



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 89385 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C12P021/08 A	C12N015/00 B
C12N005/00 B	A61K039/395 B
G01N033/577 B	A61K049/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1989.01.03

(30) *Prioridade:* 1988.01.05 GB 8800078

(43) *Data de publicação do pedido:*

1990.02.08

(45) *Data e BPI da concessão:*

03/93 1993.03.04

(73) *Titular(es):*

FRANZ BUCHEGGER
GRAND-RUE 1605 CHEXBRES CH
RESEARCH CORP. TECHNOLOGIES INC.
6840 EAST BROADWAY BOULEVARD TUCSON
ARIZONA US

(72) *Inventor(es):*

FRANZ BUCHEGGER CH
JEAN-PIERRE MACH CH

(74) *Mandatário(s):*

JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ
RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA
PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS ANTICORPOS

(57) *Resumo:*

10

**DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 89 385

REQUERENTE: FRANZ BUCHEGGER, suíço, residente em Grand-Rue, 1605 Chexbres, Suiça e RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES, INC., com sede em 6840 East Broadway Boulevard Tucson, Arizona 85710, Estados Unidos da América do Norte.

EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS ANTI-CORPOS ".

INVENTORES: Franz Buchegger e Jean-Pierre Mach.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. Reino Unido em 5 de Janeiro de 1988 , sob o nº. 8800078.

1

MEMORIA DESCRIPTIVA

Resumo

O invento refere-se a novos anticorpos monoclonais com elevadas especificidade e afinidade em relação ao antigénio carcinoembrónico humano (CEA), seus derivados, processos para a preparação destes anticorpos e dos seus derivados, linhas celulares do hibridoma que segregam

=====

FRANZ BUCHEGGER e RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES, INC.
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS ANTICORPOS"

os anticorpos e processos para a preparação das referidas linhas celulares.

Os anticorpos monoclonais do invento e os seus derivados são úteis para o diagnóstico e terapia do cancro e para a monitorização seriada dos doentes com cancro, relativamente a doenças recurrentes ou resposta à terapia. Constituem também objecto deste invento os equipamentos ("kits") de teste e as composições farmacêuticas que contêm os referidos anticorpos anti-CEA monoclonais.

O processo de preparação dos referidos anticorpos consiste em se multiplicarem as células de hibridoma que segregam o anticorpo, in vitro ou in vivo, e, se desejado, se converterem os anticorpos resultantes, nos seus derivados.



Novos anticorpos

O invento refere-se a novos anticorpos monoclonais com elevadas especificidade e afinidade em relação ao抗原 carcinoembriónico humano (CEA), seus derivados, processos para a preparação destes anticorpos e dos seus derivados, linhagens celulares do hibridoma que segregam os anticorpos, processos para a preparação das referidas linhagens celulares, a utilização destes anticorpos anti-CEA para o diagnóstico e terapêutica do cancro, estojos contendo os anticorpos monoclonais, e preparações farmacêuticas contendo os referidos anticorpos.

Fundamentos do invento

O desenvolvimento da tecnologia do hibridoma tornou possível produzir linhagens celulares produtoras de anticorpos monoclonais (MAbs) com a especificidade desejada os quais podem ser usados para identificar, isolar e caracterizar moléculas biologicamente importantes.

Os MAbs de que trata o presente invento são dirigidas contra o抗原 carcinoembriónico (CEA). CEA é um complexo de glicoproteínas imunoreactivas com um peso molecular de 180.000 encontrado em adenocarcinomas dos epitélios do aparelho digestivo e do colon fetal derivados da endoderme.

O papel desempenhado pelos ensaios imunitários com CEA para o diagnóstico e monitorização seriada dos doentes com cancro em relação a doença recorrente ou resposta à terapêutica (Mach et al., Imun. Today 2, 239, 1981; Berche et al., Br. Med. J. 285, 1447, 1982) assim como a sua utilização em modelos experimentais de ratos rapados portadores de xenoimplantes de carcinoma de colon humano (Hedin

et al., Int. J. Cancer 30, 547, 1982; Buchegger et al., Int. J. Cancer 33, 643, 1984) foram amplamente avaliados e documentados.

Um dos principais inconvenientes da utilização dos anticorpos anti-CEA com finalidades clínicas tem sido a reactividade-cruzada destes anticorpos com alguns tecidos adultos aparentemente normais.

Estudos prévios revelaram que a maior parte dos antisoros hiperimunes convencionais produzidos contra diferentes formas imunogénicas de CEA apresentam reacção cruzada com muitos tipos diferentes de carcinomas assim como com抗igenos relacionados com CEA encontrados na mucosa normal do colon, no baço, fígado, pulmão, glândulas sudoríperas, leucocitos polimorfonucleares e monocitos de indivíduos aparentemente normais.

A primeira das séries de抗igenos identificadas com reacção cruzada com CEA foi chamada glico-proteína normal (NGP) ou抗igeno de reacção cruzada não-específico (NCA) por Mach and Pusztaszeri (Immunochemistry 9, 1031, 1972) e por von Kleist et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2492, 1972), respectivamente. Aqui será mencionado como NCA₅₅, devido ao facto de ter sido verificado por ambos os grupos de pesquisa, possuir um peso molecular de cerca de 55KD.

Este抗igeno também foi descrito por vários outros grupos de pesquisa com nomes diferentes, incluindo CCEA-2 (Tuberville et al., Immunochemistry 10, 841, 1973), CCA-III (Primus et al., J. Immunol. 118, 55, 1977) e TEX (Kessler et al., Cancer Res. 38, 1041, 1978). Buchegger et al., (Int. J. Cancer 33, 643, 1984) identificou um抗igeno de reacção cruzada de 95 KD (NCA₉₅).



Um outro antigénio relacionado muito intimamente com CEA em termos de reactividade cruzada e de peso molecular (160 KD) foi descrito por Burtin et al., (in: Fishman & Sell, Onco-developmental expressão genética do desenvolvimento oncológico, N.Y. 1976, pp. 609-611) e foi designado como NCA-II. Este antigénio parece ser muito semelhante ao antigénio-2 fecal normal (NFA-2) descrito por Matsuoka et al. (Int. J. Cancer 21, 604, 1978).

O mesmo grupo identificou em fezes de adulto normal uma glicoproteína relacionada com CEA de 20-30 KD chamada NFA-1 (Kuroki et al., Mol. Immunol. 19, 399, 1982). Finalmente, a glicoproteína-1 biliar (BGP-1) é um antigénio com reacção cruzada com CEA presente na bilis normal descrito por Svenberg (Int. J. Cancer 17, 558, 1976).

Estes resultados como um todo demonstram que os antíseros reconhecem epítópos específicos para o CEA isolados assim como epítópos presentes em ambos os antigénios CEA e afins do CEA; sugerem ainda genes intimamente relacionados entre os antigénios CEA e afins do CEA assim como relações do produto precursor entre alguns deles. De acordo com Hammarström et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 1528, 1975) e Hedin et al. (Mol. Immunol. 23, 1053, 1986) os epítópos encontram-se predominantemente localizados nas metades peptídicas de CEA e parecem ser fortemente dependentes da conformação.

A produção de anticorpos anti-CEA monoclonais é apresentada por vários grupos de pesquisa. Accolla et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 563, 1980) referiram que anticorpos obtidos a partir de dois clones de hibridoma reagiam fortemente com CEA mas também fracamente com NGP.

As reacções destes dois anticorpos com CEA não foram inibidas competitivamente um pelo outro indicando que reagiam com determinantes antigenicos diferentes na molécula de CEA. Os anticorpos descritos por Kupchik et al., (Cancer Res. 41, 3306, 1981) e Primus et al. (Cancer Res. 43, 686, 693, 1983) revelaram ter pelo menos um certo grau de reactividade com leucocitos polimorfonucleares (PMNs).

Kuroki et al. (J. Immunol. 30, 2090, 1984) descreveram dois MABs contra CEA os quais, contudo, não reagiram com preparações de CEA purificadas diferentes das usadas para imunização. Estes MABs ainda não foram caracterizados quanto ao grau de reactividade em relação ao tumor versus tecidos normais.

Objectivo do invento

O objectivo do invento é constituído por MABs anti-CEA que possuem uma elevada afinidade em relação a CEA, que revelam uma elevada percentagem de ligação às células de carcinoma transportando CEA, tanto in vitro como in vivo, e que possuem elevadas taxas de ligação entre o tecido tumoral e o tecido normal (T/N).

Descrição do invento

O invento refere-se a um anticorpo mono-clonal específico em relação ao antigeno carcinoembriónico (CEA) humano, e seus derivados, caracterizado pelo facto de reconhecer epítopos de CEA não presentes ou antigeno NCA₅₅ ou NCA₉₅ de reacção cruzada não específicos, na glicoproteína biliar, ou nos granulocitos, e que se liga ao CEA humano com uma afinidade de pelo menos $(1,6 \pm 0,3) \times 10^{10}$ litros/mol.

