

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 93.776

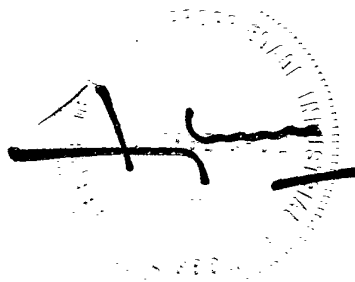
NOME: ONCOGEN LIMITED PARTNERSHIP

EPÍGRAFE: "ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA NOVOS ANTIGÉNIOS
ASSOCIADOS A TUMORES HUMANOS"

INVENTORES: Karl Erik Hellstrom, Ingegerd Hellstrom e
Hans Marquardt

**Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo
4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.**

Estados Unidos da América do Norte, 17 de Abril 1989
No. 339,142



MEMÓRIA DESCRITIVA

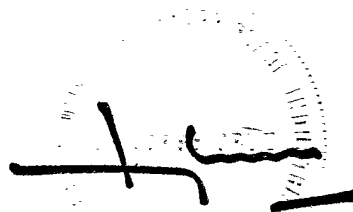
Resumo

O presente invento diz respeito a um novo anticorpo monoclonal que se liga fortemente a um antigénio proteico associado a tumores humanos incluindo carcinomas do colón e do pulmão. O anticorpo liga-se a células humanas normais num grau muito menor do que às células tumorais.

=====

ONCOGEN LIMITED PARTNERSHIP

"ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA NOVOS ANTIGÉNIOS ASSOCIADOS
A TUMORES HUMANOS"



O anticorpo pode ter utilidade em métodos de diagnóstico tais como detecção de células malignas associadas a tumores e em métodos terapêuticos para o tratamento de humanos com tumores. Também é divulgado um novo antigénio glicoproteico de 66000 daltons encontrado na superfície celular de células de tumores humanos. A sequência de aminoácidos amino-terminal deste antigénio é:

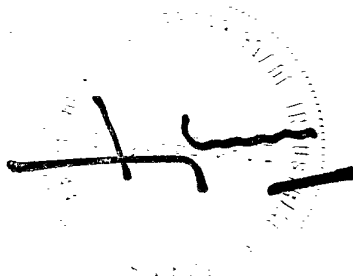
1	5	10	15	20
X	E	L	T	I
L	H	T	N	D
V	H	S	R	L
E	Q	T	S	X

em que X representa um aminoácido não identificado.

Campo do Invento

O presente invento está relacionado com um novo anticorpo monoclonal e um novo antigénio e com métodos para a produção, utilização de tal novo anticorpo monoclonal reactivo com células de carcinoma humano. Mais especificamente, o anticorpo monoclonal deste invento é reactivo com o novo antigénio da superficie celular que está associado a uma variedade de tumores humanos incluindo carcinomas do cólon e do pulmão.

O anticorpo monoclonal deste invento é adequado para fins de diagnóstico clinico in vivo e in vitro, como seja a detecção de carcinomas malignos. Em adição o anticorpo do presente invento é adequado para fins terapêuticos, por exemplo para reagir com células tumorais e em conjugados como veiculo selectivo de um alvo para vários agentes que tenham efeitos anti-tumorais incluindo, mas não estando limitado a: drogas quimioterapêuticas, toxinas, modificadores da resposta imunológica e radioisótipos. O antigénio do invento é também útil para fins terapêuticos e de diagnóstico.



Fundamento do Invento

Os carcinomas provocam milhões de mortes anualmente. Por exemplo, os carcinomas do pulmão são responsáveis pela maioria das mortes provocadas por cancro entre o homem e estão a alcançar os carcinomas da mama como a causa mais frequente de morte por cancro entre as mulheres. A maior parte dos casos de carcinoma são incuráveis por quimioterapia e terapia da radiação a menos que radicalmente removidos nas fases iniciais da doença. Existe portanto uma grande necessidade de métodos de diagnóstico e terapia de carcinomas da mama, cólon, ovário e pulmão, assim como de outros neoplasmas malignos tais como melanomas e sarcomas.

São conhecidos anticorpos monoclonais reactivos com antigénios associados a carcinomas (ver, e.g. papsidero, Semin. Surg. Oncol. 1 (4): 171-81 (1985); Schlom et al., Important Adv. Oncol., 170-92 (1985); Allum et al., Surg. Ann., 18:41-64 (1986); Houghton et al., Semin. Oncol., 13 (2): 165-79 (1986); Monoclonal Antibodies in cancer: Advances for Diagnosis and Treatment Roth (ed.), Futura Publishing, Mt, Kisco, New York (1986); e Cancer Diagnosis In Vitro Using Monoclonal Antibodies, Kupchik (ed.) Marcel Driker, Inc., New York (1988)).

A maior parte dos anticorpos monoclonais conhecidos são reactivos com vários tipos de carcinomas humanos, enquanto apenas alguns anticorpos reagem com carcinomas derivados de órgãos específicos do corpo, e.g. pulmão, mama, ovário, cólon, estômago ou pâncreas. Os antigénios alvo são glicoproteínas ou glicolipídios comuns (ver e.g. Hellstrom et al., cancer Research, 46: 3917-23 (1986) e Fink et al., prog. Clin. pathiol. 9:121-

-33 (1984)). Por exemplo, os anticorpos monoclonais reactivos com antigénios glicoproteínas em tipos específicos de carcinomas incluem os descritos na Patente dos Estados Unidos 4 737 579 (anticorpos monoclonais contra carcinoma renal humano). Alguns anticorpos monoclonais reagem com antigénios de alto peso molecular que parecem ser nureínas. Por exemplo, o anticorpo monoclonal B72.3 parece reconhecer um antigénio glicoproteína neofetal associado a tumores com um peso molecular superior a 1000 kd que é selectivamente expresso numa série de diferentes carcinomas. Assim, observou-se que B72.3 reage com 84% dos carcinomas da mama, 94% dos carcinomas do cólon, 100% dos carcinomas do ovário e 96% dos carcinomas do pulmão que não sejam das células pequenas (ver Johnston, Acta Cytol. 1(5): 537.56 (1987) e Patente dos Estados Unidos 4 612 262, publicada por Scholan et al). De modo semelhante, o anticorpo monoclonal KC-4 reconhece um antigénio proteico de aproximadamente 400-500 kd expresso numa série de carcinomas, tais como carcinoma do cólon, da próstata, do pulmão e da mama (Ver Patente dos Estados Unidos 4.708.930).

Anticorpos monoclonais reactivos com antigénios glicolipídios que se pensa estejam associados a certas células tumorais foram também descritos. Por exemplo, Young et al., J. Exp. Med. 150:1008 - 19 (1979) descreve a produção de dois anticorpos monoclonais específicos de asialo GM₂, um antigénio glicosfingolípido da superfície celular que foi estabelecido como marca para células BALB/c 3T3 transformadas pelo vírus do sarcoma murino de Kirsten. Ver, também, Kriep et al., J. Immunol. 131 (3): 1591-94 (1983) e Patente dos Estados Unidos 4 507 391 (anticorpo monoclonal contra melanoma humano).

Em adição, anticorpos monoclonais reactivos com antigénios glicolipídios encontrados em tipos específicos de células de carcinoma incluem os descritos

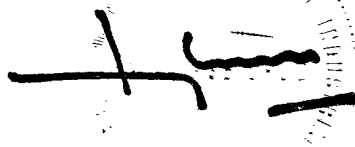


por Rosen et al., Cancer Research, 44:2052-61 (1984) (anticorpos monoclonais contra cancro de células pequenas do pulmão humano); Varki et al., Cancer Research, 44:681-87 (1984) (anticorpos monoclonais contra adenocarcinomas humanos do pulmão, estomago e colón e melanoma); e Patente dos Estados Unidos 4,579,827 (anticorpos monoclonais contra adenocarcinoma do cólon humano). Ver, também, Hellstron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059.63 (1986) que descreve o anticorpo monoclonal L6 que reconhece um antigénio açúcar expresso na superfície de carcinoma do pulmão humanos que não sejam das células pequenas, carcinomas da mama e carcinomas do colón.

São muito necessários outros anticorpos monoclonais que apresentem reactividade contra antigénios encontrados numa variedade de células tumorais.

Isto deve-se à heterogeneidade antigénica da maior parte dos tumores que muitas vezes necessita, em diagnóstico ou terapia, da utilização de uma combinação de diferentes anticorpos monoclonais dirigidos contra a mesma massa tumoral. Ainda, não são comuns anticorpos monoclonais que apresentem um elevado grau de reactividade com uma gama larga de tumores, ao mesmo tempo não apresentando reactividade com tecidos normais ou tendo uma reactividade muito fraca. Tais anticorpos seriam claramente vantajosos.

É portanto aparente que um anticorpo monoclonal reactivo com um antigénio expresso em níveis elevados por uma variedade de tumores pode tornar-se útil no diagnóstico precoce de cancro, numa melhor definição do alastramento do cancro, no controle imunológico de pacientes com cancro, assim como no desenvolvimento de melhores métodos para a terapia de cancros. É também apa-

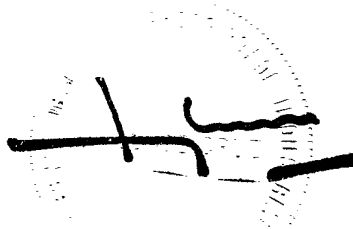


rente que os anticorpos monoclonais contra novas moléculas de superficie celular podem ser usados para posterior definição de tais moléculas as quais podem ser importantes para a preparação de imunogénios na forma de vacinas contra o cancro e também desempenhar importantes funções celulares, por exemplo, como receptores de hormonas ou de factores de crescimento ou como moléculas que de outro modo estejam envolvidos na comunicação intra e intercelular. os antigénios podem mesmo ter actividade enzimática e de factor de crescimento por si sós.

