiert mit HRPO (Southern Biotechnology Assoc., Inc.) wird als Antikörper zum Nachweis des Maus-IgG3 verwendet.

Einer der Human-IgGamma 1-positiven Mäuse-IgG3-negativen (Hugamma 1⁺, MuG3⁻) Klone wird ausgewählt und mit ChiHBR96 bezeichnet. Diese chimäre „heavy chain“-Hybridomzelllinie (ChiHBR96) wird auf Antigen-spezifität gegenüber MCF-7-Zellen getestet. Weiterhin wird durch einen quantitativen ELISA-Test die Expressionsrate von Human-IgG gegenüber MCF-7-Zellen bestimmt. Die Zelllinie ChiHBR96 exprimiert annähernd 20 µg/ml eines Antigen-spezifischen Human-IgG-Antikörpers.

Light Chain DNA Transfection

Das ChiBR96-Hybridom (8×10^6 Zellen) wird durch Elektroporation, wie oben beschrieben, transfiziert, wobei jedoch $30 \mu\text{g/ml}$ des rekombinanten „human light chain“-Vektors pSV₂gpt/C_K (NRRL Nr. B 18507) verwendet werden. Dieser Vektor enthält die Immunoglobulinsequenz der Human-leichten Kette (K), ist in Fig. 16 dargestellt und wurde mit HindIII linearisiert. Nach 48 h werden die Zellen auf Platten (96 Kammern, 10^4 Zellen/Kammer) übertragen. Eine Selektion nach gpt wird in einem IMDM-Medium, welches 10% (v/v) FBS, $15 \mu\text{g/ml}$ Hypoxanthin, $250 \mu\text{g/ml}$ Xanthin und $2,25 \mu\text{g/ml}$ Mycophenolsäure (MA) enthält, durchgeführt.

Nachweis der Ausscheidung von Human Kappa (Hu K)-Antikörper durch ELISA

Zwei Wochen nach Transfektion werden Kulturüberstände mit Hilfe eines „Sandwich“-ELISA-Tests, wie oben beschrieben, gescreent. Als Einfang-Antikörper werden Ziegen- α -Human-K-Antikörper (CALTAG) und als Antikörper zum Nachweis von gebundener Human-K-Kette werden Anti-Human-K-HRPO-Antikörper (CALTAG) verwendet. Kammern, welche Human-K-Antikörper enthalten, werden durch Verdünnung subkloniert und die Klone werden mit Hilfe des ELISA-Tests zum Nachweis von Human-K- oder Mäuse-K-Ketten gescreent. Als Einfang-Antikörper werden Ziegen-Anti-Maus-K-Antikörper (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) und als Antikörper zum Nachweis von vorliegenden Mäuse-K-Ketten werden Ziegen-Anti-Maus-K-Antikörper, konjugiert mit HRPO (Fisher Scientific), verwendet. Einer der Human-K-positiven, Maus-K-negativen Klone (HUK⁺, MuK⁻) wird ausgewählt, um die Antigen-spezifität gegenüber MCF-7-Zellen und das Maß der Human-IgG-Expression auf MCF-7-Zellen mit Hilfe eines quantitativen ELISA-Test zu analysieren. Eine Zelllinie, die Antigen-spezifisch für MCF-7-Zellen war und als HulG⁺, MulgG³⁻, HuK⁺, MuK⁻ charakterisiert wurde, wurde ausgewählt und als chimärer BR96-Antikörper (Chi-BR96) bezeichnet. Die ursprüngliche Expression des chimären BR96-Antikörpers (Chi-BR96) (heavy chain- und light chain-Antigen-spezifisch) betrug annähernd $25 \mu\text{g/ml}$. Nach vier aufeinanderfolgenden Klonierungsdurchgängen mit dieser Zelllinie, durchgeführt in Soft-Agarose mit einem Kaninchen- α -HulG-Antikörperüberzug zum Nachweis von Zellen mit der mengenmäßig höchsten Sekretion an chimärem Antikörper (Coffino et al., J. Cell. Physiol., 79:429-440 [1972]), erhält man eine Hybridomzelllinie (ChiBR96), die etwa $130 \mu\text{g/ml}$ des chimären Antikörpers ausscheidet. Das Hybridom ChiBR96 wurde bei der ATCC am 23. Mai 1990 hinterlegt und trägt die Hinterlegungsnummer HB 10460.

Bindung von ChiBR96

Die relative Affinität des ChiBR96-Antikörpers und des Maus-BR96-Antikörper gegenüber dem tumorassoziierten Antigen auf MCF-7-Zellen wurde mit einem ELISA-Konkurrenzbindungstest (competition binding assay) bestimmt (Hellstrom et al., „Cancer Res.“, 50:2449-2454 [1990]).

Hierzu wurde die adhärenente Antigen-tragende Zelllinie MCF-7 in Mikrotiterplatten (96 Kammern, 3×10^4 Zellen/Kammer) ausplattiert und bis zur Konfluenz 3-4 Tage gezüchtet. Das Wachstumsmedium wird verworfen und die Zellen werden mit 0,5% Glutaraldehyd in PBS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ($100 \mu\text{l/Kammer}$) 30 min fixiert. Den Glutaraldehyd verwirft man und wäscht die Platten vorsichtig dreimal mit PBS. Die Platten werden anschließend mit Bindungspuffer (0,1% BSA in DMEM, $200 \mu\text{l/Kammer}$) innerhalb 1 h blockiert und für unbestimmte Zeit bei -20°C aufbewahrt. Den Bindungspuffer verwirft man und gibt in die Kammern die jeweiligen Proben und Standards. Die Platten werden abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Proben und Standards werden verworfen und die Platten werden dreimal mit PBS gewaschen. Dann gibt man HRP-Konjugat, verdünnt in 1% Pferdeserum in PBS zu den Kammern hinzu ($100 \mu\text{l/Kammer}$) und inkubiert 1 h bei 37°C . Den ELISA-Test entwickelt man mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Chromagen (Genetic Systems, Seattle, WA) in Citratpuffer. Die Farbentwicklung wird mit 3N H₂SO₄ gestoppt und die Platten werden mit einem Titertek Microplate-Lesegerät bei 450 nm abgelesen. Mit Hilfe dieses Test bestimmt man, wie gut $0,3 \mu\text{g/ml}$ eines biotinylierten ChiBR96-Antikörpers, entweder mit unmarkiertem ChiBR96 oder unmarkiertem monoklonalen Mäuse-BR96-Antikörper um das Antigen konkurrieren. Der gebundene biotinylierte ChiBR96-Antikörper wird mit Avidin-HRPO und unter Verwendung von Standard-ELISA-Reagentien nachgewiesen.

Wie in Fig. 17 gezeigt, weist ein Überlappen der beiden Bindungskurven darauf hin, daß die beiden Antikörper die gleiche Spezifität und relative Affinität für das Tumorantigen besitzen.

Beispiel 10

Charakterisierung des ChiBR96-Antikörpers und des BR96 F(ab')₂-Fragmentes

Zytotoxizität von unmodifiziertem ChiBR96 und BR96 F(ab')₂-Fragment

Suspendierte, lebende Zellen von BR96-Antigen-positiven Karzinomzelllinien 3396, 2987 und MCF-7 werden mit ChiBR96 und BR96 F(ab')₂-Fragmenten, hergestellt gemäß Beispiel 8 und 9, zur Bestimmung der Zytotoxizität dieser Antikörper im Vergleich zum erfindungsgemäßen monoklonalen BR96-Antikörper behandelt. Die Zytotoxizitätstests werden mit Hilfe des FACS-Tests gemäß Beispiel 4 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den Fig. 18 bis 20 dargestellt. Es ist jeweils der Prozentsatz abgetöteter Zellen gegen die Antikörperkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ aufgetragen.

Die Fig. 18 und 20 zeigen, daß der chimäre BR96-Antikörper und die F(ab')₂-Fragmente von BR96 IgG 3 hinsichtlich ihrer Toxizität gegenüber 3396-Zellen und MCF-7-Zellen mit dem monoklonalen BR96-Antikörper vergleichbar sind. Die Fig. 19 zeigt, daß der zytotoxische Effekt gegenüber 2987-Zellen sehr viel geringer ist als gegenüber anderen Brustkarzinomzellen (Fig. 18 und 20). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein höheres Bindungsverhältnis (Tabelle II) für die abtötende Wirkung dieser Antikörper entscheidend ist und/oder daß verschiedene Tumorzellen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der abtötenden Wirkung dieser Antikörper besitzen. Diese Ergebnisse zeigen auch, daß der ChiBR96-Antikörper und die F(ab')₂-Fragmente selbst, d. h. in unkonjugierter Form, zytotoxisch sind. Sie veranschaulichen außerdem, daß die Zytotoxizität des BR96-Antikörpers unabhängig von der Fc-Region ist.

Internalisierung von ChiBR96

Die Internalisierung des ChiBR96-Antikörpers in Karzinomzellen wird mit der Internalisierung des monoklonalen Antikörpers BR96 verglichen. Die Antikörper werden mit dem Ricin-A-Kettentoxin zur Ausbildung des Immunotoxins ChiBR96-RA (1-4 Ricin-A-Ketten je Antikörpermolekül) und des Immunotoxins BR96-RA (1-2 Ricin-A-Ketten je Antikörpermolekül) konjugiert. Die Internalisierung durch die Karzinomzelllinien 3396 und 3630 wird mit Hilfe des Thymidin-Aufnahme-Inhibitionstest gemäß Beispiel 3 beschrieben.

In den Fig. 21 und 22 sind graphische Auftragungen der prozentualen Inhibition des Thymidin-Einbaus gegen die Immunotoxinkonzentration für jede getestete Zelllinie gezeigt. Fig. 21 zeigt die prozentuale Inhibition des Thymidin-Einbaus durch Zellen der Brustkarzinomzelllinie 3396 nach Internalisierung von ChiBR96-RA und BR96-RA. Wie aus der Auftragung hervorgeht, wird ChiBR96 in ähnlicher Weise wie BR96 internalisiert und erscheint ebenso wirksam wie BR96 beim Abtöten von Tumorzellen zu sein. Ähnliche Ergebnisse erhält man mit der Brustkarzinomzelllinie 3630 (Fig. 22).

ADCC-Aktivität des ChiBR96-Antikörpers

Die Bestimmung der ADCC-Aktivität von ChiBR96 erfolgt gemäß Beispiel 5 unter Verwendung der folgenden Zelllinien: Brustkrebszelllinien 3396, 3630 und 3680 (Oncogen, Seattle, WA) und MCF-7 (ATCC Nr. HTB22); Ovarialkrebszelllinie 3633-3 (Oncogen, Seattle, WA); und Lungenkrebszelllinien 2987, 3655-3 und 2981 (Oncogen, Seattle, WA). Die Ergebnisse sind in Tabelle III für verschiedene Antikörperkonzentrationen zusammengefaßt.

Tabelle III
ADCC-Aktivität von ChiBR96

Zelllinien	Antikörper	NK	10	1	Antikörperkonzentration (µg/ml)		
					0,1	0,01	0,001
Brustkrebs							
3396	BR 96	28	86	74	58	27	25
	ChiBR 96		88	79	60	34	26
MCF-7	BR 96	16	82	69	54	17	15
	ChiBR 96		90	82	57	25	17
MCF-7	BR 96	22	73	69	48	22	22
	ChiBR 96		76	70	57	33	26
3630	BR 96	30	69	64	42	30	34
	ChiBR 96		69	56	42	36	36
3680	BR 96	13	73	67	58	34	38
	ChiBR 96		70	71	61	39	30
Ovarialkrebs							
3633-3	BR 96	20	92	90	64	28	23
	ChiBR 96		88	88	54	43	29
Lungenkrebs							
2987	BR 96	11	51	57	41	9	7
	ChiBR 96		69	65	51	28	15
3655-3	BR 96	4	49	37	0	0	0
	ChiBR 96		39	35	12	6	5
2981	BR 96	3	4	3	3	4	5
	ChiBR 96		5	4	3	4	4

Die Ergebnisse von Tabelle III für verschiedene Antikörperkonzentrationen weisen darauf hin, daß ChiBR 96 die ADCC-Aktivität in ähnlichem Maße wie BR 96 vermittelt. Die ADCC-Aktivität kann bei Antikörperkonzentrationen beobachtet werden, die geringer sind als diejenigen Werte, bei denen der ChiBR 96-Antikörper selbst zytotoxisch wirkt. Wird der BR 96-Antikörper bei den getesteten Konzentrationen alleine als Kontrolle verwendet, so ist keine Wirkung (0%ige Abtötung) zu beobachten. Die ADCC-Aktivität kann nur bei Zelllinien beobachtet werden, welche den BR 96-Antikörper binden.

Vermittlung der Complement-Mediated Cytotoxicity durch ChiBR 96

Die Bestimmung der Fähigkeit von ChiBR 96 zur Abtötung von Tumorzellen in Gegenwart von Humanserum als Komplementquelle (CDC) wird gemäß Beispiel 6 unter Verwendung der Brustkrebszelllinien 3396, MCF-7, 3630 und 3680, der Ovarialkrebszelllinie 3633-3 und der Lungenkrebszelllinien 3655-3, 2987 und 2981 durchgeführt. Tabelle IV zeigt die Ergebnisse.