Em particular, o invento refere-se ao anticorpo monoclonal com a designação MAb CE25, e seus derivados.

Os derivados de um anticorpo monoclonal de acordo com o invento, especialmente de MAb CE25, são, por exemplo, fragmentos, tais como os fragmentos univalentes, Fab ou Fab' e os fragmentos divalentes F(ab')₂ (Fab = ligação ao fragmento antigénio), que retem a sua especificidade em relação aos determinantes antigénicos de CEA, conjugados do anticorpo com enzimas, marcadores fluorescentes, quelatas de metal, substâncias citotóxicas ou citostáticas, avidin, biotin, etc., e anticorpos marcados radioactivamente.

Os enzimas usados para anticorpos conjugados do invento são, por exemplo, peroxidase de rábano bravo, fosfatase alcalina, β -D-galactosidase, glucose oxida se, glucoamilase, carboanidrase, acetilcolinesterose, lisozima, malato deshidrogenase ou glucose-6-fosfato deshidrogenase. Os marcadores fluorescentes conjugados com MAb são fluoresceina, fluorocromo, rodamina, etc.

Nesses conjugados o anticorpo está ligado aos enzimas ou marcadores fluorescentes directamente ou por meio de um grupo de espaçamento ou ligação. Exemplos para quelatores de metal são ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentaacético (DPTA), 1,4,8,11-tetraazatetradecano, ácido 1,4,8,11-tetraazatetradecano-1, 4,8,11-tetraacético, ácido 1-oxa-4,7,12,15-tetraazaheptadecano-4,7,12,15-tetraacético, etc.

Os citostáticos, aplicáveis em ligação com os anticorpos do invento, são, inter alia, substâncias de alquilação, tais como meclorotamina, trietilenofosfarami-

da, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, busulfan, melfalan ou triaziquone, também composto nitrosoureia, tais como carmustine, lomustine, ou semustine. São também usadas antimetabolitos, tais como metotrexato, mercaptopurina, citarabina, fluorouracilo, floxuridina, ou fтораfur.

Um outro grupo de citostáticos inclui vinblastina e vincristina, assim como certos antibióticos, tais como actinomicina-D, daunorubicina (= daunomicina), doxorubicina, mitramicina, estreptonigrina, mitomicina e bleomicina. Outros citostáticos apropriados são, inter alia, procarbacina, hidroxiureia, L-asparaginase, dacarbazina, mitotano, estramustina, ou podofilotoxina.

Outros agentes citostáticos são hormonas e antagonistas das hormonas, tais como corticosteroides, por exemplo prednisona, progestinas, por exemplo, hidroxiprogesterona ou medroprogesterona, estrogénios, por exemplo diethylstilbestrol, antiestrogénios, por exemplo tamoxifen, androgénios, por exemplo testosterona, e inibidores da aromatase, por exemplo aminoglutetimida.

Derivados de um anticorpo monoclonal do invento conjugado com uma substância citostática contem ou a toxina intacta ou o seu derivado de cadeia-A. Toxinas apropriadas para ligação com anticorpo são, entre outras, várias lectinas, tais como ricina ou abrina, ou toxina A da difteria, etc.

Os anticorpos monoclonais marcados radioactivamente contêm por exemplo, iodo radioactivo (^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), yttrium (^{90}Y), tecnetium (^{99m}Tc), etc.

Um anticorpo monoclonal e os seus derivados de acordo com o invento são preparados por processos que são conhecidos per se, caracterizados pelo facto das células do hibridoma tal como são definidas a seguir segregando o anticorpo monoclonal sereno multiplicadas de acordo com métodos conhecidos in vitro ou in vivo. Se desejado, os anticorpos monoclonais resultantes são convertidos nos seus derivados.

A multiplicação in vitro é realizada num meio de cultura apropriado, que são os meios de cultura padrão habituais, por exemplo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ou meio RPMI 1640, cheio facultativamente por um soro de mamífero, por exemplo soro de vitelo fetal, ou elementos vestigiais e suplementos sustentando o crescimento, por exemplo células alimentadoras tais como células do exsudado peritoneal do ratinho normal, células do baço, macrófagos da medula óssea, etc.

A produção in vitro proporciona preparações de anticorpo relativamente puras e permite um aumento proporcional para dar origem a grandes quantidades dos anticorpos desejados. Técnicas para o cultivo de hibridoma em larga escala em condições de cultura de tecido são conhecidas na técnica e incluem cultura em suspensão homogénea, por exemplo, num reactor de elevação de ar ou num reactor com agitação continua, ou cultura de células imobilizadas ou apanhadas em armadilha, por exemplo em fibras ocas, microcápsulas, em micro pérolas de agarose ou em cargas de cerâmica.

Para isolamento dos anticorpos monoclonais, as imunoglobulinas nas porções flutuantes das culturas são primeiramente concentradas por exemplo por precipitação com sulfato de amónio, diálise contra material higroscópico tal como PEG, filtração através de membranas selectivas, etc.

Se necessário e/ou desejado, os anticorpos concentrados são purificados pelos métodos cromatográficos habituais, por exemplo filtração por gel, cromatografia de permuta iônica, cromatografia sobre celulose-DEAE, Proteína A ou cromatografia de imuno-afinidade.

Grandes quantidades dos anticorpos monoclonais desejados podem também ser obtidos multiplicando as células do hibridoma in vivo. Os clones celulares são injetados a mamíferos que sejam histocompatíveis com as células afins, por exemplo, ratinhos sinjeneicos, para causar crescimento dos tumores produtores de anticorpos.

Facultativamente, os animais são preparados com um hidrocarbonato, especialmente óleos minerais tais como pristano (tetrametilpentadecano), antes da injeção. Após uma a três semanas, os anticorpos monoclonais desejados são recuperados dos fluidos do corpo do referido mamífero.

Como um exemplo, as células de hibrido ma derivados dos ratinhos Balb/c são injectadas intraperitonealmente a ratinhos Balb/c pré-tratados facultativamente com um hidrocarboneto tal como pristano, e após uma a duas semanas são recolhidos os fluidos ascíticos destes ratinhos. Os anticorpos monoclonais desejados são isolados a partir dos fluidos corporais por métodos convencionais tal como foram atrás descritos.

Fragmentos de anticorpos monoclonais, por exemplo fragmentos Fab, Fab' ou F(ab')2, que retêm a sua especificidade em relação ao CEA humano, podem ser obtidos a partir de compostos preparados tal como foi atrás descrito por métodos conhecidos per se, por exemplo, por digestão com enzimas tais como a pepsina ou a papaina e/ou clivagem das ligações di-sulfureto por redução química.

Os conjugados de anticorpos monoclonais do invento são preparados por métodos conhecidos nesta técnica, por exemplo, por reacção de um anticorpo monoclonal preparado tal como foi aqui anteriormente descrito com o enzima na presença de um agente de ligação, por exemplo glutaraldeído, periodato, N,N'-o-fenilenodimaleimida, N-(m-maleimidobenzoxi)-succinimida, N-(3-[2'-piridilditio]-propionoxi)-succinimida, N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, etc.

Os conjugados com avidina são preparados de um modo semelhante. Os conjugados com biotina são preparados por exemplo por reacção de anticorpos monoclonais com um éster activado da biotina tal como o N-hidroxisuccinimida éster de biotina. Os conjugados com marcadores fluorescentes são preparados na presença de um agente de ligação, por exemplo os indicados atrás, ou por reacção com um isotiocianato, de preferência fluoresceina-isotiocianato. Os conjugados de anticorpo com quelatos de metal são preparados de um modo análogo.

Os anticorpos monoclonais marcados radioactivamente com iodo (^{123}I , ^{125}I , ^{131}I) são obtidos a partir de anticorpos monoclonais de acordo com o invento por iodinação conhecida per se, por exemplo com iodeto de sódio ou de potássio radioactivo e um agente químico de oxidação, tal como hipoclorito de sódio, clorammina T, etc, ou um agente de oxidação enzimático, tal como lactoperoxidase, glucose oxidase e glucose.

Os anticorpos monoclonais de acordo com o invento são ligados a yttrium (90 Y) por exemplo por queiação com ácido dietileno-triaminopentaacético (DPTA).

Os anticorpos marcados com Technetium-^{99m} são preparados por processo de permuta de ligandos, por exemplo reduzindo pertechnate (TcO_4^-) com solução de estanho, fazendo a quelação do technetium reduzido numa coluna Sephadex e aplicando o anticorpo a esta coluna, ou por meio de técnicas de marcação directas, por exemplo incubando pertechnate, um agente de redução tal como $SnCl_2$, uma solução tampão tal como uma solução de ftalato de sódio-potássio, e o anticorpo.

O invento também se refere à linhagem de células de hibridoma que segregam um anticorpo monoclonal anti-CEA de acordo com o invento, de preferência a linhagem celular do hibridoma com a designação CE 25, a qual foi depositada na "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" ("Colecção Nacional de Culturas de Microorganismos") do Instituto Pasteur, Paris, em 15 de Dezembro, 1987, sob o número de acesso I-719.