Sumário do Invento

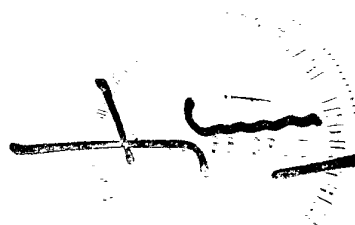
O presente invento proporciona um anticorpo monoclonal, Cl, que é específico para um sitio determinante num antigénio glicoproteína de superficie celular, o antigénio Cl, associado a células de tumores huamnos, particularmente células de carcinomas do pulmão e do cólon. Assim, o anticorpo do invento pode ser útil para o diagnóstico e terapia de tumores expressando o antigénio Cl identificado pelo anticorpo Cl. O anticorpo Cl do invento é da classe IgG e da subclasse IgG1 e não apresenta reactividade significativa com células humanas normais.

O anticorpo do invento pode ser usado nos métodos de diagnóstico in vitro para determinação da presença de um estado maligno em tecido de pulmão humano e noutros tecidos huamnos. os métodos envolvem exame do tecido quanto à presença de um antigénio tendo as características do antigénio glicoproteína Cl de 66000



daltons reactivo com o anticorpo Cl. Por exemplo, o tecido pode ser posto em contacto com o anticorpo monoclonal Cl do invento o qual define um sitio determinante num antigénio associado a células tendo as características do antigénio Cl, um equivalente funcional ou um fragmento deste anticorpo e serem detectados quaisquer interacções do referido anticorpo e determinantes antigénicos. Tal método envolve a determinação da presença de células de carcinoma numa amostra suspeita de conter tais células. A amostra é posta em contacto com o anticorpo monoclonal, o qual é capaz de distinguir tais células de entre outros tipos celulares que possam estar presentes na amostra. O contacto é efectuado em condições de ligação do anticorpo a tais células. Depois do contacto é determinada a presença ou ausência de ligação do anticorpo às células na amostra. Esta ligação está relacionada com a presença ou ausência de células de carcinoma na amostra. geralmente, a amostra é posta em contacto com um parceiro de ligação específico marcado do anticorpo monoclonal. Esta marca é capaz de produzir um sinal detectável. Como alternativa, o próprio anticorpo monoclonal pode ser marcado.

Um outro método de diagnóstico envolve a localização in vivo de um tumor através da administração a um paciente de um anticorpo ou fragmento de anticorpo purificado do presente invento marcado com um agente que dá um sinal detectável. A localização é então detectada usando cintigrafia externa, tomografia de emissão ou varrimento radionuclear. Este método pode também proporcionar melhores maneiras de controlar pacientes com cancro no que respeita ao grau de doença, e para controlar as alterações como resposta às terapias.



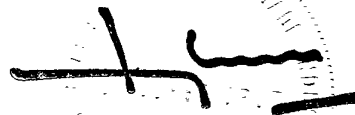
O invento também tem aplicações terapêuticas uma vez que o anticorpo C1 e anticorpos semelhantes podem reagir com o antigénio C1 que é expresso em concentrações altas na superfície das células tumorais. O anticorpo monoclonal do invento pode ser usado para preparar uma composição para o tratamento de tumores. A composição compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de anticorpo em associação com um veículo parenteral farmacêuticamente aceitável. O anticorpo do invento também pode ser usado em imunoconjugados como um veículo de vários agentes que tenham um efeito anti-tumoral, incluindo, mas não estando restringido a drogas quimioterapêuticas, toxinas, modificadores da resposta imunológica e radioisótipos.

O invento também compreende o novo antigénio C1 caracterizado por um peso molecular de aproximadamente 66000 daltons e tendo uma sequência de aminoácidos amino-terminal.

1	5	10	15	20
X-E-L-T-I-L-H-T-N-D-V-H-S-R-L-E-Q-T-S-X				

em que X representa um aminoácido não identificado e equivalentes, identificado pelo anticorpo C1 e a classe de anticorpos que se liga a este antigénio.

O invento inclui métodos para usar o antigénio C1 purificado ou clonado como uma vacina para imunizar contra certos tumores.



Descrição detalhada do invento

Para que o invento aqui descrito possa ser totalmente compreendido é apresentada a descrição detalhada que se segue.

O presente invento diz respeito a um novo anticorpo monoclonal, designado Cl, o qual é especificamente reactivo com um antigénio (antigénio Cl) localizado nas células tumorais humanas, particularmente derivado de carcinomas do pulmão e do colón, métodos para a produção do anticorpo monoclonal Cl e métodos de diagnóstico e terapêuticos que utilizam o anticorpo. O anticorpo Cl reage com uma gama de tumores ao mesmo tempo que praticamente não apresenta reactividade com tecidos humanos normais ou outros tipos de tumores tais como melanomas ou linfomas.

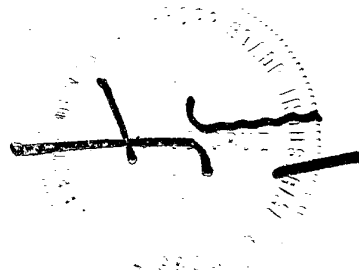
O invento diz ainda respeito a um novo antigénio glicoproteína de superfície celular, designado antigénio Cl e principalmente associado a tumores humanos do pulmão e colón e métodos para usar o antigénio Cl.

O anticorpo monoclonal do invento pode ser preparado por técnicas de fusão de hibridomas ou por técnicas que utilizam as tecnologias de imortalização por EBV.

As técnicas de fusão de hibridomas foram primeiro introduzidas por Kohler e Milstein (ver, Kohler e Milstein, Nature 256:499-97 (1975); Brown et al., J. Immunol., 127 52):539-46 (1981); Brown et al., J. Biol. Chem., 255: 4980-83 (1980); Yeh et al., Proc.

Nat'l Acad. Sci. (USA), 76 (6): 2927.-31 (1976); e Yeh et al., Int. J. Cancer 29 : 269-75 (1982)).

Estas técnicas envolvem a injeção de um imunogénio (e.g. antigénio purificado ou células ou extractos celulares portadores do antigénio) num animal (e.g., um ratinho) de modo a induzir uma resposta imune pretendida (i.e., produção de anticorpos) naquele animal. Por exemplo, células de carcinoma de pulmão humano derivadas de efusões pleurais, de células cultivadas derivadas de carcinomas do pulmão humano que não sejam das células pequenas (NSCLC) ou de células de pulmão fetal normal ou lisados de tais células podem ser usados como imunogénio. No Exemplo I, infra, foram usados como imunogénio uma preparação de membranas de adenocarcinoma humano de cólon designado H3059 e células de linha celular de carcinoma do cólon 3347. A preparação de membranas foi injectada, por exemplo num ratinho e após tempo suficiente, o ratinho foi morto, e obtidos os linfócitos somáticos produtores de anticorpos. As células produtoras de anticorpos podem derivar dos nódulos linfáticos, baços e sangue periférico de animais sensibilizados. São preferidos as células do baço. os linfócitos de ratinho dão uma percentagem mais elevada de fusões estáveis com os mielomas de ratinho descritos abaixo. A utilização de células somáticas de rato, coelho e rã. Os cromossomas de células do baço codificadores das imunoglobulinas pretendidas são imortalizados por fusão das células do baço com células de mieloma, geralmente na presença de um agente de fusão como seja polietilenoglicol (PEG). Pode ser usado qualquer uma de uma série de linhas celulares de mieloma como parceiro de fusão de acordo com técnicas convencionais; por exemplo, as linhas celulares de mieloma P3-NS1/1-Ag 4-1, P3 - X63-Ag 8-653 ou Sp2/0-Ag 14. Estas linhas de mieloma estão disponiveis na American Type Culture Collection



(ATCC) Rockville, Maryland.

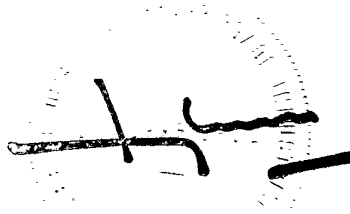
As células resultantes, as quais incluem os hibridomas pretendidos, são então cultivadas num meio selectivo, como seja meio HAT, no qual as células de meiloma parenterais não fundidos ou as células de linfócito morram. Apenas as células de hibridoma sobrevivem e podem crescer em condições de diluição limite para se obter clones isolados. Os sobrenadantes dos hibridomas são despistados quanto à presença de anticorpo da especificidade pretendida, e.g. por técnicas de imunoensaio usando o antigénio que foi usado na imunização. Os clones positivos podem então ser subclonados em condições de diluição limite e o anticorpo monoclonal produzido pode ser isolado. Existem vários métodos convencionais para o isolamento e purificação dos anticorpos monoclonais de modo a libertá-los das outras proteínas e de outros contaminantes. Métodos vulgarmente usados para a purificação de anticorpos monoclonais incluem precipitação com sulfato de amónio, cromatografia de permuta iónica e cromatografia de afinidade (ver, e.g., Zola et al., em Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, Hurell (ed.) pág.-51-52 (CRC Press 1982)). Os hibridomas produzidos de acordo com estes métodos podem ser propagados in vitro ou in vivo (em fluido ascítico) usando técnicas conhecidas (Ver, como caracter geral, Fink et al., supra na página 123, Fig. 6-1).

De um modo geral, a linha celular individual pode ser propagada in vitro, por exemplo em frascos de cultura de laboratório e o meio de cultura contendo concentrações elevadas de um único anticorpo monoclonal específico pode ser colhido por decantação, filtração ou centrifugação. Como alternativa, a produção de anticorpos monoclonais pode ser aumentada injectando



uma amostra do hibridoma num animal histocompatível do tipo usado para proporcionar as células somáticas e de mieloma para a fusão original. No animal injectado desenvolvem-se tumores que secretam o anticorpo monoclonal específico produzido pelo híbrido de células fundidas. Os fluidos do corpo do animal, tais como fluido ascítico ou soro, proporcionam anticorpos monoclonais em concentrações elevadas. Conforme discutido por Cole et al., supra, quando se usa hibridomas humanos ou hibridomas de EBV, é necessário evitar a rejeição do enxerto injectado em animais tais como ratinho. Podem ser usados ratinhos imunodeficientes ou labro ou o hibridoma pode ser passado primeiro em ratinhos labro irradiados como um tumor subcutâneo, cultivados in vitro e depois injectado intraperitonealmente em ratinhos labro irradiados e previamente injectados com pristano os quais desenvolvem tumores ascísticos que secretam grandes quantidades de anticorpos monoclonais humanos específicos (Ver Cole et al., supra).

