



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 276 165 A5

4(51) G 01 N 33/577
G 01 N 33/574

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP G 01 N / 322 420 0
(31) 834,172(22) 25.02.87
(32) 26.02.86(44) 14.02.90
(33) US

(71) siehe (73)

(72) Hellstrom, Karl E., SE; Brown, Joseph P., GB; Hellstrom, Ingegerd, SE; Marquardt, Hans, DE

(73) ONCOGEN, Seattle, Washington, 98121, US

(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Detektion maligner Zellen

(55) Verfahren, Detektion, Diagnose, maligne Zellen, Lungenkarzinom, Brustkarzinom, Colonkarzinom, Immunfärbung
 (57) Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Detektion maligner Zellen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern bereitgestellt, welche stark an ein Proteinantigen binden, das mit menschlichen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen („NSCLC“), menschlichen kleinzelligen Lungenkarzinomen und anderen menschlichen Karzinomen einschließlich vieler Karzinome des Colons und der Brust assoziiert ist. Die Antikörper binden wesentlich weniger stark an normale Humanzellen als an Tumorzellen. Erfindungsgemäß umfaßt ist auch ein neues Glykoprotein-Antigen mit 110 000 Dalton, das auf der Zelloberfläche menschlicher nicht-kleinzelliger Lungenkarzinomtumorzellen und auf Zellen bestimmter anderer Humankarzinome zu finden ist. Die aminoterminal Aminosäuresequenz dieses Antigens ist:

1 5 10 15 20
 L-X-V-Q-V-P-E-X-P-V-V-A-L-V-G-T-D-A-X-L ,

worin X eine nicht-identifizierte Aminosäure bedeutet.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Detektion maligner Zellen in einer Probe, von der angenommen wird, daß sie derartige Zellen enthält, **gekennzeichnet dadurch**, daß man die Probe mit einem gemäß einem der vorhergehenden Punkte hergestellten monoklonalen Antikörper unter Reaktionsbedingungen in Kontakt bringt, die es dem monoklonalen Antikörper ermöglichen, an die Determinante zu binden; die nichtgebundenen monoklonalen Antikörpermoleküle aus der Probe entfernt und die Probe auf die Anwesenheit gebundener monoklonaler Antikörper untersucht, wobei die Bindung des monoklonalen Antikörpers die Anwesenheit maligner Zellen in der Probe anzeigt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man maligne Zellen bestimmt, die nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzellen aufweisen.
3. Verfahren nach Punkt 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß man eine Probe einsetzt, die Lungengewebe enthält.
4. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man maligne Zellen einsetzt, die Brustkarzinomzellen aufweisen.
5. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man maligne Zellen einsetzt, die Colonkarzinomzellen aufweisen.
6. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß man die Bindung durch immunohistologisches Anfärben detektiert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Detektion maligner Zellen bereitgestellt. Der zur Detektion verwendete monoklonale Antikörper ist spezifisch für Karzinomantigene. Dieser monoklonale Antikörper ist insbesondere immunospezifisch für und/oder immunoreaktiv mit einem Proteinantigen, das beim nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinom beim Menschen (human nonsmall cell lung carcinoma NSCLC) und bei bestimmten anderen Karzinomen beim Menschen einschließlich bei Brust- und Colonkarzinomen auftritt.

Der erfindungsgemäß verwendete monoklonale Antikörper reagiert mit einer Determinante eines Glycoproteinantigens, das mit NSCLC-Zellen und auch mit anderen Karzinomen assoziiert ist, wozu Brust-, Colon- und kleinzellige Lungenkarzinome gehören. Der erfindungsgemäß verwendete monoklonale Antikörper besitzt klar unterscheidbare Eigenschaften und Fähigkeiten und findet daher Anwendung sowohl bei in vivo- als auch bei in vitro-klinischen Diagnosen. Der erfindungsgemäß verwendete Antikörper kann außerdem therapeutisch eingesetzt werden. So kann der Antikörper ein zielektiver Träger verschiedener Agentien sein, welche gegen Tumore wirken, wozu beispielsweise chemotherapeutische Arzneimittel, Toxine, Immunmodulatoren und Radioisotope gehören.

Ferner können die durch diesen Antikörper produzierten Hybridomzellen unter Einsatz der rekombinante DNA verwendenden Technik so modifiziert werden, daß die erhaltenen Antikörper eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität vermitteln oder für Tumorzellen in Anwesenheit von Komplementkomponenten zytolytisch sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Männer, die ihrem Krebsleiden erliegen, sterben vorwiegend an Lungenkrebs. Dabei sterben mehr Männer an Lungenkrebs als Frauen an Brustkrebs, welcher die bei Frauen häufigste Krebserkrankung ist. Der Lungenkrebs bzw. die Lungenkarzinome können in die folgenden vier histologischen Haupttypen unterteilt werden:

- (1) Epidermoides oder Plattenepithelkarzinom (30%),
- (2) Adenokarzinom (35%),
- (3) undifferenziertes großzelliges Karzinom (15%) und
- (4) kleinzelliges Karzinom (20%).

Zum sogen. nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) gehören die folgenden Zelltypen: epidermoide Karzinomzellen, Adenokarzinomzellen und große undifferenzierte Karzinomzellen.

In den meisten Fällen sind Lungenkarzinome durch Chemotherapie oder Bestrahlung nicht heilbar. Kleinzellige Lungenkarzinome können auf eine Chemotherapie und eine Bestrahlungstherapie durch Reduktion ihrer Größe ansprechen. Jedoch stellt dies keine endgültige Heilung dar. Nur durch eine vollständige chirurgische Entfernung des Tumors scheint eine wirksame Therapie möglich zu sein. Leider haben jedoch weniger als 30% der Lungenkrebspatienten Tumore, die, nachdem sie diagnostiziert worden sind, auch völlig reseziert werden können. Von denjenigen Patienten, denen der Tumor chirurgisch vollständig (soweit feststellbar) entfernt wurde, überleben nur 1/3 mehr als fünf Jahre. Es besteht daher ein großes Bedürfnis danach, Lungenkrebs in einem früheren Stadium diagnostizieren zu können, die Ausbreitung des Krebses besser definieren zu können und eine wirksamere Therapie zur Hand zu haben.

Monoklonale Antikörper, die homogene Antikörpermoleküle darstellen, welche an eine einzelne molekulare Stelle (d.h. ein Epitop) an einem Antigen mit einer spezifischen Bindungs- oder Affinitätskonstante binden, kann man nach drei im Stand der Technik beschriebenen Verfahren herstellen.

Man kann monoklonale Antikörper nach der Hybridomtechnik herstellen, die von Köhler und Milstein entwickelt wurde (1975, *Nature* 256: 495; 1976, *Eur. J. Immunol.* 6: 511).

Durch Verschmelzen antikörper-produzierender Zellen (Milz-Lymphozyten) mit Myelomzellen schufen Köhler und Milstein Hybridzellen, wobei immortalisierte Zelllinien entstanden, welche einerseits die Fähigkeit zur Antikörperherstellung besitzen und andererseits in einer Zellkultur permanent wachsen können. Die Hybridome sezernieren einen einzelnen Typ von Immunglobulin einer prädefinierten Antigenspezifität in Abhängigkeit von dem Antigen, dem die Lymphozyten zuvor ausgesetzt waren.

In alternativer Weise kann man monoklonale Antikörper durch in vitro-Transformation von B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Säugetieren mit beispielsweise dem Epstein Barr Virus (EBV) produzieren. Das Virus immortalisiert die antikörperproduzierenden Lymphozyten. Derartige Transformationstechniken sind im Stand der Technik bekannt, man vgl. beispielsweise Steinmetz et al., 1977, *Nature* 269: 420; Crawford et al., 1983, *The Lancet*, i: 386).