As linhagens de células do hibridoma do invento são genéticamente estáveis, segregam anticorpos monoclonais do invento com especificidade constante e podem ser reactivados a partir de culturas congeladas a temperaturas baixas por descongelação e reclonagem.

O invento também se refere a um processo para a preparação dessa linhagem celular de hibridoma, caracterizado pelo facto de ratinhos Balb/c serem imunizados com CEA humano purificado ou com um veiculo antigenico contendo CEA humano purificado, sendo as células produtoras de anticorpo dos ratinhos Balb/c imunizados fundidos com células do mieloma P3-NS2/1Ag4, e sendo as células hibridas obtidas na fusão clonadas, e sendo seleccionadas as células clones segregando os anticorpos desejados.

A imunização com CEA de elevada pureza, preparado pelos métodos que se seguem é preferida. O CEA é extraído das células que transportam CEA, por exemplo metastases de adenocarcinoma colo-rectal, ou do pulmão, ou adenocarcinoma primário do pulmão, por precipitação com ácido perclórico, ou por extração salina.

O último método é vantajoso visto que o CEA resultante ser menos desnaturado. Para o processo de extração salina, o tecido que transporta CEA é homogenizado em tampão com um pH variando entre 7,0-7,6 tal como tampão fosfato, tampão Tris, tampão TAPSO (ácido N -tris(hidroximetil)metilamino N -2-hidroxipropanosulfónico), tampão POPSO (ácido piperazina-N,N'-bis-(2-hidroxipropanossulfónico)), tampão EPPS (ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-3-propansulfónico), etc.

A homogenização é alcançada por métodos conhecidos per se, por exemplo pela utilização de dispositivos mecânicos, por exemplo um batedor, misturador ou ultraturrax, por ondas de ultra-som, pela adição de compostos tensio-activos tais como Tween, Triton ou Tergitol, etc.

O CEA extraído é purificado por meio de métodos de cromatografia convencionais tais como cromatografia de permuta iônica, filtração por gel, cromatografia de afinidade, etc, e/ou por aplicação a um imunoadsorvente consistindo numa combinação de anticorpos anti-CEA conhecidos conjugados com uma matriz tal como sefarose ou agarose, facultativamente activados, por exemplo com brometo de ciano-génio, cloroformato de nitrofenilo, hidrazida poliacrilamida ou outros.

Especialmente preferido é um processo para a preparação das linhagens celulares de hibridoma do in vento e seus derivados, caracterizado pelo facto de ratinhos Balb/c serem imunizados injectando intraperitonealmente 15 µg de CEA purificado extraído por solução salina, sendo administrada intraperitonealmente após 4 meses uma série de in jecções intensificadoras (de reforço) com 15, 50 e 150 µg de CEA purificado extraído com solução salina, sendo células de baço retiradas de animais imunizados 3 dias após a última infecção e fundidas com células de mieloma P3-NS2/1Ag4 na presença de um promotor de fusão.

Os promotores de fusão considerados são por exemplo virus Sendai ou outros paramixovirus, facultativamente sob a forma inactivada-UV, iões de cálcio, lipídios tensio-activos tais como lisolecitina, ou polietileno glicol.

A fusão celular é realizada de acordo com métodos descritos préviamente (Köhler & Milstein, Nature 256, 495, 1975). De preferência, as células de mieloma são fundidas com um excesso de três a vinte vezes superior de células do baço retiradas de mamíferos imunizados numa solução contendo cerca de 30% a cerca de 60% de polietileno glicol, com um peso molecular variando entre 1.000 e 4.000.

Após a fusão, as células são suspensas de novo e expandidas, num meio de cultura apropriado tal como foi aqui anteriormente descrito, suplementada com um meio selectivo, por exemplo meio HAT, com intervalo de tempo regulares a fim de evitar que as células de mieloma normais ultrapassem em número as células do hibridoma.

Os produtos flutuantes da cultura de células de hibridoma são testadas em relação ao anticorpo monoclonal contra CEA com um imunoensaio, de preferência com um imunoensaio enzimático ou um imunoensaio com rádio. As linhagens de células de hibridoma que segregam MAbs anti-CEA monoclonais tal como foi anteriormente descrito, por exemplo a linhagem de células CE25 que segregam MAb CE25, são clonadas, por exemplo limitando a diluição em agar mole, de preferência duas vezes ou mais.

Facultativamente, as células de hibridoma são feitas passar através de animais, por exemplo ratinhos, por injecção intraperitoneal e colheita da ascite, o que estabiliza as hibridomas e melhora as características de crescimento. As linhagens de células clonadas podem ser congeladas de um modo convencional.

Os anticorpos monoclonais e os seus derivados de acordo com o invento são úteis no diagnóstico do cancro.

Um exemplo de utilização diagnóstica é constituído pela determinação qualitativa e quantitativa do抗原 carcinoembriónico humano, especialmente em fluidos biológicos. O anticorpo monoclonal do invento e seus derivados podem ser usados em qualquer um dos imunoensaios conhecidos per se que utilizam as interacções de ligação entre o抗原 e o anticorpo monoclonal, tais como os radioimunoensaios (RIA), imunoensaios ligados ao enzima, testes de imunofluorescência, aglutinação do latex ou hemaglutinação.

Os anticorpos monoclonais de acordo com o invento podem ser usados como tal ou sob a forma de derivados marcados radioactivamente num radioimunoensaio (RIA). Pode ser usada qualquer uma das modificações conhecidas de RIA em fase homogénea, RIA de fase sólida ou RIA heterogénia, RIA simples ou RIA duplo (sandwich) com determinação directa ou indirecta (competitiva) de CEA.

É preferido um RIA em sandwich em que um veiculo apropriado, por exemplo a superficie plástica de uma placa de microtitulação ou de um tubo de ensaio, por exemplo de poliestireno, cloreto de polipropileno ou de pilivinilo, vidro ou pérolas de plástico, papel de filtro, ou dextrano, folhas de acetato de celulose ou de nitrocelulose, etc, é revestido com um anticorpo monoclonal contra o CEA por simples adsorção ou facultativamente após activação do veiculo, por exemplo com glutaraldeído ou brometo de cianogénio, e incubado com a solução do teste e uma solução de um anticorpo monoclonal marcado radioactivamente com ^{125}I , o anticorpo monoclonal dissolvido reconhecendo um outro epítopo de CEA para além diferente do anticorpo monoclonal ligado ao veiculo, e a quantidade de CEA é determinada medindo a radioactividade ligada ao veiculo. Um dos anticorpos utilizados no RIA em sandwich é um anticorpo anti-CEA monoclonal do invento.

Particularmente preferido é um radioimunoensaio em sandwich tal como foi aqui anteriormente descrito, em que um anticorpo monoclonal do invento é ligado a uma pérola, por exemplo uma pérola de polistireno, sendo esta pérola revestida incubada numa solução do teste ou padronizada contendo CEA e é finalmente desenvolvido com um anticorpo monoclonal marcado com rádio que reconhece um epítopo diferente.

Os anticorpos monoclonais de acordo com o invento podem ser usados como tal ou sob a forma de derivados formados por conjugados com enzima num imunoensaio com enzima. Esses imunoensaios incluem processos de teste em que são usados os derivados de anticorpos monoclonais marcados com enzima de acordo com o invento ou anticorpos marcados com enzima conhecidas per se que reconhecem e se ligam com um epítopo dos anticorpos do invento.

É preferido um ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima) em que um veículo tal como foi descrito anteriormente para RIA é revestido com um anticorpo monoclonal de acordo com o invento, incubado com uma solução do teste contendo CEA e depois com um soro polyclonal em relação ao CEA, por exemplo soro de carneiro, e, finalmente, os anticorpos ligados do soro polyclonal são desenvolvidos por anticorpos marcados com enzima que os reconhecem e que se ligam com eles, e a quantidade da proteína ligada é determinada por uma reacção do substrato enzimático. Esse anticorpo marcado com enzima é, por exemplo, uma imunoglobulina de cabra contra carneiro marcada com fosfatase.

Também se prefere um ELISA em que um veículo revestido com um anticorpo monoclonal de acordo com o invento é incubado com uma solução do teste e com uma solução de um anticorpo monoclonal que é conjugado com um enzima, com o anticorpo monoclonal dissolvido reconhecendo um epítopo diferente de CEA em relação ao que é reconhecido pelo anticorpo monoclonal ligado ao veículo.



Por meio de uma reacção do substrato enzimático que resulta, por exemplo, numa alteração da cor que pode ser observada a olho nú ou por meio de dispositivos de medição óptica, é medida a quantidade de enzima ligado, a qual é proporcional à quantidade de CEA na solução do teste.

Também se prefere um ELISA em que é usado um anticorpo monoclonal marcado com enzima do invento e o veiculo é revestido com um anticorpo monoclonal anti-CEA que reconhece um epítopo diferente daquele que o anticorpo monoclonal reconhece de acordo com o invento.