Para certas aplicações terapêuticas os anticorpos monoclonais quiméricos (ratinho-humano) ou humanos podem ser preferíveis aos anticorpos murinos pois os pacientes tratados com anticorpos de ratinho dão origem a anticorpos humanos anti-ratinho. (Shawler et al., J. Immunol. 135: 1530-35 (1985)). Anticorpos monoclonais quiméricos ratinho-humano reactivos com o antígeno C1 podem ser produzidos, por exemplo, por técnicas recentemente desenvolvidas para a produção de anticorpos quiméricos (Oi et al., Biotechnologies, 4 (3): 214-221; Liu et al., Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) 84: 3439-43 (1987)). Assim, genes codificadores de regiões constantes da molécula do anticorpo C1 murino são substituídas com genes humanos codificadores das regiões constantes de um anticorpo com actividade biológica adequada (como seja a capacidade para activar o complemento humano



e mediar ADCC). Novos anticorpos de origem murina, ou humana, podem também ser feitos para o antígeno C1 tendo as funções biológicas adequadas. Por exemplo, podem ser feitos anticorpos monoclonais humanos usando o antígeno e.g., o antígeno C1 do invento, para sensibilizar linfócitos humanos contra o antígeno in vitro seguido de transformação com EBV ou hibridação dos linfócitos sensibilizados com o antígeno com linfócitos de ratinho ou humanos como descrito por Borrebaeck et al., (Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), 85: 3955-99 (1988)).

De acordo com uma realização preferida, o anticorpo deste invento designada C1, foi produzido via técnicas de hibridoma usando membranas de células de efusão de adenocarcinoma do cólon e células de uma linha celular de carcinoma do cólon 3347 como imunogénio conforme descrito no Exemplo I, infra. O hibridoma C1, produtor do anticorpo C1, foi depositado na ATCC, Rockville, Maryland e foi identificado como se segue:

C1 Nº de acesso: HB 9803

O anticorpo C1 é da subclasse IgG1. O anticorpo apresenta uma reactividade muito forte com células tumorais, particularmente células de carcinomas do cólon e do pulmão. O anticorpo C1 não apresenta ligação detectável às linhas celulares de linfoma CEM, MOLT-4, à linha de linfoma de células B e a células de melanoma.

Em adição, o anticorpo deste invento não apresenta qualquer ligação imuno-histologicamente detectável a tecidos humanos normais tais como fibro-

blastos, células endoteliais ou células epiteliais da maioria dos órgãos, e.g., rim, baço, fígado, pele, pulmão, mama, colón, cérebro, tiróide, coração, nódulos linfáticos ou ovário. O anticorpo também não reage com leucócitos do sangue periférico. Assim este anticorpo é superior à maioria dos anticorpos antitumorais conhecidos na sua especificidade para uma gama de células tumorais e no seu elevado grau de especificidade para células tumorais comparado com células normais. (Ver, e.g. Hellstrom et al Covalently Modified Antigens And Antibodies In diagnosis and Therapy Quash/Rodwell (eds.) pág. 24-28 (Marcel Dekker Inc. (1989); e Bagshawe, Br. J. cancer, 48: 167-75 (1983)).

Deve ser entendido que o presente invento engloba o anticorpo C1 descrito atrás e quaisquer fragmentos dele contendo a região de ligação activa do anticorpo, tais como os fragmentos Fab, F(ab)₂ e Fv. Tais fragmentos podem ser produzidos a partir do anticorpo C1 usando técnicas bem estabelecidas (ver., e.g. Ronsseawx et al., em Methods Enzymol. 121:603-69, Academic Press (1986)).

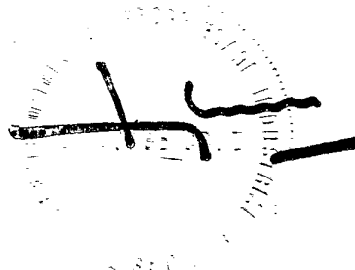
Em adição, o presente invento inclui anticorpos que são capazes de se ligarem ao mesmo determinante antigénio que o anticorpo C1 e de competirem com o anticorpo C1 para a ligação naquele sitio. Estes incluem anticorpos tendo a mesma especificidade antigénica do anticorpo C1 mas diferindo na origem das espécies, isotipo, afinidade de ligação ou funções biológicas (e.g. citotoxicidade). Por exemplo, podem ser construídas variantes de classe, isotipo e outras do anticorpo do invento usando técnicas recombinantes conhecidas de mudança de classe e fusão (ver, e.g. Thammama et al., Eur. J. Immunol. 13:614 (1983); Spira et al., J. Immunol. Meth. 74: 307-15 (1984); Neuberger et al., Nature, 312: 604-08 (1984); e Oi et al



supra)). Assim, os anticorpos quiméricos ou outros anticorpos recombinantes (e.g. anticorpo fundido com uma segunda proteína como seja uma linfoguina) tendo a mesma especificidade de ligação do anticorpo C1 caem dentro do âmbito deste invento. Ainda, uma vez que o antigénio C1 ao qual o anticorpo do invento se liga é um novo antigénio tumoral o anticorpo do invento inclui anticorpos que se ligam a qualquer determinante antigénico naquele antigénio C1, incluindo outros determinantes além daqueles com os quais o anticorpo C1 reage.

Também estão incluídos no âmbito do invento anticorpos anti-idiotípicos do anticorpo C1 do invento. Estes anticorpos anti-idiotípicos podem ser produzidos usando o anticorpo C1 como imunogénico e são úteis em diagnóstico para a detecção de resposta humoral e em aplicações terapêuticas, e.g. numa vacina, para induzir uma resposta anti-tumoral em pacientes (Ver, e.g. Nepom et al., Cancer and metastasis Reviews, 6: 487-501 (1987); e Lee et al., Proc. Nat'l Acad. Sci (USA), 82: 6286-90 (1985)).

O anticorpo C1 pode ser usado para isolar e caracterizar o antigénio C1 ao qual se liga. Assim, C1 pode ser usado como sonda para identificar e caracterizar o epitopo reconhecido pelo anticorpo e para ainda definir o antigénio C1 na superfície das células de carcinoma (ver, e.g. Hakomori; Ann. Rev. Immunol., 2:103-26 (1984); Brown et al., J. Immunol., 127:539-546 (1981); Brown et al., Nature, 296: 171-173 (1982); e Rose et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 83:1261-1265 (1986)).



O antígeno Cl reconhecido pelos anticorpos monoclonais do presente invento compreende um novo antígeno glicoproteína da superfície celular característico de células tumorais, particularmente células de carcinomas do colon e pulmão. O antígeno Cl tem um peso molecular de aproximadamente 66000 daltons quando sujeito a imunoprecipitação em electroforese em gel de poliacrilamida.

A sequência de aminoácidos amino-terminal do novoantígeno glicoproteína Cl é a seguinte:

1	5	10	15	20
X-E-L-T-I-L-H-T-N-D-V-H-S-R-L-E-Q-T-S-X				

em que X representa um aminoácido que não foi ainda identificado e o resto das letras representam as abreviaturas convencionais de uma só letra para os aminoácidos. Uma comparação da sequência de 20 resíduos amino-terminal de Cl com as guardadas nas bases de dados habituais (PIR Release 16, Março 1988; Gen BANK Release, 57.0, Setembro 1988; NEW 30 de Novembro 1988; DIF, 30 de Novembro 1988; SWISS PROT, 30 de Novembro, 1988; LOSPRO, 30 de Novembro 1988) não revela homologia de sequências significativas com quaisquer outras sequências conhecidas.

O anticorpo monoclonal do invento é também útil para fins de diagnóstico, tanto in vitro como in vivo, para a detecção de carcinomas humanos portadores do antígeno Cl com o qual o anticorpo Cl é especificamente reactivo. Os métodos de diagnóstico in vitro são bem conhecidos (Ver, e.g. Roth Supra, e Kupchik, supra) e incluem detecção imuno-histológica de células tumorais (e.g., em tecido humano, células ou amostras retiradas de tumores/

ou detecção serológica de antígenos associados a tumores (e.g. em amostras de sangue ou outros fluidos biológicos).

As técnicas imuno-histológicas envolvem o contacto de uma amostra biológica como seja uma amostra de tecido tumoral com o anticorpo do invento e depois detecção da presença na amostra do anticorpo complexado com o seu antígeno. A formação de tais complexos do anticorpo-antígeno com a amostra indica a presença de células tumorais no tecido. A detecção do anticorpo na amostra pode ser conseguida usando técnicas conhecidas, tais como a técnica de coloração com imunoperoxidase, a técnica da avidina-biotina (ABC) ou técnicas de imunofluorescência (ver, e.g. Ciocca et al., *Meth. Enzymol.* 221:562-79 (1986); Hellstein et al; Cancer Research, 46: 3917-23 (1986); e Kinball (ed.) Introduction to Immunology (2nd Ed.), pp. 113-117, MacMillan Publ. Co. (1986)). Por exemplo, a coloração com imunoperoxidase foi usada como descrito no Exemplo III, infra para demonstrar a reactividade do anticorpo C1 com carcinomas do pulmão e do colón e a ausência de reactividade do anticorpo com a amostra de tecido humano normal.