Tabelle IV
CDC-Aktivität von ChiBR 96

Zelllinien	Antikörper	Antikörperkonzentration (µg/ml)			
		10	1	0,1	0,01
Brustkrebs					
3396	BR 96	100	99	78	13
	ChiBR 96	86	92	13	2
MCF-7	BR 96	94	100	63	2
	ChiBR 96	92	83	1	0
3630	BR 96	94	100	82	9
	ChiBR 96	86	86	33	9
3680	BR 96	100	100	19	7
	ChiBR 96	87	100	5	9
Ovarialkrebs					
3633-3	BR 96	98	98	21	0
	ChiBR 96	100	100	26	1
Lungenkrebs					
3655-3	BR 96	91	22	0	0
	ChiBR 96	46	3	0	0
2987	BR 96	100	100	1	0
	ChiBR 96	100	43	0	0
2981	BR 96	0	3	3	2
	ChiBR 96	1	1	2	10

Wie in Tabelle IV gezeigt, erhält man für ChiBR96 einen mit BR96 vergleichbaren zytotoxischen Effekt (CDC) in Gegenwart von Komplement-haltigem Humanserum. BR96 und ChiBR96 wirken bei keiner Konzentration zytotoxisch. Humanserum zeigte ebenfalls keine zytotoxische Aktivität.

Die oben aufgeführten Ergebnisse weisen darauf hin, daß die erfindungsgemäßen ganzen BR96-Antikörper und die chimären Antikörper in Karzinomzellen, an welche sie binden, internalisiert werden, in unmodifizierter Form selbst zytotoxisch sind und eine ADCC- und CDC-Aktivität gegenüber Zellen besitzen, die eine größere Menge des Epitops exprimieren.

Beispiel 11

Bestimmung von BR96-Antikörpern in vivo

Das therapeutische Potential der erfindungsgemäßen unmodifizierten BR96-Antikörper zur Behandlung von Tumoren wird in einer Reihe von Experimenten unter Verwendung von Humantumor-Xenotransplantaten (xenografts) in nackten Mäusen bestimmt. Zusätzlich wurden bestimmte Parameter untersucht, die einen Einfluß auf die Wirksamkeit von BR96 als Antitumormittel haben könnten. Diese Parameter sind: Maß der Antigenexpression auf den Tumor-Zielzellen, Zeit zwischen Tumorimplantation und Beginn der Therapie sowie Dosiseffekte.

In sämtlichen In-vivo-Experimenten wird der jeweiligen Anzahl von Balb/c nu/nu-Mäusen (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) entweder die Humanlungenadenokarzinomzelllinie H 2987- oder H 2707-Tumorlinie implantiert. Zellen dieser Tumorkolonien werden in vitro gezüchtet, geerntet, gewaschen und vor der subkutanen (s. c.) Implantation von 10 Millionen Zellen in die Hinterflanke der Maus in PBS resuspendiert. Diese Mäuse werden wahllos in kleinere Gruppen von jeweils 8–10 Mäusen aufgeteilt.

Um die Chance zur Beobachtung eines Antitumoreffekts von BR96 zu erhöhen, wobei der Antikörper die Tumorimplantationsstelle in jedem Fall zu lokalisieren hat, wird mit der Therapie 24 h nach der Tumorimplantation am Tag 2 begonnen. BR96 sowie monoklonale Kontrollantikörper werden in gleicher Dosis und nach gleichem Schema verabreicht, obwohl der Therapiebeginn in einzelnen Zellen unterschiedlich war. Die Behandlungsdosis wird in 0,2 ml PBS intravenös (i. v.) über die Schwanzvene der Maus verabreicht. Normalerweise werden in einem Rhythmus von jeweils 3 Tagen fünf Injektionen auf einmal verabreicht (Q3DX5). Zwei zusätzliche Injektionen werden am Tag 19 und 21 nach Implantation des H 2987-Tumors im Ausgangsexperiment verabreicht.

Antitumoreffekt von BR96-Antikörper gegenüber 2987- und 2707-Tumoren

Die Tumorumfänge werden bei jedem Tier wöchentlich durch Messung, beginnend am 18. Tag nach der Implantation bestimmt. Die Tumorumfänge werden aus der Messung der Tumurlänge und der senkrechten Breite gemäß folgender Formel bestimmt:

$$\text{Tumorumfang} = \text{größte Länge} \times (\text{senkrechte Breite im Quadrat}/2)$$

Gruppen-Mittelwerte werden berechnet und gegen die Zeit nach Tumorimplantation aufgetragen.

In dem in Fig. 23 gezeigten Ausgangsexperiment führt eine Behandlung mit BR96 zu hochsignifikanten Antitumoreffekten gegenüber der H2987-Zelllinie. BR 64, welcher ebenfalls bindet und von diesen Zellen internalisiert wird, verwendet man als negative Kontrolle. Dieser Antikörper zeigt, wenn überhaupt, nur einen sehr geringen Effekt im Vergleich zu der PBS-behandelten Kontrollgruppe.

In Tabelle V sind die Einflüsse auf die jeweiligen Tumoren am Ende der Behandlung in diesem ersten Experiment zusammengefaßt.

Tabelle V

Wirkungen der Behandlung mit unmodifiziertem BR96 durch Start zu verschiedenen Zeitpunkten nach H2987-Implantation

Experiment 1 Tag 28

Gruppe	Monoklonale Antikörper	vollständig	Tumorantwort teilweise	stabil	Progression
1	BR 96	2	0	3	5
2	BR 64	0	0	1	9
3	PBS	0	0	0	10

Lediglich eine Behandlung mit dem BR96-Antikörper führt zu einem vollständigen Verschwinden des Tumors. Zwei Tiere dieser Gruppe waren tumorfrei und drei weitere Tiere zeigten eine Wachstumsbeendigung ihrer Tumoren aufgrund der Behandlung mit BR96-Antikörper. Die beiden tumorfreien Mäuse blieben tumorfrei im Verlauf des Experimentes.

Antitumoreffekt von BR96-Antikörper auf bestehende Tumoren

Eines der endgültigen Ziele einer Tumorthherapie ist eine wirksame Behandlung von bestehenden und wachsenden Tumoren. Um zu untersuchen, ob BR96 einen Antitumoreffekt auf bestehende Tumoren besitzt, wurden die Lungenadenokarzinom-Tumorzelllinien H2987 und H2707 als Xenotransplantate in nackten Mäusen verwendet. Da diese beiden Tumorzelllinien zu einem fühlbaren Tumor innerhalb von 8 Tagen nach Verabreichung von 10 Millionen Zellen (s. c.) führen, ermöglicht eine Verzögerung des Behandlungsbeginns die Bereitstellung eines Verfahrens zur Untersuchung von Antitumoreffekten auf bestehende Tumoren.

Um die Wirksamkeit von unmodifiziertem BR96 weiter zu untersuchen, wurden mehrere Experimente durchgeführt, bei denen der Behandlungsbeginn um 5 oder 8 Tage nach subkutaner Tumorumplantation verzögert wurde. Durch den verzögerten Behandlungsbeginn können sich die Tumorzellen zu Tumoren entwickeln. Hierdurch erhält man ein Tiermodell, das schwieriger zu handhaben ist, aber einer realistischeren Wiedergabe der klinischen Situation entspricht.

Das Behandlungsprotokoll ist in Tabelle VI wiedergegeben. Drei Gruppen von 10 Mäusen werden mit BR96-Antikörper, beginnend zu den in dieser Tabelle angegebenen Zeiten, behandelt. Kontrollmäuse erhielten entweder FA6 oder BPS, beginnend mit Tag 2. FA6 ist ein Maus-IgG₃ gegen ein bakterielles Antigen, das in Säugetieren nicht gefunden wird und dient als ein isotypähnlicher, nicht-bindender monoklonaler Antikörper zur negativen Kontrolle.

Tabelle VI

Wirkung einer Behandlung mit unmodifiziertem BR96, beginnend zu verschiedenen Zeiten nach Implantation von H2987 oder H2702

Behandlungsprotokoll Gruppe	MAB	Schema/Verabreichungsart	Dosis	Tage der Injektion
1	BR 96	Q 3 DX 5 i. v.	1 mg	2, 5, 8, 11, 14
2	BR 96	Q 3 DX 5 i. v.	1 mg	5, 8, 11, 14, 17
3	BR 96	Q 3 DX 5 i. v.	1 mg	8, 11, 14, 17, 20
4	FA 6	Q 3 DX 5 i. v.	1 mg	2, 5, 8, 11, 14
5	PBS	Q 3 DX 5 i. v.	0,2 ml	2, 5, 8, 11, 14

Die Ergebnisse dieses Behandlungsprotokolls sind für die H2987- und H2707-Tumorzelllinien in Fig. 24 zusammengefaßt, wobei die Anzahl der Tiere ohne Tumor in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Behandlungsbeginns aufgetragen ist. Das Fehlen eines Tumors, definiert durch das Fehlen eines tastbaren Tumors, wird am Ende der Behandlung für jede Gruppe bestimmt. Die Tage zur Bestimmung der Tumorabwesenheit sind verschieden, da die Behandlung zu verschiedenen Zeiten nach Tumorumplantation begonnen wurde.

Es zeigte sich, daß ein früher Behandlungsbeginn deutlich wirksamer ist und daß die Wirksamkeit mit zunehmender Verzögerung des Behandlungsbeginns abnimmt. Da eine Verzögerung des Behandlungsbeginns ein größeres Wachstum und Festsetzung des Tumors ermöglicht, wird eine Behandlung größerer und besser ausgebildeter Tumoren bei spätem Behandlungsbeginn zunehmend erschwert.

Die Ergebnisse zeigen, daß BR96 einen Antitumoreffekt gegenüber zwei verschiedenen Tumorzelllinien zeigt. Antitumoreffekte erhält man nur bei den drei mit BR96-Antikörper behandelten Gruppen, während in Tieren, welche entweder mit FA6 oder PBS als Kontrolle behandelt wurden, keine Antitumoreffekte gezeigt werden konnten.

Es ist weiterhin signifikant, daß die Unterschiede in der Wirksamkeit gegenüber ausgeprägteren Tumoren bei der Tumorzelllinie H2707 größer sind, da diese eine höhere Antigenexpressionsrate besitzt. Die Beobachtung, daß H2707 auf eine BR96-Therapie stärker anspricht als H2987 stimmt mit der Annahme überein, daß die durch die Tumorzelle exprimierte Antigenmenge die Wirksamkeit der BR96-Behandlung beeinflusst. Die oben erwähnten Daten machen deutlich, daß BR96 einen Antitumoreffekt gegenüber bestehenden Tumoren besitzt.

Dosiseffekte des BR96-Antikörpers

In einem anderen Experiment wurden die Dosiseffekte von BR96 gegenüber der H2707-Tumorzelllinie untersucht. In diesem Experiment wird BR96 in halblogarithmisch abnehmenden Mengen von 1 mg/Dosis bis 0,032 mg/Dosis verabreicht. Die mittleren Tumorumfänge werden für die Testgruppen gegen die Zeit nach Tumorumplantation aufgetragen (Fig. 25). Den Kontrolltieren wird lediglich die höchste Dosis des monoklonalen Antikörpers FA6 (1 mg/Dosis) verabreicht. Bei diesen Kontrolltieren konnte kein Antitumoreffekt nachgewiesen werden, während ein dosisabhängiges Ansprechen in dem gewählten Dosisbereich bei Verabreichung des BR96-Antikörpers beobachtet werden konnte.

Das einzige Gewebe, daß signifikante Unterschiede zwischen spezifischen und nichtspezifischen Antikörpern zeigt, ist das Tumorgewebe. Alle anderen untersuchten Gewebe zeigen eine annähernd gleiche Aufnahme von spezifischen und nichtspezifischen Antikörpern. Eine mögliche Ausnahme sind die erniedrigten Blutwerte für den nichtspezifischen Antikörper Fa 6. Dies ist ein Hinweis auf eine beschleunigte Blutklärung für diesen Antikörper. Der Unterschied zwischen spezifischen und unspezifischen Antikörpern im Tumor ist jedoch größer als der Unterschied in den Blutwerten zwischen Fa 6- und BR96-Antikörper.

Die Daten von Tabelle VII zeigen außerdem, daß der prozentuale Anteil der in dem jeweiligen Organ vorliegenden Dosis unabhängig von der verabreichten Dosis konstant ist. Dies würde bedeuten, daß mengenmäßig mehr Antikörper im Bereich des Tumors vorhanden sind, wenn eine höhere Dosis verabreicht wird. Außerdem gibt es keinerlei offensichtliche Unterschiede zwischen den beiden Tumorzelllinien hinsichtlich des Verhältnisses von spezifischer zu unspezifischer Aufnahme.

Tabelle VII zeigt außerdem, daß das F(ab')₂-Fragment mit sehr viel höherer Geschwindigkeit als IgG₃ oder der chimäre BR96-Antikörper aus dem Tier entfernt werden. Dies könnte die Verminderung der Wirksamkeit des Fragmentes im Vergleich zu Therapieexperimenten mit ganzen Antikörpern erklären. Jeder durch das Fragment bedingte Antitumor-Effekt muß daher sehr schnell und innerhalb einer kurzen Zeitspanne noch vor der erneuten Freisetzung erfolgen.

ChiBR96 wird in vergleichbarer Menge wie IgG₃ lokalisiert. Größere Mengen sind im Vergleich zum chimären Kontrollantikörper lediglich im Tumor vorhanden. Dies weist darauf hin, daß jede Wirkungszunahme des chimären Antikörpers im Vergleich zum Maus-BR96-IgG₃-Antikörper durch die Substitution mit menschlicher konstanter Region bedingt wird. Ebenso wichtig ist, daß eine Substitution mit menschlicher konstanter Region die Fähigkeit des chimären Antikörpers, sich im Bereich des Tumors anzuhäufen, nicht zu beeinflussen scheint oder dessen Biodistribution gegenteilig beeinflußt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die IgG₃- und die chimäre Form von BR96 zur spezifischen Anhäufung im Bereich des Tumors befähigt sind. Darüber hinaus konnten Anhäufungseffekte sowie therapeutische Effekte in diesen vorläufigen Studien bei vergleichbaren Dosen gezeigt werden. Ein indirekter Hinweis auf die Lokalisation der F(ab')₂-Fragmente konnte über die Antitumoraktivität dieser Fragmente mit Hilfe der Therapieexperimente erhalten werden. Diese Aktivität muß vor Ablauf von 24 Stunden auftreten.

Die vorliegende Beschreibung befaßt sich mit besonderen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung. Es bleibt zu erwähnen, daß Variationen und Modifikationen durchgeführt werden können, welche zum Gegenstand der vorliegenden Erfindung gehören. Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird daher eher durch die beiliegenden Ansprüche als durch die speziellen Ausführungsbeispiele wiedergegeben.

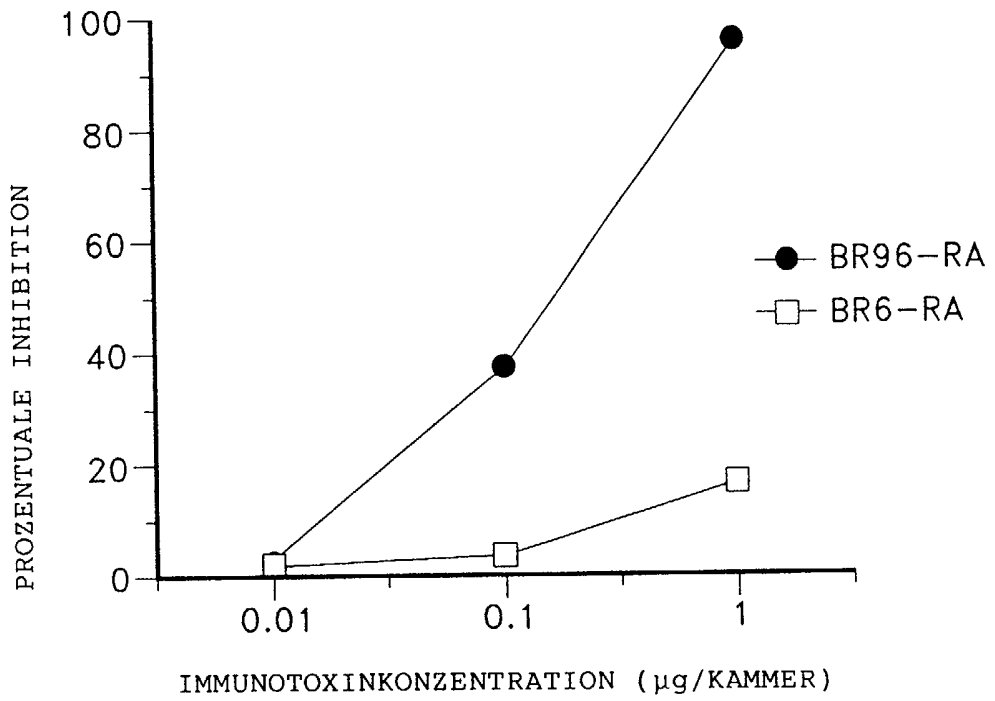


FIG. 1

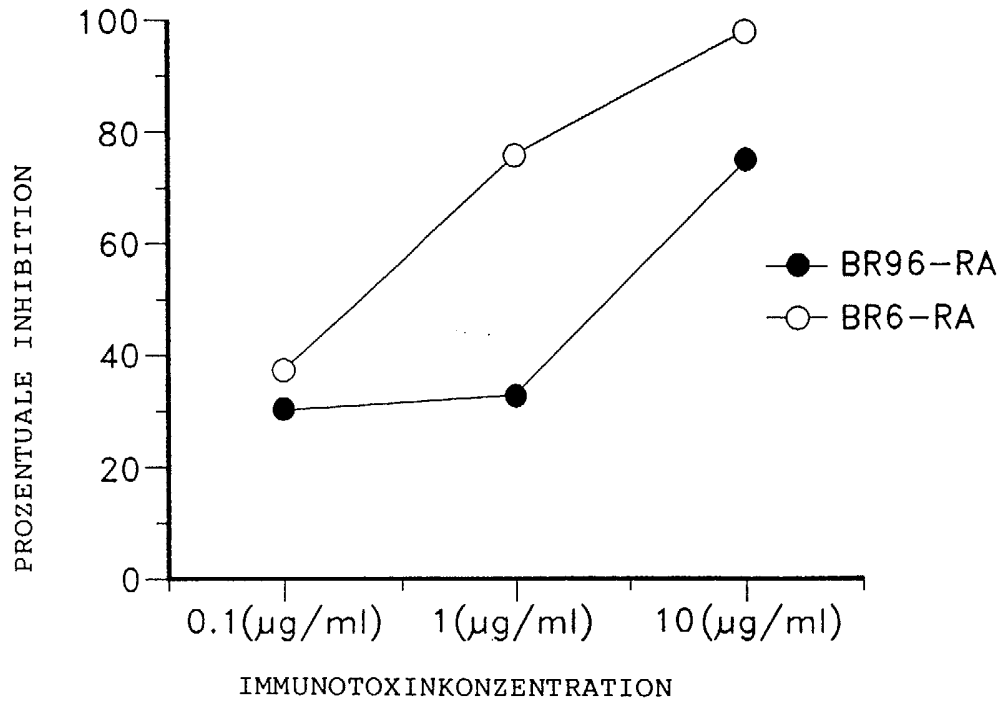


FIG. 2

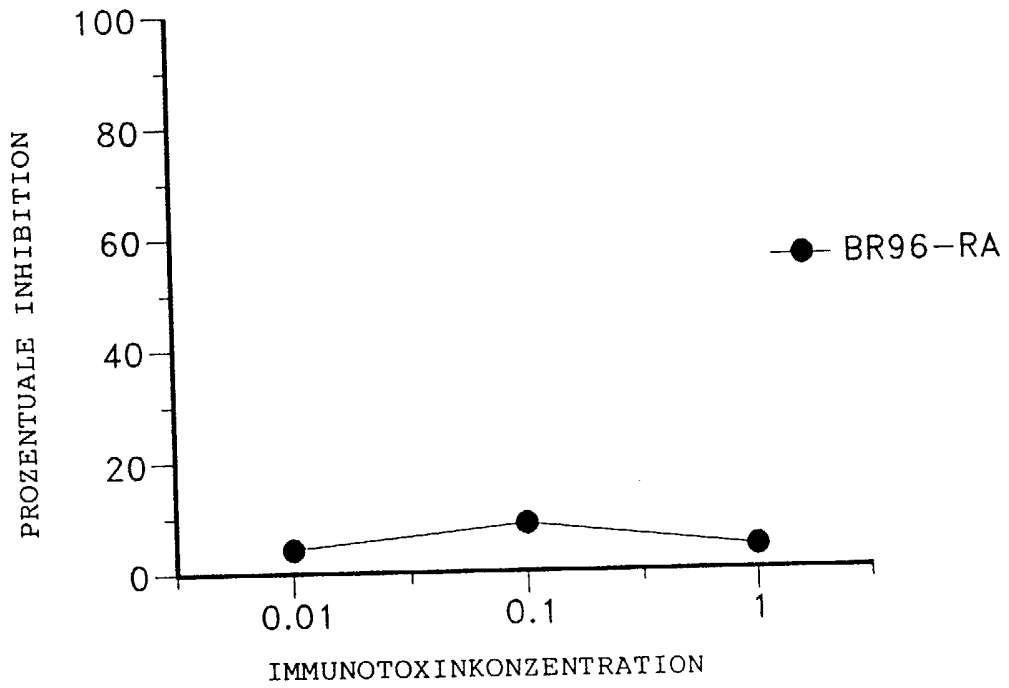
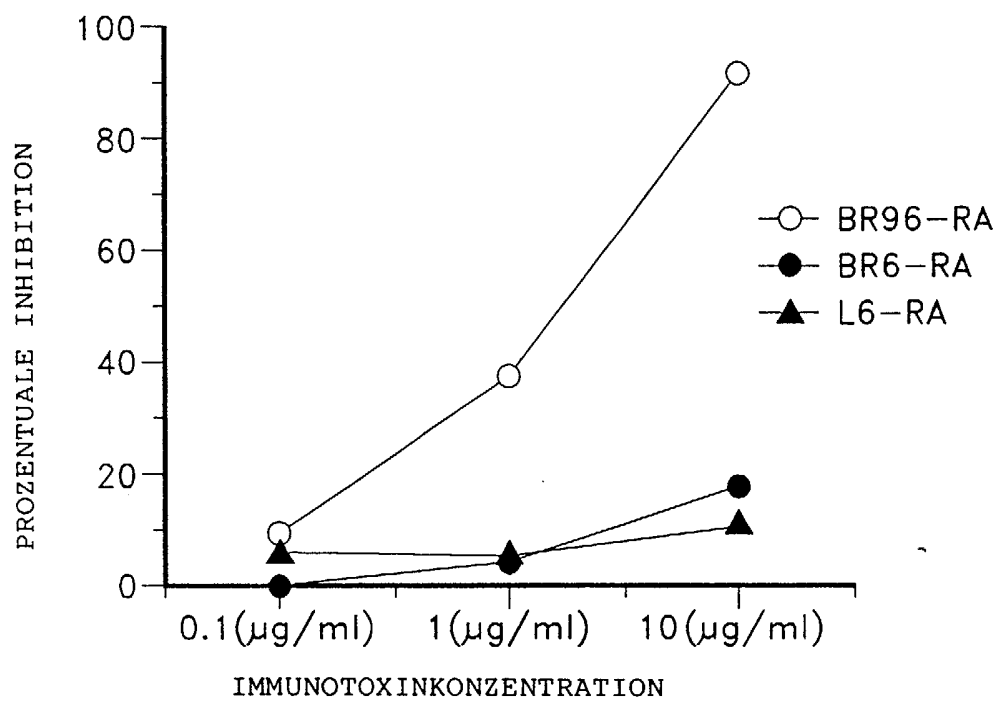


FIG. 3

*FIG. 4*

07.11.90

297418

-27-

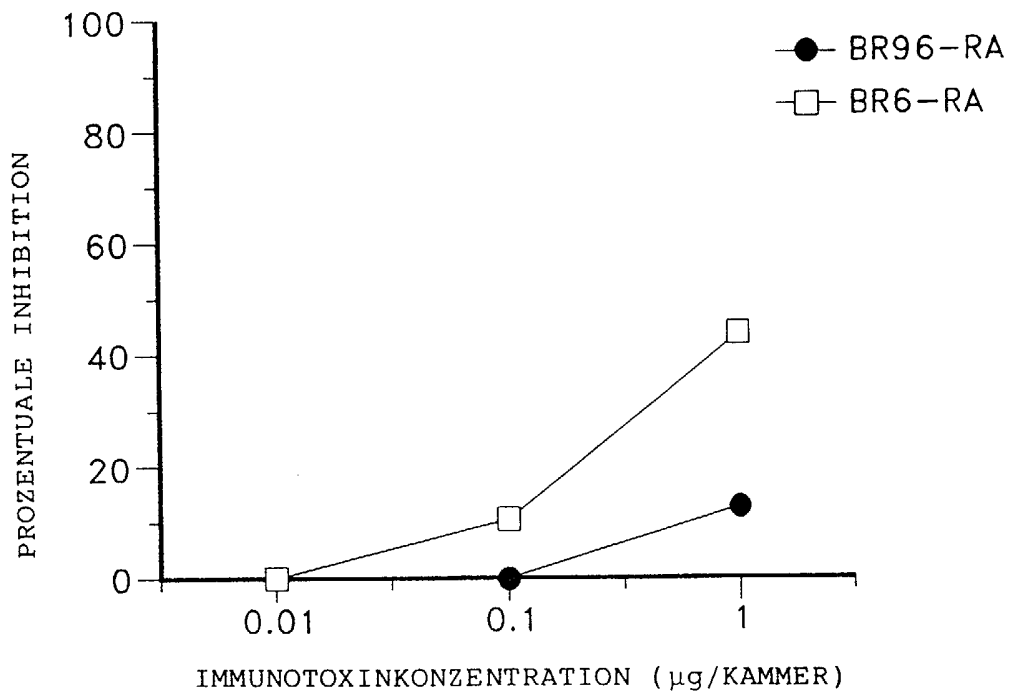


FIG. 5

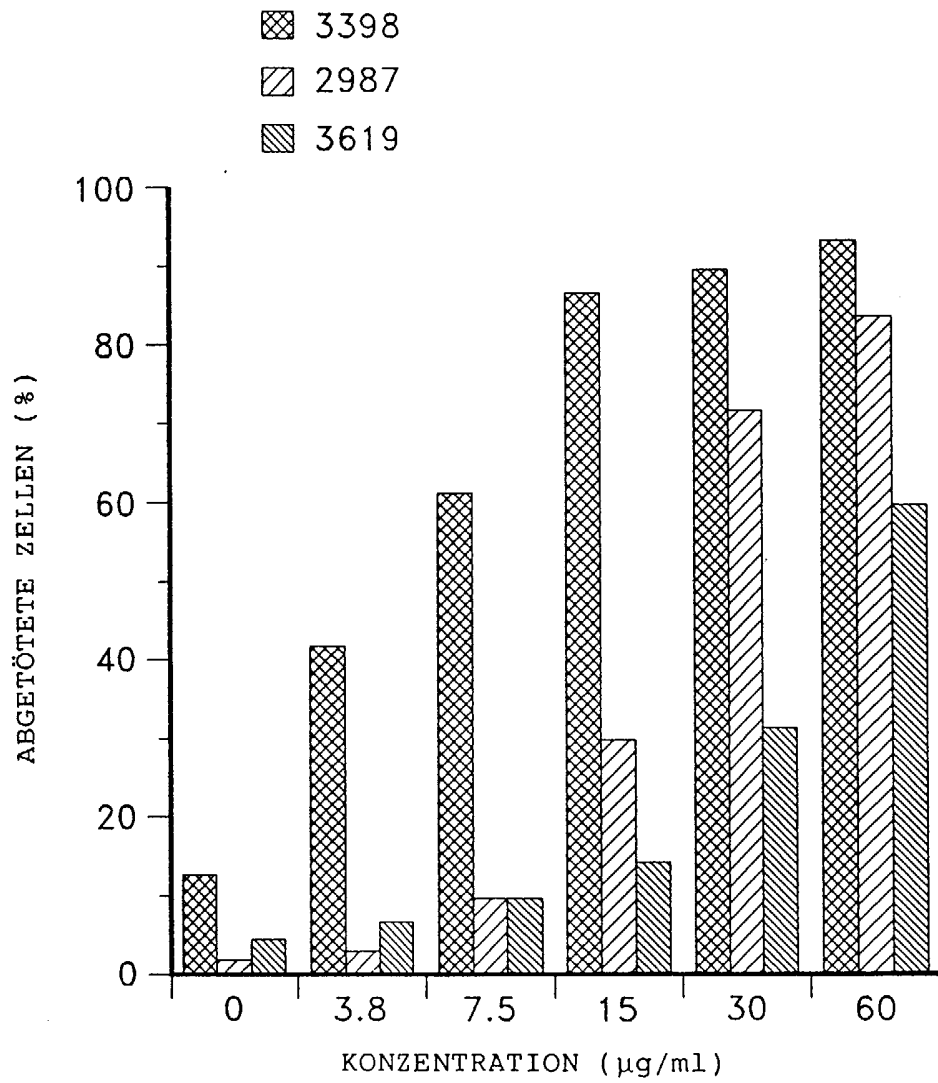


FIG. 6

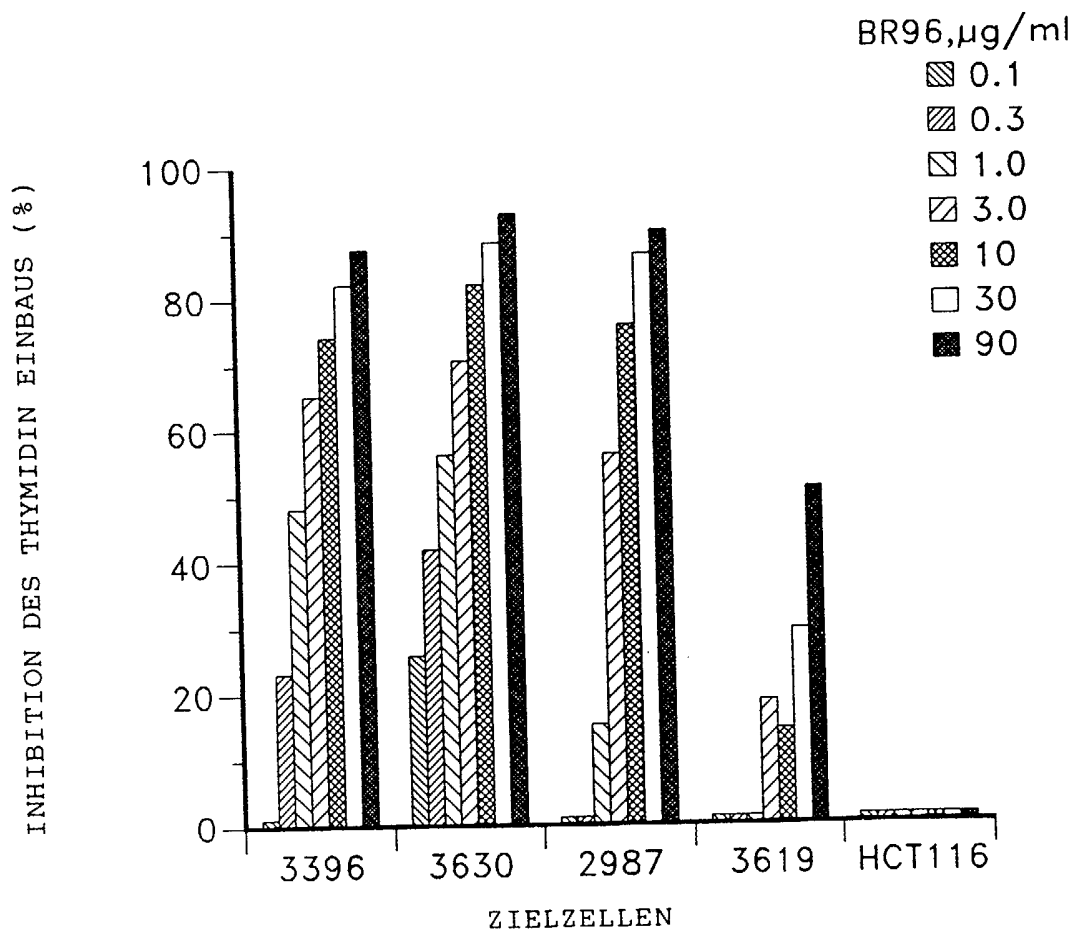


FIG. 7

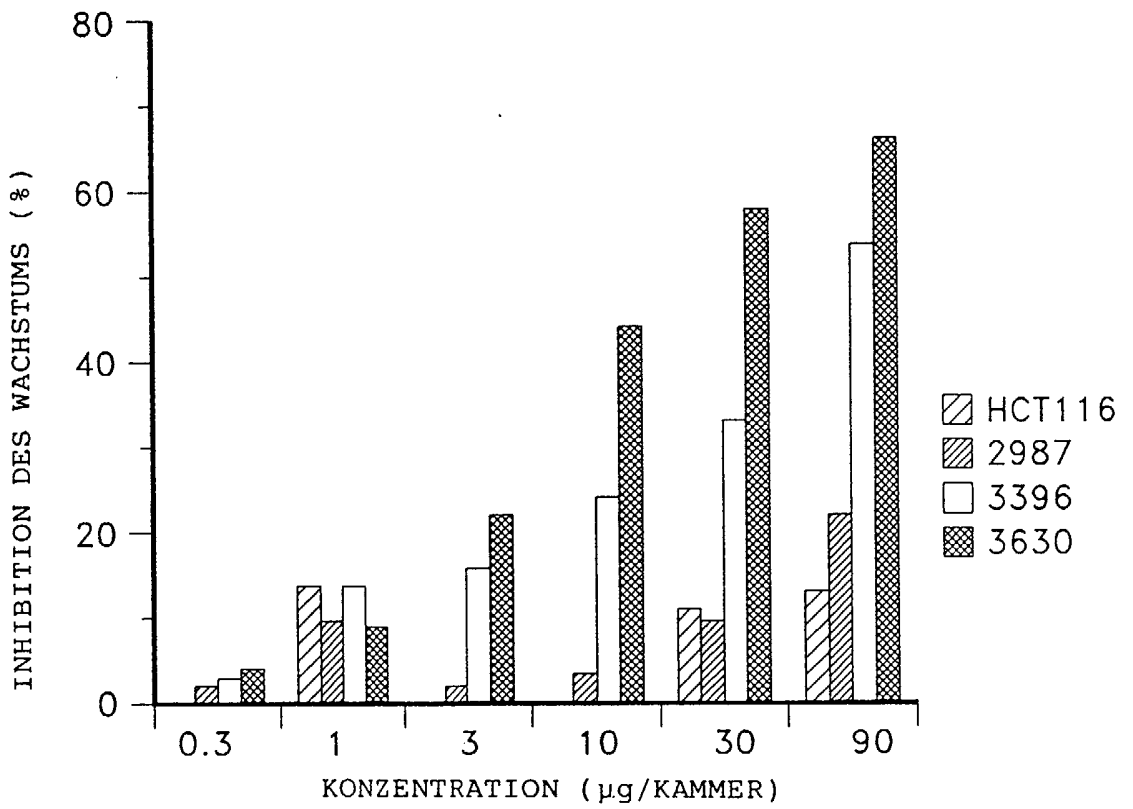


FIG. 8

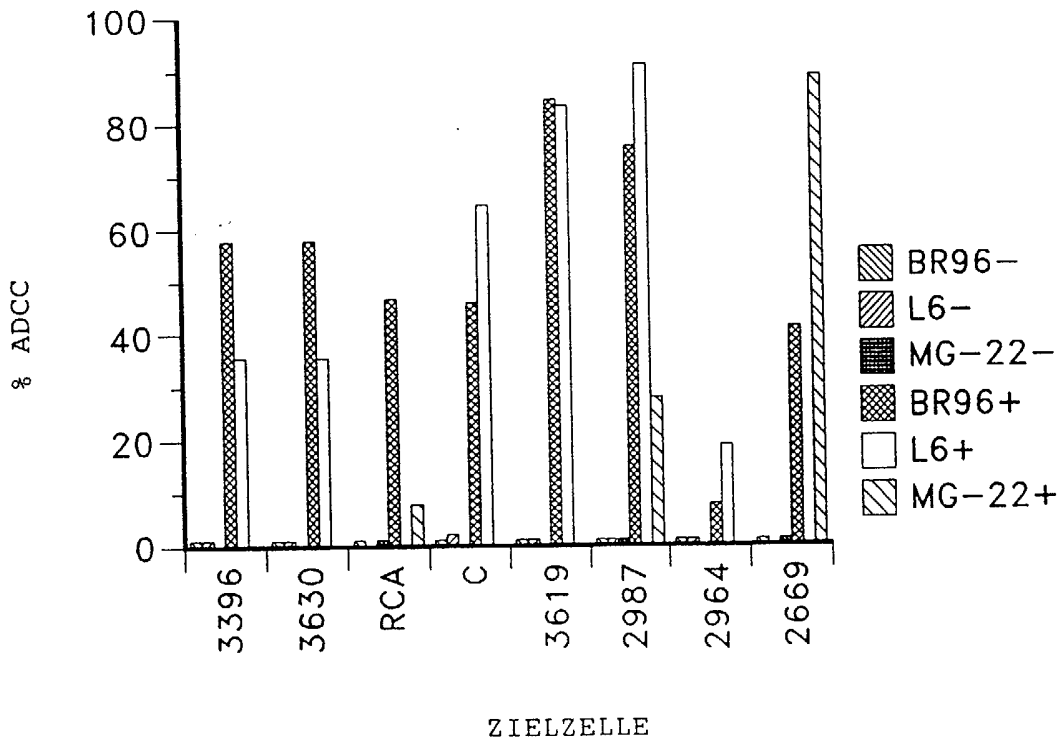


FIG. 9

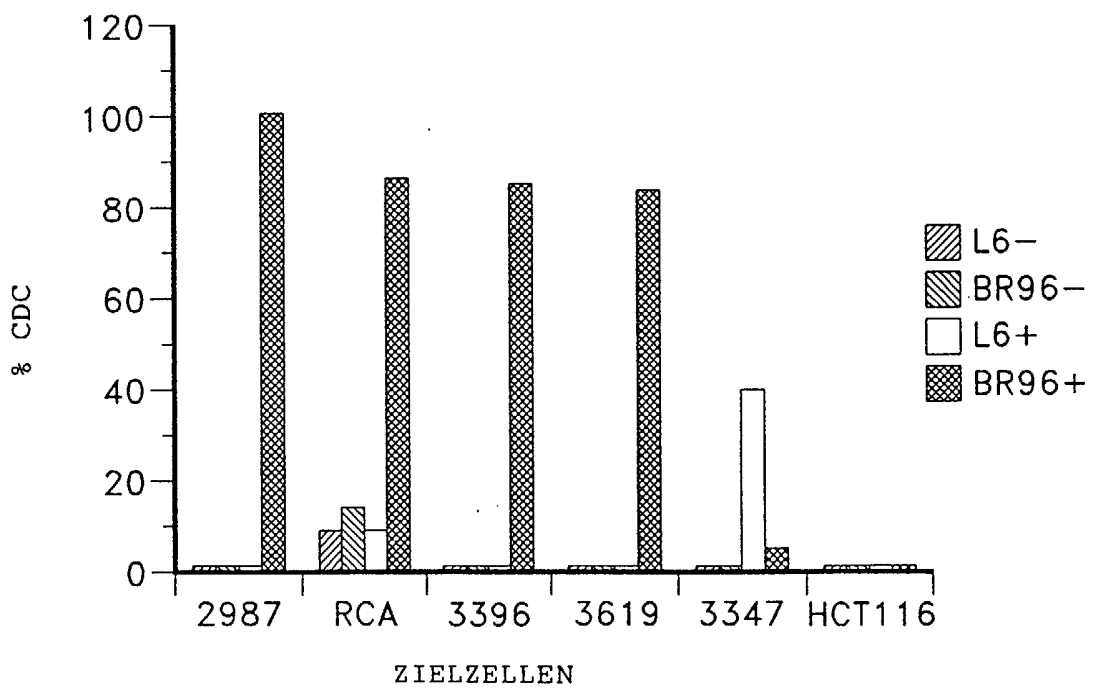


FIG. 10

07.11.90
297418

EXTINKTION BEI 450 nm

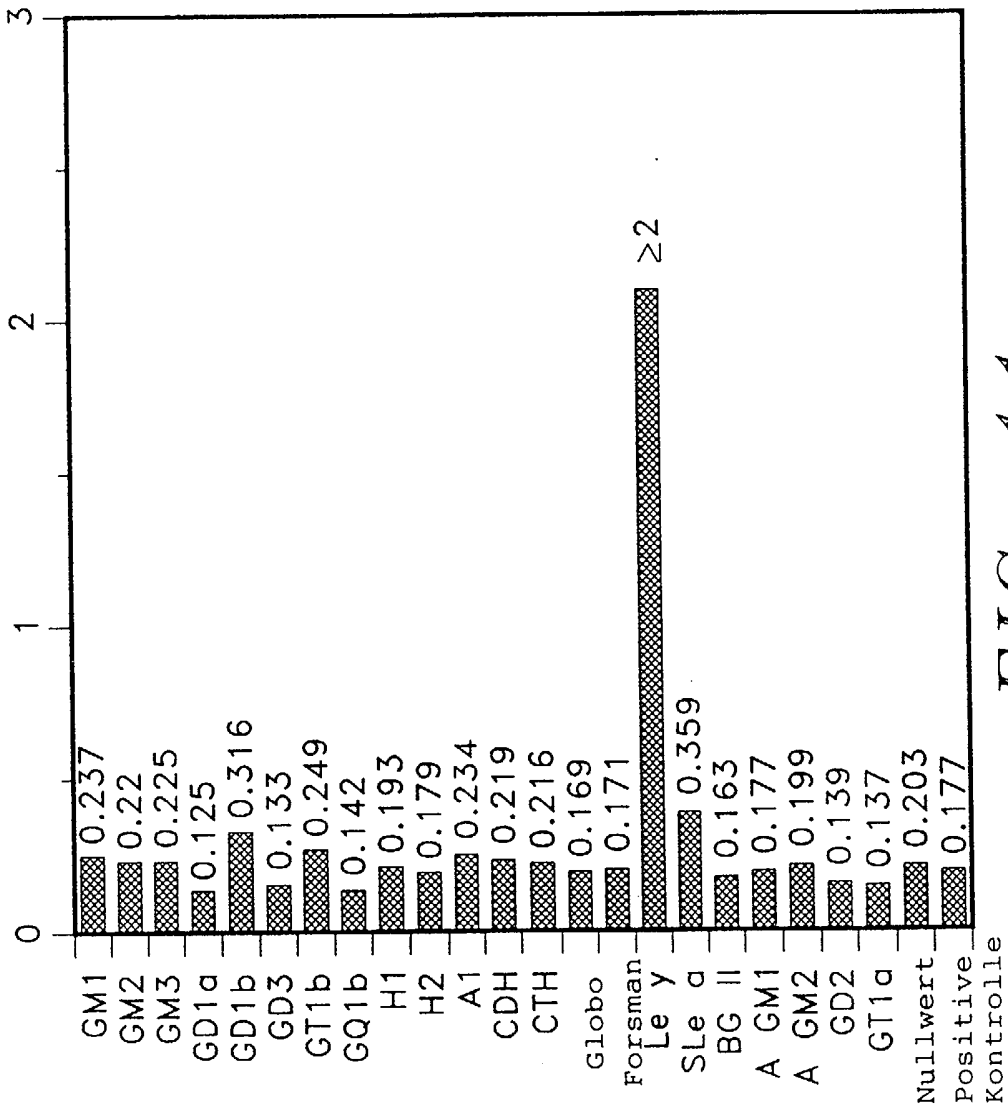


FIG. 11

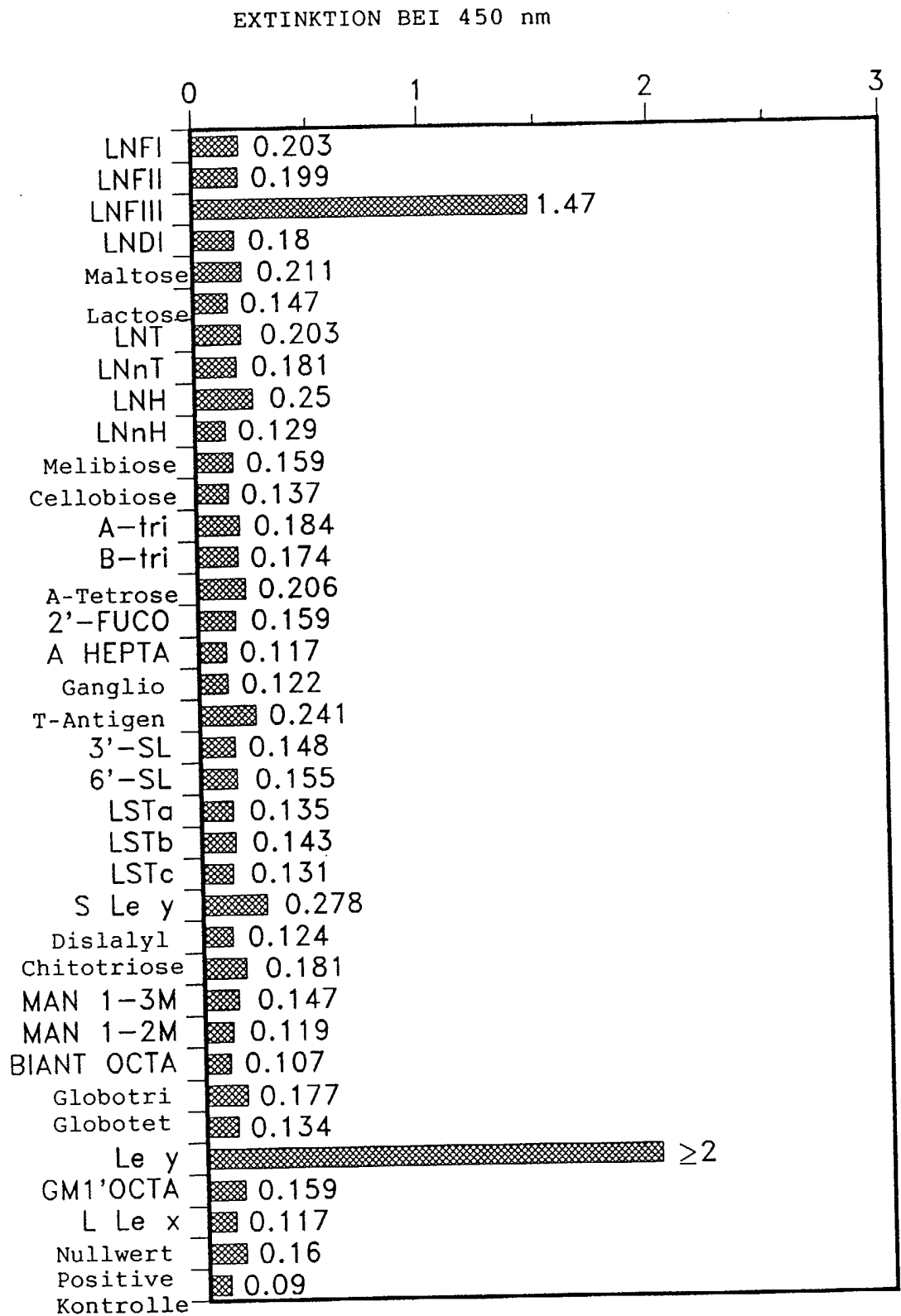


FIG. 12

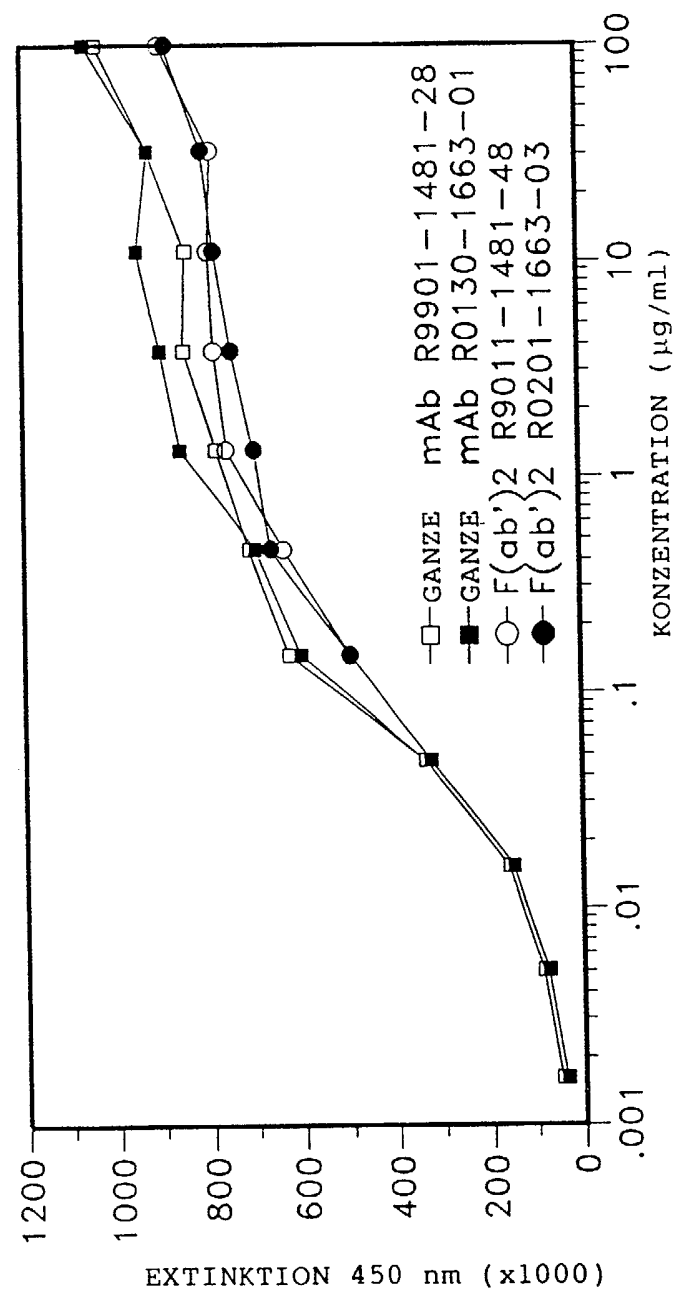


FIG. 13

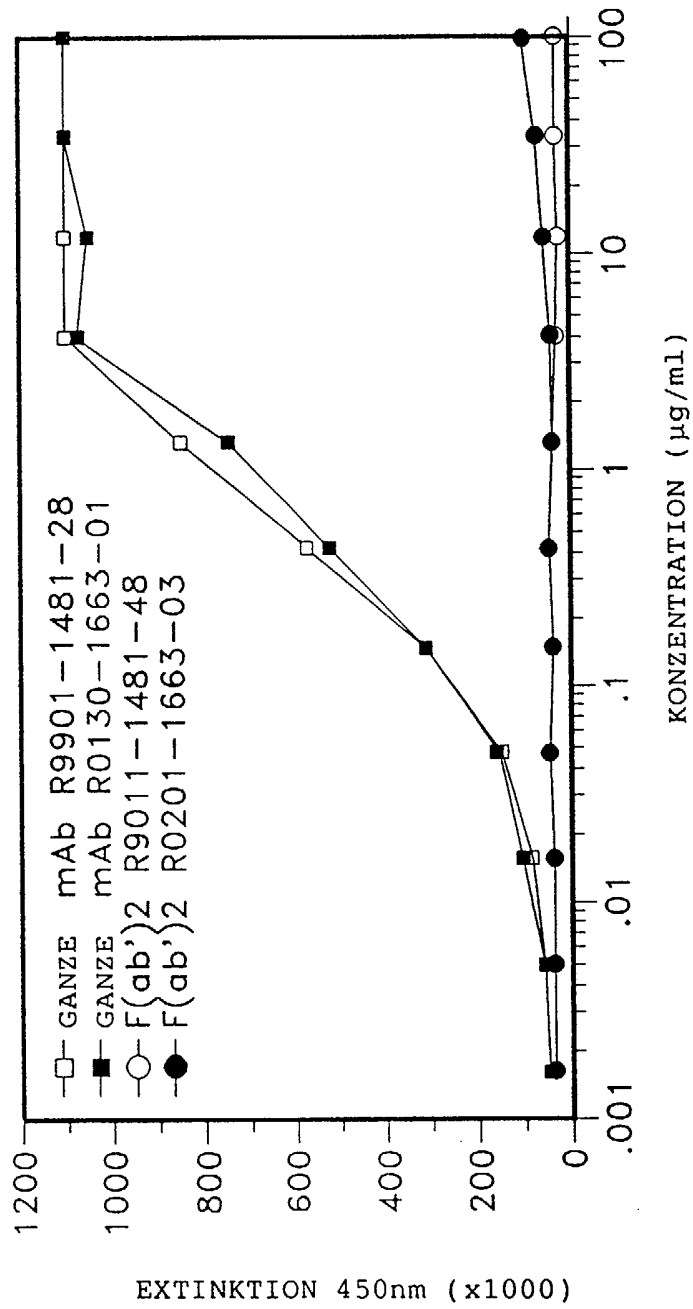


FIG. 14

001100

297418

-37-

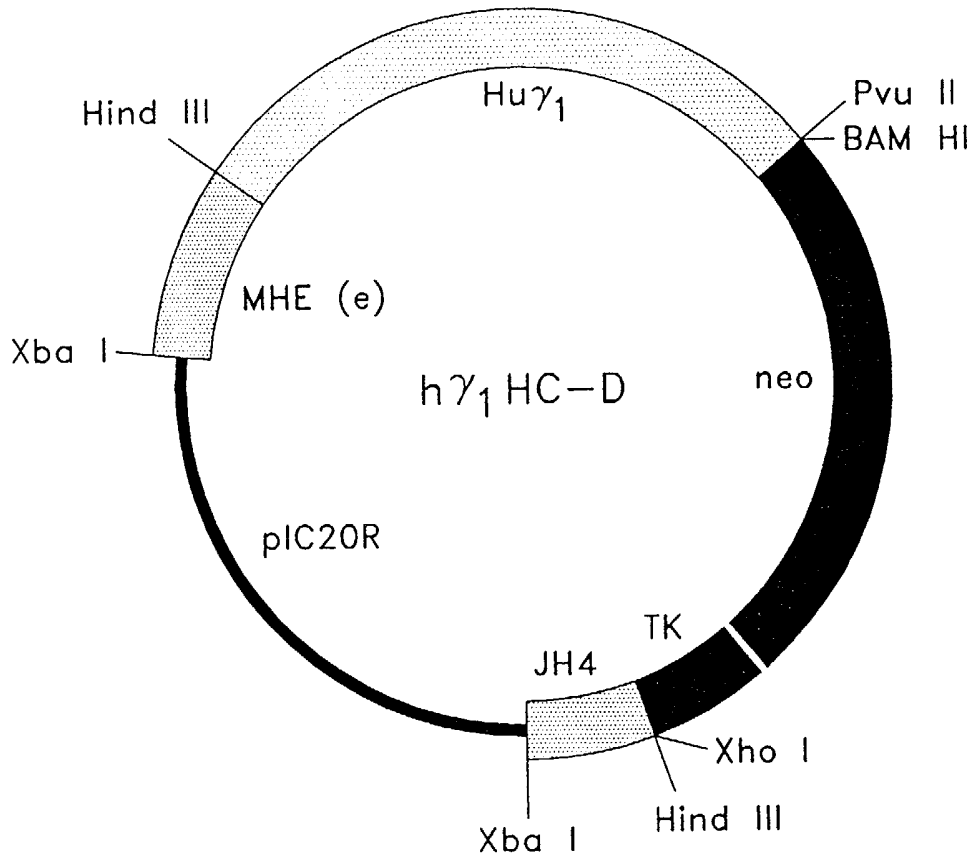


FIG. 15

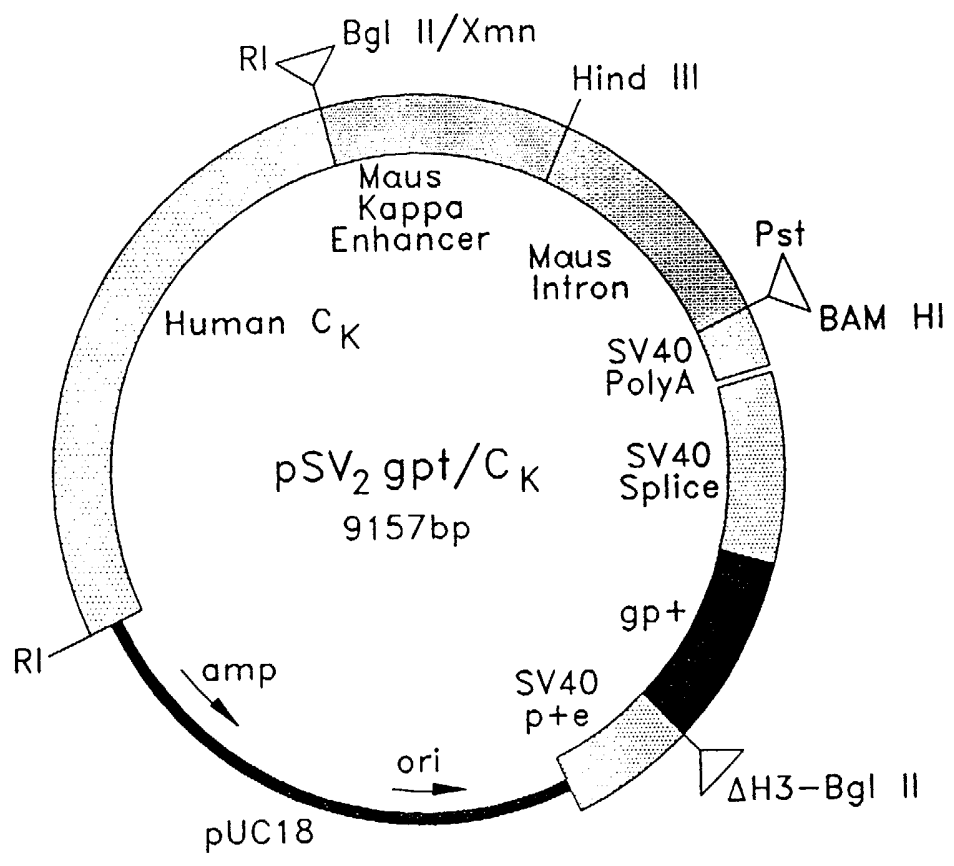


FIG. 16

CHARAKTERISIERUNG VON SPEZIFITÄT UND
ACTIVITÄT DES CHIMÄREN ANTIKÖRPERS IM
KONKURRENZ-BINDUNGSTEST

KONKURRENZ-BINDUNGSTEST

0.3 $\mu\text{g/ml}$ BIOTINYLIERTER CHIMÄRER BR 96 ANTIKÖRPER

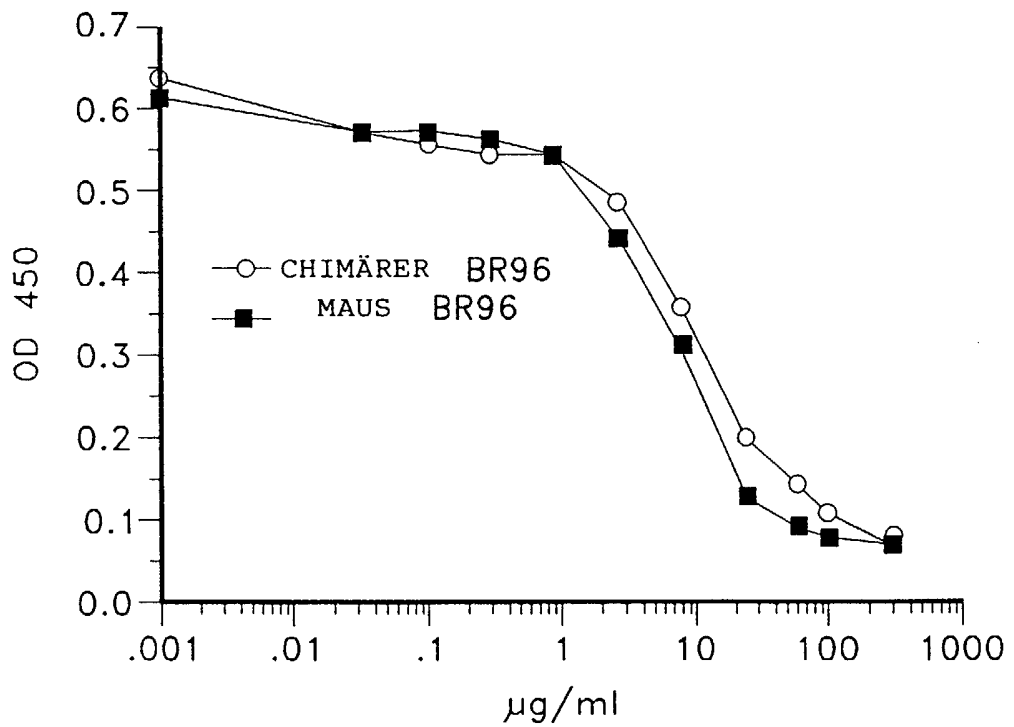


FIG. 17

07.1.1960

297418

-40-

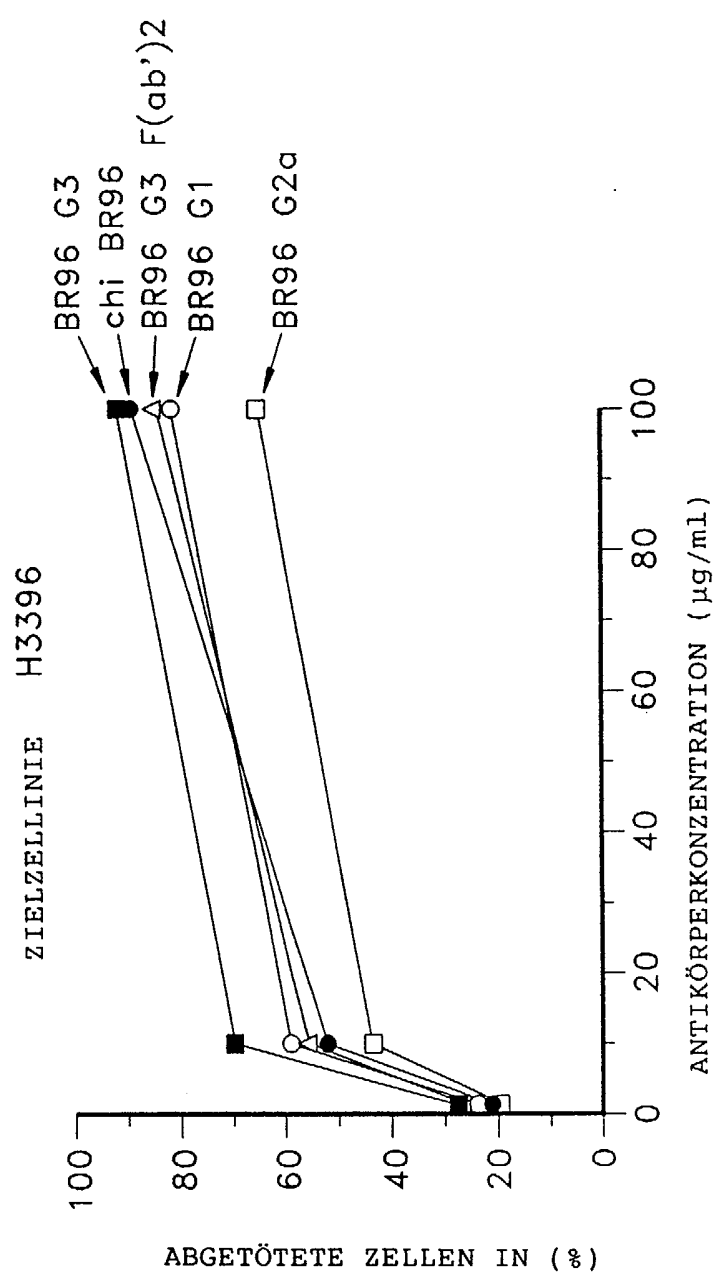


FIG. 18

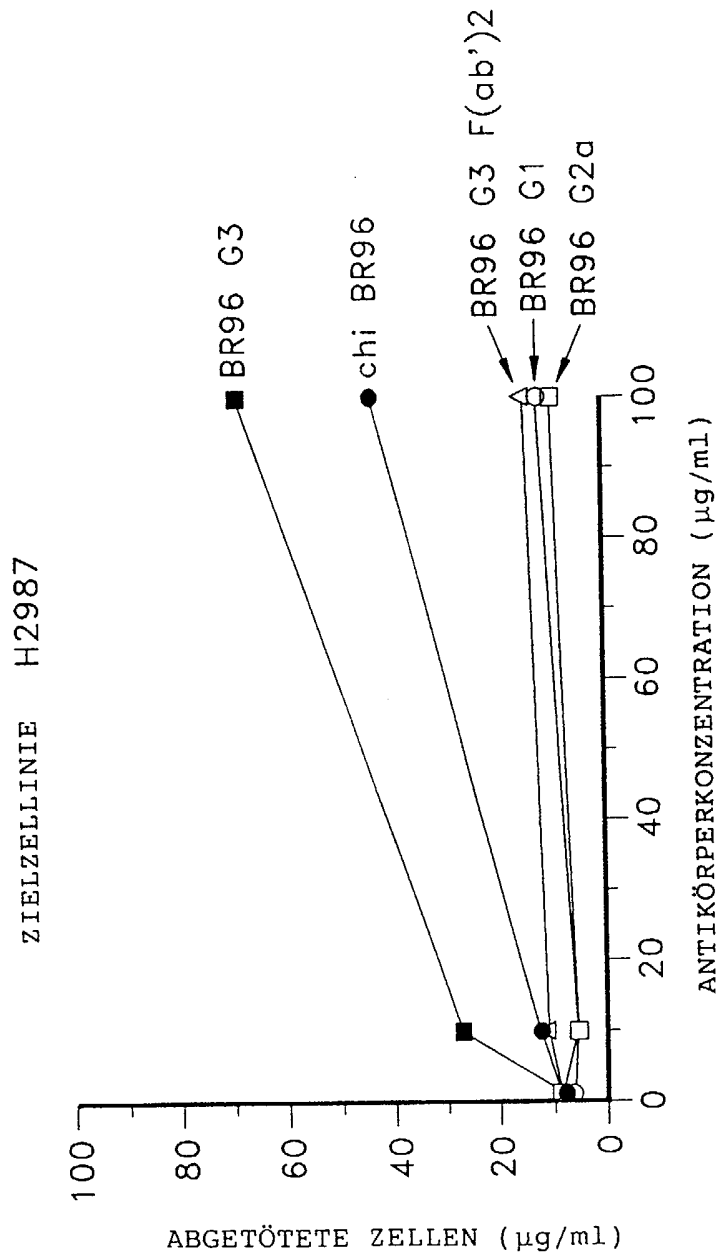


FIG. 19

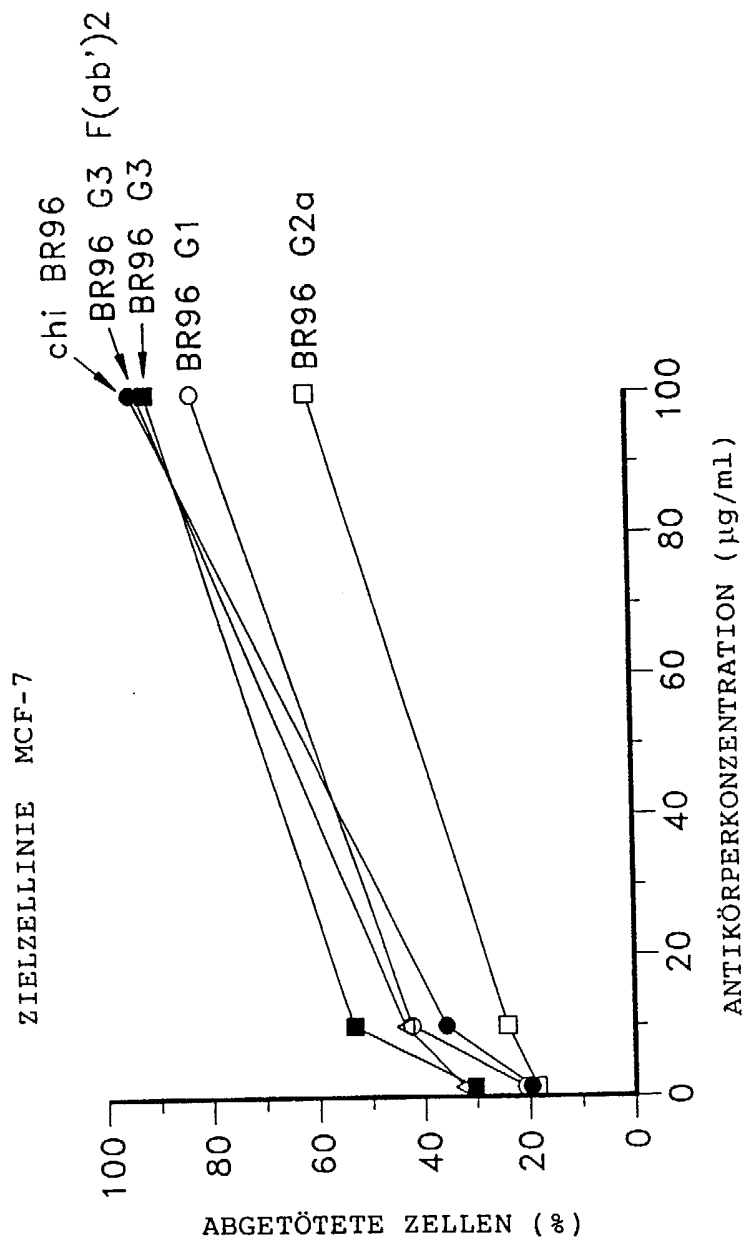


FIG. 20

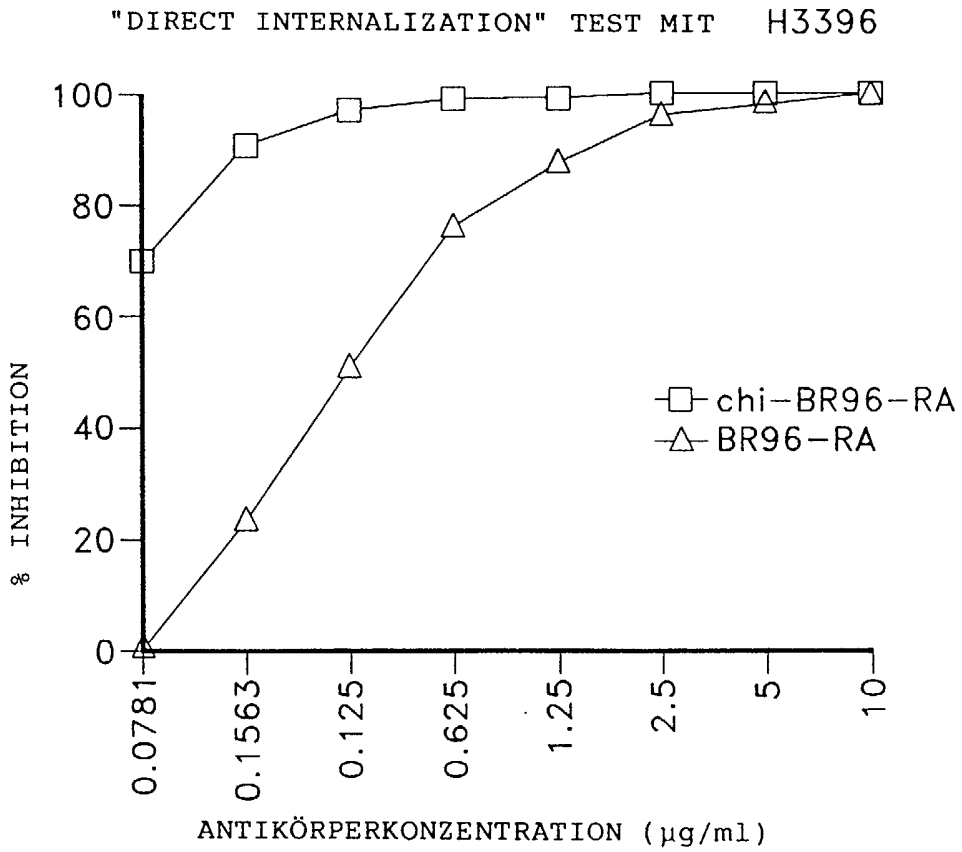


FIG. 21

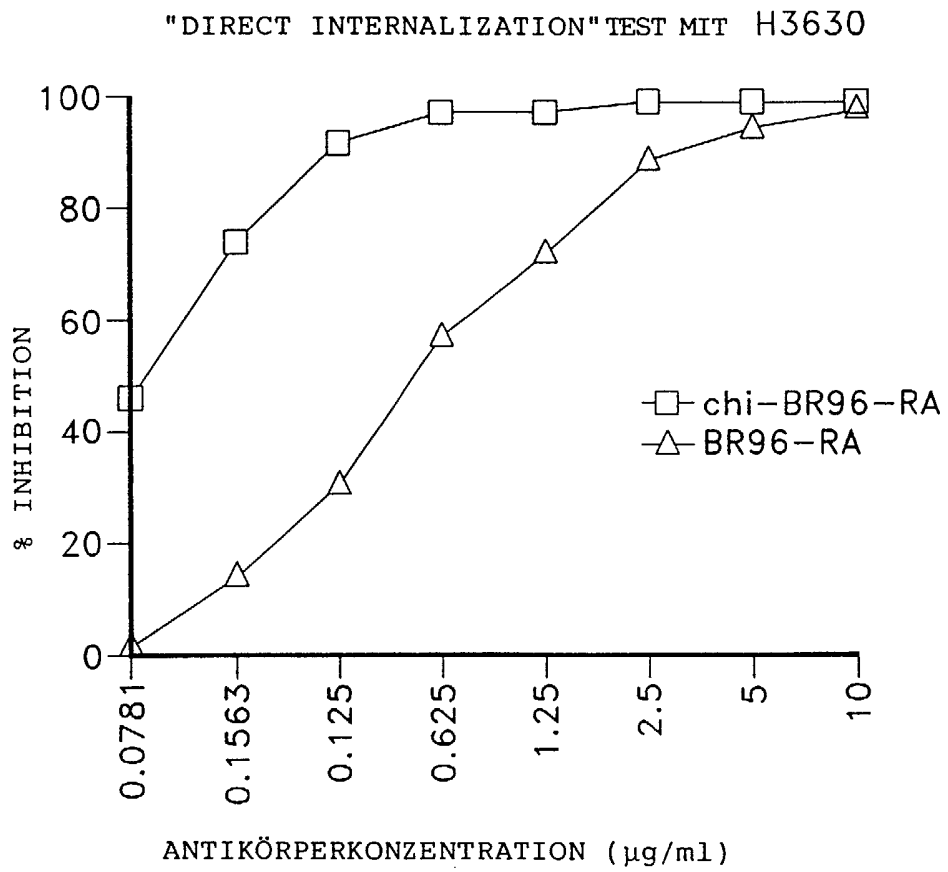


FIG. 22

EINFLUSS UNKONTROLLIERTER MAbS AUF H 2987

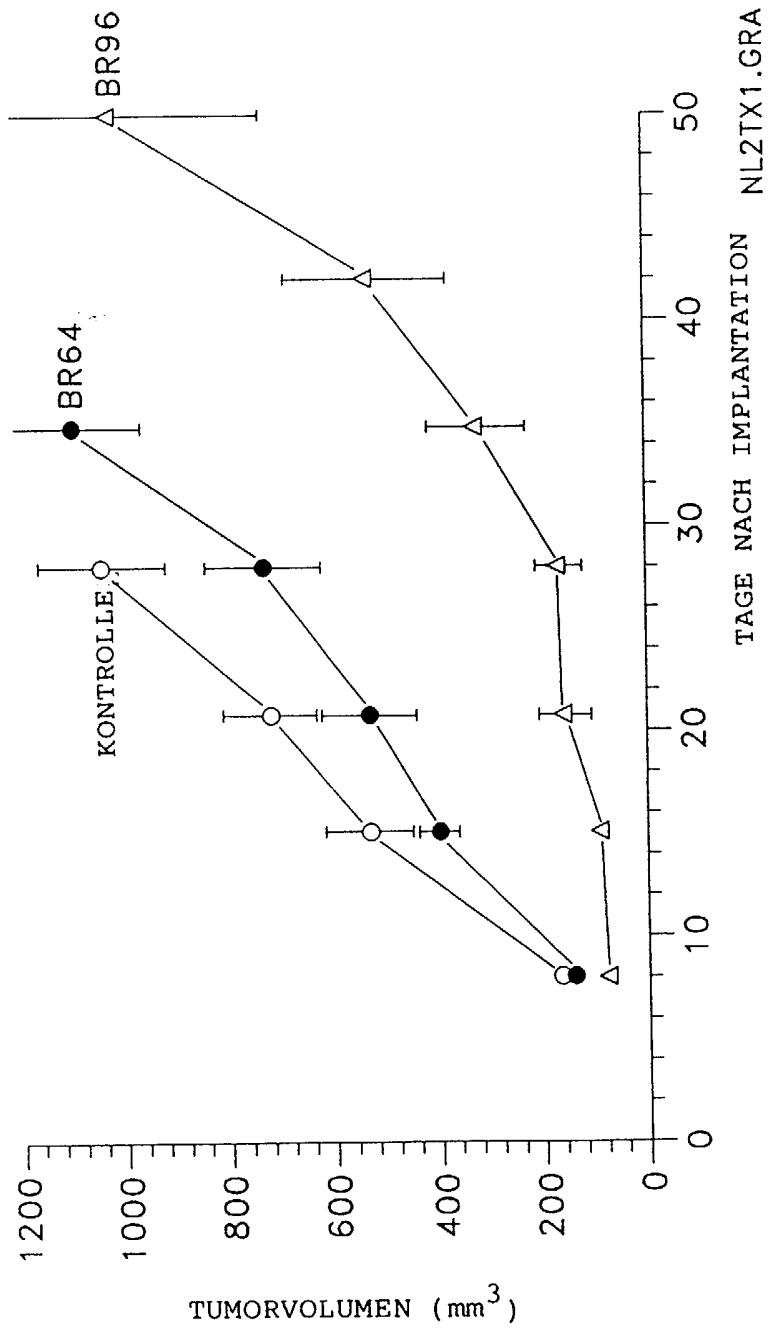


FIG. 23

FEHLEN VON TUMOREN AM ENDE EINER BEHANDLUNG
10 TIERE JE GRUPPE

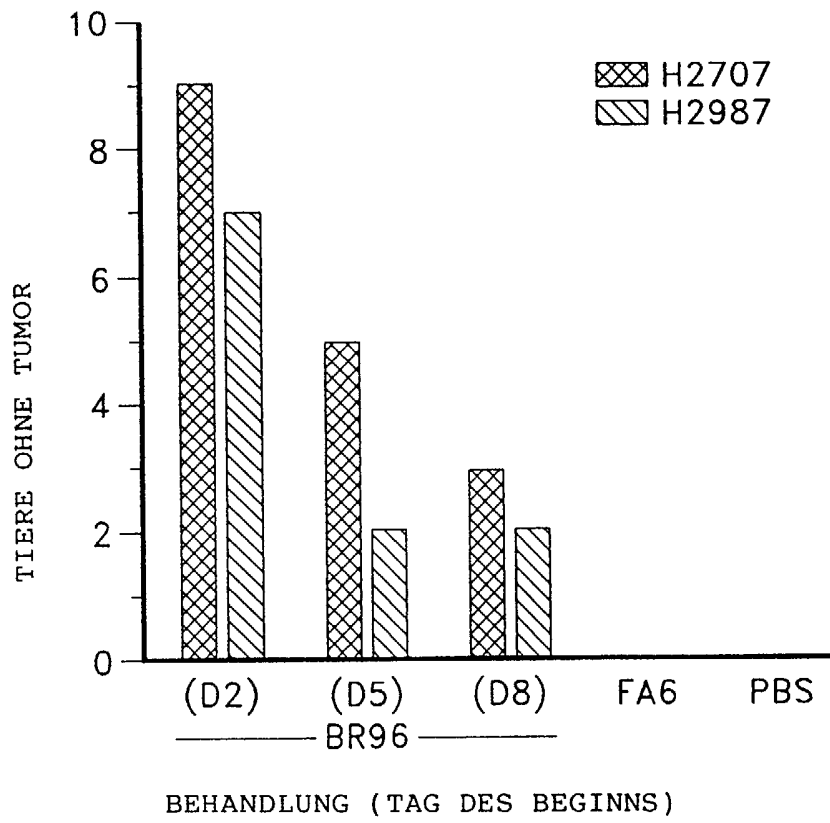


FIG. 24

07.11.60

297418

DOSISEFFEKT VON BR96 I_G3 AUF H 2707

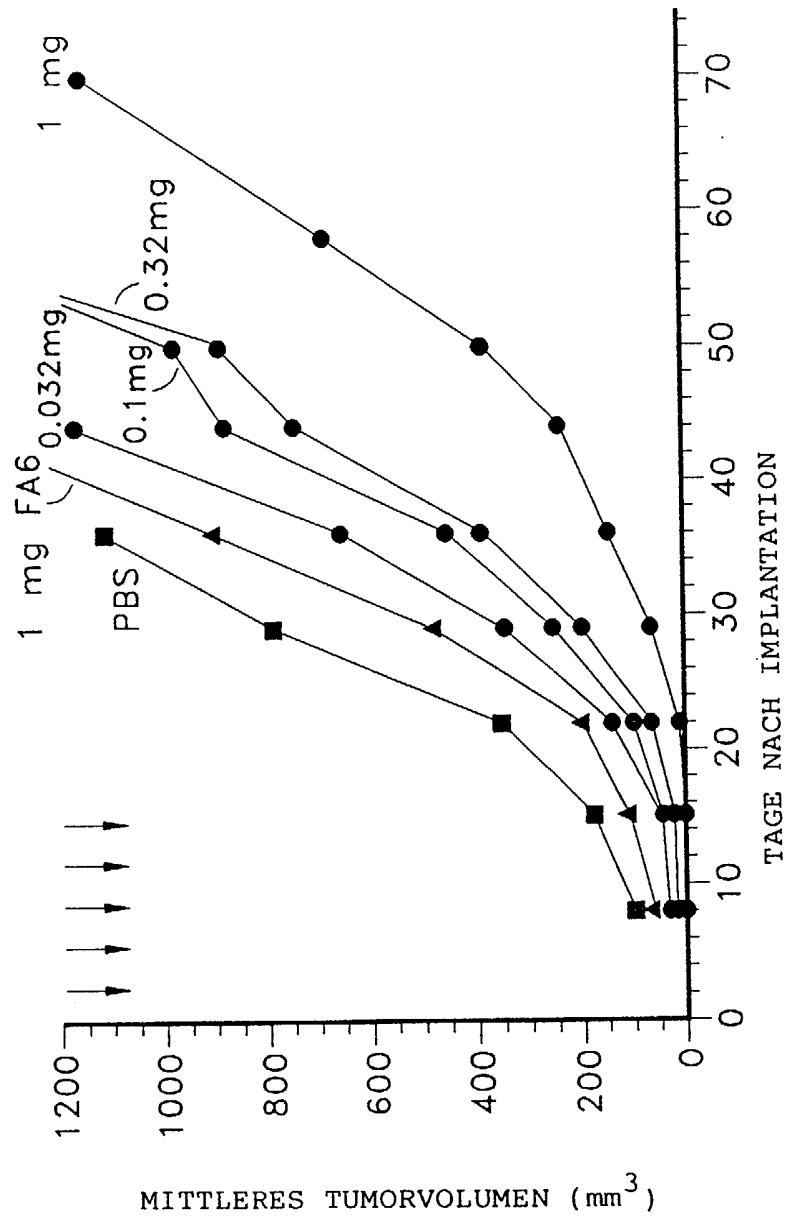


FIG. 25

EINFLUSS VON F(ab')₂ UND CHIMÄREM BR96 auf H 2707

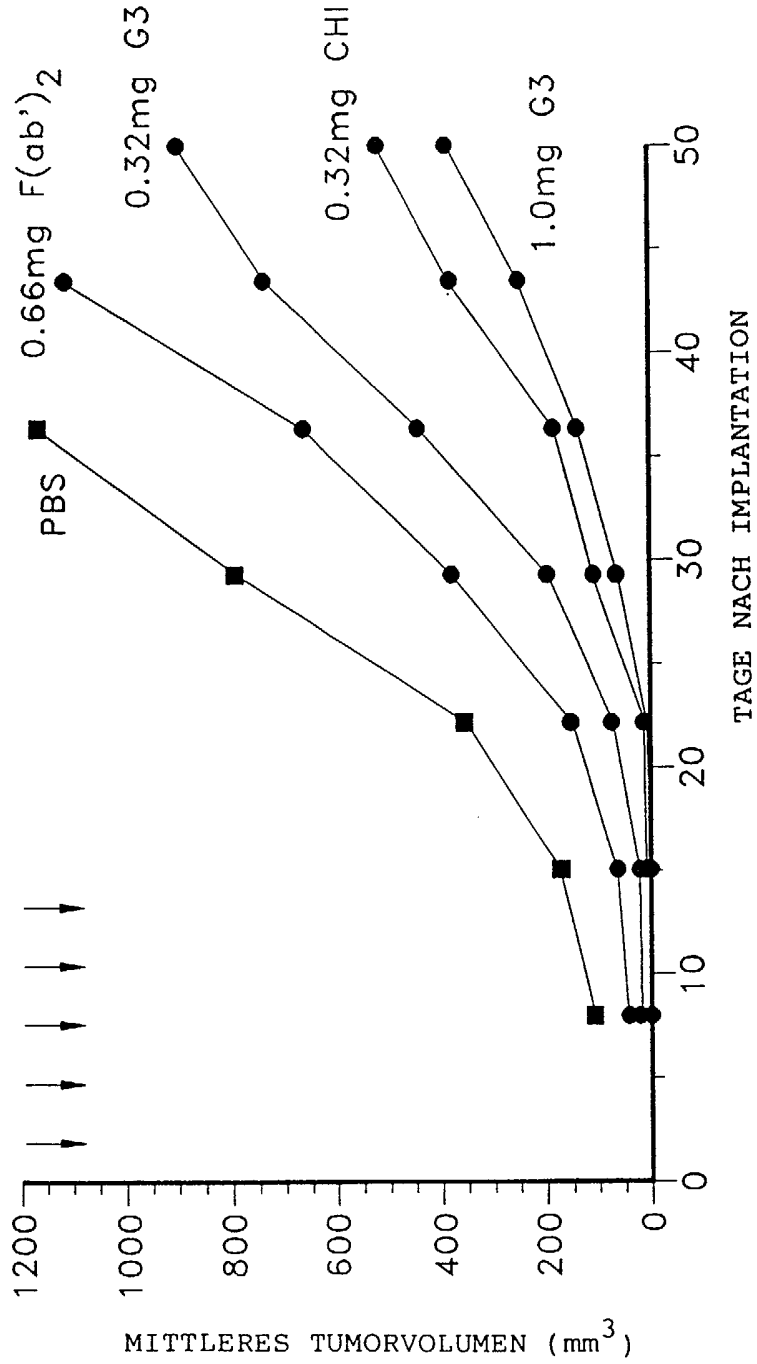


FIG. 26

27 11 1955

297418

FEHLEN VON TUMOREN NACH BEHANDLUNG
8 TIERE JE GRUPPE
H 2707 XENOTRANSPLANTAT

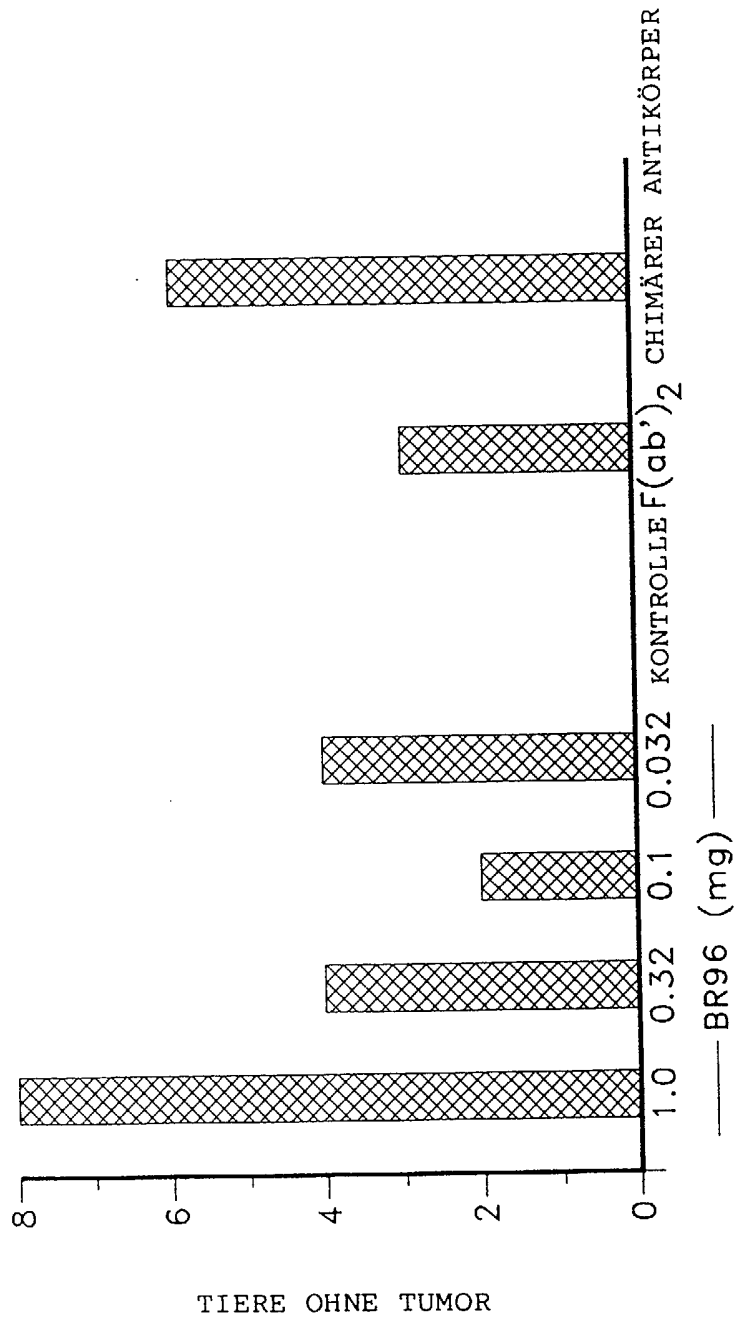


FIG. 27