Particularmente preferido é um imunoensaio enzimático chamado análise immunodot, em que as soluções do teste ou padrão contendo CEA são localizadas num veiculo microporoso com uma elevada afinidade intrínseca em relação aos polipeptideos, por exemplo em nitrocelulose, sendo o veiculo que tem uma ou várias partes com as referidas amostras incubado numa solução de um anticorpo monoclonal do invento, em seguida numa solução de um segundo anticorpo marcado com enzima que reconhece e se liga com o anticorpo monoclonal do invento e finalmente uma solução de um substrato enzimático que leva a um sinal detectável, por exemplo uma substância corada.

Esse segundo anticorpo marcado com enzima é por exemplo imunoglobulina de coelho anti-ratinho conjugada com peroxidase de rábano bravo que pode ser desenvolvido com substratos enzimáticos apropriados tais como 4-cloro-1-naftol, etc.

Os anticorpos monoclonais de acordo com o invento podem ser usados como tal sob a forma de derivados de acordo com o invento conjugados com marcadores fluorescentes em testes de imunofluorescência.

Esse testes de imunofluorescência incluem processos em que são usados os derivados do anticorpo monoclonal de acordo com o invento, por exemplo derivados conjugados com fluoresceina, ou anticorpos marcados com marcadores fluorescentes conhecidos per se que reconhecem e se ligam com um epítopo do anticorpo monoclonal do invento.

É preferido um teste de imunofluorescência em que um veículo tal como foi atrás descrito para RIA é revestido de acordo com métodos padrão (normalizado) com células a serem testadas quanto à presença de CEA, sendo as células fixadas e permeabilizadas para permitir a interacção do material proteináceo no interior da célula com soluções aplicadas, sendo incubado com uma solução de um derivado de anticorpo monoclonal conjugado com um marcador fluorescente ou incubado com uma solução de um anticorpo monoclonal do invento seguindo-se uma solução de um segundo anticorpo marcado com um marcador fluorescente que reconhece e se liga ao anticorpo monoclonal do invento, por exemplo uma imunoglobulina de coelho anti ratinhos marcada com fluoresceina. A presença de CEA é então detectada e localizada por microscopia de fluorescência padrão ou por citometria de fluxo.

A utilização de acordo com o invento de anticorpos monoclonais e seus derivados tal como foi aqui anteriormente descrito para a determinação qualitativa e quantitativa do CEA humano inclui também outros imunoensaios conhecidos per se, por exemplo aglutinação de latex com partículas de latex revestidos com anticorpo ou revestida com antigénio ou hemaglutinação com glóbulos vermelhos sanguíneos revestidos com anticorpo ou revestidos com antigénio, etc.

O invento relaciona-se também com estojos para teste para a determinação qualitativa e quantitativa dos anticorpos monoclonais contendo CEA do invento e/ou seus derivados e, facultativamente, outros anticorpos monoclonais ou policlonais e/ou adjuntos.

Os estojos do teste de acordo com o invento para um radioimunoensaio contém, por exemplo, um veiculo apropriado, não revestido ou revestido com um anticorpo monoclonal do invento, facultativamente congelado pelo frio ou soluções concentradas de um anticorpo monoclonal ou policlonal em relação ao CEA e/ou um seu derivado marcado com radio, solução de CEA padrão (normalizadas), soluções tampão e, facultativamente, polipeptideos e detergentes para evitar adsorção não específica e formação de agregados, pipetas, recipientes de reacção, curvas de calibração, manuais de instrução, etc.

Os estojos do teste de acordo com o invento para um imunoensaio enzimático, contém, por exemplo, um veiculo apropriado, por exemplo placas de monotitulação ou folhas de nitrocelulose, facultativamente soluções secas por congelação ou concentradas de um anticorpo monoclonal do invento e de um anticorpo monoclonal ou policlonal marcado por enzima em relação ao CEA ou em relação a um primeiro anticorpo reconhecendo CEA, substratos enzimáticos sob uma forma sólida ou dissolvida, soluções de CEA padrões, soluções de tampão e, facultativamente, polipeptideos e detergentes, pipetas, recipientes de reacção, curvas de calibração, quadros de escala de cores, manuais de instrução, etc.

Os estojos de teste de acordo com o invento para um teste de imunofluorescência contem, por exemplo, um veiculo apropriado por exemplo, coberturas de plástico ou lâminas de vidro facultativamente secas por congela-

ção ou soluções concentradas de um anticorpo monoclonal do invento e de um anticorpo policlonal marcado com fluoresceína reconhecendo o anticorpo monoclonal, soluções de tampão e, facultativamente, soluções de CEA padrão, polipeptideos e detergentes, pipetas, recipientes de reacção, manuais de instrução, etc.

Além disso, o anticorpo monoclonal do invento e seus derivados **são usados** para localização e forma ção de imagem in vivo de tumores. Para a formação de imagem in vivo, o anticorpo monoclonal do invento é marcado com radio ou conjugado com um quelato de metal formando um complexo com um nucleo de radio, por exemplo iodo, technetium, rhenium, etc, e as técnicas de exploração por rádio são usadas para detectar tumores primários e metastáticos.

Com esta finalidade, o anticorpo radio activo é injectado, por exemplo, intravenosamente e o doente é explorado com um formador de imagens gama com intervalos regulares. Os tumores expressando CEA fixarão mais anticorpos radioactivos do que os outros tecidos e serão claramente reconhecidos pela câmara de imagens gama. De preferência os anticorpos monoclonais marcados com ^{131}I ou ^{123}I são usados para a exploração com rádio em quantidades de 3 a 50 μg representando 15 a 30 μCI por kg de peso corporal.

Para a actividade biocida no tratamento do cancro, os anticorpos do invento são usados como derivados conjugados com substâncias citostáticas ou citotóxicas tal como foi aqui anteriormente descrito, por exemplo ricina A, como derivados marcados com rádio, ou ainda administrados em liposomas contendo reagentes biocidas. A dose terapêutica para mamíferos varia entre aproximadamente 1 mg e 5 mg por kg de peso corporal para os próprios anticorpos monoclonais, e entre 0,1 mg e 5 mg por kg do peso corporal para con-

jugados com drogas citotóxicas, dependendo do estado do doente e do modo de aplicação.

O invento também se relaciona com preparações farmacêuticas contendo o anticorpo monoclonal do invento e/ou seus derivados com uma especificidade elevada em relação ao CEA como foi aqui anteriormente indicado. As preparações farmacêuticas contêm, por exemplo, o anticorpo monoclonal do invento ou seus derivados numa quantidade eficaz juntamente ou em mistura com veículos inorgânicos ou orgânicos, sólidos ou líquidos, farmaceuticamente aceitáveis.

São preferidas preparações farmacêuticas para aplicação parentérica. As preparações para aplicação intramuscular, subcutânea ou intravenosa são, por exemplo, soluções ou suspensões aquosas isotônicas, facultativamente preparadas pouco antes da sua utilização a partir de preparações liofilizadas ou concentradas.

As preparações farmacêuticas podem ser esterilizadas e conter adjuvantes por exemplo para conservação, estabilização, humidificação, emulsificação ou solubilização dos ingredientes, sais para a regulação da pressão osmótica, tampão e/ou compostos que regulem a viscosidade, por exemplo carboxicelulose de sódio, dextrano, polivinilpirrolidona ou gelatina.

São preparadas por métodos conhecidos nesta técnica, por exemplo por mistura, dissolução ou liofilização convencionais; e contêm aproximadamente 0,01% a aproximadamente 50% dos ingredientes activos. As preparações para injecções são processadas, introduzidas em ampolas ou frascos, e seladas em condições assépticas de acordo com todos conhecidos nesta técnica.

Os exemplos que se seguem ilustram o invento mas não o limitam de qualquer modo.

Abreviaturas

BSA	albumina do soro bovino
FCS	soro de niteto fetal
ELISA	ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
meio HAT	meio hipoxantina/aminopterina/timidina
NCA	antigénio de reacção cruzada não específico
PBS	solução salina tamponada com fosfato

Exemplo 1: Preparação da linhagem celular CE25 do hibridoma

1.1 Purificação do antigénio carcinoembriónico (CEA)

São extraídas com solução salina metátese do figado do carcinoma do colon (nas 6 horas após a morte). 1 volume de tecido é primeiro homogenizado em 3 volumes de tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 a 4°C durante 10 minutos, num Sorrall Omnimixer a 8.000 rpm.

O homogenato crú é então centrifugado a 8.000 g durante 15 minutos a 4°C. O produto flutuante transparente é aplicado a um imunoabsorvente consistindo numa reunião dos anticorpos monoclonais MAb 35 e MAb 115 anti CEA conhecidos Haskell et al., Cancer Res. 43, 3857, 1983; Buchegger et al., J. Exp. Med. 158, 413, 1983) e MAb 73 (Buchegger et al., Immunol. Letters 5, 85, 1982) ligados

com Sepharose activada com CnBr. O CEA é submetido a eluição com tiocianato de amónio 2M. Após uma cromatografia final com Sepharose 6B obtem-se CEA com uma pureza de 90%.