As técnicas de diagnóstico serológico envolvem a detecção e quantificação de antígenos associados a tumores que foram secretados ou "largados" para o soro ou outros fluidos biológicos de pacientes que se pensa sofrerem de carcinoma. Tais antígenos podem ser detectados nos fluidos do corpo usando técnicas conhecidas tais como radioimunoensaios (RIA) ou ensaios imunossorventes ligados a enzimas (ELISA) em que um anticorpo reactivo com o antígeno secretado é usado para detectar a presença do antígeno numa amostra de fluido (ver, e.g. Uotila et al., J. Immunol. Methods, 42:11 (1981) e Allum et al., supra, na página 48-51). Estes ensaios, usando o anticorpo C1 aqui descrito, podem pois ser usados para a detec-



ção em fluidos biológicos do antigénio Cl com o qual o anticorpo Cl reage e portanto na detecção de vários carcinomas em doentes humanos. Assim, é aparente pelo que se disse que o anticorpo Cl do invento pode ser usado na amior parte dos ensaios que envolvem reacções antigénio - anticorpo. Estes ensaios incluem, mas não estão limitados, a técnicas convencionais de RIA, fase líquida e fase sólida, assim como ensaios de ELISA, técnicas de imunofluorescência, e outros ensaios imunocitoquímicos (ver, e.g. Sikora et al (eds.) Monoclonal Antibodies pág. 32-52, Blackwell Scientific Publications (1984)).

O anticorpo Cl do invento é também útil para aplicações de diagnóstico in vivo para a detecção de tumores humanos. Tal abordagem envolve a detecção de tumores in vivo por técnicas de visualização de tumores usando o anticorpo marcado com um reagente ou visualização adequada que produz sinal detectável. Os reagentes de visualização e processos para a marcação de anticorpos com tais reagentes são bem conhecidos (ver, e.g. Wend e Mears, Radio Immunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York, (1983); Colcher et al, meth. Enzymol. 121: :802-16 (1986)). O anticorpo marcado pode ser detectado por uma técnica tal como varrimento radionuclear (ver, eg., Beadwell et al., em Monoclonal Antibodies for Cancer detection and Therapy, Baldwin et al., (eds), pag. 65-85, Academic Press (1985)).

O anticorpo Cl do invento tem uma série de aplicações terapêuticas in vivo. Além de poder ser usado sózinho no direccionamento para células tumorais o anticorpo pode ser usado em conjunção com um agente terapêutico adequado para tratar cancro humano. Por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado ou ligado a uma droga terapêutica ou toxina para libertação do agente terapêutico

no sitio do cancro. São bem conhecidas as técnicas de conjugação de tais agentes terapêuticos com anticorpos (ver, e.g. Arnon et al., Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy Reisfeld et al (eds) pág. 243-56, Alan R., Liss, Inc., (1985); Hellston et al., em Controlled Drug Delivery (2ª Ed.) Robinson et al., (eds) pág. 623-53, Marcel Dekker, Inc., (1987); Thorpe, Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications Pinchera et al., (eds) pág. 475-506 (1985); e Thorpe et al., Immunol. rev. 62:119-58 (1982)). Uma vez que o anticorpo C1 não é facilmente internalizado quando as células são expostas a ele in vitro pode ser preferível direccionar fármacos terapêuticos para as células tumorais acoplando o anticorpo com uma enzima, e.g. usando acoplamento, químico directo ou técnicas de DNA recombinante. Quando tais conjugados estão localizados no tumor, a enzima pode converter uma prodroga inactiva (não tóxica), a qual é administrada depois dos conjugados se terem ligado às células tumorais, numa droga anticancro activa. (ver, e.g. Senter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) 85: 4842-46 (1988)).

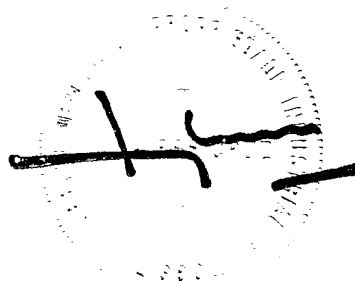
Como alternativa, o anticorpo pode ser acoplado a uma fonte de radiação de alta energia e.g., num radioisótopo tal como ^{131}I , o qual, quando localizado no sitio do tumor, resulta na morte de vários diâmetros de células (Ver, e.g. Order, em Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al., (eds) pág. 303-16, Academic Press, (1985)). De acordo com uma outra realização, o anticorpo C1 pode ser conjugado com um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo para o tratamento de células tumorais como descrito por Segal na Patente dos Estados Unidos 4, 676,980.



Ainda outras aplicações para o anticorpo Cl do invento inclui a sua utilização, na presença de acoplamento ou como parte de um conjugado anticorpo-droga ou anticorpo-toxina, para remover células tumorais da medula óssea de doentes com cancro. De acordo com esta abordagem, medula óssea análoga pode ser tratada ex vivo por tratamento com o anticorpo e a medula introduzida de novo no doente (Ver, e.g. Ransay, et al., J. Clin. Immunol., 8 (2): 81-88 (1988)).

Ainda, anticorpos Cl quiméricos ou outros recombinantes do invento, como descrito atrás, podem ser usados em terapêutica. Por exemplo, uma proteína de fusão compreendendo pelo menos a região de ligação ao antigénio do anticorpo Cl ligado a pelo menos uma fracção funcionalmente activa de uma segunda proteína tendo actividade anti-tumoral, e.g. uma linfocina ou oncostatina, pode ser usada para tratar tumores humanos in vivo. Em adição, um anticorpo Cl quimérico humano em que a região de ligação ao antigénio de Cl está ligada a uma região fe humana, e.g. IgG1, pode ser usado para promover a citotoxicidade celular dependente de anticorpos ou citotoxicidade mediada pelo complemento. Ainda, as técnicas recombinantes conhecidas podem ser usadas para construir anticorpos, bioespecificos em que uma das especificidades de ligação do anticorpo é a do anticorpo Cl (Ver, eg patente dos Estados Unidos 4,474,893).

Finalmente, os anticorpos anti-idiotipicos do anticorpo Cl podem ser usados terapêuticamente na imunização aditiva contra tumores e na terapia de tumores (ver, e.g. Hellstron et al., Immunological Approaches To Tumor Therapy Monoclonal Antibodies, Tumor Vaccines, And Auto-Idiotypes" em COvalently Modified Antigens and Antibodies In Diagnosis and Therapy, supra



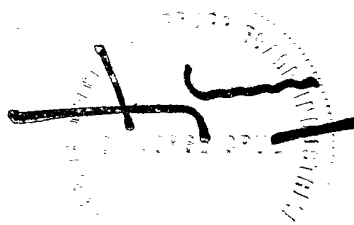
na pág. 35-41).

É pois aparente, que o presente invento engloba composições farmacêuticas, combinações e métodos para o tratamento de tumores humanos. Por exemplo, o invento inclui composições farmacêuticas para usar no tratamento de tumores humanos compreendendo uma quantidade farmacêuticamente eficaz de um anticorpo Cl e um veículo farmacêuticamente aceitável, As composições podem conter o anticorpo Cl, não modificado, conjugado com um agente terapêutico (e.g. droga, toxina, enzima ou segundo anticorpo) ou numa forma recombinante (e.g. Cl quimérico ou bispecífico). As composições podem ainda incluir outros anticorpos ou conjugados para o tratamento de carcinomas (e.g. um "cocktail" de anticorpos).

As composições de anticorpos do invento podem ser administrados usando métodos convencionais de administração, incluindo, mas não estando limitado a administração intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática ou directamente no tumor. É preferida a administração intravenosa.

As composições de anticorpos do invento podem ser formulados numa variedade de formas de dosagem as quais incluem, mas não estão limitadas a, soluções ou suspensões líquidas, comprimidos, pilulas, pós,, supositórios, microacápsulas, poliméricas ou microvesículas, lipossomas e soluções injectáveis ou para infusão. A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica.

As composições de anticorpo também preferencialmente incluem veículos convencionais farmacêuticamente aceitáveis e adjuvantes conhecidos tais

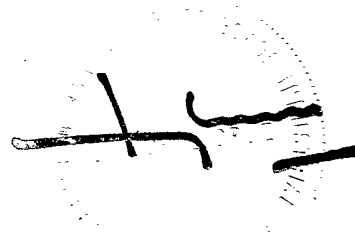


como albumina do soro humano, permutadores iônicos, alumina, lecitina, substâncias tamponantes tais como fosfatos glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio e sais ou electrolitos tais como sulfato de protamina.

O modo de administração e regime de dosagem mais eficazes para as composições deste invento depende da gravidade e curso da doença, da saúde do doente e da resposta ao tratamento e da opinião do médico ocupado do tratamento. Assim, as dosagens das composições deverão ser determinadas individualmente para cada paciente. No entanto, uma dose eficaz das composições de anticorpos deste invento pode estar na gama de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 mg/m².

O novo antigénio do presente invento, referido como o antigénio C1 pode também ser usado para aplicações terapêuticas. O antigénio pode ser purificado a partir de tumores ou produzido por tecnologia de DNA recombinante (Brown, et al., Pedido de Patente U.S. copendente Nº de Série 827 313, "Attorney Docket" No. 5624-008, entregue em 7 de Fevereiro 1986, aqui incluído por referência). O gene codificador do antigénio C1 pode ser clonado por métodos que primeiro fazem o enriquecimento em mRNA do antigénio C 1. Através de um destes métodos polissomas (assistindo em ribossomas com mRNA e cadeias polipeptídicas nascentes) podem ser purificadas por cromatografia de imunoafinidade com anticorpo que reconhece o determinante antigénico C1 de cadeia nascente.

O mRNA é isolado por imunoprecipitação com, e.g. anticorpo C1 e o cDNA é clonado num vector de expressão adequado. Como alternativa, o anticorpo C1 ou antisoro contra o antigénio C1 podem ser usados para fazer o despiste da biblioteca de cDNA usando

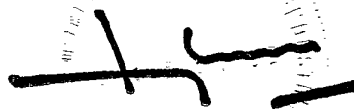


um vector de expressão. O antígeno Cl purificado ou clonado pode ser administrado sózinho como um imunogénio ou juntamente com um adjuvante imunológico adequado.