Schließlich ist es auch möglich, monoklonale Antikörper unter Einsatz von Techniken zu produzieren, bei denen die EBV-Immortalisierung und die Zellfusion oder die Hybridomtechnik kombiniert werden. Cole et al. (1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Liss, Inc., S. 77-96) beschreiben Techniken zum Verschmelzen einer menschlichen Plasmazytom- oder lymphoblastoiden Zelllinie als Fusionspartner eines EBV-transformierten Donorlymphozyten, welche zuvor als eine Zelllinie erkannt worden sind. In einem solchen System sind beide ursprünglichen Zelllinien unsterblich. Der Fusionspartner muß somit geeignete Arzneimittel-Marker aufweisen, um gegenüber den ursprünglichen Zelllinien selektioniert werden zu können, wenn das fusionierte Hybridom kultiviert wird. Die entstehenden EBV-Hybridome produzieren Antikörper, welche spezifisch für die eingesetzte EBV-Lymphozyten-Zelllinie ist.

Monoklonale Antikörper können in großen Mengen durch in vitro-Zellkultivierung bestimmter Hybridome oder transformierter Zelllinien hergestellt werden. Außerdem führt die Inokulierung einer Hybridomzelllinie in die Peritonealhöhle geeigneter Säugetiere, beispielsweise Mäuse, zu einem Tumor, der hohe Konzentrationen (1-20 mg/ml) des monoklonalen Antikörpers in die Tumoraszitesflüssigkeit sekretiert. Durch Entfernen der Aszitesflüssigkeit und Reinigen des monoklonalen Antikörpers kann eine einzelne Maus eine ausreichende Menge eines Antikörpers bereitstellen, die für Tausende von Diagnose-Assays genügt.

Monoklonale Antikörper für menschliche Lungenkrebsantigene sind in den folgenden Literaturstellen beschrieben:

Sikora et al., 1981, *Brit. J. Cancer* 43: 696; Cuttita et al., 1981, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 78: 4591; Moody et al., 1981, *Science* 214: 1246; Minna et al., 1981, *In Vitro* 17: 1058; Kennel et al., 1981, *Cancer Res.* 41: 3465; *Chem. Abst.* 95 (15): 1308502; Baylin et al., 1982, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 79: 4650; Carney et al., 1982, *Pathobiology Annual* 12: 115; Gazdar et al., 1983, *Seminars in Oncology* 10: 3; Hollinshead et al., 1983, *Cancer Detect. Prevent* 6: 185; Mulshine et al., 1983, *J. Immunol.* 131: 497; Huang et al., 1983, *Arch. Biochem. Biophys.* 220: 318; Saji et al., 1984, *Hybridoma* 3: 119; *Bio. Abst.* 79005569; Bosslet et al., Behring, *Ins. Mitt.* 74: 27; *Chem. Abst.* AC 101 (9): 706686; Roset et al., 1984, *Cancer Res.* 44: 2052; *Bio. Abst.* 79023605; Princlar et al., 1982, *Cancer Res.* 42: 843; Mazaure et al., 1982, *Cancer Res.* 42: 150; Braatz et al., 1982, *Cancer Res.* 42: 849; Sobel et al., 1982, *Fed. Proc.* 41: 409; Cole et al., 1985 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Liss, Inc., S. 77-96 und Varki et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Liss, Inc., S. 207.

In den US-Patentanmeldungen mit den Ser. Nos. 687 521 (eingereicht am 2. November 1984); 785 177 (eingereicht am 7. Oktober 1985); 684 759 (eingereicht am 21. Dezember 1984); 776 321 (eingereicht am 18. Oktober 1985) und 738 612 (eingereicht am 28. Mai 1985) sind bestimmte monoklonale Antikörper gegen menschliche nicht-kleinzellige Lungenkarzinome beschrieben. Monoklonale Antikörper können zur früheren Diagnose von Lungenkrebs, zur genaueren Bestimmung des Ausbreitungsgrades von Krebs und für eine wirksamere Therapie von Lungenkrebs eingesetzt werden. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß man Antikörper für Antigene findet, die in Lungenkrebsgewebe stärker exprimiert werden als in normalem Gewebe von Erwachsenen. Angesichts der bekannten Heterogenität von Tumorzellenpopulationen, der Anwesenheit verschiedener Determinanten auf demselben Antigenmolekül, der zu erwartenden Unterschiede zwischen Antigenen bezüglich ihrer Stabilität als diagnostische Marker und als therapeutische Targets und des unterschiedlichen biologischen Verhaltens verschiedener Antikörper zu demselben Antigen müssen für mehrere unterschiedliche Antikörper auch mehrere unterschiedliche Antigene zum Einsatz gebracht werden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, Diagnose und Therapie von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und von bestimmten anderen Humankarzinomen mit Hilfe monoklonaler Antikörper zu ermöglichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein neues Verfahren zur Diagnose und Therapie von Lungenkrebs, Brustkrebs und Colonkrebs bereitzustellen.

Der erfindungsgemäß verwendete monoklonale Antikörper gehört zu einer neuen Klasse, die als L 20 bezeichnet ist. Dieser monoklonale Antikörper ist spezifisch für eine Determinante (Determinantenstelle) an einem Glycoproteinantigen, das mit menschlichen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (NSCLC) assoziiert ist. Zu diesen Zellen, die nachstehend als „NSCLC-Zellen“ bezeichnet sind, gehören epidermoide Karzinomzellen, Adenokarzinomzellen und undifferenzierte großzellige Karzinomzellen. Die Determinante kann auch an Antigenen von einigen anderen Karzinomen vorhanden sein, beispielsweise bei einigen Karzinomen der Brust und des Colon und beim kleinzelligen Lungenkarzinom. Somit bindet der erfindungsgemäß verwendete Antikörper auch an Zellen von anderen Karzinomen und kann zur Diagnose und Therapie von allen anderen Tumoren eingesetzt werden, die das durch den Antikörper L 20 identifizierte Antigen exprimieren. Der erfindungsgemäß verwendete monoklonale Antikörper bindet wesentlich weniger stark an normale erwachsene Zellen als an Tumorzellen. Mit dem Ausdruck „bindet wesentlich weniger stark an“ soll zum Ausdruck gebracht werden, daß ein Binden überhaupt nicht detektierbar ist oder nur als sehr schwaches Anfärben detektierbar ist, falls immunhistologische Techniken zur Anwendung kommen. Der Antikörper ist somit in hohem Maße spezifisch für das Antigen, das charakteristisch für NSCLC und bestimmte andere Karzinome ist.

Gegenstand der Erfindung ist auch, das neue L20-Antigen, das durch den Antikörper L20 identifiziert wird, und die Klasse von Antikörpern, die an dieses Antigen binden, dafür immunospezifisch sind oder damit immunoreaktiv sind. Erfindungsgemäß werden Verfahren zur Verwendung des gereinigten oder klonierten L20-Antigens als Vakzin zum Immunisieren gegen bestimmte Karzinome bereitgestellt.

Der erfindungsgemäß verwendete monoklonale Antikörper kann bei bestimmten Diagnoseverfahren eingesetzt werden. So kann dieser Antikörper zur Bestimmung malignen Lungengewebes und anderer maligner Humangewebe eingesetzt werden. Dabei untersucht man das Gewebe auf die Anwesenheit eines Antigens mit den Charakteristika eines durch den Antikörper L20 definierten Glycoproteins mit 110 000 Dalton. So kann das Gewebe mit einem Antikörper in Kontakt gebracht werden, der eine Determinantenstelle auf einer Zelle definiert, welche mit dem Antigen assoziiert ist, das die Charakteristika des Antigens besitzt, das durch den Antikörper L20, ein funktionelles Äquivalent oder ein Fragment dieses Antikörpers definiert ist. So kann jede Interaktion des Antikörpers und der Antigen determinanten detektiert werden. Bei einer solchen Arbeitsweise wird die Anwesenheit von NSCLC-Zellen in einer Probe untersucht, von der angenommen wird, daß sie derartige Zellen enthält. Die Probe wird mit dem monoklonalen Antikörper in Kontakt gebracht, der derartige Zellen von anderen Zelltypen unterscheiden kann, welche in der Probe ebenfalls vorhanden sein können. Den Antikörper bringt man bei solchen Bedingungen mit der Probe in Kontakt, bei denen er an die Zellen binden kann. Nach dem Inkontaktbringen wird bestimmt, ob der Antikörper an die Zellen in der Probe bindet oder nicht. Ob der Antikörper bindet, hängt davon ab, ob NSCLC-Zellen in der Probe vorhanden sind oder nicht. Im allgemeinen wird die Probe mit einem markierten spezifischen Bindungspartner des monoklonalen Antikörpers in Kontakt gebracht. Diese Markierung ist in der Lage, ein detektierbares Signal zu liefern.