1.2 Imunização de ratinhos Balb/c

Ratinhos Balb/c com dois meses de idade são imunizados com CEA por injecção intraperitoneal de 15 µg de CEA purificado extraído com solução salina com adjuvante de Freund completo. Após 4 meses, é administrada uma série de injecções intensificadoras compreendendo 15, 50 e 150 µg da mesma preparação salina de CEA sem adjuvante de Freund administradas intraperitonealmente 5, 4 e 3 dias antes da fusão, respectivamente.

1.3. Fusão celular

A fusão celular é realizada usando $1,5 \times 10^8$ células do baço de ratinhos imunizado e $1,5 \times 10^7$ células de mieloma P3-NS2/1Ag4 de ratinho de acordo com métodos convencionais descritos previamente (Koehler & Milstein, Nature 256, 495, 1975). Após lavagem, as células são de novo suspensas em 48 ml de meio essencial mínimo de Dulbecco padrão Gibco No. 0422501). 3×10^6 células normais de ratinho do exsudado peritoneal são adicionadas com células alimentadoras.

As células são distribuídas por recipientes Costar 96 x 0,5 ml e alimentadas 3 vezes por semana com meio padrão de selecção HAT durante 3-6 semanas. Quando o crescimento das células de hibridoma se torna visível, os produtos flutuantes são testados tal como foi descrito no Exemplo 1.4. Os hibridomas positivos são reclonados e armazenados.

1.4 Ensaio de detecção do anticorpo

Fluidos de cultura dos hibridomas em crescimento são testados quanto à presença de anticorpo anti-CEA por meio de uma modificação do ensaio de Farr (J. Infect. Dis. 103, 239, 1958) tal como foi previamente descrito Accolla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 563, 1980). Diluições 1:10 (v/v) dos produtos flutuantes da cultura de células são incubadas em duplicado com CEA marcado com ^{125}I em tampão HCl-Tris 0,02M, pH 7,4. A ligação do CEA aos anticorpos é precipitada a 4°C adicionando solução de sulfato de amónio saturada, fria, na presença de soro humano normal.

As linhagens de células de hibridoma segregando anticorpos anti-CEA que reconhecem epítopos de CEA não presentes ou antigênio NCA₅₅ ou NCA₉₅ de reacção cruzada não específico, em glicoproteína biliar ou em granulocitos, e ligados a CEA humano com uma afinidade de pelo menos $(1,6 \pm 0,3) \times 10^{10}$ litros/mol, por exemplo linhagem celular CE25 segregando MAb CE25, são seleccionadas para outros estudos.

1.5 Armazenamento e processamento do hibridoma

As células de hibridoma seleccionadas podem ser feitas crescer em cultura, congeladas a -80°C ou em azoto líquido sendo então reactivadas. As células são clonadas pelo método de limitação de diluição e são expandidas formando ascite em ratinhos Balb/c preparada com pristano.

A linhagem celular CE25 foi depositado na "Collection Nationale de Culturas de Microorganismos" ("Colecção Nacional de Microorganismos") do Instituto Pasteur, Paris, em 15 de Dezembro, 1987, sob o numero de acesso I-719.

Exemplo 2: Isolamento e purificação do anticorpo monoclonal MAb CE 25 e preparação de derivados

2.1 Síntese in vivo

Ratinhos Balb/c com 8-10 semanas de idade são pré-tratados intraperitonealmente e com 0,5 ml de pristano (Aldrich). 1-3 semanas mais tarde, $2-5 \times 10^6$ células de hibridoma clonadas são inoculadas intraperitonealmente. Após 8-10 dias o fluido da ascite é recolhido, centrifugado a $800 \times g$ e armazenado a $-20^{\circ}C$ ou a $-80^{\circ}C$.

O fluido da ascite descongelado é centrifugado a $50000 \times g$ durante 60 minutos. É removida cuidadosamente numa camada de gordura flutuando à superfície, e a concentração da proteína é ajustada até uma concentração de 10-12 mg/ml.

A imunoglobulina crua é precipitada por adição gota a gota de 0,9 equivalente por volume de sulfato de amónio saturado a $0^{\circ}C$, sendo então dissolvida em tampão fosfato 0,04 M pH 8 e submetido a diálise utilizando o mesmo tampão. Obtem-se uma fracção de imunoglobulina imunologicamente activa por cromatografia em celulose DEAE-D52 (Whatman) onde MAb CE25 é eluído no volume vazio.

Essas preparações proporcionando entre 5 e 15 mg de anticorpo por ml de ascite podem ser usadas directamente ou podem ser preparados fragmentos de anticorpo para aplicação in vitro e in vivo. (Exemplo 2.3).

2.2 Síntese in vitro

É obtida uma pré-cultura da linhagem celular CE25 cultivando células de hibridoma a uma temperatura fisiológica (à volta de 37°C) em meio RPMI 1640, contendo 10% de FCS até uma densidade celular final de 5×10^5 a 10^6 células por ml. A totalidade da pré-cultura é introduzida em recipientes de cultura Bellco e ajustada até um volume total de 1.500 ml com meio RPMI 1640 recente/10% de FCS.

A cultura é agitada a cerca de 37°C sob CO₂ a 5% a 30 rpm durante dois a três dias, sendo então diluída até um volume total de 3.000 ml com RPMI 1640/10% de FCS e agitada durante mais sete a dez dias. Após este periodo de tempo 95% das células estão mortas. O caldo de cultura é centrifugado a 1.000 x g durante 20 minutos a 4°C.

O produto flutuante é filtrado através de um filtro com um tamanho de poros de 0,2 um em condições de esterilidade. A imunoglobulina crua é precipitada por meio de adição lenta gota a gota de 0,9 equivalente de volume de sulfato de amônio saturado a 0°C. Este precipitado é purificado tal como foi descrito no Exemplo 2.1.

2.3 Preparação do fragmento

Os fragmentos F(ab')2 de MAb CE25 são preparados usando digestão por pepsina (2-4%, p/p) em tampão acetato 0,2M pH 4 durante 22 horas a 37°C (Lamyo & Nisonoff, J. Immunol. Methods 56, 235, 1983). F(ab')2 fragmentos são purificados por cromatografia em Sephadex G150 onde os fragmentos F(ab')2 100 KD são eluidos sob a forma de um único pico e os pequenos produtos de digestão são bem separados.



A IgG1 e F(ab')2 dos ratinhos de controlo são purificados por métodos idênticos a partir de ascite dos ratinhos injectados com células de mieloma P3 x 63 (Koehler & Milstein, Nature 256, 495, 1975). A dextrose do gel poliacrilamida-SDS de acordo com Laemmli (Nature 227, 680, 1970) revela uma pureza superior a 95% das fracções IgG e F(AB')2.

2.4 Marcação com rádio de MAb CE 25 e dos seus fragmentos

MAb CE25 ou fragmentos são marcados com ^{131}I pelo método da cloramina-T a fim de proporcionar actividades específicas de 8-9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de proteína. Não se observou marcação preferencial dos MAbs intactas em comparação com os fragmentos. O iodo ligado à proteína é separado do iodo livre por cromatografia em Sephadex, a qual revela a presença de menos de 1% de ^{131}I ligado a proteínas agregadas. A imunoreactividade é controlada por incubação de CEA ligado a Sepharose activada com CnBr (Pharmacia).

Exemplo 3: Caracterização do anticorpo monoclonal MAb CE25

3.1. Determinação da classe e subclasses de MAb CE25

A classe e subclasses do anticorpo monoclonal MAb CE25 produzido por células de hibridoma clonadas é determinada pela conhecida técnica de Ouchterlony de imuno difusão agar-gel usando classe e subclasses de anticorpos de coelho específicos (Bionetics). Os resultados são confirmados por um imunoensaio enzimático (ELISA) do modo que se segue: Placas de microtitulação são revestidas com 1 μg por recipiente de uma preparação de imunoglobulina de coelho de

uma classe - ou sub-classe - específica de soro (Bionetics) em 50 μ l de PBS. A capacidade de ligação livre da placa é saturada com um tampão de 1% de albumina do soro bovino em PBS contendo 0,2% de NaN_3 (p/v), pH 7,4.

Sondas de 100 μ l contendo anticorpos monoclonais são incubados no recipiente a 37°C durante 1 hora. As placas são lavadas com PBS, sendo então incubadas a 37°C durante 1 hora com uma preparação de imunoglobulina de coelho conjugado com fosfatase com a mesma especificidade que foi usada para revestimento das placas.

O enzima fixado é desenvolvido por incubação (37°C, 30 minutos) com uma solução do substrato enzimático fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/ml em tampão dietanolamina a 10% contendo MgCl_2 0,5 mM e NaN_3 a 0,02% (p/v), pH 9,8) e medindo a densidade óptica a 405 nm. O anticorpo monoclonal MAb CE25 pertence à classe IgG1.