O antígeno Cl, purificado ou clonado pode ser usado nos métodos do invento como vacina para imunizar contra certos tumores. São conhecidos os processos para a preparação de tais vacinas (ver, e.g. Ertin et al., proc. Nat'l Acad. Sci (USA), 8511052 (1988)).

Resumidamente, foram construídos virus recombinantes para a expressão do antígeno clonado associado a tumores, por exemplo, antígeno Cl. Células infectadas com os virus recombinantes expressam o antígeno de tumor na superfície das células juntamente com os antígenos de incompatibilidade do hospedeiro e proteínas virus imunogénicas. Isto favorece a indução de imunidade celular que desempenha um papel fundamental na rejeição de tumores. Um virus adequado, por exemplo o virus da vacina derivado de um virus purificado em placa da vacina de variola de Wyeth (estirpe do New York City Board of Health), foi usado para construir um virus recombinante contendo a sequência codificadora do antígeno Cl sob o controle do promotor "7.5 k" do virus da vacina (Hu et al., J. Virol. 62: 176-180 (1988)). O virus recombinante pode então ser administrado intravenosamente como uma vacina para proteger contra o cancro.

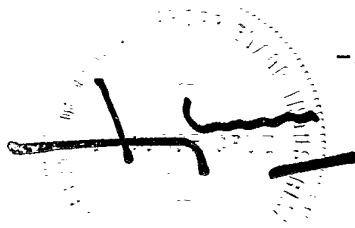
para que o invento aqui descrito seja melhor compreendido são apresentados os exemplos que se seguem. Deve ser entendido que estes exemplos têm apenas fim ilustrativo e não devem ser pensados como limitantes do âmbito deste invento de algum modo.



EXEMPLO I

Preparação do Anticorpo Monoclonal C1

O anticorpo monoclonal C1 do invento foi produzido usando técnicas de fusão de hibridomas descritos anteriormente por Yeh et al., Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) (1979), supra. Todas as linhas celulares usadas nos exemplos que se seguem foram desenvolvidas em Oncogen, Seattle, Washington, a partir de amostras de tumores obtidos de humanos como tumores sólidos ou efusões. Resumidamente, um ratinho BALB7C de três meses de idade foi imunizado quatro vezes usando uma preparação de membranas de um adenocarcinoma humano do colón, designado H3059 e três vezes usando células da linha celular de carcinoma do colón 3347. A preparação de membranas foi preparada como se segue: Obteve-se tumor a partir da efusão de ascites. 10ml de tampão de lise (19,8 ml de água desionizada e 0,1 ml de NaHCO_3 0,2 M e 0,1 ml de PMSF 0,2M (inibidor de proteases) em etanol) foi adicionado às células que foram rebentados em gelo 25 a 50 vezes. A mistura foi então transferida para um tubo de 15 ml e centrifugada durante 2 min., a 2000 xg a 0°C. O sobrenadante foi removido e transferido para um tubo de 5 ml de celulose. O sedimento foi testado ao microscópio quanto à lise. O sobrenadante foi então centrifugado numa ultracentrifuga durante 15 min., a 37000 xg a 4°C. O sobrenadante foi então aspirado e o sedimento ressuspense em pelo menos 1 ml de PBS. A suspensão foi transferida para um tubo de 5 ml e sonicada em gelo durante 1 min. Fez-se uma diluição a 1:100 e determinou-se a concentração de proteína usando o processo Bradford (Bradford, Analytic Biochemistry, 72: 248-254 (1976)). As preparações de membranas foram guardadas congeladas em quanti-



dades de 0,2 ml num congelador Reveo (-70°C).

O ratinho recebeu sete (7) injeções (inj.) como se segue:

1ª inj: 100 µg de preparação de membranas a + 100 µg de muramildipeptideo (MDP)/50 µl + 50 µl de adjuvante incompleto ou Freund dado subcutaneamente (s.c.) em 4 sitios;

2ª inj.: 100 µg de preparação de membranas dada s.c. em 4 sitios;

3ª inj.: 100 µg de membranas dada intraperitonealmente (i.p.);

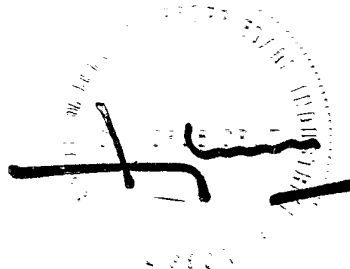
4ª inj.: 100 µg de membranas dado i.p. e s.c. em 4 sitios;

5ª inj.: 10^7 células 3347 dado i.p. e s.c. em 4 sitios;

6ª inj.: 10^7 células 3347 dado i.p. e s.c. em 4 sitios;

7ª inj.: 10^6 células 3347 dado i.p. e s.c. em 4 sitios.

Três dias após a última imunização, o baço foi removido e as células de baço foram suspensas em meio de cultura. As células do baço foram então fundidas com células ATCC CRL 1580. P3 x 63- Ag 8. 653, usando polietilenoglicol (PEG) e a suspensão de células foi cultivada em cavidades de microtitulação em meio reactivo HAT como descrito por Yeh et al.,

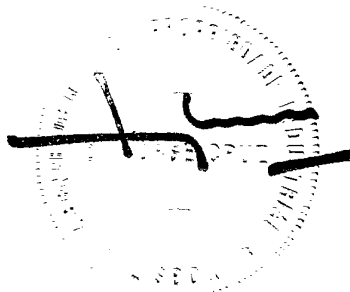


Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) supra. A mistura foi semeada para formar culturas de baixa densidade derivadas de células fundidas individuais ou clones.

Ensaaios de Ligação

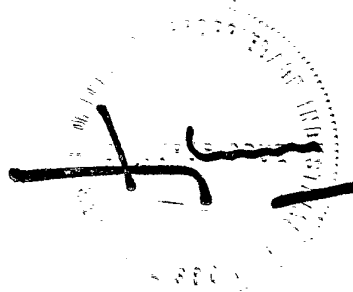
Os sobrenadantes destas culturas de hibridomas foram então despistados quanto à actividade de ligação directa na linha celular de cancro do colón 3347, usando um ensaio de ELISA semelhante ao descrito por Donillard et al., meth. Enzymol. 52:168-74 (1983). De acordo com este ensaio, o antigénio (com o qual é reactivo o anticorpo a ser despistado) é imobilizado em placas de microtitulação e depois incubado com sobrenadantes de hibridomas. Se um sobrenadante possuir o anticorpo pretendido, o anticorpo ligar-se-à ao antigénio imobilizado e é detectado pela adição de um conjugado de anticorpo anti-imunoglobulina-enzima e um substracto para a enzima que dê uma alteração mensurável da densidade óptica.

Para este exemplo, células de cancro do colón foram distribuídas por uma placa de cultura de tecidos de 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) e incubadas durante a noite numa câmara húmida a 37°C (5% CO₂). As células foram então fixadas com 100 µl de gluturaldeído a 1,0% preparado de fresco para uma concentração final de 0,5% e incubadas durante 15 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem três vezes com PBS 1 x.



As células foram em seguida bloqueadas durante 2 hr com BSA a 5% em PBS e lavadas novamente três vezes com PBS. Os sobrenadantes das culturas de hibridomas foram então adicionados a 100 μ l/cavidade, as cavidades foram incubadas durante 1 hr., à temperatura ambiente e as células lavadas três vezes com PBS. Em seguida peroxidase de rábano silvestre conjugado com anticorpos de cabra anti-ratinho (Zymed, CA) diluída em BSA a 0,1% e PBS foi adicionada para uma concentração de 100 μ l/cavidade. A mistura de reacção foi incubada durante 1 h à temperatura ambiente ou durante 30 min., a 37°C e as células foram então lavadas três vezes com PBS. Adicionou-se então o-fenilenodiamina (OPD) a 100 μ l/cavidade e as placas incubadas no escuro à temperatura ambiente durante 5-45 minutos. A ligação do anticorpo às células foi detectada por uma alteração de cor nas cavidades que ocorrem dentro de 10-20 minutos. A reacção foi parada pela adição de 100 μ l (cavidade de H_2SO_4 e a absorvância lida num leitor de Microelisa Dynatech (Alexandria, VA) a 492 nm.

Em seguida o anticorpo foi testado num ensaio fluorescente usando células 3347 ligadas a lamelas e coradas com fluorescência. As células 3347 em cultura foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades com lamelas de vidro esterilizadas a uma densidade de 1 a 2×10^5 células por cavidade e deixadas a crescer até 75-90% da confluência. As células foram fixadas com paraformaldeído a 3% durante cinco minutos e depois lavadas com tampão de ligação. Adicionou-se 250 μ l de anticorpo contendo sobrenadante diluído a 1:2 com tampão de ligação a cada cavidade e incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente ou a 37°C. As células foram então lavadas três vezes. Em seguida adicionou-se 250 μ l de uma diluição óptima de FITC conjugado com anticorpos de cabra



anti-IgG de ratinho a cada cavidade e incubou-se como anteriormente. O passo de lavagem foi então repetido e as lamelas removidas e montadas em lâminas de microscópio. Os padrões de coloração foram lidos usando um microscópio de fluorescência.

Os sobrenadantes das cavidades positivas na linha de células de carcinoma do colón nos ensaios de ELISA e de fluorescência foram posteriormente testados por tecnologia de imuno-histologia em sedimentos de células 3347, tecido de carcinoma do colón e tecidos normais do rim, fígado, e baço como descrito no Exemplo II, infra.