Bei einem weiteren Diagnoseverfahren: unter Anwendung der in vivo-Lokalisierung eines Tumors wird ein erfindungsgemäß anwendbarer, gereinigter Antikörper oder ein Antikörperfragment, der (das) mit einem Agens markiert ist, das ein detektierbares Signal liefert, an einen Patienten verabreicht. Die Lokalisation wird dann durch externe Szintigraphie, Emissionstomographie oder Scannen auf Radionuklide detektiert. Dieses Verfahren kann auch dazu eingesetzt werden, bösartige Geschwülste bei Krebspatienten in pathologische Stadien anhand deren Ausbreitung einzuteilen und die Veränderungen beim Ansprechen auf die Therapie zu überwachen.

Der erfindungsgemäß verwendete Antikörper kann auch therapeutisch eingesetzt werden, da der L20-Antikörper und ähnliche Antikörper mit dem L20-Antigen reagieren, welches in hohen Konzentrationen an der Oberfläche der Tumorzelle exprimiert wird. Antikörper können daher als Träger verschiedener Agentien eingesetzt werden, welche Antitumorwirkung besitzen. Dazu zählen chemotherapeutische Arzneimittel, Toxine, Immunmodulatoren und Radioisotope.

Außerdem kann der L20-Antikörper derart modifiziert werden, daß er eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) vermittelt; d. h. er kann NSCLC-Zellen in Anwesenheit von Humanlymphozyten oder Makrophagen töten oder er wirkt für Tumorzellen in Anwesenheit des Humankomplements zytolytisch.

Eine derartige Modifikation kann beispielsweise mit Hilfe von Techniken erzielt werden, die kürzlich für die Produktion von „chimären Antikörpern“ entwickelt wurde. Demgemäß werden Gene, die für die variable Region des L20-Antikörpermoleküls kodieren, mit Humangenomen verknüpft, die für die Fc-Region eines Antikörpers mit einer geeigneten biologischen Aktivität (beispielsweise die Fähigkeit, das Humankomplement zu aktivieren und ADCC zu vermitteln) kodieren. Es können auch neue Antikörper, die von der Maus oder vom Menschen stammen, für das L20-Antigen mit den geeigneten biologischen Funktionen hergestellt werden.

Erfindungsgemäß wird ein neuer monoklonaler Antikörper verwendet, der als L20 bezeichnet ist und der immunospezifisch für und/oder immunoreaktiv mit einem Antigen an menschlichen NSCLC-Zellen und Zellen von verschiedenen anderen Humankarzinomen ist, wozu Karzinome des Colons und der Brust und kleinzellige Lungenkarzinome zählen. Erfindungsgemäß werden somit Verfahren zur Verwendung eines derartigen neuen monoklonalen Antikörpers bereitgestellt, der für bestimmte diagnostische und therapeutische Zwecke Anwendung finden kann.

Die Erfindung betrifft auch ein neues Zelloberflächenantigen, das für menschliche NSCLC-Zellen und bestimmte andere Humankarzinome der Brust, des Colons und der Lunge charakteristisch ist.

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen NSCLC

Monoklonale Antikörper gegen Human-NSCLC und bestimmte andere Humankarzinome können nach der Hybridom-Fusionstechnik, durch EBV-Transformation von humanen Lymphozyten, welche Antikörper produzieren, oder nach Techniken, bei denen die Zellverschmelzung und EBV-Immortalisationstechniken kombiniert werden, hergestellt werden.

Fusionstechniken

Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die monoklonalen Antikörper gegen NSCLC unter Anwendung der Hybridomzell-Fusionstechnik hergestellt. So werden beispielsweise menschliche Lungenkarzinomzellen von pleuralen Ergüssen, kultivierte Zellen von explantierten menschlichen NSCLC-Tumoren oder Zellen von einer normalen fötalen Lunge oder Lysate von derartigen Zellen als Immunogen eingesetzt. So wurden beispielsweise explantierte Zellen von einem NSCLC, menschliches Lungenadenokarzinom Nr. 3082, als Immunogen eingesetzt, man vgl. die weiter unten gemachten Ausführungen. Die Zellen wurden beispielsweise einer Maus injiziert. Nachdem genügend Zeit verstrichen war, wurde die Maus getötet. Es wurden somatische Antikörper-produzierende Lymphozyten erhalten. Die Antikörper-produzierenden Zellen können von den Lymphknoten, der Milz und dem peripheren Blut der primierten Tiere stammen, wobei jedoch Milzzellen bevorzugt sind. Mäuselymphozyten führen zu einem höheren Prozentsatz an stabilen Fusionen mit den unten beschriebenen Mäusemyelomen. Es ist auch möglich, somatische Zellen von Ratten, Kaninchen und Fröschen einzusetzen. Die Milz-Zellchromosomen, die für die gewünschten Immunglobuline kodieren, werden durch Verschmelzen der Milzzellen mit Myelomzellen, im allgemeinen in Anwesenheit von Polyethylenglycol, immortalisiert. Es können verschiedene Myelomzelllinien zur Herstellung fusionierter Zellhybride eingesetzt werden. Dazu zählen NSI-Ag4/I, X83-Ag8, MPC 11-45.6 TG 1.7, X63-Ag.653, Sp2/0-Ag 14, Fo und S 194/5 XX0.Bu.1, von Mäusen erhalten, und 210.RCY3.Ag 1.2.3, U-226AR und GM 1500GT GAL 2, von Ratten erhalten (Hammerling et al.; 1981, „Monoclonal Antibodies and T-cell hybridomas“ in Research Monographs in Immunology, Band 3, J. L. Turk, Hrsg. Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York). So wurden beispielsweise NS 1-Zellen eingesetzt. Die erhaltenen Zellen, die die fusionierten Hybridome umfassen, läßt man in einem selektiven Medium wachsen, wozu beispielsweise HAT-Medium zählt. Die überlebenden Zellen werden in diesem Medium unter Einsatz limitierender Verdünnungstechniken vermehrt. D's

Zellen wachsen in einem geeigneten Behälter, beispielsweise den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte. Der Überstand wird auf monoklonale Antikörper mit der gewünschten Spezifität gescreent. Es existieren verschiedene übliche Verfahren, um die monoklonalen Antikörper zu isolieren und zu reinigen und um sie beispielsweise von anderen Proteinen oder anderen Verunreinigungen zu befreien.

EBV-Transformations Techniken

Bei einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die monoklonalen Antikörper gegen NSCLC unter Anwendung der EBV-Transformations-technik hergestellt. So werden beispielsweise Lymphozyten, die aus dem peripheren Blut, aus Tumorgebietenden Lymphknoten, aus aus Markknochen gewonnenen Aspiraten, aus Tumoren oder aus pleuralen Ergüssen von Patienten mit NSCLC stammen, unter Verwendung von EBV immortalisiert, gemäß den von Cole et al., 1984, Cancer Res. 44: 2750, beschriebenen Methoden. Wie dort bereits ausgeführt ist, sind B-Lymphozyten, die für Tumorantigene spezifisch sind, in Lungenkrebspatienten selten. Es ist daher insbesondere wichtig, die Zahl der Antikörper-produzierenden Lymphozyten zu erhöhen, indem man Lymphozyten, welche den Antikörper gegen das relevante Antigen produzieren, präselektiert. Die EBV-Transformations-technik umfaßt somit zwei Stufen:

- (1) Anreicherung von Zellen mit Rezeptoren für das gegebene Antigen, i.e. L20-Antigen, das nachstehend beschrieben ist; und
- (2) Immunisierung derartiger Zellen durch Infektion mit EBV.

EBV-Hybridom Techniken

Die erfindungsgemäß verwendeten Antikörper gegen NSCLC können erfindungsgemäß auch durch Kombination der Transformations- und Hybridom-Fusionstechnik hergestellt werden, man vgl. Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., S. 77-96. So kann man beispielsweise eine Myelomzelllinie mit Donorlymphozyten von NSCLC-Patienten verschmelzen, welche zuvor durch EBV-transformiert und als eine Zelllinie erkannt worden sind, die unter Kulturbedingungen wachsen und sich entwickeln kann. Um in der Lage sein zu können, die erhaltenen EBV-Hybridom-Fusionszelllinien zu selektieren, ist es erforderlich, daß der Fusionspartner dominante geeignete selektierbare Arzneimittelmarker, beispielsweise Ouabain- oder Neomycinresistenz, besitzt, so daß sich keine parentale Zellen entwickeln, wenn die verschmolzenen Hybridomzelllinien kultiviert werden. Eine geeignete Linie ist die thioguaninresistente GM-150, ouabainresistente lymphoblastoide Zelllinie, KR-4, beschrieben von Cole et al., s. oben. Die erhaltenen Hybridomzellen werden nach üblichen Techniken kloniert.

Zellvermehrung und Antikörperproduktion

Sobald die gewünschten verschmolzenen Zellhybride oder transformierten Zelllinien selektiert und kloniert sind in einzelne Antikörper-produzierende Zelllinien, kann jede Zelllinie nach beiden von zwei üblichen Wegen vermehrt werden. Die einzelne Zelllinie kann in vitro, beispielsweise in Laboratoriums-Kulturgefäßen, vermehrt werden. Das Kulturmedium, das hohe Konzentrationen eines einzelnen spezifischen monoklonalen Antikörpers enthält, kann durch Dekantieren, Filtrieren oder Zentrifugieren gewonnen werden. In alternativer Weise kann die Ausbeute an monoklonalem Antikörper durch Injizieren einer Probe des Hybridoms in ein histokompatibles Tier des gewählten Typs erhöht werden, um so die somatischen und Myelomzellen für die ursprüngliche Verschmelzung bereitzustellen. Tumore, die den spezifischen monoklonalen Antikörper säernieren, der durch das fusionierte Zellhybrid produziert wird, entwickeln sich im infizierten Tier. Die Körperflüssigkeiten des Tieres, beispielsweise Aszitesflüssigkeit oder Serum, stellen monoklonale Antikörper in hohen Konzentrationen bereit. Wie bereits von Cole et al. in der oben angeführten Literaturstelle ausgeführt ist, ist es dann, falls Humanhybridome oder EBV-Hybridome eingesetzt werden, erforderlich, eine Abstoßung des den Tieren, beispielsweise Mäusen, injizierten Xenotransplantats zu verhindern. Es können immunodefiziente oder nackte Mäuse eingesetzt werden oder das Hybridom kann zuerst eine Passage in bestrahlten nackten Mäusen als fester subkutaner Tumor durchlaufen, in vitro kultiviert werden und dann intraperitoneal in mit Priatan primierte, bestrahlte nackte Mäuse injiziert werden, welche Aszitestumore entwickeln, die große Mengen spezifischer monoklonaler Humanantikörper sekretieren, man vgl. die oben aufgeführte Literaturstelle von Cole et al. Der erfindungsgemäß verwendete monoklonale Antikörper bindet an ein neues Zelloberflächen-Glycoprotein-Antigen, das als L20-Antigen bezeichnet ist und charakteristisch für menschliche NSCLC-Zellen und Zellen von bestimmten anderen menschlichen Karzinomen ist, wie dies nachstehend beschrieben ist. Das Glycoprotein-Antigen besitzt ein Molekulargewicht von etwa 110000 Dalton, wenn es einer Immunopräzipitation in einer Elektrophorese an Polyacrylamidgel unterworfen wird, wie dies ebenfalls nachstehend beschrieben ist. Durch Verdauung des L20-Antigens mit Glycanase konnte gezeigt werden, daß es N-verbundene Oligosaccharidketten enthält.

Der L20-Antikörper wird beispielsweise von dem nachstehend beschriebenen L20-murinen Hybridom produziert. Der L20-Antikörper ist vom Isotyp IgG1 (dies ist ebenfalls nachstehend beschrieben) und besitzt eine Avidität von etwa 3×10^6 . Der Antikörper bindet nicht detektierbar an normale Zellen, wozu beispielsweise Fibroblasten, endotheliale Zellen oder Epithelzellen in den Hauptorganen zählen. Mit dem Ausdruck „er bindet nicht detektierbar“ soll zum Ausdruck gebracht werden, daß immunohistologisch nur eine sehr schwache Anfärbung oder überhaupt keine Anfärbung detektierbar ist.

Erfindungsgemäß umfaßt sind auch nützliche bindende Fragmente des obigen monoklonalen Antikörpers, beispielsweise Fab, Fab', Fv-Fragmente usw. Die Antikörperfragmente erhält man nach üblichen Techniken. So kann man beispielsweise nützliche bindende Fragmente herstellen und durch Peptidaseverdauung des Antikörpers unter Einsatz von Papain oder Pepsin.

Ähnliche Antikörper, wozu auch Antikörper unterschiedlicher Isotypen, unterschiedlicher Affinität und mit neuen biologischen Funktionen, wie der Fähigkeit Tumorzellen in Anwesenheit des Komplements oder von Effektorzellen, beispielsweise Lymphozyten oder Makrophagen, zu töten, sind ebenfalls erfindungsgemäß umfaßt. Das oben aufgeführte spezifische Beispiel für einen neuen erfindungsgemäßen Antikörper, das auf einen Antikörper gerichtet ist, der an eine spezifische Determinante an dem entsprechenden Antigen bindet und zu der IgG1-Unterklasse aus einer murinen Quelle stammt, soll die vorliegende Erfindung nicht einschränken. Sowohl dieser oben beschriebene Antikörper als auch solche Antikörper, die über eine funktionelle Äquivalenz mit dem oben beschriebenen Antikörper verfügen, unabhängig davon, ob sie auch einer murinen Quelle, aus einer „Säugetierquelle“ einschließlich des Menschen oder aus anderen Quellen oder aus

Kombinationen davon stammen, sind erfindungsgemäß umfaßt. Dies gilt auch für die Antikörper anderer Isotypen. Mit dem Ausdruck „funktionelle Äquivalenz“ wird ein Antikörper bezeichnet, der in der Lage ist, an die oben beschriebene Determinante zu binden und mit einem bestimmten erfindungsgemäß erhältlichen Antikörper um diese Determinante bzw. Determinantengstellung in Wettbewerb zu treten. Dies bedeutet, daß ein derartiger Antikörper, falls er mit einer Probe vereinigt wird, die eine Zelle oder ein Fragment mit einer derartigen Determinante enthält, an diese Determinante bindet und einen erfindungsgemäß erhältlichen Antikörper davon abhält, an diese Determinante bzw. an diese Stelle zu binden. Da außerdem das erfindungsgemäße Antigen mehr als eine Determinante aufweisen kann, umfaßt die Erfindung auch monoklonale Antikörper, welche andere Determinanten als die durch den zuvor genannten monoklonalen Antikörper definierte Determinante definieren und die durch im Stand der Technik bekannte sequentielle Immunopräzipitations-Assays identifiziert werden können. Zur Erfindung gehörig sind auch Antikörper, die in Antwort auf die Antigen-bindenden Stellen hergestellt wurden, oder Idiotypen des L20-Antikörpers, da derartige anti-idiotypische Antikörper zur Analyse des Immunansprechens auf Tumorentigene für diagnostische Zwecke und zur Induzieren eines Immunansprechens für therapeutische oder prophylaktische Zwecke eingesetzt werden können (man vgl. Nepom et al., 1984, Proc. Nat'l Acad. Sci. 81: 2664).

Das durch die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper erkannte Antigen weist ein neues Zelloberflächen-Glycoprotein-Antigen auf, das für NSCLC-Zellen und andere Karzinome, einschließlich Brust- und Colonkarzinomen sowie kleinzelligen Lungenkarzinom charakteristisch ist. Das Antigen besitzt ein Molekulargewicht von etwa 110000 Dalton. Die aminoterminal Aminosäuresequenz des neuen Glycoprotein-Antigens ist die folgende:

$$\begin{array}{cccccccccccccccc} 1 & & 5 & & 10 & & 15 & & 20 \\ \text{L-X-V-Q-V-P-E-X-P-V-V-A-L-V-G-T-D-A-X-L} \end{array}$$

Dabei bedeutet X eine Aminosäure, die bis jetzt noch nicht identifiziert worden ist. Die übrigen Buchstaben stellen die üblichen Abkürzungen für Aminosäuren dar. Ein Vergleich dieser Sequenz mit denjenigen, die in der Proteindatenbank (PIR Release 6.0, November 1985) gespeichert sind, zeigt keine signifikante Übereinstimmung mit irgendeiner der anderen bekannten Sequenzen.

Diagnostische Anwendungen

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können als Sonden zum Detektieren diskreter Antigene in menschlichen NSCLC und anderen Humantumoren eingesetzt werden. So kann man die Anwesenheit eines malignen Zustands in Lungengewebe oder anderen Humangeweben bestimmen, indem man das Gewebe auf die Expression oder auf das Fehlen einer derartigen Expression eines Glycoprotein-Antigens mit den Charakteristika des L20-Antigens untersucht. Der Ausdruck „mit den Charakteristika des“ bezeichnet, daß das Antigen mit einem Antikörper reagieren kann, der das L20-Antigen erkennt. Die Expression oder das Fehlen der Expression dieses Antigens kann eine für klinische Zwecke verwertbare Information darstellen, die mit Hilfe von üblichen histopathologischen Techniken nicht erhalten werden kann.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können beispielsweise dazu eingesetzt werden, nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzellen in histologischen und zytologischen Proben zu detektieren. Bringt man beispielsweise die nachstehend beschriebene Technik zum Anfärben mit Immunoperoxidase zur Anwendung, dann zeigen exzidierte Gewebeproben von Adenokarzinomen, epidermoiden und kleinzelligen Karzinomen der Lunge eine intensive positive Verfärbung. Normales Lungen-, Milz-, Brust-, Colon-, Nieren-, Leber-, Hirn-, Herz-, Haut-, Schilddrüsen-, Hoden- und Vaginagewebe sowie normale Lymphozyten waren negativ.

Eine weitere wichtige in vitro diagnostische Anwendungsmöglichkeit für die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper besteht in der Bewertung von Karzinomen, die sich von den NSCLC unterscheiden. Der Antikörper wurde eingesetzt, um das Epitop bei Brust- und Colonkarzinomen und in kleinzelligen Lungenkarzinomen zu detektieren. Normale Proben dieser Gewebe exprimierten die Determinante nicht. Somit ist der monoklonale Antikörper nützlich zum Detektieren einer mit dem Tumor assoziierten antigenischen Determinante bzw. Antigendeterminante in diesen Karzinomen. Der monoklonale Antikörper kann somit ein nützliches diagnostisches Reagens für Brust- und Colonkarzinome und für kleinzellige Lungenkarzinome sein. In alternativer Weise können Immunofluoreszenztechniken zur Anwendung gebracht werden, um Humangewebeproben mit den erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern zu untersuchen. So wurden beispielsweise Objektträger mit Kryostat Schnitten einer gefrorenen, nicht-fixierten Gewebebiopsie oder exzidierten Tumorproben oder zytologischen Ausstrichen an der Luft getrocknet und mit dem monoklonalen Antikörper in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die zytologischen Ausstriche enthielten exfoliative Zellproben. Der Ausdruck „exfoliativ“ bringt zum Ausdruck, daß die Probe isolierte Zellen oder Zellklumpen enthält, die durch Kratzen oder Waschen der Gewebeoberfläche erhalten wurden, wobei diese Zellen einzeln oder als Schuppen oder als Plättchen entfernt wurden. Die exfoliative Zellprobe kann unterschieden werden von exisiertem Gewebe, wie demjenigen, das bei der Biopsie erhalten wurde. Dieses Verfahren findet Anwendung bei der Detektion eines malignen Zustands in exfoliativen Zellproben aus der Lunge, beispielsweise Sputumprobe, aus den Bronchien, dem Gastrointestinaltrakt einschließlich Rachen und Mund, aus einem zervikalen Ausstrich usw.

Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit einem Antikörperpräparat gegen den monoklonalen Antikörper überschichtet. Es handelt sich dabei gewöhnlich um eine Art von Antimausimmunoglobulin, falls der eingesetzte monoklonale Antikörper aus der Verschmelzung von Milzlymphozyten von einer Maus mit einer Myelomlinie von der Maus stammt. Dieses Antimausimmunoglobulin wurde nach bekannten Techniken mit einer Verbindung konjugiert, beispielsweise Rhodamin oder Fluoresceinisothiocyanat, die bei einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Das Färbungsmuster und die Intensitäten innerhalb der Probe wurden dann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops bestimmt und gegebenenfalls photographisch festgehalten. Obige Ausführungen beschreiben primär die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper in Immunofluoreszenztechniken. Die erfindungsgemäßen Antikörper können jedoch auch in den meisten Assays eingesetzt werden, bei denen Antigen-Antikörper-Reaktionen stattfinden. Es kann sich dabei um homogene oder heterogene Assays handeln. In einem homogenen Assay kann die Probe ein Gewebe sein, das lysiert und geklärt ist, um Debris zu entfernen. An der immunologischen Reaktion nehmen gewöhnlich der spezifische Antikörper, ein mit einer Markierung ausgestatteter Analyt und die interessierende Probe teil. Das von der Markierung stammende Signal wirkt direkt oder indirekt modifiziert, sobald der Antikörper an den mit der Markierung ausgestatteten Analyt bindet. Sowohl die immunologische Reaktion als auch die Untersuchung darauf, wie stark diese Reaktion war, werden in einer homogenen Lösung durchgeführt. Zu den

Immunochemischen Markierungen, die Anwendung finden können, zählen freie Radikale, Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, Bakteriophagen, Coenzyme usw.

Bei einem heterogenen Assay werden normalerweise die Probe, der spezifische Antikörper und Mittel zur Produktion eines detektierbaren Signals eingesetzt. Der monoklonale Antikörper ist gewöhnlich in Form eines Überzugs auf einem festen Träger oder einer festen Phase aufgebracht. Die Probe wird dann in flüssiger Phase mit dem Antikörper in der Festphase in Kontakt gebracht. Der Träger für die Festphase wird dann von der flüssigen Phase abgetrennt. Entweder die Festphase oder die flüssige Phase wird auf ein detektierbares Signal untersucht, wobei Mittel zum Erzeugen eines derartigen Signals eingesetzt werden. Das Signal steht mit der Anwesenheit des Analyts in der Probe in Beziehung. Zu den Mitteln zur Erzeugung eines detektierbaren Signals gehören radioaktive Markierungen, fluoreszenzierende Agentien, Enzyme usw. Derartige heterogene Immunoassays sind beispielsweise Radioimmunoassays, Immunofluoreszenzverfahren, Enzyme-linked-Immunoassays und dergleichen.

Eine genauere Beschreibung obiger Immunoassaytechniken findet sich in „Enzyme-Immunoassay“ von Edward T. Maggio, 1980, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. Diesbezüglich wird auch auf die folgenden US-Paten verwiesen: 3690834, 3751932, 3817837, 3850578, 3853987, 3867517, 3901654, 3935074, 3984533, 3996345 und 4098876. Obige Aufzählung ist nicht vollständig.

Therapeutische Anwendungen

Die erfindungsgemäßen Antikörper können auch für in vivo diagnostische Anwendungen eingesetzt werden. So können beispielsweise Antikörper oder Fragmente, die aus den Antikörpern erhalten wurden, z. B. Fab- und F(ab')₂-Fragmente, zum Sichtbarmachen von Tumoren, einschließlich von metastatischen Einlagerungen, bei Patienten mit NSCLC eingesetzt werden, und zwar in ähnlicher Weise, wie dies für maligne Melanome beschrieben ist von Larson et al., 1983, J. Nucl. Med. 24: 123 und von Larson et al., 1983, J. Clin. Invest., 72: 2101. Der gereinigte Antikörper oder die Fragmente davon werden mit einem Agens markiert, das ein detektierbares Signal liefert. Es kann sich dabei um ein Radioisotop, beispielsweise ¹³¹Jod handeln. Der Antikörper wird dann in einem geeigneten Träger, beispielsweise intravenös, an einen Patienten verabreicht. Die Lokalisation des an den Tumor gebundenen Antikörpers wird durch externe Szintigraphie, Emissionstomographie oder durch Radioisotop-Scannen unter Verwendung beispielsweise einer Gamma-Kamera detektiert.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können auch therapeutisch eingesetzt werden. Die monoklonalen Antikörper können in Verbindung mit einem breiten Spektrum pharmazeutischer oder zytotoxischer Agentien eingesetzt werden. So kann der Antikörper beispielsweise an ein Toxin zur Bildung eines Immunotoxins (Jansen et al. 1982, Immunol. Rev. 62: 185) oder an ein radioaktives Material, z. B. ¹²⁵I, ¹³¹I usw. (Order, 1984, Compr. Ther. 10: 9; Larson et al., 1983, J. Clin. Invest. 72: 2101; Carrasquillo et al., 1984, Cancer Treatment Reports, 68: 317) oder an ein Arzneimittel (Rowland et al., 1985, Cancer Immunol. Immunother. 19: 1) zur Bildung eines Radiopharmakons oder eines Pharmakons gebunden werden. Konjugierte Antikörper können an Patienten verabreicht werden, um die tumorzerstörenden Wirkungen durch die zytotoxische Wirkung des chemotherapeutischen Agens zu unterstützen, welches aufgrund der bindenden Affinität der Antikörpereinheit zu dem Tumor transportiert wird.

Sogenannte „chimere Antikörpermoleküle“ des erfindungsgemäßen Antikörpers können hergestellt werden, die eine Maus-Antigen-bindende Domäne mit menschlichen Konstantregion-Domänen enthalten (Morrison et al., 1984, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851; Takeda et al., 1985, Nature, 314: 452). Man kann so neue Antikörpermoleküle konstruieren, die wünschenswerte Effektorfunktionen besitzen. Sie haben beispielsweise die Fähigkeit, das Humankomplement zu aktivieren oder ADCC zu vermitteln (Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604).

Eine weitere therapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper besteht darin, einen anti-idiotypischen Antikörper unter Verwendung des L20-Antikörpers als Immunogen herzustellen (man vgl. beispielsweise Nepon et al., 1984, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 81: 2864, Lee et al., 1985, Proc. Nat'l Acad. Sci. 82: 6286).

Erfindungsgemäß ist ferner von Interesse, daß die erfindungsgemäßen Antikörper mit anderen Antikörpern für NSCLC oder für andere Tumore kombiniert werden können. Dazu zählen diejenigen, die beschrieben sind in den U.S.-Patentanmeldungen mit den Ser. No. 667521 (eingereicht am 2. November 1984); 684759 (eingereicht am 21. Dezember 1984) und 738612 (eingereicht am 28. Mai 1985). Die Kombination ist wirksam beim Detektieren der oben genannten Typen von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, nämlich undifferenzierten großzelligen Lungenkarzinomen, Adenokarzinomen und epidermoiden Karzinomen.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper definieren auch Determinanten (Determinantenstellen) an einem Antigen, das mit anderen Karzinomen assoziiert ist, wozu Brustkarzinome, Colonkarzinome und kleinzellige Lungenkarzinome zählen (man vgl. die nachstehend aufgeführte Tabelle I). Die erfindungsgemäßen Antikörper können folglich für therapeutische Verfahren und in therapeutischen Produkten eingesetzt werden, die für diese Karzinome bestimmt sind.

Das neue Antigen der vorliegenden Erfindung, das als Antigen L20 bezeichnet ist, kann auch für therapeutische Anwendungen eingesetzt werden. Das Antigen kann von Tumoren gewonnen werden oder durch die rekombinante DNA-Technik hergestellt werden (Brown et al., U.S.-Patentanmeldung mit der Ser. No. 827313, eingereicht am 7. Februar 1986, worauf hiermit Bezug genommen wird). Das für das L20-Antigen kodierende Gen kann nach Verfahren kloniert werden, bei denen zuerst die mRNA des L20-Antigens angereichert wird. Bei einem derartigen Verfahren können Polysome (bestehend aus mRNA, Ribosomen und naszierenden Polypeptidketten) mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie unter Anwendung des Antikörpers, der die L20-Antigen-Determinante auf der naszierenden Kette erkennt, gereinigt werden. Die mRNA wird durch Immunopräzipitation mit beispielsweise L20-Antikörper isoliert und die cDNA wird in einem geeigneten Expressionsvektor kloniert. In alternativer Weise kann der L20-Antikörper oder das Antiserum für das L20-Antigen dafür eingesetzt werden, eine cDNA-Library unter Verwendung eines Expressionsvektors zu screenen. Das gereinigte oder klonierte L20-Antigen kann alleine als Immunogen oder zusammen mit einem geeigneten immunologischen Adjuvans verabreicht werden. In alternativer Weise kann man das Gen, das für das Antigen kodiert, in das Gen für ein Virus, wie das Vaccinia-Virus, insertieren, um ein Rekombinante-DNA-Produkt zu produzieren, das als Immunogen eingesetzt wird (man vgl. Brown et al., U.S.-Patentanmeldung Ser. No. 827313, eingereicht am 7. Februar 1986).

Diagnostische Kits

Erfindungsgemäß sind auch diagnostische Kits zur Durchführung der oben beschriebenen Verfahren umfaßt. Bei einer Ausführungsform umfaßt das diagnostische Kit

- (a) einen wie oben näher beschriebenen monoklonalen Antikörper und
- (b) ein Konjugat eines spezifischen Bindungspartners für den monoklonalen Antikörper und eine Markierung, die ein detektierbares Signal liefern kann.

Zu den Reagentien gehören auch zusätzliche Agentien, wie Puffermittel und proteinstabilisierende Mittel, z. B. Polysaccharide und dergleichen. Das diagnostische Kit bzw. das Diagnosekit kann außerdem, soweit erforderlich, andere Komponenten des das Signal liefernden Systems enthalten, wozu auch Agentien zur Reduktion der Wechselwirkungen mit dem Untergrund, Kontrollreagentien, eine Vorrichtung zur Durchführung eines Tests usw. enthalten. Der Diagnosekit kann ferner ein Konjugat eines erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpers und einer ein detektierbares Signal liefernden Markierung enthalten. Auch in diesem Fall können die oben genannten zusätzlichen Agentien vorhanden sein.

Beispiele

Herstellung der monoklonalen Antikörper

Die monoklonalen Antikörper stellt man nach der Hybridomfusionstechnik her, die zuvor beschrieben wurde von Yeh et al., 1979, Int. J. Cancer 29: 295. Eine drei Monate alte Balb/c-Maus wurde unter Verwendung verpflanzter kultivierter Zellen aus einem menschlichen Adenokarzinom der Lunge, bezeichnet mit 3082, als Immunogen immunisiert. Die Maus erhielt vier intraperitoneale Injektionen von etwa 10^7 Zellen. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde die Milz der Maus entfernt, im Kulturmedium suspendiert und mit NS 1-Mäuse myelomzellen (Kohler und Milstein, s. oben) verschmolzen. Die Mischung wurde beimpft, um Kulturen mit niedriger Dichte zu bilden, die aus einzelnen verschmolzenen Zellen (Klonen) stammen. Die Überstände von den Hybridzellen wurden auf die direkte Bindungsaktivität an Lungenkrebszelllinien gescreent unter Verwendung von sowohl einem ELISA-Assay als auch einem autoradiographischen indirekten 125 I-markierten Protein A-Assay (Brown et al., 1979, J. Immunol. Meth., 31: 201).

Die Extrakte der Zellmembranen von dem Tumor, der zur Immunisierung eingesetzt wurde, wurden hergestellt unter Verwendung eines modifizierten Verfahrens nach Colcher et al., 1981, Cancer Res. 42: 1451; Yeh et al., s. oben. Die Gewebe wurden mit PBS gewaschen und die Zellen von intakten Tumoren wurden suspendiert durch Pressen durch ein rostfreies Stahlsieb. Danach wurde 1 mM NaHCO_3 mit einem Gehalt von 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Calbiochem-Behring Corp., San Diego, CA) hinzugegeben. Das Material wurde dann auf Eis durch 50 Schläge mit dem B-Stößel einer Dounce-Homogenisiervorrichtung homogenisiert. Nach 15minütigem Zentrifugieren bei 27 000 g wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, 1 min beschallt und bei -70°C gelagert.

Hybridome, die Antikörper produzierten, die an die Zellmembranextrakte binden, wurden kloniert, in vitro expandiert und weiterhin auf ihre Antikörperspezifität getestet. Diese Hybridome, die Antikörper mit einer deutlichen Spezifität für Humanlungenkrebs produzierten, wurden rekloniert, expandiert und in Pristan-primierte 3 Monate alte BALB/c-Mäuse injiziert, wo sie als Aszitestumore wuchsen.

Nach dieser Arbeitsweise wurde die Hybridomzelllinie L20 erhalten, kloniert und in Mäuse injiziert, um einen Aszitestumor zu entwickeln. Der in die Aszites sekretierte Antikörper wurde an Protein A-Sepharose (Eyre et al., 1978, Immunochemistry, 15: 429) oder durch Gelfiltration in Sephacryl S-300 gereinigt. Der gereinigte Antikörper wurde für die weitere Charakterisierung eingesetzt.

Charakterisierung des L20-monoklonalen Antikörpers

Die subzelluläre Lokalisation des Antigens wurde durch Messen der Antikörperbindung an Zellen vor oder nach der Permeabilisierung mit einem nicht-ionischen Detergens bestimmt. Antikörper, die an die Zelloberfläche intakter kultivierter Zellen binden, wurden entweder durch direkte Bindungsassays mit 125 I-markiertem Antikörper (Brown et al., 1981, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 78: 639) oder mit Hilfe der indirekten Fluoreszenz unter Anwendung des fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (FACS) II (cell sorter [FACS] II) identifiziert. Antikörper, die an intrazelluläre Stellen binden, wurden durch direkte Bindung des 125 I-markierten Antikörpers an Zellen nach Fixierung mit Paraformaldehyd und anschließende Permeabilisierung mit dem nicht-ionischen Detergens NP-40 bestimmt.

Für die durchgeführten Bindungsassays unter Anwendung radiomarkierter Antikörper (Brown et al., s. oben) wurden kultivierte Zellen (10^6) auf Eis 30 min mit 10^6 cpm von 125 I-markiertem Antikörper in 100 μl bindenden Puffer inkubiert. Die Suspension wurde auf 0,2 ml Dinonylphthalat: Dibutylphthalat (1:1 V/V) geschichtet und zentrifugiert. Das Pellet und die wäßrige Phase wurden ausgezählt (125 I). Zur Untersuchung der nicht-spezifischen Bindung wurden parallele Inkubationen mit nicht-markiertem Antikörper als Kompetitor durchgeführt (man vgl. Brown et al., s. oben).

Tabelle I

Bindung des mit radioaktivem Jod markierten L20-Antikörpers an kultivierte Zellen

Zellen	spezifische Bindung
Calu-1 Lungenadenokarzinom	45 400
H3082 Lungenadenokarzinom	50 100
H2981 Lungenadenokarzinom	64 100
H2984 Lungenadenokarzinom	119 300
MCF7 Brustkarzinom	78 800
3017 Melanom	2 200
Normale T-Zellen	200
Jurkat T-Leukämie	200
Daudi B-Lymphom	200

Isotyp Bestimmung des L-20 Antikörpers

Zur Bestimmung der Klasse der durch die L-20-Hybridomzelllinie produzierten Immunglobuline wurden die folgenden Techniken eingesetzt:

(a) Ouchterlony-Immunodiffusion

Ein Aliquot des Überstandes bestimmter Hybridomzellen wurde in die zentrale Vertiefung einer 25% Agarplatte gegeben. Monospezifische Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Isotypen-Antikörper (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) wurden in die Außenvertiefungen gegeben und die Platte wurde 2 h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C inkubiert.

(b) Isotypisierung mit ELISA

Dynatech Immulon-Platten mit 96 Vertiefungen (Dynatech Immulon 96-well plates) wurden beschichtet mit jeweils Antiserum in einer Konzentration von 1 µg/ml, 50 µl/Vertiefung in PBS und über Nacht bei 4°C stehengelassen. Die Platten wurden mit PBS/Tween 20, 0,05% gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur blockiert mit Medium 100 µl/Vertiefung.

Nach Waschen der Platten wurden die Überstände von dem L-20-Hybridom hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden Rinderserumalbumin-(BSA)-Platten 2 h bei 37°C mit monospezifischen Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Isotyp-Antikörpern inkubiert, die an Peroxidase (Zymed) gekuppelt waren. Nach Waschen wurden die Platten mit 1 mg/ml o-Phenylendiamin und 0,03% H₂O₂ in 0,1 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die optische Dichte bei 630 nm wurde mit einer Dynatech-ELISA-Plattenlesevorrichtung bestimmt.

Der monoklonale Antikörper L-20 ist vom IgG₁-Isotyp.

Antigenerkennung durch den L-20 Antikörper

Um Proteinantigene zu identifizieren wurden Lungenkarzinomzellen an der Oberfläche mit radioaktivem Jod oder metabolisch mit ³⁵S-Methionin markiert. Die Antigene wurden aus Zellen durch Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper, Addition von Anti-Maus-IgG von der Ziege und Adsorption an *Staphylococcus aureus* isoliert. Die Immunpräzipitate wurden gewaschen und einer präparativen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) an einem 10–20% Acrylamidgel unterworfen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue (0,5 Gew.-% zu 10% Essigsäure und 30% Isopropanol) angefärbt und in einer Lösung von Essigsäure (5%, V:V) und Methanol (17%, V:V) entfärbt. Das angefärbte L-20-Antigenband wurde mit einer Rasierklinge herausgeschnitten und unverzüglich einer Elektroelution mit einem ECU-040-Elektroeluator/Konzentrator (ECU 040 Electroelutor/Concentrator; C.B.S. Scientific Co., San Diego, CA) unterworfen, wobei nach dem Verfahren vorgegangen wurde, die beschrieben sind von Hungapiller et al., 1983, *Methods in Enzymol.* 91: 227–236.

Ein automatisierter Edman-Abbau (automated Edman degradation) wurde mit etwa 23 pmol des L-20-Antigens (auf Basis der Ausbeute des identifizierten L-1) in einer Gasphasen-Sequentierungsvorrichtung (gcs-phase sequencer; Model 470A, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) durchgeführt. Die Phenylthiohydantoinamino-säurederivate wurden durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung einer Model 120A on-line HPLC-Einheit (Applied Biosystems, Inc.) mit einer PTH-C18-Säule (2,1 × 220 mm, Applied Biosystems, Inc.) und einem Natriumacetat/Tetrahydrofuran/Acetonitril-Gradienten für die Elution durchgeführt.

Die aminoterminal Aminosäuresequenz ist die folgende:

1 5 10 15 20
L-X-V-Q-V-P-E-X-P-V-A-L-V-G-T-D-A-X-L

worin X eine Aminosäure bedeutet, die bis jetzt noch nicht identifiziert wurde.

Ein Vergleich dieser Sequenz mit denjenigen, die in der derzeitigen Proteindatenbank (PIR Release 6.0; November 1985) gespeichert sind, ergab keine signifikante Ähnlichkeit hinsichtlich der Sequenz mit irgendeiner anderen Sequenz.

Das durch den L-20-Antikörper erkannte Antigen ist ein Glycoproteinantigen mit einem Molekulargewicht von etwa 110000 Dalton.

Nachstehend ist die in vitro immunohistologische Anwendung beschrieben.

Die einen nicht-markierten Antikörper verwendende Technik von Sternberger (1979 in *Immunochemistry*, John Wiley & Sons, New York, S. 104–169, modifiziert durch Garrigues et al., 1982, *Int. J. Cancer* 29: 511) wurde für die immunohistologischen Untersuchungen an gefrorenen Schnitten eingesetzt. Die Target-Gewebe für diese Tests wurden durch chirurgische Eingriffe erhalten und innerhalb von 4 h nach der Entnahme in Isopentan, das in flüssigem Stickstoff vorgekühlt ist, eingefroren. Die Gewebe wurden dann in flüssigem Stickstoff oder bei mindestens 70°C bis zur Verwendung gelagert. Kaninchen-Anti-Maus IgG (rabbit anti-mouse IgG; Sternberger-Meyer Immunochemicals, Inc., Jarrettsville, MD) wurde in einer Verdünnung von 1/50 eingesetzt. Nac.oxidase-Antiperoxidase-Komplexe (PAP, Sternberger-Meyer Immunochemicals, Inc.) mit einem Gehalt von 2 mg/ml an spezifisch gereinigtem PAP wurde in einer Verdünnung von 1/80 zur Anwendung gebracht. Es wurden gefrorene Schnitte hergestellt, getrocknet, mit Aceton behandelt und getrocknet (Garrigues et al., s. oben). Die für die histologische Bewertung verwendeten Schnitte wurden mit Hematoxylin angefärbt. Um den nicht-spezifischen Untergrund „zu vermindern“, wurden die Schnitte mit 1/5 verdünntem normalem Humanserum präinkubiert (Garrigues et al., s. oben). Antikörper von der Maus, Anti-Maus-IgG von der Ziege und PAP von der Maus wurden in einer Lösung von 10% normalem Humanserum und 3% Kaninchenserum verdünnt.

Zum Anfärben wurden Serienschnitte entweder mit spezifischem Antikörper oder Kontrollantikörper 2,5 h behandelt, 30 min mit Kaninchen-Anti-Maus-IgG (verdünnt 1/50) inkubiert und 30 min einem Maus-PAP-Komplex (verdünnt 1/80) ausgesetzt.

Nach jeder Behandlung mit dem Antikörper wurden die Objektträger zweimal in PBS gewaschen. Die immunohistochemische Reaktion wurde entwickelt mit frisch hergestelltem 0,5%igem 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (Sigma, St. Louis, MO) und 0,01% H₂O₂ in 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6, während 8 min. Die Anfärbung konnte intensiviert werden, indem man die Schnitte 20 min einer 1%igen OsO₄-Lösung in destilliertem Wasser aussetzte. Die Schnitte wurden mit Wasser gespült, in Alkohol vom Wasser befreit, in Xylol geklärt und auf Objektträgern befestigt.

Die Objektträger wurden jeweils mit Hilfe eines Codes bewertet. Die kodierten Proben wurden durch eine unabhängige Person überprüft. Typische Objektträger wurden fotografiert, wobei die differentielle Interferenz-Kontrast-Optik (Zeiss-Nomarski) eingesetzt wurde. Das Ausmaß der Antikörperanfärbung wurde wie folgt bewertet:

- 0 bedeutet keine Reaktivität;
 + bedeutet wenige schwach positive Zellen;
 ++ bedeutet, daß mindestens $\frac{1}{3}$ der Zellen positiv sind;
 +++ bedeutet, daß die meisten Zellen positiv sind;
 ++++ bedeutet, daß etwa alle Zellen stark positiv sind.
 Da die Unterschiede der Verfärbungen, die mit + und 0 bewertet wurden, wesentlich weniger ausgeprägt sind, als die, die mit + und ++ bewertet wurden, wurde eine mit ++ oder mehr bewertete Anfärbung als positiv angesehen. Sowohl neoplastische als auch Stromazellen wurden in Tumorproben untersucht. Die aufgeführte Anfärbung ist diejenige von Tumorzellen, da die Stromazellen überhaupt nicht oder wesentlich schwächer als die Tumorzellen gefärbt waren.

Tabelle II
Immunoperoxidase-Anfärbung von Tumoren und normalen Gewebeproben mit L20-monoklonalem Antikörper

Gewebetyp	Zahl der positiven Proben/ Zahl der getesteten Proben*
Lungenkarzinom:	
Adenokarzinom	18/20
epidermoid	3/3
bronchial	0/1
kleinzellig	4/4
Lungenkarzinom: Zelllinien	3/3
Brustkarzinom	4/7
Colonkarzinom	5/8
Melanom	5/8
renales Karzinom	1/1
Liposarcom	0/1
normale Lunge	schwache Anfärbung von einer der drei getesteten Proben
normale Milz	negativ
normale Brust	negativ
normales Colon	negativ
normale Niere	negativ
normale Leber	negativ
normales Hirn	negativ
normales Herz	negativ
normale Haut	negativ
normale Schilddrüse	negativ
normaler Hoden	negativ
normale Vagina	negativ
normales Lymphozytpellet	negativ

- * Bei allen untersuchten Proben handelte es sich um Gefrierschnitte von Geweben, die durch chirurgischen Eingriff erhalten wurden. Die eingesetzten immunohistologischen Verfahren sind im Text näher beschrieben. Eine mit 2+ bewertete Anfärbung (zeigt an, daß mindestens ein Drittel der Zellen positiv sind) wurde als positiv betrachtet.

Eine hier beschriebene Zelllinie, L20, wurde bei der American Type Tissue Culture Collection, Rockville, Maryland, hinterlegt und hat die ATCC Nr. HB 8913 erhalten. Die hier beschriebene und beanspruchte Erfindung ist hinsichtlich ihres Umfangs nicht auf die hinterlegte Zelllinie beschränkt, da die hinterlegte Ausführungsform nur eine einzelne Illustration eines Aspekts der Erfindung darstellt und jede äquivalente Zelllinie, die einen funktionell äquivalenten monoklonalen Antikörper produziert, erfindungsgemäß umfaßt ist. Insbesondere dienen die hier beschriebenen Ausführungsformen nur zur beispielhaften Erläuterung.