3.2 Reactividade cruzada com antigénios de tecido normal

A linhagem de células de hibridoma CE25 flutuante é testada quanto a reactividade cruzada com granulocitos presentes em cortes congelados de baço, pancreas, pulmão e figado normais; por meio de coloração indirecta com imunoperoxidase. Além disso, a ausência de reacção cruzada com glicoproteína biliar é determinada em cortes de tecido hepático humano normal.

Para coloração do antigénio com MAB anti-CEA usa-se uma técnica com três camadas de biotina-avidina-peroxidase (Guesdon et al., J. Histochem. Cytochem. 27, 1131, 1979). Em resumo, cortes pelo criostato com 10 μ m são fixados durante 10 minutos em acetona à temperatura ambiente lavada em PBS frio contendo Thimerosal 5×10^{-5} M e tratados

com H_2O_2 a 7% para abolir a actividade da peroxidase endógena. Os cortes são então incubados durante 60 minutos com 25 μl de fluido de cultura não diluido a partir da linhagem de células do hibridoma anti-CEA ou a partir da linhagem de células do mieloma P3 x 63Ag8 usadas como controlo.

A segunda incubação, de 15 minutos, faz-se com anticorpo IgG de cavalo anti-ratinho bioestanhado, seguindo-se uma terceira incubação, de 15 minutos, com o conjugado avidina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Todas as incubações são realizadas à temperatura ambiente sendo seguidas por uma lavagem com PBS.

Finalmente, a actividade da peroxidase é revelada adicionando uma solução preparada recentemente contendo 0,4% de 3-amino-9-etil-carbazole e 0,015% de H_2O_2 , e os tecidos são contra-corados com hematoxilina (Schreyer et al., in: Sordat, 4th Int. Workshop sobre animais imunodeficientes em pesquisa experimental, Basel 1984).

Os resultados são resumidos no quadro que se segue:

imunoperoxidase em	coloração resultante
carcinoma do colon	++
pancreas normal (ductos pancreáticos)	-
figado normal (ductos biliares)	-
pulmão normal (células epiteliais)	(+)
granulocitos de baço	-

simbolos: ++ coloração fortemente positiva, (+) coloração ocasional de algumas células epiteliais alveolares, - nenhuma coloração

A especificidade de MAb CE25 é ainda analisada por um radioimunoensaio usando抗énios NCA₅₅ e NCA₉₅ com reacção cruzada não específicos marcada com rádio purificados. O estudo é realizado tal como foi descrito no exemplo 1.4 para o ensaio Farr exceptuando o facto de CEA marcado com ¹²⁵I ser substituído por NCA marcado com ¹²⁵I.

NCA é purificado a partir de extracto com ácido perclórico de pulmão normal por filtração sobre Sephadex G-200 seguindo-se imunoabsorção sobre uma coluna CNBr-Sepharose 4B contendo IgG de um antisoro anti-CEA de cabra com reacção cruzada conhecida com NCA (Heumann et al., in: Lehmann, Carcino-embryonic proteins, Vol. II, Amsterdam 1979).

NCA₉₅ e NCA₅₅ são ainda purificados por colunas de imunoadsorção contendo MAbs cada um destes reconhecendo dois NCA (Buchegger et al., Int. J. Cancer 33, 643, 1984). NCA₉₅ é marcado com ¹²⁵I pelo método com clorammina T, NCA₅₅ é marcado com ¹²⁵I com o reagente de Balton e Hunter (Amersham, Bucks., England).

Os resultados do teste são:

radioimunoensaio em	percentagem de抗igénio marcado com radio precipitado
¹²⁵ I CEA	54
¹²⁵ I NCA ₅₅	0
¹²⁵ I NCA ₉₅	1

Além disso, muda-se a ligação de MAb CE25 marcado com ¹²⁵I a CEA ligado a Sepharose activada com CNBr e as células de tumor de colon Co 112 fixadas com glutaraldeido após incubação durante a noite a 25°C e ligação a leucocitos humanos recentemente preparados, embalados, após incubação durante 4 horas a 4°C.

Os resultados são indicados a seguir:



^{125}I MAb ligando-se a	percentagem do input de MAb marcados com radio
CEA imobilizado em CNBr Sepharose	75
Células Co 112 fixadas	60
Granulocitos recentes	< 1.7

Os resultados atrás referidos indicam que MAb CE 25 é um bom candidato para a localização óptima de tumor juntamente com acumulação mínima, não específica na medula óssea e figado.

3.3 Determinação de constantes de afinidade

A uma quantidade limitada de MAb CE25, são adicionados quantidades crescentes de CEA marcado com ^{125}I em PBS tal como foi descrito por Accolla et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 563, 1980). Após 16 horas, o soro humano normal é adicionado seguindo-se sulfato de amónio saturado frio para precipitar CEA ligado a anticorpos. A radioactividade da amostra total e do precipitado é determinada por contagem de γ .

Para calcular a constante de afinidade curvas de saturação obtidas em equilíbrio são transformados e analisadas pelo método de Scatchard (Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660, 1949).



MAb CE 25 liga-se a CEA humano com uma afinidade de pelo menos $(1,6 \pm 0,3) \times 10^{10}$ litros/mol.

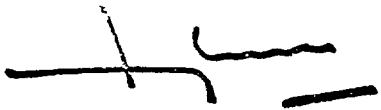
3.4 Determinação do epítopo reconhecido por MAb CE 25

A determinante antigénica (epítopo) de CEA reconhecida por MAb CE 25 é avaliada por meio de uma técnica de inibição cruzada em que MAb CE25 marcado com ^{125}I é testado quanto à sua capacidade de ligação a CEA não marcado seguindo-se incubação com um excesso 1.000 vezes maior de outro MABs anti-CEA, tal como foi descrito anteriormente por Accolla et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 563, 1980) e Haskell et al. (cancer Res. 43, 3857, 1983). Os resultados indicam que MAb CE25 tem uma especificidade única em relação a um epítopo de CEA não reconhecido por qualquer um dos MAb anti-CEA previamente publicados.

Comparado com a especificidade do epítopo de MABs previamente descritos por Buchegger et al. (Int. J. Cancer 33, 643, 1984), o epítopo reconhecido por MAb CE25 está esteticamente em relação íntima com um epítopo reconhecido pelo conhecido MAb 202.

A ligação de MAb CE25 é fortemente iniciada por MAb 202. Os dois epítopos são contudo claramente diferentes, visto que MAb 202 revela uma reacção cruzada forte com granulocitos facto completamente ausente do MAb CE25.

O epítopo reconhecido por MAb CE25 na molécula de CEA ou é repetitivo ou é mais acessível ao anti-corpo monoclonal do que os epítopos reconhecidos por outros MABs anti-CEA. Isto é sugerido por ensaios de ligação em que MAb CE25 (1 ng) marcado com rádio é incubado com células vivas de carcinoma do colon (3×10^6 células).



Neste teste, MAb CE 25 liga-se até 36% enquanto que os MAbs anti-CEA e MAb 73 se ligam a um nível inferior a 16%.

Estes resultados são confirmados por outros ensaios de ligação em que quantidades crescentes de MAb CE25 e o MAb 35 altamente específico e bem caracterizado são incubados ou com CEA purificado ligado a Sepharose activada por CnBr ou a células vivas de carcinoma do colon tal como se descreve a seguir.

Para os ensaios de ligação à Sepharose -CEA, concentrações crescentes de dois anticorpos monoclonais marcados com rádio ($0,15 - 40 \mu\text{g}$) são incubados durante 16 horas a 25°C com $3 \mu\text{g}$ de CEA ligado a Sepharose -CnBr. A ligação não específica é determinada por incubação com Sepharose - CnBr contendo proteína irrelevante e é subtraído. Os resultados demonstram que cerca de 4 vezes mais MAb CE25 se liga à Sepharose - ligada a CEA do que MAb 35.

Resultados muito semelhantes são obtidos num ensaio com células vivas de carcinoma do colon. As células do carcinoma de colon são feitas crescer em 96 placas de cultura de tecido após lavagem, quantidades crescentes de MAbs marcadas com rádio ($2-450 \mu\text{g}$) são então incubadas com as células aderentes durante 4 horas a 37°C num meio de cultura.

A ligação não específica é determinada usando quantidades elevadas de MAb não marcado para inibir a ligação específica e é subtraída. Tal como no ensaio com Sepharose - CEA atrás descrito, obtem-se uma ligação 4 vezes maior de MAb CE 25 às células de carcinoma de colon em comparação com MAb 35.



Assim, a ligação superior de MAb CE25 a células expressando CEA torna o anticorpo um candidato promissor para o diagnóstico e aplicação da terapêutica.

Exemplo 4: Imunocintigrafia em ratinhos rapados

4.1 Modelos de tumor de ratinho rapado

O carcinoma do colon humano T380 (Martin & Halpern, *Cancer Res.* 44, 5475, 1984; Mach et al., *Nature* 248, 704, 1974) transplantados seriadamente subcutaneamente para ratinhos rapados (Iffa Credo, Arbesle, France), é usado como alvo para MAbs anti-CEA marcados com rádio e fragmentos.

O tumor T380 revela relativamente poucas áreas (superfícies) necróticas até tamanhos de mais de 1 g devido a um elevado grau de vascularização. O tumor é moderadamente diferenciado e contém numerosos pseudolumens que são ricos em CEA, rodeados por células epiteliais com um grau mais baixo de organização.

Foi descrita a produção de CEA e a libertação na corrente sanguínea. Podem ser extraídos 15 a 45 µg de CEA por grama de tumor, e 10 a 18 ng por hora são produzidos e libertados para o sangue a partir de 1 g de tumor (Martin & Halpern, *Cancer Res.* 44, 5475, 1984).

4.2 Injecção analítica a ratinhos rapados apresentando tumor

MAb CE 25, MAB 35 e MAb D17, cada um deles reconhecendo diferentes epítopos da molécula CEA, e os seus fragmentos F(ab')2 são marcados com rádio com ^{131}I pelo

método da cloramina T, dando origem a uma actividade específica final de 8-9 μ Ci/ μ g da proteína, sendo injectados intravenosamente a grupos de 3-4 ratinhos nus apresentando tumores do colon T380 de 0,2 a 1,5 gramas.

São usadas misturas de anticorpos e os seus fragmentos para se conseguir uma boa e rápida penetração dos nódulos, do tumor assim como libertação de elevadas quantidades de anticorpos durante um período de tempo mais longo. Anticorpos em fragmentos ou intactos marcados com ^{131}I podem também irradiar diferentes áreas dos nódulos tumoriais.

A marcação com ^{131}I é também vantajosa tendo em vista uma boa penetração do tumor. Os ratinhos são dissecados 3 dias após a injecção de anticorpos intactos ou 2 dias após injecção de F(ab')₂. As relações entre o tecido tumoral e o tecido normal (T/N) são calculadas assim como a relação entre tumor e peso total (média T/N).

A "média T/N" expressa a relação da radioactividade do tumor/g em comparação com a radioactividade do peso total/g incluindo todos os órgãos e a carcassa dissecada.

Os resultados são resumidos no quadro que se segue:

Relações T/N em ratinhos dissecados após injecção de doses terapêuticas de Mabs anti-CEA e fragmentos ^{131}I

Tempo de dis- secção	Tamanho do tu- mor em g	% de dose in- jectada por g de tumor	Relações entre o tumor e o tecido normal						
			média T/N**	T/sangue	T/fígado	T/trim	T/pulmão	T/baço	T/osso
24 h	0,34	25,5	26,7	7,2	12,6	14,2	10,6	20,1	40,1
72 h	0,27	7,2	22,2	4,7	13,3	14,8	7,0	15,3	29,4
168 h	0,21	2,2	13,2	2,4	11,9	8,8	3,3	8,1	19,4

Os ratinhos são dissecados 1,3 e 7 dias após injecção de doses terapêuticas de Mab intactas e de fragmentos F(ab')2 marcados com ^{131}I . O peso e a radioactividade no tumor, sangue e tecidos normais incluindo a casca do rato são medidos e é calculada a relação entre o tumor e o tecido normal (T/N).

* Percentagem da radioactividade injectada por grama do tumor medida em diferentes alturas (não corrigida para a meia vida física).

** "Média T/N" indica a taxa de radioactividade por grama do tumor em comparação com o rato total (sem tumor) incluindo sangue e carcassa.

4.3 Injecção terapêutica de ratinhos nus apresentando tumor do colon T380

Para demonstrar a possibilidade de se obter regressão do tumor de carcinomas do colon humano por injecção de MAbs anti-CEA marcados com ^{131}I , são realizados as experiências que se seguem.

Com fins terapêuticos, anticorpos intactos são misturados com os seus fragmentos F(ab')₂ numa relação 1:2. Um mg desta mistura é marcado por clorammina T com 10 mCi de ^{131}I até uma actividade específica de 8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de proteína. A ratinhos nus machos com 7 semanas de idade são feitos transplantes de tumor do colon T380 e distribuem-se ao acaso 3-4 ratinhos por cada gaiola.

Os tumores são medidos três dias antes e no dia da injecção marcada com rádio, isot é, 10 dias após a transplantação quando os tumores estão bem estabelecidos e organizados e em crescimento exponencial. São escolhidos 4 grupos de ratinhos com tumores em crescimento de tamanhos variados.

O primeiro grupo é injectado intravensamente com anticorpos marcados com 600 μCi ^{131}I , o segundo com IgG normal marcado com 600 μCi ^{131}I (também intactos e F(ab')₂ misturados). Um terceiro grupo é injectado com uma quantidade correspondente de 75 μg de anticorpos anti-CEA não marcados, e um quarto grupo não recebe qualquer injecção.

A tiroideia dos ratinhos injectados com proteínas marcadas com ^{131}I é protegida adicionando solução de Lugol a 5% à agua para beber (0,5 ml por 300 ml de agua), carregando 3 dias antes da injecção e mantendo essa

adição até às 6 semanas seguintes. Os ratinhos são mantidos em condições assépticas usando gaiolas cobertas com papel de filtro e com acesso limitado a 2 pessoas. Inicialmente, todos os 3 a 4 dias, e mais tarde uma vez por semana, são medidos os diâmetros do tumor em 3 dimensões.

Usando a fórmula

$$\text{volume} = r_1 \times r_2 \times r_3 \times 4/3 \pi (r = \text{radius})$$

são calculados os volumes do tumor. A precisão para as medições do tamanho de cada tumor é de cerca $\pm 10\%$ como se verificou por medições feitas por diferentes pessoas. A contagem da totalidade do corpo usando um RADX Assayer 1 (RADX Corporation, Houston, Texas) permite a determinação de duas meias vidas.

A irradiação da totalidade do corpo é então calculada pelas fórmulas

$$D_{\beta} = 2,13 \times T.\text{eff} \times 1,44 \times C \times E_{\beta} \text{ rads}$$

(T.eff em horas, C em $\mu\text{Ci/g}$, $E_{\beta} = 0,19$ para ^{131}I) e

$$D_{\gamma} = 2,13 \times T.\text{eff} \times 1,44 \times C \times \sum_{i=1}^N f_i \times E_i \times \Phi (u_{en} r)_i \text{ rads}$$

(f = frequência de raios γ , E = energia de raios- γ , Φ = coeficiente de absorção linear (u_{en}) multiplicado pelo rádio (r), ver Johns and Cunningham, in: Friedman, Monograph in the Bannerstane Division of American lectures on Radiation Therapy, Springfield 1978).

A irradiação da totalidade do corpo para os ratinhos é devida em 90% à radiação β^- e em 10% à radiação γ .

Os ratinhos dissecados às 24 e às 72 h e no dia 7 após a injecção do Mab marcado com rádio em dose terapêutica são analisados quanto às relações (taxas) T/N. Uma relação T/N média total é calculada a partir das relações entre o tumor e a totalidade do corpo nestes animais tomando em consideração uma fase de enriquecimento e de diminuição putativa da radioactividade no tumor.

Uma dose no tumor devida apenas à radiação β^- é calculada em comparação com a dose da totalidade do corpo. Os tumores são examinados histologicamente aos 1, 3 e 7 dias, e obtém-se autoradiografia a partir de tumores dissecados às 24 e 72 horas após a injecção.

A coloração com imunoperoxidase usando MAbs anti-CEA de porco e conjugado de peroxidase-IgG anti-porco é realizada em 3 tumores desenvolvendo-se tarde após injecção com anticorpo marcado com rádio assim como do tumor T380 não tratado nos ratinhos nus. O sangue de 4-5 ratinhos injectados com MAb marcado com rádio ou de ratinhos não tratados apresentando tumores é obtido semanalmente após injecção com anticorpo e faz-se a contagem dos glóbulos brancos do sangue.

Finalmente, cinco ratinhos, que sobrevivem durante 1/2 ano após os protocolos de terapêutica preliminar, são examinados histologicamente e por coloração com imunoperoxidase quanto às restantes células tumorais viáveis e à sua expressão em CEA. A tiroideia, fígado, rim, pulmão e baço destes ultimos ratinhos são analisados morfologicamente quanto às lesões provocadas pela radiação.

O tamanho de enxertos de tumores bem estabelecidos aumenta até aos 6 dias após a injeção com anticorpo marcado com rádio mas nessa altura estabelece-se a regressão do tumor durante 4 - 12 semanas.

Isto deve corresponder quer a uma destruição de mais de 99% das células do tumor quer à destruição de uma percentagem inferior mas acompanhada por uma acentuada inibição, da proliferação celular.

Um grupo principal de controlo de 13 ratinhos é injectado com a mesma quantidade de IgG1 normal intacta marcada com ^{131}I e dos seus fragmentos F(ab')2. A progressão do tumor é retardada durante 1 a 3 semanas em comparação com os controlos não tratados, mas não se observa qualquer regressão do tumor.