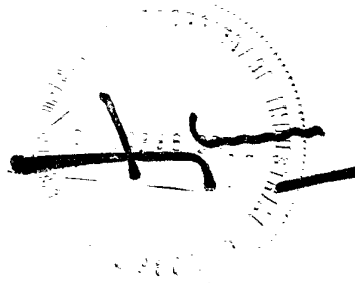
Deve-se notar que o ensaio de ELISA pode ser efectuado usando células intactas ou antígeno solúvel purificado ou extractos celulares como antígeno imobilizado. Quando o antígeno solúvel ou extractos de células foram usados como antígeno, o antígeno foi inicialmente semeado a 50 μ l/cavidade com PBS e as placas incubadas durante a noite à temperatura ambiente antes do começo do ensaio. Quando se usa células intactas como antígeno, elas podem ser usadas frescas ou após fixação. Em ambos os casos, as células foram inicialmente semeadas a 10^4 células a 100 μ l/cavidade em meio de cultura e incubadas durante a noite ou até à confluência numa estufa a 37°C (5% CO₂).

Os hibridomas que produziram anticorpos apresentando ligação à linha celular de cancro do colón e não nos tecidos normais foram pois seleccionados, clonados, expandidos in vitro e ainda testados quanto à especificidade dos anticorpos. Os hibridomas que produziram anticorpos reactivos com cancro do colon humano foram reclonados, expandidos e injectados com artinhos BALB/c



com 3 meses de idade previamente injectados com pristano onde elas cresceram como tumores de ascites.

Seguindo este processo, a linha celular de hibridoma C1 foi obtida, clonada e injectada em ratinhos para se desenvolverem como tumor de ascites. Conforme descrito atrás, o hibridoma C1 foi depositado na ATCC. O anticorpo secretado para as ascites foi purificado em proteina A ou proteina G-Sepharose (ver, e.g. Ey et al., Immunochemistry, 15:429-436 (1978)) ou por filtração em gel de Sephacryl S-300. O anticorpo C1 purificado foi usado para posterior caracterização.



EXEMPLO II

Caracterização do Anticorpo Monoclonal C1 Determinação do Isotipo

Para determinar a classe de imunoglobulina produzida pelo hibridoma C1, foram utilizadas as seguintes técnicas:

a) Imunodifusão Onchterlony

Uma amostra de sobrenadante das células de hibridoma C1 foi colocada na cavidade central de uma placa de agar a 25%. Anticorpos mono-especificos de coelho anti-isotipos de Ig de ratinho (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) foram colocados nas cavidades externas e a placa foi incubada durante 24-48 h a 37°C. Leu-se então as linhas de precipitação.

b) Isotipagem por ELISA

Placas de 0,6 cavidades Immulon Dynatech foram revestidas com anticropos de cabra anti-Ig de ratinho numa concentração de 1 µg/ml, 50 µl/cavidade em PBS e deixadas cobertas durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas com PBS/Tween 20, 0,05%. Após lavagem das placas, os sobrenadantes do hibridoma C1 foram adicionados e incubados à temperatura ambiente durante 1 hr. Após lavagem com PBS/Tween 20 contendo albumina de soro bovina

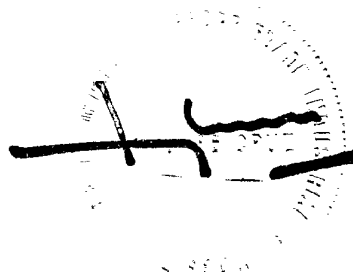


(BSA), as placas foram incubadas a 37°C durante 2 hr., com anticorpos mono-especificos de cabra anti-isotipo de Ig de ratinho acoplados a peroxidase (Zymed). Após lavagem, as placas foram incubadas com 1 mg/ml de o-fenilenodiamina e 0,03% de H_2O_2 em tampão citrato 0,1M, pH 4,5. A densidade óptica a 490 e 630 nm foi determinada num leitor de placas de ELISA Dynatec.

Com base nestes processos, determinou-se que o anticorpo monoclonal Cl é do isotipo IgG1.

Características de Ligação do Anticorpo Monoclonal Cl

A localização subcelular do antígeno foi determinada por medição da ligação do anticorpo a células antes ou após permeabilização com detergente não iónico. Os anticorpos que se ligam à superfície celular de células intactas em cultura foram identificados por fluorescência directa usando o analisador de células activadas por fluorescência (FACS) como descrito por Hellstrom et al., Cancer Research, 46: 3817-3923 (1986). Resumidamente para as análises de ligação usando um analisador de células FACS, 1×10^6 células cultivadas foram colocadas em 15% de soro fetal bovino (FBS) em meio IMDM (Gibco, Grand Island, NY) para um volume total de 500 μ l / tubo. As células foram centrifugadas durante 1,5 min., numa Serofuge e removido o sobrenadante 100 μ l do anticorpo monoclonal Cl a 10 μ g/ml e marcado com ficoeritrina foi adicionado a cada tubo, e conteúdo dos quais foi então misturado e incubado em gelo durante 30 min. A mistura de



reacção foi lavada três vezes com 1 ml de 15% FBS/IMDM por centrifugação durante 1,5 min numa Serofuge (os tubos foram invertidos sobre papel absorvente após a terceira lavagem), cada sedimento foi ressuspenso em 500 μ l de PBS. Cada uma das amostras foi analisada num FACS Coulter Epics C e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi determinada. A partir da MFI determinou-se o equivalente de fluorescência linear (LFE). O LFE de cada amostra a testar dividido pelo LFE de uma testemunha negativa deu uma razão entre a luminosidade das células coradas por anticorpo específico e anticorpos testemunha (1,0 = nenhuma diferença na fluorescência, 2,0 = fluorescência duas vezes mais brilhante, etc.) . Na Tabela I abaixo estão apresentados os resultados de ligação. A ficoeritrina foi usada como um conjugado fluorescente quando as tentativas para conjugar o anticorpo C1 com FITC foram inglórias.

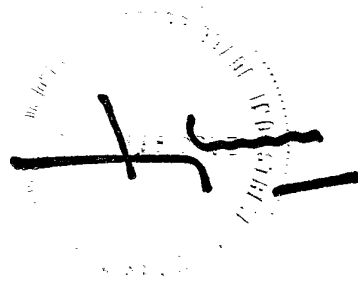


Tabela I

Ligação do anticorpo Cl a várias linhas celulares

<u>Linhas Celulares</u>	<u>Taxa de ligação do anticorpo Cl</u>
Carcinoma (ca.) do colón RCA	2,6
Ca. colón 3347	76,0
Ca. pulmão 2964	14,1
Ca. pulmão 2981	12,4
Ca. pulmão 3606	2,4
Ca. mama 3464	2,8
Melanoma 3620	1,0
Melanoma 2669	7,4
Melanoma 3614	3,7
Células do sangue periférico	1,0
Linfócitos T CEM	1,0
Linfócitos T Molt-4	1,0
Linfoma B ByHR-1	1,1

Tal como a Tabela 1 demonstra pois o anticorpo monoclonal Cl reagiu com linhas celulares de carcinoma do pulmão e do colón, mas não reagiu com linhas celulares de linfoma T ou B nem com leucócitos de sangue periférico normal. Foi também observada reactividade fraca com 2 de 3 linhas de melanoma.

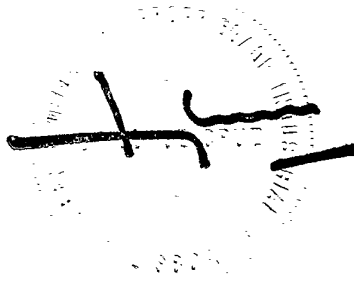


Imuno-histologia

A técnica PAP de L.A. Sternberger como descrito em Immunochemistry, pág. 104-69, John Wiley & Sons, New York, (1979), como modificada por Garrigues et al., Int. J. Cancer, 29: 511-15 (1982), foi usada para estudos imuno-histológicos em secções congeladas de tecidos.

As secções de tecido para estes testes foram obtidas em cirurgia e congeladas dentro de 4 hr após remoção usando isopentano pré-arrefecido em azoto liquido. Os tecidos foram então guardados em azoto liquido ou a -70°C até serem usados. Repararam-se secções congeladas, secaram-se ao ar, trataram-se com acetona e secaram-se novamente (ver Garrigues, et al., supra). As secções a serem usadas para avaliação histológica foram coradas com hematoxilina. Para diminuir os fundos inespecificos, as secções foram pré-incubadas com soro humano normal diluído 1/5 em PBS (ver Garrigues et al., supra). Os anticorpos de ratinho, anticorpos de coelho anti-IgG de ratinho e PAP de ratinho foram diluídos numa solução de 10% de soro humano normal e 3% de soro de coelho. Anticorpos de coelho anti-IgG de ratinho (Stenberger-Meyer Immunochemicals, Inc., Jarettsville, MD) foi usado numa diluição de 1/50. Os complexos peroxidase-antiperoxidase de ratinho (PAP, Sternberger-Meyer Immunochemicals, Inc.) contendo 2 mg/ml de PAP especificamente purificado foram usados numa diluição de 1/80.

O processo de coloração consistiu no tratamento de secções seriadas com anticorpo específico, i.e., Cl, ou com um anticorpo testemunha durante 2,5 hr., incubando as secções durante 30 min., à temperatura

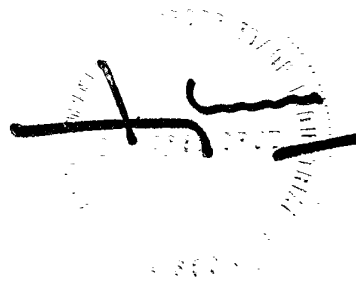


ambiente com anticorpos de coelho anti-IgG de ratinho diluído 1/50 e depois expondo as secções a complexos PAP diluídos 1/80 durante 30 min., à temperatura ambiente. Após cada um dos tratamentos com anticorpo, os cortes foram lavados duas vezes em PBS.

A reacção imuno-histoquímica foi desenvolvida pela adição de 3,3'-diaminobenzidina-tetra-hidrocloreto a 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) e 0,01% H_2O_2 tampão Tris 0,05M, pH 7,6, durante 8 min. (ver Hellstrom et al., J. Immunol, 127:57-60 (1981)) Posterior exposição a uma solução de OsO_4 a 1% em água destilada durante 20 min., intensificou a coloração. As secções foram lavadas com água, desidratadas em álcool colocadas em xileno e montadas em lâminas. Secções paralelas foram coradas com hematoxilina.

Os cortes foram avaliados de acordo com códigos e as amostras codificadas foram observadas por investigadores independentes. Os cortes tipicos foram fotografados usando óptica de contraste por interferência diferencial (Zeiss-Normaski). O grau de coloração com anticorpos foi avaliado em o (nenhuma reactividade), + (algumas células fracamente psitivas), ++ (pelo menos um terço das células positivas), +++ (a maior parte das células positivas), ++++ (todas as células fortemente positivas).

Devido às diferenças entre coloração + e o serem menos claras do que entre coloração + e ++ numa coloração classificada como ++ ou superior foi considerada "positiva". Células neoplásicas e de estroma foram observadas nas amostras de tumor. A coloração registada é a das células tumorais devido às células de estroma não corarem de todo ou corarem muito mais fracamente do que as células tumorais.



A Tabela 2 abaixo apresenta a coloração imuno-histológica de várias amostras de tecido tumoral e normal usando o anticorpo monoclonal Cl. Como a Tabela claramente demonstra o anticorpo Cl reage com carcinomas humanos do colón e do pulmão mas não de modo detectável com células de carcinoma da mama ou melanoma; a única amostra de carcinoma do ovário testada era positiva. O anticorpo Cl não mostra reactividade com qualquer uma de uma série de tecidos humanos normais testados.

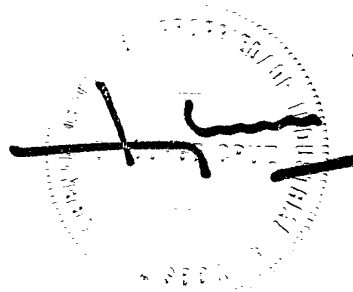


Tabela 2

Coloração com imunoperoxidase de amostras de tumores e de tecidos normais com o anticorpo monoclonal C1

Tipo de tecido

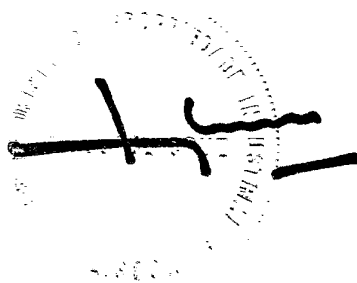
Ligação do anticorpo

(Número de Tumores Positivos/
Número total de tumores testados).

Carcinoma (ca.) do colón (ca.)	9/9
Ca. do pulmão	12/17
Ca. da mama	0/14
Ca. do ovário	1/1
Melanoma	0/6
Sarcoma	1/5

Tecidos normais:

Baço	0/4
Rim	0/5
Fígado	0/3
Coração	0/2
Ovário	0/1
Adrenais	0/2
Testiculos	0/2
Mama	0/2
Amígdala	0/1
pele	0/5
Pulmão	0/5



Tecidos normais: (Cont.)

Cólon	0 / 7
Cérebro	0 / 2
Tiróide	0 / 2
Nódulos	
Linfáticos	0 / 3
Retina	0 / 1
Pancreas	0 / 2

EXEMPLO III

Antigénio C1 Reconhecido pela Purificação com Anticorpos C1

O antigénio C1 foi isolado a partir de células do carcinoma do cólon 3347 e a partir de células de carcinoma do pulmão 2964 e parcialmente purificado por cromatografia de imunoafinidade. O antigénio C1 foi purificado até à homogeneidade por SDS-PAGE e recuperado dos géis de SDS-poliacrilamida por electro-eluição ou electrotransferência para membranas.

Após electroforese, o gel de SDS-poliacrilamida foi corado com Coomassie Brilliant Blue e descorado. A banda de antigénio C1 corada ($M_r = 66\ 000$) foi retirada com uma lâmina de barbear e subme-

1111

—

1

—

1

A sequência amino-terminal do antígeno Cl foi comparada contra as seguintes bases de dados:

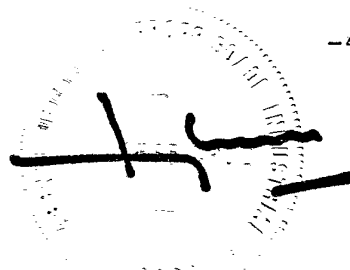
<u>Número de sequências</u>		
1. PIR	(Saida 18.0 Set. 1988)	8 588
2. GEN BANK	(Saida 57.0, Set. 1988)	19 044
3. NEW	(30 de Novembro, 1988)	4 148
4. DIF	(30 de Novembro, 1988)	2 610
5. SWISSPROT	(30 de Novembro, 1988)	7 724
6. LOSPRO	(30 de Novembro, 1988)	11 343

A comparação de sequências não revelou concordâncias significativas com qualquer outra sequência conhecida.

Caracterização imunológica

Análise de transferências Western

O antígeno Cl purificado por imunoafinidade foi sujeito a SDS-PAGE (10% de acrilamida) e eletrotransferido para membrana de nitrocelulose



(Schleicher and Schuell, Keene, NH), como descrito por Towbin et al., em Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) 76:4350-4354 (1979). O antígeno Cl foi imunodetectado usando anticorpos de coelho anti-IgG de ratinho conjugados com fosfatase alcalina como segundo anticorpo (ICN Biomedicals Lisle, IL) e fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo sal de p-toluidina e cloreto de p-nitro azul tetrazolina como cromogénios (BioRad laboratories). A imunodeteção revelou que a banda principal na Mr = 66 000 foi especificamente corada com o anticorpo Cl.

Radioimunoprecipitação

Células 3347 foram marcadas metabolicamente com ^3H -glucosamina por incubação em meio RPMI 1640 (RPMI 1640 sem glucose) suplementado com 10% de soro fetal bovino dialisado durante 4 hr a 37°C. O sedimento de células foi extraído com tampão 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40 PMSF (10 µg/ml) aprotimina (10 µg/ml). O antígeno Cl foi imunoprecipitado por incubação do lisado celular com anticorpo Cl durante 1 hr a 4°C. O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado com anticorpos de cabra anti-IgG de ratinho e Pansorbin (Calbiochem, San Diego, CA). O imunoprecipitado lavado foi analisado por SDS-PAGE em condições não redutoras e redutoras e visualizado por fluorografia após impregnação do gel com EN³HANCETM.

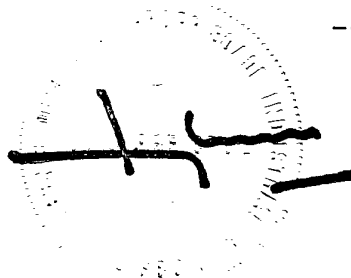
Células 2964, células 2707 células CH₃T₂ e células 2981, todas derivadas de adenocarcinomas do pulmão, foram marcadas na superfície com ^{125}I pelo método da lactoperoxidase descrito por Vitetta et al

A handwritten signature in black ink is positioned over a circular stamp. The signature consists of a series of loops and a long horizontal stroke. The stamp is faint and appears to be a library or archival mark.

em J. Exp. med., 134: 242-264 (1971). O antígeno Cl foi imunoprecipitado a partir de lisados celulares marcados com ^{125}I com o anticorpo Cl, anticorpos de cabra anti-IgG de ratinho e Pansorbin. Os imunoprecipitados foram analisados por SDS-PAGE em condições não redutoras e visualizados por autoradiografia.

O anticorpo Cl precipita especificamente o antígeno Cl com uma Mr de aproximadamente 66 000 a 68 000. Estes dados demonstram que o determinante antigénico reconhecido pelo anticorpo monoclonal Cl está localizado numa glicoproteína de cadeia única com uma Mr de aproximadamente 66 000. O antígeno Cl está associado a uma variedade de células tumorais, particularmente tumores do tipo carcinoma do pulmão e do cólon.

É óbvio que podem ser feitas muitas modificações e variações deste invento como estabelecido atrás sem que se afastem do espírito e âmbito do invento. As realizações específicas descritas são dadas apenas como exemplo e o invento está limitado apenas pelos termos das reivindicações apensas.



REIVINDICAÇÕES:

1a. - Anticorpo monoclonal produzido por linha celular de hibridoma ATCC No. HB 9803 caracterizado por se ligar a um sitio determinante num antigénio glicorpoteína da superficie celular de células de tumores humanos e equivalentes funcionais, fragmentos de ligação e imunocomplexos do referido anticorpo.

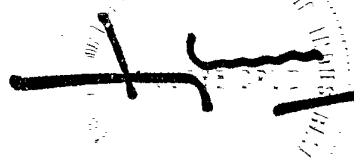
2a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as referidas células de tumor serem células de carcinoma.

3a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as referidas células de carcinoma serem seleccionadas do grupo constituido por células de carcinoma do pulmão e do cólon.

4a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser conjugado com uma marca capaz de produzir um sinal detectável.

5a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a marca ser seleccionada do grupo constituido por um radionucleico uma enzima, um agente fluorescente e um cromóforo.

6a. - Anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma ATCC No. HB 9803 caracterizado por se ligar a um sitio determinante celular num antigénio glicoproteína da superficie celular de células de tumores humanos, o referido antigénio sendo caracte-



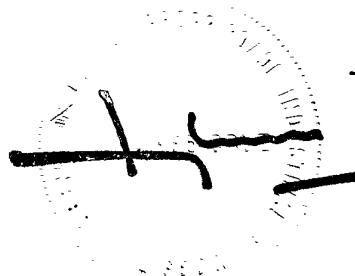
rizado por um peso molecular de aproximadamente 66000 daltons, conforme determinado por electroforese em gel de poliacrilamida e tendo uma sequência de aminoácidos amino-terminal como se segue:

1	5	10	15	20
X	E	L	T	I
L	H	T	N	D
V	H	S	R	L
E	Q	T	S	X

em que X representa um aminoácido não identificado e equivalentes funcionais, fragmentos de ligação e imunocomplexos do referido anticorpo.