Os resultados (evolução do tamanho do tumor em ratinhos tratados e controlos são resumidos no quadro que se segue. No dia da injeção os tamanhos médios do tumor variam entre 47-50 mm^3 nos quatro grupos de ratinhos indicado no quadro. Observa-se um aumento rápido nos grupos (c) e (d) durante os 28 dias que se seguem.

Em ratinhos injectados com anticorpos marcados com rádio o tamanho médio do tumor após um aumento inicial até 122 mm^3 , diminui até um valor mínimo de 44 mm^3 no dia 28 (grupo a). No grupo (b) injectado com IgG normal marcado com rádio observou-se uma progressão lenta mas constante do tumor com um tamanho médio do tumor de 449 mm^3 no dia 28.

Evolução dos tamanhos dos tumores em ratinhos tratados e controlos

Tamanho médio do tumor em mm ³ e desvio padrão nos dias que se seguem após injecção	
Tratamento	Número de ratinhos
(a) MAb abt1-CEA 131-I	13
(b) IgG controlo 1131	13
(c) MAb anti-CEA	11
(d) Sem tratamento	10
	0
	6
	10
	14
	21
	28

Os tumores dos tamanhos dos tumores são avaliados por medição externa cada 3 a 4 dias nas primeiras 6 semanas a seguir à injeccão, e cada 7 dias em seguida.

Novos resultados indicam que ratinhos nus em que se transplantou tumor podem ficar completamente curados dos seus tumores usando fragmentos F(ab')2 marcados com ^{131}I de três MAbs. 8 de entre 10 ratinhos sobreviveram um ano sem reincidência do tumor.

Os tumores dissecados 24 e 72 horas após injecção de doses terapêuticas de misturas anticorpo/fragmento marcados com ^{131}I não revelam qualquer modificação histológica detectável por meio de microscopia óptica. Em contraste, são observados superfícies desiguais de necrose e numerosas células picnóticas nos tumores dissecados 7 dias após a injecção.

Nos animais que sobreviveram 6 meses após a imunoterapêutica com rádio, são analisados vários órgãos pelo microscópio óptico. As tiroideias, rins, pulmões e baço têm um aspecto normal.

A ausência de mortalidade entre os ratinhos tratados indica que os efeitos da imunoterapêutica com rádio sobre a hematopoiese são insignificantes.

Exemplo 5: Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA)

5.1 Processo de ensaio

Placas de microtitulação de polipropileno (Dynatech) são revestidas durante um período de 2 horas a 37°C e durante a noite a 4°C com 150 μl de uma solução do anticorpo monoclonal MAb CE 25 ($10 \mu\text{g/ml}$) num tampão pH 8,6 (solução salina a 0,9% tamponada com carbonato contendo 0,02% de azida de sódio).



As placas são lavadas cinco vezes com PBS, e locais reactivos à proteína ainda presentes são saturados por incubação durante 1 hora a 37°C com 250 µl de um tampão pH 7,4 (0,2% de gelatina e 0,2% de NaN₃ em PBS). As placas revestidas deste modo podem ser mantidas a 4°C neste tampão durante alguns dias.

50 µl de uma série de diluições de uma solução de teste ou de uma solução padrão contendo CEA humano purificado, 50 µl de tampão pH 7,4 e 50 µl de uma solução de anticorpo MAb 35 anti-CEA monoclonal marcado com fosfatase alcalina reconhecendo um epítopo de CEA diferente diluído 1:100 com tampão pH 7,4 são misturados e incubados nos reservatórios das placas de microtitulação durante 2 horas a 37°C e durante 30 minutos a 4°C.

As placas são lavadas cinco vezes com PBS, sendo então incubadas durante 30 minutos a 37°C com 150 µl de uma solução de fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/ml em 10% de tampão dietanolamina, MgCl₂ 0,5 mM, pH 9,8). Medindo a densidade óptica a 405 nm, é determinado a quantidade de p-nitrofenol libertado, a qual é proporcional à quantidade de fosfatase enzimática ligado e desse modo proporcional à quantidade de CEA na solução do teste.

O ELISA pode também ser realizado usando MAb CE 25 marcado com enzima e revestindo as placas de microtitulação com o anticorpo MAb 35 anti-CEA monoclonal reconhecendo um epítopo de CEA diferente.

5.2 Estojo de teste para ELISA

Um estojo de teste para o ensaio descrito no Exemplo 5.1 contem:

placas de microtitulação de polipropileno,
20 ml de anticorpo MAb CE25 monoclonal ($10 \mu\text{g/ml}$) em solução salina tamponada com carbonato (0,9% de NaCl, 0,42% de NaHCO_3 , 0,0072% de Na_2CO_3 , 0,02% de NaN_3),

1 ml do anticorpo MAb 35 monoclonal ligado à fosfatase alcalina reconhecendo um epítopo de CEA diferente (0,3 mg de anticorpo por ml) em tampão Tris (0,05 M, MgCl_2 1 mM, BSA a 1%, 0,02% de NaN_3 , pH 8,0),

2 ml de solução padrão contendo 5 μg de CEA humano purificado, 300 ml de PBS,

300 ml de tampão pH 7,4 (0,2% de gelatina e 0,2% de NaN_3 em PBS),

50 ml de fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/ml) em tampão dietanolamina (1 mg/ml),

(10% de MgCl_2 0,5 mM, 0,02% de NaN_3 , ajustado para pH 8,9 com HCl),

curva de calibração,
escala de intensidade da cor,
manual de instruções.

Exemplo 6: Preparação farmacêutica para aplicação parenteral

120 mg de anticorpo MAB CE 25 monoclonal preparado de acordo com o Exemplo são dissolvidos em 5 ml de solução salina fisiológica. A solução é feita passar através de um filtro bacteriológico, e o filtrado é introduzido numa ampola em condições assépticas. A ampola é preferencialmente armazenada no frio, por exemplo a -20°C.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1ª. - Processo para a preparação de anticorpos monoclonais específicos em relação ao抗原 carcinoembriónico humano (CEA), e seus derivados, que reconhecem epitopos de CEA não presentes em抗原 NCA₅₅ ou NCA₉₅ de reacção cruzada não específicos, na glicoproteína biliar ou nos granulocitos e que se ligam ao CEA humano com uma afinidade de pelo menos $(1,6 \pm 0,3) \times 10^{10}$ litros/mol, caracterizado pelas células do hibridoma que segregam o anticorpo serem multiplicados in vitro ou in vivo, e, se desejado, os anticorpos resultantes serem convertidos nos seus derivados.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células do hibridoma que segregam o anticorpo serem injectadas intraperitonealmente em ratinhos Balb/c que tenham sido facultativamente pré-tratados com um hidrocarboneto, e após 8-10 dias, o líquido ascítico é colhido destes animais.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar o anticorpo monoclonal com a designação de **MAb CE25**, e seus derivados.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado de um anticorpo monoclonal, caracterizado por o anticorpo monoclonal ser conjugado com um enzima, um marcador fluorescente, um quelato de metal, uma substância citostática, avidina, biotina, e substâncias afins.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado de um anticorpo monoclonal, caracterizado por o anticorpo monoclonal ser marcado radioactivamente.

6a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado de um anticorpo monoclonal, caracterizado por o anticorpo monoclonal ser cilvado enzimaticamente ou quimicamente dando origem a um fragmento.

7a. - Linha celular de hibridoma caracterizado por segregar um anticorpo monoclonal específico em relação ao抗原 carcinoembriónico humano (CEA) reconhecendo epitopos de CEA não presentes no抗原 NCA₅₅ ou NCA₉₅ de reacção cruzada não-específicos na glicoproteína biliar ou nos granulocitos, e que se ligam ao CEA humano com uma afinidade de pelo menos $(1,6 \pm 0,3) \times 10^{10}$ litros/mol.

8a. - Linha celular do hibridoma de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por ter a designação CE25.

9a. - Processo para a preparação de uma linha celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado por ratinhos Balb/c serem imunizados com CEA humano purificado ou com um CEA humano purificado contendo veiculo antigenico, por as células produtoras de anticorpo dos ratinhos Balb/c serem fundidas com células P3-NS2/1Ag4, por as células hibridas obtidas na fusão serem clonadas, e

por serem seleccionados os clones celulares que segregam os anticorpos desejados.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por os ratinhos Balb/c serem imunizados com CEA purificado extraido com solução salina.

11ª. - Processo para a preparação de composições farmacêuticas contendo um anticorpo monoclonal específico em relação ao CEA humano e/ou seus derivados preparados por meio de um processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o anticorpo monoclonal ser misturado com um veículo farmacêutico.

12ª. - Método para a terapia do cancro em mamíferos, caracterizado por um anticorpo monoclonal e/ou seus derivados preparados por um processo de acordo com a reivindicação 1, serem administrados ao referido mamífero numa dosagem de 0,1 a 5 mg por kg do peso corporal.

Lisboa, 3 de Janeiro de 1989



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.^o
1200 LISBOA