7a. - Processo para a preparação de uma composição para o tratamento de tumores caracterizado por compreender a mistura de uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo da reivindicação 6 com um veículo parenteral farmacêuticamente aceitável.

8a. - Anticorpo monoclonal caracterizado por ser produzida uma linha celular de hibridoma formada pela fusão de uma célula de mieloma e uma célula capaz de produzir anticorpo que se liga a um determinante num antigénio glicoproteico da superfície celular de células de tumores humanos, o referido antigénio tendo um peso molecular de aproximadamente 66000 daltons conforme determinado por electroforese em gel de poliacrilamida e tendo uma sequência de aminoácidos amino-terminal como se segue:



1 5 10 15 20
X-E-L-T-I-L-H-T-N-D-V-H-S-R-L-E-Q-T-S-X

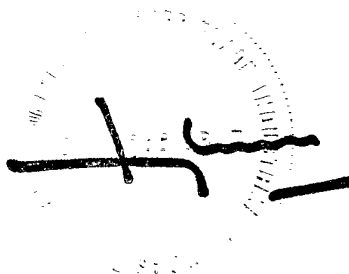
em que X representa um aminoácido não identificado e equivalentes funcionais, fragmentos de ligação e imunocomplexos do referido anticorpo.

9a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por cada classe IgG.

10a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por ser da subclasse IgG1.

11a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por ser um anticorpo murino.

12a. - Anticorpo monoclonal reactivo caracterizado por ser um sitio determinante num antigénio glicoproteína da superfície celular associado a células de tumores humanos, o referido antigénio sendo caracterizado por um peso molecular de aproximadamente 66000 daltons como determinado por electroforese em gel de poliacrilamida e tendo uma sequência de aminoácidos amino-terminal como se segue:



1 5 10 15 20
X-E-L-T-I-L-H-T-N-D-V-H-S-R-L-E-Q-T-S-X

em que X representa um aminoácido não identificado e equivalentes funcionais, fragmentos de ligação e imunocomplexos do referido anticorpo.

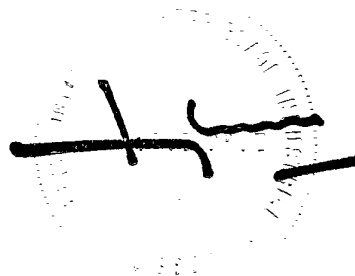
13a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por consistir no anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma ATCC No. HB 9803.

14a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser um anticorpo humano.

15a. - Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser um anticorpo ratinho-humano.

16a. - Processo para a preparação de uma composição para o tratamento de tumores caracterizado por compreender uma mistura de uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo da reivindicação 12 em associação com um veículo parenteral farmacêuticamente aceitável.

17a. - Imunoensaio para a detecção de tumores humanos caracterizado por compreender:



a) Combinação de um anticorpo monoclonal reactivo com um antigénio glicoproteína de superficie celular associado a células de tumores humanos, o referido antigénio sendo caracterizado por um peso molecular de cerca de 66000 daltons conforme determinado por electroforese em gel de poliacrilamida e tendo uma sequência de aminoácidos amino-terminal como se segue:

1	5	10	15	20
X-E-L-T-I-L-H-T-N-D-V-H-S-R-L-E-Q-T-S-X				

em que X representa um aminoácido não identificado, com uma amostra de células tumorais e o referido anticorpo marcado de modo a poder ser detectado; e

b) ensaio da ligação do referido anticorpo monoclonal marcado a células tumorais ao referido antigénio.

18a. - Imunoensaio de acordo com a reivindicação 17 caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser o anticorpo produzido pela linha celular de hibridoma ATCC Hb 9803.

19a. - Imunoensaio de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o referido anticorpo ser marcado com uma marca seleccionada do grupo constituido por um radionuclídeo, uma enzima, um agente fluorescente e um cromóforo.

20a.- Método para a detecção de tumores caracterizado por compreender o contacto do anticorpo monoclonal da reivindicação 1, 6, 8 ou 12, com uma amostra de tecido ou fluido humano e detecção da interacção do referido anticorpo com quaisquer células tumorais antigénicamente correspondentes ou sem determinantes antigénicos na referida amostra sendo a gama de dosagem desde 1 a cerca de 5000 mg/m².

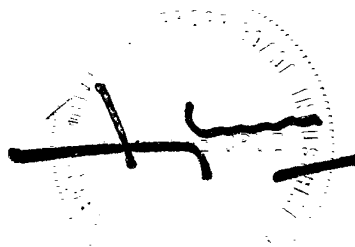
21a.- Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por as referidas células tumorais serem células do carcinoma do pulmão e o tecido humano é tecido do pulmão

22a.- Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por as referidas células de tumor serem células de carcinoma do colon e o tecido humano ser tecido de colon.

23a.- Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por a interacção do referido anticorpo monoclonal com as referidas células tumorais ser detectada por coloração imuno-histológica.

24a.- Método para localização de tumores humanos caracterizado por compreender:

- a) purificação do anticorpo monoclonal de acordo com as reivindicações 1, 6, 8, ou 12;
- b) radiomarcção do referido anticorpo;



c) administração do referido anticorpo a um paciente humano num veículo apropriado; e

d) localização do anticorpo monoclonal através de cintigrafia externa, emissão tomográfica ou exploração radionuclear.

25a. - Método de imunoterapia para o tratamento de tumores, caracterizado por compreender:

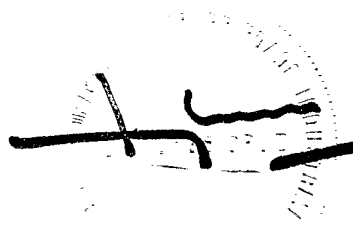
a) purificação do anticorpo monoclonal de acordo com as reivindicações 1, 6, 8 ou 12;

b) conjugação do referido anticorpo monoclonal com um agente citotóxico, uma toxina ou um radiofarmacêutico; e

c) administração do referido anticorpo monoclonal conjugado num paciente humano com um tumor, num veículo apropriado.

26a. - Método de acordo com a reivindicação 25 caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser um anticorpo anti-idiotipo.

27a. - Linha celular contínua caracterizado por produzir um anticorpo monoclonal, sendo o referido anticorpo monoclonal caracterizado pela capacidade de ligação a um sítio determinante numa antigénio glicoproteína de superfície celular de células de carcinoma

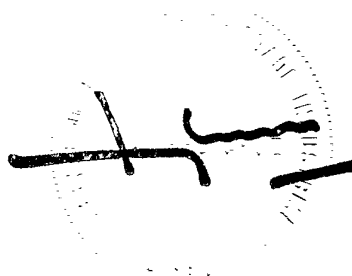


humanas, o qual se caracteriza por um hibridoma, de um linfócito derivado de um ratinho imunizado em células de carcinoma ou um seu determinante imunogénico e uma célula de mieloma de ratinho.

28a. - Linha celular continua caracterizado por produzir um anticorpo monoclonal, o referido anticorpo monoclonal sendo caracterizado pela capacidade de ligação a um sitio determinante num antigénio glicoproteína de superficie celular de células de carcinoma humano, o qual se caracteriza por: um hibridoma de um linfócito derivado de um ser humano com carcinoma e uma célula de mieloma.

29a. - Linha celular de hibridoma ATCC No. 9803 caracterizado por ser produtora de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a um determinante num antigénio glicoproteína de superficie celular.

30a. - Linha celular de hibridoma ATCC No. HB 9803 caracterizado por ser formada por fusão de uma célula de mieloma de ratinho P3 X 63-Ag 8.653 ATCC CRL 1580, com um esplenócito obtido a partir de um ratinho BALB/c imunizado com células H3059 de adenocarcinoma a qual produz um anticorpo monoclonal que se liga a um determinante de antigénio glicoproteína de superficie celular de células de tumores humanos tendo um peso molecular de aproximadamente 66000 daltons e tendo uma sequência de aminoácidos amino-terminal como se segue:



1 5 10 15 20
X-E-L-T-I-L-H-T-N-D-V-H-S-R-L-E-Q-T-S-X

em que X representa um aminoácido não identificado conforme determinado por electroforese em gel de poliacrilamida.

31a. - Linha celular contínua caracterizado por produzir um anticorpo monoclonal sendo caracterizado pela capacidade de ligação a um sitio determinante num antigénio glicoproteína da superfície celular associado a células tumorais, o referido antigénio tendo um peso molecular de aproximadamente 66000 daltons e tendo uma sequência de aminoácidos amino-terminal como se segue:

1 5 10 15 20
X-E-L-T-I-L-H-T-N-D-V-H-S-R-L-E-Q-T-S-X

em que X representa um aminoácido não identificado, o qual compreende: um hibridoma de um linfócito capaz de produzir anticorpo contra o referido antigénio e uma célula de mieloma.

32a. - Antigénio glicoproteico na forma substancialmente pura, o referido antigénio sendo derivado de células de tumores humanos e tendo um peso molecular de aproximadamente 66000 daltons conforme determinado por electroforese em gel de poliacrilamida e tendo uma sequência de aminoácidos amino-terminal como se segue:

1 5 10 15 20
X-E-L-T-I-L-H-T-N-D-V-H-S-R-L-E-Q-T-S-X-

em que X representa um aminoácido não identificado e imuno-complexos deste antigénio.

33a.- Processo para a preparação de uma vacina para usar na imunização contra tumores caracterizado por incluir na referida vacina um vírus recombinante incluindo o DNA codificador do antigénio da reivindicação 32.

34a.- Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado por o referido vírus é o vírus da vaccinia.

35a.- Método para imunização contra tumores caracterizado por compreender a administração numa quantidade terapêuticamente eficaz de cerca de 10^7 a 10^8 unidades formadoras de placas/ml de vacina da reivindicação 34.

Lisboa, 16 de Abril de 1990



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA