



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 240 215 A5

4(51) C 12 N 5/02
A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N / 280 120 0
(31) 8421944
8515538(22) 29.08.85
(32) 30.08.84
19.06.85(44) 22.10.86
(33) GB

(71) siehe (73)

(72) Rosenfelder, Günter, Dr., DE; Towbin, Harry, Dr., CH; Braun, Dietmar, Prof. Dr., DE

(73) Ciba-Geigy AG, 4002 Basel, CH

(54) Monoklonale Antikörper gegen Glycokonjugate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendung

(57) Die Erfindung betrifft neue monoklonale Antikörper gegen Zellmembran-Glycokonjugate. Ziel der Erfindung ist ein Antikörper und ein Verfahren zu seiner Herstellung, der eine gewünschte Spezifität aufweist. Erfindungsgemäß werden monoklonale Antikörper hergestellt, die sich an durch Epithelzellen produzierte neutrale Glycosphingolipide binden, sowie ihre Derivate wie Antikörperfragmente, radioaktiv markierte monoklonale Antikörper und Konjugate der monoklonalen Antikörper mit Zelltoxinen, Radionuklid-Komplexbildnern oder Enzymen. Des weiteren wird ein Verfahren zur Darstellung der Antikörper und ihrer Derivate, Hybridom-Zelllinien, die diese Antikörper ausscheiden, sowie ein Verfahren zur Erzeugung solcher Hybridome beschrieben. Des weiteren werden pharmazeutische Zubereitungen, die die monoklonalen Antikörper oder ihre Derivate enthalten, für die Anwendung in der Krebsdiagnose und -behandlung angegeben.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper und ihrer Derivate, die sich an von Epithelzellen gebildete neutrale Glycosphingolipide binden, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen, die die genannten monoklonalen Antikörper abscheiden,
 - a) in vitro kultiviert und die monoklonalen Antikörper aus der überstehenden Flüssigkeit der Kultur isoliert werden oder
 - b) in vivo in einem geeigneten Säugetier fortgepflanzt werden und die monoklonalen Antikörper aus den Körperflüssigkeiten der genannten Säugetiere gewonnen werden, und, wenn gewünscht,
 - c) die erhaltenen monoklonalen Antikörper in ein Derivat überführt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen aus Balb/c-Mäusen, intraperitoneal Balb/c-Mäusen, die mit einem Kohlenwasserstoff vorbehandelt sein können, injiziert werden, nach einer oder zwei Wochen die Aszitesflüssigkeit dieser Mäuse gewonnen wird und daraus die monoklonalen Antikörper durch Ausfällen mit Ammoniumsulfat und/oder durch chromatographische Standardmethoden isoliert werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die monoklonalen Antikörper und ihre Derivate sich an von malignen Epithelzellen gebildete neutrale Glycosphingolipide binden.
4. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die monoklonalen Antikörper und ihre Derivate sich an von Mammakarzinomzellen gebildete neutrale Glycosphingolipide binden.
5. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß monoklonale Antikörper und ihre Derivate sich an aus Meconium gewonnene neutrale Glycosphingolipide binden.
6. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung 1018S19.11, 1018S69.4, 1021S11.28 und 1022S25.17 und ihre Derivate hergestellt werden.
7. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung 1018S19.11, 1018S69.4, 1021S11.28 und 1022S25.17 hergestellt werden.
8. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung 1022S.23.24 und seine Derivate hergestellt werden.
9. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung 1022S.23.24 hergestellt werden.
10. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen verwendet werden, die hergestellt werden, indem ein geeignetes Säugetier mit einem Glycosphingolipidgemisch oder einem antigenen Derivat davon immunisiert wird, antikörperproduzierende Zellen dieses Säugetieres mit Myelomzellen verschmolzen werden, die bei der Verschmelzung erhaltenen Hybridzellen kloniert werden und die Zellklone, die die gewünschten Antikörper ausscheiden, selektiert werden.
11. Verfahren nach Punkt 1 oder 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen verwendet werden, die hergestellt werden, indem eine Maus oder Ratte mit einem Glycosphingolipidgemisch oder einem antigenen Derivat davon immunisiert wird und B-Lymphozyten dieses Tieres mit syngenen Mäuse- oder Ratten-Myelomzellen verschmolzen werden.
12. Verfahren nach Punkt 1, 10 oder 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen verwendet werden, die hergestellt werden, indem Balb/c-Mäuse mit an Salmonella minnesota R 595-Rohmutanten adsorbierten Glycosphingolipidgemischen durch drei bis acht parenterale Injektionen, die 100 bis 500 µg Glycosphingolipidgemisch enthalten, in Intervallen von einem bis zehn Tagen immunisiert werden, Milzzellen der immunisierten Mäuse zwei bis fünf Tage nach der letzten Aktivierungsinjektion entnommen werden und diese Zellen mit Myelomzellen einer geeigneten Zelllinie in Gegenwart eines Fusionspromotors verschmolzen werden.
13. Verfahren nach Punkt 1, 10 oder 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen verwendet werden, die hergestellt werden, indem antikörpererzeugende Zellen aus immunisierten Balb/c-Mäusen mit Myelomzellen der Zelllinien X63-Ag8.653 oder Sp2/0-Ag14 verschmolzen werden.
14. Verfahren nach Punkt 1, 10 oder 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen verwendet werden, die hergestellt werden, indem die Myelomzellen mit einem drei- bis zwanzigfachen Überschuß von Milzzellen aus immunisierten Säugetieren in einer Lösung, die etwa 30 % bis etwa 60 % Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 4000 enthält, verschmolzen werden.
15. Verfahren nach Punkt 1 oder 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen verwendet werden, die ein- oder mehrmals durch Grenzverdünnung kloniert worden sind.
16. Verfahren nach Punkt 1 oder 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen der Zelllinien mit der Bezeichnung 1018S19.11, 1022S25.17, 1021S11.28 und 1018S69.4, die bei der „Collection Nationale de Cultures de Microorganismes“, Institut Pasteur, Paris, unter der Nummer I-331, I-332, I-333 und I-334 deponiert sind, verwendet werden.
17. Verfahren nach Punkt 1 oder 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß Hybridomzellen der Zelllinien mit der Bezeichnung 1022S23.24, die bei der „Collection Nationale de Cultures de Microorganismes“, Institut Pasteur, Paris, unter der Nummer I-453 deponiert ist, verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft neue monoklonale Antikörper gegen Zellmembran-Glycokonjugate, ihre Derivate, ein Verfahren zur Herstellung dieser Antikörper und ihrer Derivate, Hybridom-Zelllinien, die diese Antikörper ausscheiden, ein Verfahren zur Erzeugung solcher Hybridome, pharmazeutische Zubereitungen, die die monoklonalen Antikörper oder ihre Derivate enthalten, und die Verwendung der monoklonalen Antikörper und ihrer Derivate in der Krebsdiagnose und -behandlung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Glycokonjugate sind Biomoleküle, die eine Kohlenhydratfunktion enthalten, z.B. Glycolipide wie Glycosphingolipide, N- oder O-glycosylierte Glycoproteine und Proteoglycane. Glycosphingolipide (GSL) und Glycoproteine sind für einige der vielen Funktionen biologischer Membranen verantwortlich.

Glycosphingolipide bestehen aus drei Grundstruktureinheiten: einer Base, einer Fettsäure und einem Kohlenhydrat. Der Lipidteil des GSL enthält einen langkettigen Aminoalkohol, meistens Sphingosin, an den eine Fettsäure über eine Amidbindung gebunden ist. Diese Struktur wird als Ceramid bezeichnet. Die hydrophile Kohlenhydrateinheit ist über eine glycosidische Bindung an die primäre Hydroxygruppe des Sphingosins gebunden. Das Kohlenhydrat ist ein Monosaccharid oder üblicherweise ein Polysaccharid, das aus D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose, L-Fucose, N-Acetyl-D-glycosamin, N-Acetyl-D-galactosamin und/oder N-Acetyl-neuraminsäure (Sialsäure) zusammengesetzt ist. Solche Kohlenhydratreste werden oft auch als Komponenten von Membran-Glycoproteinen gefunden. Glycosphingolipide sind normalerweise im Außenblatt der Plasmamembran zu finden. Ihnen werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Sie verleihen den Membranen Strukturfestigkeit, sind am Ionentransport durch die Membranen beteiligt, üben Rezeptorfunktionen gegenüber Glycoprotein-hormonen, Lymphokinen, Bakterientoxinen und ähnlichem aus und sind Antigene der Zelloberfläche und Markierer, die am Zellwachstum und der Zellwechselwirkung beteiligt sind. Letztere Eigenschaft wurde im Zusammenhang mit der Tumorgenese und Metastasie untersucht. Veränderungen der GSL-Zusammensetzung sind von Malignität begleitet, und einige ganz bestimmte GSL-Antigene werden nur in Tumoren gefunden.

Mit dem Ziel, wertvolle Werkzeuge für die Tumordiagnostik und Immuntherapie zu erhalten, wurden Antikörper gegen Tumorzell-Oberflächenstrukturen einschließlich dieser Antigen-Glycosphingolipide gezüchtet. Hakomori (Bulletin du Cancer, Paris, **70**, 118 [1983]) berichtet über Glycolipidveränderungen im Zusammenhang mit onkogenen Veränderungen und die Verwendung monoklonaler Antikörper in diesem Zusammenhang.

In der DE-OS 3 228 233 wird die Verwendung des Antikörpers R-24 für die Behandlung von Tumoren bei Menschen beschrieben. Dieser Antikörper wurde gegen maligne Melanomzellen gezüchtet und ist spezifisch für ein Antigen, das als Gangliosid identifiziert wurde, d. h. ein Glycosphingolipid, das Sialsäure enthält. Einige der in der US-PS 4 444 744 beschriebenen Antikörper, die gegen carcino-embryonisches Antigen gezüchtet wurden, oder der in der EP-PS 37 953 beschriebenen Antikörper, die gegen maligne Nierenzellen wirken sollen, können auch spezifisch gegen Glycosphingolipide sein, die sich als integrale Komponenten der Zelloberflächenmembrane erwiesen haben. Wegen der Verwandtschaft des Kohlenhydratrestes der Glycosphingolipide und der Membran-Glycoproteine können gegen Glycolipide gezüchtete Antikörper auch auf Glycoproteine ansprechen und umgekehrt.

Die Hybridomtechnik von Köhler und Milstein (Nature **256**, 495 [1975]) ermöglicht es, homogene Populationen von hochspezifischen Antikörpern, sogenannten monoklonalen Antikörpern, reproduzierbar und in theoretisch unbegrenzter Menge aus Zellkulturen herzustellen. Die Verschmelzung von Myelomzellen mit Antikörper abscheidenden Lymphozyten aus der Milz eines vorher mit einem speziellen Antigen immunisierten Säugetieres mit einem bestimmten Antigen liefert Hybridzellen, die die Fähigkeit der unbegrenzten Reproduktion und des unbegrenzten Wachstums in vitro mit der Fähigkeit der Milzzellen zur Erzeugung von Antikörpern vereinigen. Daher ist es möglich, das Gegenmittel eines einzelnen Organismus auf ein spezifisches Antigen zu isolieren und zu verbreiten und monoklonale Antikörper durch Dauerkultur von Hybridzellen in vitro zu erzeugen. Obwohl die allgemeine Technik im Grundsatz wohl bekannt ist, gibt es viele Schwierigkeiten und notwendige Variationen für jeden Einzelfall. Es ist bisher nicht gesichert, daß das gewünschte Hybridom erhalten wird, daß es genetisch stabil ist und Antikörper erzeugt und daß die so erzeugten Antikörper die gewünschte Spezifität haben. Die Erfolgsrate wird prinzipiell beeinflusst durch Typ und Reinheit des bei der Immunisierung verwendeten Antigens, die Immunisierungsmethode, die Technik der Zellverschmelzung und vor allem durch die Auswahlmethode spezieller Hybridomzellklone.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, Antikörper zu schaffen, die eine gewünschte Spezifität zur Behandlung von Zellmembran-Glycokonjugaten aufweisen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue monoklonale Antikörper und ihre Derivate für die Tumordiagnostik und Tumorbekämpfung sowie Verfahren zur Herstellung zu entwickeln.

Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen neuen monoklonalen Antikörper und ihre Derivate, die sich an neutrale, von Epithelzellen gebildete Glycosphingolipide binden, gute Mittel zur Tumordiagnostik und Tumorbekämpfung darstellen. Spezielle erfindungsgemäße monoklonale Antikörper und ihre Derivate sind solche, die sich an neutrale Glycosphingolipide binden, die von malignen Epithelzellen, wie Brust-, Lungen- oder Darmkrebszellen, speziell von Brustkrebszellen, gebildet werden. Bevorzugt sind dabei monoklonale Antikörper und ihre Derivate, die sich an neutrale Glycosphingolipide binden, die aus Meconium erhalten wurden.

Speziell bevorzugt sind die monoklonalen Antikörper mit der Bezeichnung 1018S19.11, 1018S69.4, 1021S11.28, 1022S25.17 und 1022S23.24 und ihre Derivate, insbesondere jedoch die monoklonalen Antikörper selbst.

Erfindungsgemäße Derivate der monoklonalen Antikörper sind z. B. Antikörperfragmente, radioaktiv markierte monoklonale Antikörper und Konjugate der monoklonalen Antikörper mit Zelltoxinen, Radionuklid-Komplexbildnern oder Enzymen. Fragmente der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper sind z. B. Fab, Fab' oder F(ab')₂-Fragmente, die ihre Spezifität für die Antigen determinanten beibehalten, d. h. die das charakteristische Bindungsmuster des zugrundeliegenden monoklonalen Antikörpers an Glycosphingolipidgemische beibehalten.

Radioaktiv markierte monoklonale Antikörper enthalten z. B. radioaktives Iod (¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I), radioaktiven Kohlenstoff (¹⁴C), Schwefel (³⁵S), Tritium (³H) usw. Bevorzugt sind mit radioaktivem Iod markierte monoklonale Antikörper.

Antikörperkonjugate sind z. B. Konjugate erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper oder ihrer Fragmente mit zytotoxischen und karzinostatischen Mitteln, wie der A-Kette von Ricin oder verwandten Peptiden, Adriamycin, Methotrexat, Vincristin, Daunomycin, 6-Mercapto-purin, Cytosin, Arabinosid, Cyclophosphamid usw. oder Konjugate mit Metallocenen oder Metallchelaten wie Dextranamin, Polyalkylenimininen mit Carbonsäure- oder Phosphonsäureresten, z. B.

Diethylentriaminpentaessigsäure usw., bei denen das Metallchelate als Metall ein Radionuclid enthält, z. B. ¹¹³In, ¹¹¹In, ²⁰⁷Pb, ⁴⁶Sc, ¹⁹⁵Pt, ⁵⁷Ni, ⁵⁷Co, ⁹⁷Ru, ⁹⁹Ru oder ⁹⁹Tc oder Konjugate mit Enzymen wie Meerrettichperoxydase, Alkaliphosphatase, β-D-

Galactosidase, Glucose-oxidase, Glucoamylase, Carboanhydrase, Acetylcholinesterase, Lysozym, Malatdehydrogenase oder Glucose-6-phosphatdehydrogenase. In solchen Konjugaten ist der Antikörper direkt oder über eine Zwischengruppe an das Zelltoxin, den Radionuklid-Komplexbildner oder das Enzym gebunden. Bevorzugt sind Konjugate monoklonaler Antikörper mit zytotoxischen Mitteln, die durch einen der in der EP-PS 88695 beschriebenen Serum-Komplementenzyme gespalten werden können.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper und ihre Derivate binden sich an von Epithelzellen gebildete neutrale Glycosphingolipide. Solche Glycosphingolipide können in der Zellmembran der Epithelzellen eingelagert sein oder können aus diesen in die Körperflüssigkeiten freigesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper und ihre Derivate werden nach bekannten Verfahren erhalten, wobei die Hybridomzellen, die die genannten monoklonalen Antikörper ausscheiden,

- a) in vitro kultiviert und die monoklonalen Antikörper aus der überstehenden Flüssigkeit der Kultur gewonnen werden, oder
- b) in vivo in einem geeigneten Säugetier fortgepflanzt werden und die monoklonalen Antikörper aus den Körperflüssigkeiten des genannten Säugetiers gewonnen werden, und, wenn gewünscht,
- c) die erhaltenen monoklonalen Antikörper in ein Derivat überführt werden.

Geeignete Kulturmedien für die Kultur in vitro sind Standard-Kulturmedien, wie Dulbecco's Modified Eagle Medium oder das Medium RPMI 1640, gegebenenfalls unter Zusatz eines Säugetierserums, z. B. Kälberfötenserum. Die Isolierung der monoklonalen Antikörper erfolgt durch Ausfällen des in der überstehenden Flüssigkeit der Kultur enthaltenen Proteins mit Ammoniumsulfat oder ähnlichem und anschließende Reinigung der Immunglobuline durch chromatographische Standardmethoden, wie Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, Chromatographie an DEAE-Cellulose oder Immunaффinitätschromatographie.

Große Mengen der gewünschten erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können durch Fortpflanzung von Hybridomzellen in vivo-Verfahren erhalten werden. Die Zellklone werden syngeneten Säugetieren injiziert, wodurch Antikörper erzeugende Tumoren wachsen. Nach ein bis drei Wochen werden die gewünschten monoklonalen Antikörper aus den Körperflüssigkeiten des genannten Säugetiers gewonnen. Als Beispiel werden Hybridomzellen von Balb/c-Mäusen intraperitoneal Balb/c-Mäusen injiziert, die mit einem Kohlenwasserstoff wie Pristan vorbehandelt sein können. Nach ein bis zwei Wochen wird Aszitesflüssigkeit von diesen Mäusen gewonnen. Die gewünschten monoklonalen Antikörper werden aus den Körperflüssigkeiten nach bekannten Methoden isoliert, z. B. durch Ausfällung der Proteine mit Ammoniumsulfat oder ähnlichem und anschließende Reinigung der Immunglobuline durch chromatographische Standardverfahren, wie vorher beschrieben.

Fragmente monoklonaler Antikörper, z. B. Fab-, Fab'- oder F(ab')₂-Fragmente, die ihre Spezifität gegenüber den antigenen Determinanten der Glycosphingolipide beibehalten, können aus den erhaltenen monoklonalen Antikörpern z. B. durch Digestion mit Enzymen wie Pepsin oder Papain und/oder Spaltung der Disulfidbindungen durch chemische Reaktion erhalten werden.

Mit radioaktivem Iod markierte monoklonale Antikörper werden nach bekannten Iodierungsmethoden dargestellt, z. B. durch Markierung monoklonaler Antikörper mit radioaktivem Natrium- oder Kaliumiodid in Gegenwart eines chemischen Oxydationsmittels wie Natriumhypochlorit, Chloramin T usw. oder eines enzymatischen Oxydationsmittels, wie Lactoperoxydase oder Glucoseoxydase und Glucose. Radioaktiv markierte monoklonale Antikörper der Erfindung werden auch durch Zugabe radioaktiv markierter Nährstoffe zu den Kulturmedien der invitro-Kultur erhalten. Solche markierten Nährstoffe enthalten z. B. radioaktiven Kohlenstoff (¹⁴C), Tritium (³H), Schwefel (³⁵S) oder andere, und sind z. B. L-(¹⁴C)-Leucin, L-(³H)-Leucin oder L-(³⁵S)-Methionin.

Konjugate der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper werden nach bekannten Methoden hergestellt, z. B. durch Umsetzung eines nach den beschriebenen Verfahren hergestellten monoklonalen Antikörpers oder eines wie oben beschrieben hergestellten Fragments davon mit dem gewünschten Konjugationspartner, d. h. der zytotoxischen oder karzinostatischen Verbindung, dem komplexbildenden Metallchelate oder dem Enzym in Gegenwart eines Kupplungsmittels, z. B. Glutaraldehyd, Periodat, N,N'-(o-Phenyl)dimaldehyd, N-(m-Maleinimido-benzoyloxy)succinimid, N-[3-(Pyrid-2-ylthio)propionyloxy]succinimid, N-Ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid oder ähnliches. Zur Darstellung der bevorzugten Konjugate monoklonaler Antikörper mit zytotoxischen Mitteln, die über eine Zwischengruppe verbunden sind, die durch eines der Serum-Komplementenzyme gespalten werden kann, wird eine der in der EP-PS 88695 beschriebenen Methoden angewendet.

Die Erfindung umfaßt ferner Hybridom-Zelllinien, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie monoklonale Antikörper ausscheiden, die sich an neutrale Glycosphingolipide binden, welche von Epithelzellen erzeugt werden.

Speziell sind solche Zelllinien gemeint, die Hybride von Myelomzellen und B-Lymphozyten eines mit Glycosphingolipiden immunisierten Säugetiers darstellen. Vorzugsweise stellen diese Zelllinien Hybride von Mäuse- oder Ratten-Myelomzellen und B-Lymphozyten einer synergenen Maus oder Ratte dar, die mit Glycosphingolipiden immunisiert wurden.

Speziell bevorzugt sind die Hybridomzelllinien mit der Bezeichnung 1018S19.11, 1022S25.17, 1021S11.28 und 1018S69.4, die am 16. August 1984, und die Hybridomzelllinie 1022S23.24, die am 31. Mai 1985 bei der „Collection Nationale de Cultures de Microorganismes“, Institut Pasteur, Paris, unter den Nummern I-331, I-332, I-333, I-334 und I-453 hinterlegt wurden. Diese Hybridomzelllinien sind Hybride der Mäusemyelomzelllinie Sp2/0-Ag14 und der B-Lymphozyten der Milz von mit Glycosphingolipiden immunisierten Mäusen. Es sind stabile Zelllinien, die die monoklonalen Antikörper mit der Bezeichnung 1018S19.11, 1022S25.17, 1021S11.28, 1018S69.4 und 1022S23.24 ausscheiden. Die Zelllinien können in tiefgefrorenen Kulturen aufbewahrt werden und durch Auftauen und gegebenenfalls durch Reklonierung reaktiviert werden.

Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von Hybridom-Zelllinien, die monoklonale Antikörper ausscheiden, welche sich an von Epithelzellen produzierte neutrale Glycosphingolipide binden. Dabei wird ein geeignetes Säugetier mit einem Glycosphingolipidgemisch oder einem antigenen Derivat davon immunisiert, Antikörper erzeugende Zellen dieses Säugetiers mit Myelomzellen verschmolzen, die bei der Verschmelzung erhaltenen Hybridzellen kloniert und die Zellklone, die die gewünschten Antikörper ausscheiden, gewonnen.

Geeignete Antigene für die Immunisierung von Säugetieren in dem erfindungsgemäßen Verfahren sind Glycosphingolipid-(GSL-)Gemische und/oder Konjugate dieser GSL-Gemische mit immunogenen Trägern. Die GSL-Gemische werden nach bekannten Methoden erhalten, z. B. durch Lösungsmittelextraktion mit Lösungsmittelgemischen, die einen niederen Alkohol, z. B. Methanol, und ein niederes Halogenalkan, z. B. Chloroform, und fakultativ Wasser enthalten, aus verschiedenen Geweben, wie Brust, Leber, Niere, Milz und Tonsillengewebe, auch Tumorgewebe, z. B. Mammakarzinom, Lungentumoren und ähnlichem, aus Erythrozyten und anderen Zellquellen, z. B. Meconium, d. h. den Faeces von Neugeborenen, die mit einem organischen Lösungsmittel, wie Aceton, vorbehandelt werden können, um gespeichertes Fett zu entfernen. Bevorzugte Quellen von GSL-Gemischen sind Gewebe humanen Ursprungs, speziell maligne Gewebe, wie Mammakarzinom-Biopsiematerial oder Meconium. Die rohen GSL-Extrakte können durch Lösungsmittelverteilung zwischen Wasser, das anorganische Salze wie Natrium- oder Kaliumchlorid enthalten kann, und anorganischen Lösungsmittelgemischen, die einen niederen Alkohol wie Methanol und ein niederes Halogenalkan wie Chloroform enthalten, und/oder durch chromatographische Methoden, z. B. durch Säulenchromatographie an Silicagel mit normalen oder umgekehrten Phasen, an Ionenaustauscherharz oder ähnlichem angereichert und gereinigt werden.

Bevorzugt sind GSL-Gemische, die aus mit Aceton vorbehandeltem Mammakarzinom oder aus Meconium durch Extraktion mit Methanol-Chloroform-Wasser-Gemischen, Lösungsmittelverteilung zwischen Wasser und Methanol/Chloroform und Chromatographie an Silicagel mit umgekehrten Phasen erhalten werden.

Antigene Konjugate von GSL-Gemischen mit immunogenen Trägern sind Konjugate z. B. mit hochmolekularen Polypeptiden wie Serumalbumin, Latexteilchen, ganzen Zellen oder Bakterien. Sie werden nach bekannten Methoden hergestellt, entweder durch Adsorption des GSL an den Träger oder durch Kupplung mit Hilfe von Carbodiimiden, Periodat, Glutaraldehyd, N,N'-(o-Phenyl)dimaleinimid, N-(m-Maleinimido-benzoyloxy)-succinimid, N-[3-(Pyrid-2-yl-dithio)propionyloxy]succinimid oder ähnlichem. Bevorzugte Antigene sind GSL-Gemische, die an Bakterien adsorbiert sind, speziell an Bakterien mit einer lipophilen Oberfläche, wie Salmonella minnesota R 595-Rohmutantenbakterien. Das Verhältnis des Trockengewichts von Salmonella minnesota R 595 zum Gewicht der GSL-Gemische beträgt vorzugsweise zwischen 2:1 und 10:1.

Bevorzugte Säugetiere für die Immunisierung sind Mäuse oder Ratten, speziell Balb/c-Mäuse. Die Immunisierung erfolgt z. B. durch drei- bis achtmalige parenterale Injektion von GSL-Konjugaten, z. B. intraperitoneal und/oder subkutan, in Abständen von 1 bis 10 Tagen in Mengen von etwa 100 µg bis etwa 500 µg, berechnet auf reines GSL-Gemisch, und eine nachfolgende Aktivierungsinjektion von etwa 300 µg bis etwa 600 µg GSL nach zwei bis acht Wochen. Die Injektionen können ein Adjuvans enthalten, das die Lymphozytenproduktion stimuliert, z. B. vollständiges oder unvollständiges Freund's Adjuvans. Ein Adjuvans ist unbedingt erforderlich, wenn unkonjugierte GSL-Gemische und keine GSL-Konjugate injiziert werden. Für Injektionen von auf Bakterien adsorbierten GSL-Gemischen werden keine zusätzlichen Adjuvantien benötigt.

Antikörper erzeugende Zellen der immunisierten Säugetiere, vorzugsweise Milzzellen, die zwei bis fünf Tage nach der abschließenden Aktivierungsinjektion entnommen werden, werden mit Myelomzellen einer geeigneten Zelllinie in Gegenwart eines Fusionspromotors verschmolzen. Einige geeignete Myelom-Zelllinien sind in der Literatur beschrieben. Bevorzugt sind Myelom-Zelllinien, denen das Enzym Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase (HGPRT) oder das Enzym Thymidinkinase (TK) fehlt, die daher in einem selektiven Kulturmedium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (HAT-Medium), nicht überleben. Speziell bevorzugt sind Myelomzellen und abgeleitete Zelllinien, die nicht in HAT-Medium überleben und keine Immunglobuline oder Fragmente davon ausscheiden, wie die Zelllinien X63-Ag8.653 oder Sp2/0-Ag14. In die Untersuchung einbezogene Fusionspromotoren sind z. B. Sendai-Virus oder andere Paramyxoviren, gegebenenfalls in UV-inaktivierter Form, Calciumionen, oberflächenaktive Lipide wie Lysolecithin, oder Polyethylenglycol. Vorzugsweise werden die Myelomzellen mit einem drei- bis zwanzigfachen Überschuß von Milzzellen immunisierter Säugetiere in einer Lösung, die zwischen etwa 30% und etwa 60% Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 4000 enthält, verschmolzen.

Nach der Verschmelzung werden die Zellen in selektivem HAT-Medium erneut suspendiert und kultiviert. Dabei überleben nur Hybridomzellen, weil sie die von den Myelomzellen geerbte Fähigkeit zum Wachstum und zur Vermehrung in vitro und das von den Antikörper erzeugenden Milzzellen der immunisierten Säugetiere geerbte Fehlen der HGPRT- oder TK-Gene, das für das Überleben in dem HAT-Medium wesentlich ist, in sich vereinen.

Geeignete Kulturmedien für die Fortpflanzung von Hybridomzellen sind die Standard-Kulturmedien, wie Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium, Minimum-essential-Medium, RPMI-1640-Medium und ähnliches, gegebenenfalls unter Zusatz von Serum, z. B. 10 bis 15%iges Kälberfötenserum. Vorzugsweise werden zum Beginn des Zellwachstums Futterzellen zugegeben, z. B. normale Mäuseperitoneal-Exsudatzellen, Milzzellen, Makrophagen des Knochenmarks und ähnliches. Die Kulturmedien werden in regelmäßigen Abständen mit selektivem HAT-Medium aufgefüllt, um zu verhindern, daß die normalen Myelomzellen die Hybridomzellen überwuchern.

Die überstehende Flüssigkeit der Hybridomzellkultur wird auf die gewünschten monoklonalen Antikörper geprüft, vorzugsweise durch Enzym-Immunoassay oder Radioimmunoassay, z. B. durch GSL-Löschblatttest. Positive Hybridomzellen werden kloniert, z. B. durch Grenzverdünnung, vorzugsweise zweimal oder öfter. Die klonierten Zelllinien werden in üblicher Weise eingefroren.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper und/oder ihre Derivate sind für die qualitative und quantitative Bestimmung und/oder Reinigung von Glycokonjugaten aus Epithelzellmembranen nützlich.

So können beispielsweise die monoklonalen Antikörper oder ihre Derivate, wie Enzymkonjugate oder radioaktive Derivate, bei jeder bekannten Immunbestimmung, die auf der Bindungs-Wechselwirkung zwischen der Antigen-Determinante, wie z. B. eines Glycosphingolipids, und den monoklonalen Antikörpern beruht, verwendet werden. Beispiele solcher Bestimmungen sind Radioimmunbestimmungen, Enzymimmunbestimmungen, Immunfluoreszenz, Latexagglutination und Hämagglutination. Solche Immunbestimmungen sind z. B. bei der Diagnose onkologischer Veränderungen, die zu einer qualitativen und quantitativen Veränderung von Glycokonjugatgehalts von Epithelzellmembranen führt, verwendbar.

Glycokonjugate, wie z. B. Glycoproteine, aus Epithelzellmembranen können durch Immunaффinitätschromatographie mit Hilfe der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gereinigt werden. Die monoklonalen Antikörper oder ihre Fragmente werden an einen geeigneten Träger organischen oder anorganischen Ursprungs gebunden, wie vernetzte Agarose, Dextran oder Polyacrylamid in geeigneter funktionalisierter Form, gegebenenfalls nach Aktivierung, unter Verwendung bekannter allgemeiner Methoden. Beispielsweise wird ein Träger, der aktivierte Esterfunktionen enthält, in einer wäßrigen Pufferlösung suspendiert, mit einer Lösung eines monoklonalen Antikörpers oder eines Fragments davon gemischt, filtriert, erneut suspendiert, zur Entfernung überschüssigen monoklonalen Antikörpers gewaschen und mit einer Lösung irrelevanter Proteine behandelt, um freie reaktive Stellen des Trägers zu blockieren. Dieser mit Antikörpern bedeckte Träger wird zur selektiven Bindung von Glycokonjugaten aus Epithelzellmembranen verwendet. Die Desorption mit verschiedenen Pufferlösungen, die zusätzliche anorganische Salze enthalten können, liefert dann Fraktionen, die die interessierenden Glycokonjugate in gereinigter Form enthalten.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper und/oder ihre Derivate sind ferner in der Krebsdiagnose und -behandlung nützlich.

Beispielsweise können radioaktiv markierte Derivate der monoklonalen Antikörper zur Auffindung von Primärtumoren und Metastasen in Säugetieren durch Radioscanning-Verfahren dienen. Dazu wird der radioaktive Antikörper z. B. intravenös injiziert und das Säugetier mit einem Gamma-Abtaster in regelmäßigen Abständen abgetastet. Tumore, die antigene GSL ausscheiden, nehmen mehr radioaktive Antikörper auf als andere Gewebe und sind auf dem Gamma-Tomogramm klar zu erkennen. Für Radioscanning-Methoden werden vorzugsweise mit ^{131}I markierte monoklonale Antikörper in Mengen von 3–8 µg verwendet, was einer Aktivität von 15–30 µCi je kg Körpergewicht entspricht.

Ferner können die monoklonalen Antikörper selbst und speziell ihre Derivate, wie Konjugate mit zytotoxischen und karzinostatischen Verbindungen zur Krebsbehandlung verwendet werden, speziell für Mamakarzinome, die das antigene GSL ausscheiden. Die therapeutische Dosis für Säugetiere liegt zwischen ca. 1 und 10 mg/kg Körpergewicht für die monoklonalen Antikörper selbst und zwischen 0,1 und 10 mg/kg Körpergewicht für Konjugate mit zytotoxischen Mitteln, je nach dem Zustand des Patienten und der Anwendungsweise.

Die monoklonalen Antikörper und/oder ihre Derivate sind auch zur immunologischen Entfernung von Krebszellen aus Knochenmark-Autotransplantaten verwendbar. Zu diesem Zweck werden Knochenmarkabsaugungen von Patienten, die hohe Dosen von Arzneimitteln und/oder Strahlendosen erhalten, mit den erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern in Gegenwart eines Komplements inkubiert, mit Konjugaten monoklonaler Antikörper mit zytotoxischen Drogen inkubiert oder mit monoklonalen Antikörpern, die mit magnetischen Mikrokugeln konjugiert sind, wie von J. G. Treleaven et al. (Lancet, 1984, 70) beschrieben, behandelt. Diese Behandlung löst antigenes GSL ausscheidende Tumorzellen auf oder entfernt sie, ohne die Knochenmarkstammzellen zu beschädigen, die dann für autologe Transplantationen verwendet werden können.

Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zubereitungen, die monoklonale Antikörper enthalten, welche sich an von Epithelzellen gebildete neutrale Glycosphingolipide binden, oder Derivate davon in einer therapeutisch wirksamen Menge zusammen mit einem festen oder flüssigen organischen oder anorganischen pharmazeutischen Träger.

Bevorzugt sind pharmazeutische Zubereitungen für parenterale Anwendung. Zubereitungen für intramuskuläre, subkutane oder intravenöse Anwendung sind z. B. isotonische wäßrige Lösungen oder Suspensionen, die nach Bedarf kurz vor dem Gebrauch aus lyophilisierten oder konzentrierten Zubereitungen hergestellt werden. Die pharmazeutischen Zubereitungen können sterilisiert sein und Hilfsstoffe enthalten, z. B. zur Konservierung, Stabilisierung, Befeuchtung, Emulgierung oder Solubilisierung der Ingredienzien, Salze zur Regulierung des osmotischen Druckes, Puffer und/oder Verbindungen, die die Viskosität regulieren, z. B. Natrium-carboxycellulose, Dextran, Polyvinylpyrrolidon oder Gelatine. Sie werden nach bekannten Methoden hergestellt, z. B. durch konventionelles Mischen, Lösen oder Lyophilisieren, und enthalten zwischen etwa 0,01 % und etwa 50 % aktiver Bestandteile. Die Zubereitungen für Injektionen werden nach bekannten Methoden unter aseptischen Bedingungen verarbeitet, in Ampullen oder Phiole gefüllt und verschlossen.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachfolgend an Beispielen näher erläutert werden, ohne sie jedoch einzuschränken.

Die in den Beispielen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazol
GSL	Glycosphingolipide
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
TBS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-gepufferte Salzlösung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Beispiel 1**Isolierung und Reinigung polarer Glycosphingolipide aus Mammakarzinom-Biopsiematerial****1.1 Extraktion**

Zellsedimente aus Biopsiegewebeproben, die zur Estrogenrezeptorbestimmung entnommen wurden, wurden von einer großen Anzahl von Patienten mit histologisch bestätigter Diagnose von Mammakarzinom erhalten.

In einem typischen Experiment werden 190 Einzelproben, die als gefrorene Klumpen in Polystyrenröhrchen erhalten wurden, in Trockeneis weiter gekühlt und das Plastmaterial mit einem Hammer zertrümmert. Die gesammelten Sedimente (169 g Naßgewicht) werden gefriergetrocknet und liefern 33 g Trockengewicht. Das Trockenmaterial wird durch mehrmalige Homogenisierung in Aceton bei 4°C in einem Sorval-Gewebemischer und anschließende Filtration vom Vorratsfett befreit. Das verbleibende feste Material enthält noch die Gesamtmenge der polaren Lipide, wie Phospholipide und Glycosphingolipide. Diese werden bei Raumtemperatur dreimal mit 200 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches 2:1 (Vol./Vol.) und zweimal mit 200 ml eines Chloroform/Methanol/Wasser-Gemisches 1:1:0,2 (Vol./Vol./Vol.) extrahiert.

1.2 Folch-Verteilung

Die Gesamtmenge der Phospholipide und derjenigen Glycosphingolipide, die weniger als vier Zucker in der Oligosaccharidkette haben, werden von den polaren Glycosphingolipiden durch ein modifiziertes Verteilungsverfahren nach Folch getrennt (T. Saito und S. Hakomori, J. Lipid Res. **12**, [1971]). Die gesammelten Extrakte von Beispiel 1.1 werden unter vermindertem Druck bei 40°C eingedampft und in 90 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches 2:1 (Vol./Vol.) in einem Glaszylinder mit Stopfen wieder aufgelöst. 15 ml Wasser werden zugegeben und die Lösung heftig geschüttelt. Nach 15minütigem Stehen haben sich die Phasen getrennt. Die untere, chloroformreiche Phase wird dreimal mit einem Chloroform/Methanol/0,1%ige wäßrige KCl-Lösung-Gemisch 1:10:10 (Vol./Vol./Vol.) extrahiert.

1.3 Chromatographie mit umgekehrten Phasen

Zur Entfernung von Salzen und anderen wasserlöslichen Verunreinigungen werden die vereinigten oberen Phasen von Beispiel 1.2 eingedampft, in Wasser aufgenommen und auf eine Glassäule mit 7 ml Lichroprep RP 18 (Merck, BRD) gegeben. Nach gründlichem Waschen mit Wasser wird die polare Glycosphingolipidfraktion mit 10 ml Methanol und danach mit 10 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches 2:1 (Vol./Vol.) eluiert. Die Ausbeute beträgt etwa 30 mg, d. h. 0,1% des Gewebe-Trockengewichts.

1.4 Dünnschichtchromatographie

Die Reinheit des GSL-Präparats wird durch Dünnschichtchromatographie auf Silicagel und anschließendes Besprühen der Platten mit Orcinol/Schwefelsäurereagenz, wobei zuckerhaltige Verbindungen sichtbar gemacht werden (L. Svennerholm, J. Neurochem. **1**, 42 [1956]), oder mit Phosphray (Supelco Inc., Bellefonte, Pa., USA, siehe J. C. Dittmer und R. L. Lester, J. Lipid Res. **5**, 126 [1964]) zum Nachweis von Phospholipiden geprüft. Es werden Silicagel 60-HPTLC-Platten (Größe 5 × 5 cm, Dicke der Sorbenschicht 0,24 mm, Merck, BRD) verwendet. Die Lipidproben werden in 10–20 µl eines Chloroform/Methanol-Gemisches 2:1 (Vol./Vol.) gelöst und auf Streifen von 4 cm Länge mit einem automatischen Probenaufgeber, Modell Linomat III (Camag, Schweiz) aufgebracht. Das Lösungsmittelsystem ist Chloroform/Methanol/Wasser 55:45:10 (Vol./Vol./Vol.) mit 1 mMol CaCl₂. Die entwickelten Platten zeigen das typische Muster von GSL-Gemischen mit Kohlenhydratresten unterschiedlichen Monosaccharidgehalts. Es wurden nur Spuren von Materialien, die kein Glycosphingolipid sind, gefunden.

Beispiel 2**Isolierung und Reinigung von Glycosphingolipiden aus Meconium**

Faeces von Neugeborenen von verschiedenen Individuen werden von Windeln abgeschabt und in genau der gleichen Masse behandelt wie in Beispiel 1 beschrieben mit der Ausnahme, daß die Aceton-Extraktionsstufe von Beispiel 1.1 ausgelassen wird. Die Ausbeute beträgt etwa 0,2% an Trockenmasse. Die Zusammensetzung und Reinheit des Glycosphingolipid-(GSL)-Gemisches wird wie in Beispiel 1.4 beschrieben bestimmt.

Beispiel 3**Erzeugung von Hybridomzellen****3.1 Herstellung des Immunogens**

Gereinigtes GSL von Beispiel 1 oder 2 werden an gefriergetrocknete und mit Essigsäure behandelte Salmonella minnesota R-595-Bakterien (C. Galanos, O. Lüderitz und O. Westphal, Eur. J. Biochem. **24**, 116 [1971]) zur Erhöhung der Immunität der Lipid-Antigene adsorbiert. Zu diesem Zweck werden 50 mg Bakterien (Trockengewicht) in einem 250 ml-Rundkolben in 100 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches 2:1 (Vol./Vol.) mit 10 mg GSL suspendiert. Das Lösungsmittel wird bei Raumtemperatur in einem Rotationsverdampfer bei voller Rotationsgeschwindigkeit eingedampft. Die mit GSL überzogenen Bakterien werden von der Glaswand abgekratzt und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei einer Konzentration von 2,4 mg/ml suspendiert. Unter dem Mikroskop werden unregelmäßig geformte Klumpen und einzelne Bakterien beobachtet.

3.2 Immunisierungskontrolle

4 weiblichen Balb/c-Mäusen wird intraperitoneal je eine Probe von GSL-überzogenen Bakterien, die am 1. Tag 100 µg GSL, am 4. Tag 200 µg, am 7. Tag 300 µg und am 11. Tag 400 µg GSL enthält, injiziert. Am 19. Tag werden die Mäuse orbital zum Bluten gebracht und mit Hilfe des in Beispiel 6 beschriebenen GSL-Löschblatttests auf Anti-GSL-Serumaktivität getestet. Am 36. Tag wird eine Aktivierungsinjektion einer Probe, die 400 µg GSL enthält, gegeben, und 4 Tage später werden die Mäuse getötet.

3.3. Zellverschmelzung

Alle Verschmelzungsexperimente werden nach der Methode von G. Köhler und C. Milstein (Nature **256**, 495 [1975]), unter Verwendung der nichtsekretierenden Myelomlinie Sp 2/0-Ag 14 (M. Shulman, C. D. Wilde und G. Köhler, Nature **276**, 269 [1978]) durchgeführt. 10^8 Milzzellen werden mit 10^7 Myelomzellen in Gegenwart von 1 ml 50%igem Polyethylenglycol (PEG 1500, Serva) gemischt. Nach dem Waschen werden die Zellen in 48 ml Standard Dulbecco's Minimum Essential Medium (Gibco No. 0422501) suspendiert. 15% Kälberfötenserum und 3×10^6 normale Mäuseperitonealexsudatzellen je Verschmelzung werden als Futterzellen zugegeben. Die Zellen werden in achtundvierzig 1 ml-Costar-Gefäße verteilt und 3 bis 4mal wöchentlich mit Standard HAT Selection-Medium 3 bis 6 Wochen lang gefüttert. Wenn das Wachstum der Hybridomzellen sichtbar wird, werden die überstehenden Flüssigkeiten auf ihre Bindung an GSL, wie in Beispiel 6 beschrieben wird, getestet. Die Klonierung der Hybridomzellen erfolgt durch Grenzverdünnung auf Mikrotiterplatten. Die überstehenden Flüssigkeiten werden auf ihre Bindung an GSL in einem Festphasen-Enzymimmunttest, wie in Beispiel 7 beschrieben, getestet. Alle Hybridomlinien werden mindestens einmal kloniert.

Beispiel 4

Isolierung und Reinigung der monoklonalen Antikörper

8 bis 10 Wochen alte Balb/c-Mäuse (Tierfarm Sisseln, Schweiz) werden intraperitoneal mit 0,3 ml Pristan (Aldrich) vorbehandelt. 2 bis 3 Wochen später werden $2 \text{ bis } 5 \times 10^6$ klonierte Hybridomzellen und 0,2 ml Pristan intraperitoneal eingepflegt. Nach 8 bis 10 Tagen wird die Aszitesflüssigkeit gesammelt, bei 800 g zentrifugiert und bei -20°C aufbewahrt. Die aufgetaute Aszitesflüssigkeit wird bei 50000 g 60 Minuten zentrifugiert. Eine an der Oberfläche schwimmende Fettschicht wird vorsichtig entfernt, und die Proteinkonzentration wird auf 10 bis 12 mg/ml eingestellt. Das rohe Immunglobulin wird durch tropfenweise Zugabe von 0,9 Volumenäquivalenten von gesättigtem Ammoniumsulfat bei 0°C ausgefällt, dann in 20 mM eines Tris-HCl/50 mM NaCl-Gemisches (pH-Wert 7,9) gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Durch Chromatographie an DEAE-D52-Cellulose (Whatman) mit einem Puffergradientensystem eines 20 mM Tris-HCl/25-400 mM NaCl-Gemisches, das einen pH-Wert 7,9 hat, wird eine Immunglobulin G-Fraktion erhalten. Das Immunglobulin G wird mit Ammoniumsulfat erneut ausgefällt und in PBS bei einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Elektrophorese an Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) zeigt einen Reinheitsgrad der monoklonalen Antikörper 1018S19.11, 1018S69.4, 1021S11.28, 1022S25.17 und 1022S23.24 von über 95%.

Beispiel 5

Bestimmung der Klasse und Unterklasse der monoklonalen Antikörper

Die Klasse und Unterklasse der durch klonierte Hybridomzellen erzeugten monoklonalen Antikörper wird durch Enzymimmunbestimmung festgestellt. Mikrotiterplatten werden je Vertiefung mit 1 µg eines Kaninchen-Immunglobulinpräparates eines klassen- oder unterklassenspezifischen Serums in 50 µl PBS bedeckt. Das freie Volumen der Plattenvertiefungen wird mit einem Puffer von 1%igem Rinderserumalbumin in PBS mit 0,2% NaN_3 (Gew./Vol.), der einen pH-Wert 7,4 hat, aufgefüllt.

100-µl-Proben, die monoklonale Antikörper enthalten, werden in den Vertiefungen 1 h bis 37°C inkubiert. Die Platten werden mit PBS gewaschen, dann bei 37°C 1 h lang mit einem phosphatasekonjugierten Kaninchen-Immunglobulinpräparat mit derselben Spezifität wie das zum Überziehen der Platten benutzte inkubiert. Das fixierte Enzym wird durch Inkubieren (37°C , 30 min) mit einer Lösung des Enzymsubstrats p-Nitro-phenylphosphat (1 mg/ml in 10%igem Diethanolamin-Puffer, der 0,5 mMol MgCl_2 und 0,02% NaN_3 (Gew./Vol.) enthält, der einen pH-Wert 9,8 hat, entwickelt und die optische Dichte bei 405 nm gemessen.

Beispiel 6

Charakterisierung der Spezifität monoklonaler Antikörper gegen GSL durch GSL-Löschblatttest

Das GSL-Gemisch wird durch Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Platten, wie in Beispiel 1.4 beschrieben, getrennt. Dann wird durch Übertragen des gesamten Musters des getrennten GSL auf Nitrocellulose ein Abbild der Platte hergestellt. Dieser GSL-Löschblatttest ist für Screen-Zwecke besonders geeignet. Speziell werden 100 µg nach Beispiel 1 hergestelltes menschliches Brust-Biopsie-GSL als 10 cm langer Streifen auf eine 5×10 cm große HPTLC-Platte aufgetragen. Nach Trennung in dem Lösungsmittelsystem von Beispiel 1.4 wird die Platte getrocknet. Mit einem weichen Bleistift werden Markierungslinien für eine spätere Orientierung gezogen. Die Platte wird mit einer Lösung eines Isopropylalkohol/Wasser-Gemisches (2:1) besprüht, bis sie eben sichtbar feucht ist, ohne daß sich Tröpfchen an der Oberfläche bilden. Die Platte wird dann sofort 1 min lang auf ein etwas größeres Blatt Nitrocellulose (HAWPOO, Millipore), das mit einer Polyethylenfolie unterlegt ist, gepreßt. Die überstehende Nitrocellulose wird abgeschnitten, und das Abbild wird trocknen gelassen. Das Blatt wird dann mit einer Pufferlösung aus 20 mM Tris-HCl/150 mM NaCl/5 mM MgCl_2 /0,15 mM CaCl_2 , die einen pH-Wert 7,4 (TBS) hat, getränkt. Das Blatt wird dann mit 10% Pferdeserum in TBS 1 h lang bei 40°C inkubiert, um überschüssige Bindungskapazität zu blockieren. Das Blatt wird in 2 mm breite Streifen geschnitten, die alle das gleiche Muster der getrennten GSL enthalten. Die Streifen werden 2 h inkubiert, z. B. mit den Hybridom-Überstandsflüssigkeiten von Beispiel 3.3 in Vielfach-Behälterzeinsätzen (Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, Va., USA), die als geeignete Inkubationsbehälter dienen. Die Streifen werden dreimal 5 min lang mit TBS gewaschen und dann 1 h lang mit einem Konjugat von Meerrettichperoxydase und gegen Mäuse-IgG gerichtetes Schaf-Immunglobulin (Cappel Laboratories Inc., Chochranville, USA), das 500fach mit 10%igem Pferdeserum in TBS (Vol./Vol.) verdünnt ist, inkubiert. Nach Waschen in TBS, wie vorher beschrieben, wird das gebundene Konjugat durch peroxydasekatalysierte Oxydation von 4-Chlor-1-naphthol als eine blaue unlösliche Ablagerung sichtbar gemacht. Das 4-Chlor-1-naphthol wird als 1%ige (Gew./Vol.) Lösung in Dimethylformamid 50fach mit TBS verdünnt. Dann wird Wasserstoffperoxid bis zu einer Endkonzentration von 0,006% (Gew./Vol.) zugegeben. Nach 20 min wird die Reaktion durch Waschen mit Wasser abgebrochen. Im Falle einer positiven Reaktion werden eine oder mehrere Banden sichtbar. Unterschiedliche Färbungsmuster deuten auf das Vorhandensein verschiedener Antikörper hin.

Für den GSL-Löschblatttest zur Charakterisierung einzelner Antikörper werden 5 µg menschliches Brust-Biopsie-GSL aus einer

Beispiel 7**Screen auf Antikörper gegen GSL durch festphasenzymgekoppelte Immunsorbentbestimmung (ELISA)**

Eine Polyvinylchlorid-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wird je Vertiefung mit 200 µg eines GSL-Extraktes von Brustkrebsbiopsiematerial, hergestellt wie in Beispiel 1 und gelöst in 25 µl Ethanol, gefüllt. Es wird getrocknet und dann vollständig mit 1%igem (Vol./Vol.) Pferdeserum in TBS aufgefüllt (Zusammensetzung des TBS wie in Beispiel 6 beschrieben). Nach einer Stunde wird die Platte mit TBS gewaschen. Dann werden 50 µl der auf monoklonale Antikörper zu testenden Lösung zugegeben. Nach 3 h wird die Platte gewaschen und 50 µl eines Reagenzes, das einen enzymgebundenen zweiten Antikörper enthält, zugegeben. Dieses Reagenz besteht aus alkaliphosphate-konjugierten Ziegen-Antikörpern gegen Mäuse-Immunglobuline in 1000facher Verdünnung in 1%igem (Vol./Vol.) Pferdeserum in TBS. Nach 1 h wird die Platte viermal mit TBS gewaschen und mit dem Enzymsubstrat p-Nitrophenyl-phosphat in 10% Diethanolaminpuffer, wie in Beispiel 5 beschrieben, entwickelt.

Beispiel 8**Immunhistochemische Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen GSL**

Kryoschnitt von 5 bis 10 µg werden in üblicher Weise aus gefrierkonservierten oder formalin-fixierten normalen Brust-, Leber-, Nieren-, Milz-, Lungen-, Dickdarm- und Tonsillengewebe und Gewebe von Darm-, Brust- und Lungenkrebs oder Epithelzystentumorgewebe hergestellt. In Paraffin eingebettetes Gewebe ist wegen der Gefahr des Verlustes von GSL beim Inkubieren in alkoholhaltigen Lösungsmitteln nicht geeignet. Die Kryoschnitte werden 5 min bei 50°C getrocknet, 5 min in eiskaltem Aceton entfettet, erneut getrocknet und mit 10%igem (Vol./Vol.) Pferdeserum in PBS vorinkubiert. Nach 30 min werden die Schnitte 5 min mit PBS gewaschen. Dann wird Hybridom-Überstand oder eine andere auf monoklonale Antikörper zu testende Probe (etwa 400 µl, ausreichend zur Bedeckung des Gewebeschnittes) zugegeben. Nach 1 h wird der Schnitt dreimal mit PBS gewaschen und der in Beispiel 6 beschriebene peroxydasekonjugierte zweite Antikörper zugegeben. Nach 30 min werden die Schnitte, die vorher beschrieben, gewaschen und mit 3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC) entwickelt, wobei eine rote Ablagerung entsteht. Die Enzymsubstratlösung besteht aus einer frisch hergestellten und filtrierten Lösung von 4 mg/ml AEC in Dimethylformamid, die 20fach mit Natriumacetatpuffer verdünnt wurde, welcher durch Mischen von 100 Teilen 0,1 M wäßrigem Natriumacetat und 40 Teilen 0,1 M wäßriger Essigsäure hergestellt wurde. Die Wasserstoffperoxiddkonzentration wird auf 0,014% (Gew./Vol.) eingestellt. Die Schnitte werden 15 min im Dunkeln inkubiert, dreimal mit Acetatpuffer gewaschen und getrocknet. Die Schnitte werden in Glycerol-Gelatine mit einem pH-Wert 5,0 eingebettet und unter dem Mikroskop untersucht. Zur Bewertung endogener Peroxydaseaktivität wurden geeignete Kontrollversuche mit Schnitten, die nur mit dem zweiten Antikörper, irrelevanten ersten Antikörper oder überhaupt keinem Antikörper inkubiert wurden, durchgeführt.

Beispiel 9**Anfärben der Zelloberfläche lebender Zellen**

Anhaftende Karzinom-Zelllinien von Brust-, Darm- und Lungenkrebs werden in Kulturplatten mit 96 Vertiefungen nach üblichen Gewebekulturtechnologien gezüchtet. Die Zellen werden mit je 100 µl von Hybridom-Überständen oder anderen auf monoklonale Antikörper zu prüfenden Proben inkubiert, dann gewaschen, mit einem peroxydase-konjugierten zweiten Antikörper inkubiert und, wie in Beispiel 8 beschrieben, mit AEC entwickelt. Um Zellverluste zu vermeiden, müssen die Waschprozesse sorgfältig durchgeführt werden, wobei die Flüssigkeit nicht vollständig entfernt werden darf. Die gefärbten Zellen werden unmittelbar nach dem letzten Waschen und der anschließenden Entwicklung mit AEC unter einem umgekehrten Mikroskop untersucht.

Details über die getesteten Zelllinien können in den folgenden Literaturhinweisen gefunden werden: BT-20: E. Y. Lasfargues und L. Ozzello, J. Natl. Cancer Inst. **21**, 1131 (1958); MCF-7: H. D. Soele et al., J. Natl. Cancer Inst. **51**, 1409 (1973); ZR-75-1: R. Cailleau et al., J. Natl. Cancer Inst. **53**, 661 (1974); MDA-MB 231: L. W. Engel et al., Cancer Res. **38**, 3352 (1978); SW 1222 NU und SW 948 NU: A. Leibovitz in „Human tumor cells in vitro“ (Hrsg. J. Fogh), Plenum Press, New York, 1975, S. 23; A 549: M. Lieber et al., Int. J. Cancer **17**, 62 (1976); MBA 9812: G. J. Todaro, C. Fryling und J. E. DeLarco, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 5258 (1980).

Beispiel 10**Speichelpunktbestimmung**

Das Verfahren ist eine Adaption des bekannten, in der EP-PS 63810 beschriebenen Punkt-Immunbindungsbestimmung auf Speichel als Antigen. Einzeln gesammelte Speichelproben von Spendern bekannter ABO- und Lewis-Blutgruppen werden 10 min auf 100°C erhitzt und 10 min bei 10000g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit (unverdünnt, 1:3 und 1:10 in PBS verdünnt) wird in aliquoten Mengen von 0,2 µl auf Nitrocellulose (mit aufgedrucktem Liniennetz, Millipore, Bedford, MA) aufgebracht. Das Blatt wird mit 10%igem Pferdeserum in BPS 1 h bei 40°C blockiert, in Streifen geschnitten, die jeweils das ganze Spektrum der Speichelproben enthalten, 3 h mit den monoklonalen Antikörpern (1:500 verdünnte Aszitesflüssigkeit aus Beispiel 4 oder Kulturüberstände aus Beispiel 3.3) inkubiert, gewaschen und 1 h mit einem peroxydasegekoppelten Ziegen-Antikörper gegen Mäuse-Immunglobulin (Nordic Laboratories, Tillburg, Niederlande, 1:500 verdünnt) inkubiert. Die Peroxydase wird, wie in Beispiel 6 beschrieben, mit 4-Chlor-1-naphthol und H₂O₂ nachgewiesen.

Beispiel 11**Herstellung eines Konjugats des monoklonalen Antikörpers 1018S19.11 mit Ricin A**

Zu einer gerührten Lösung von 3,0 g monoklonalem Antikörper 1018S19.11 in 1,5 ml PBS bei Raumtemperatur wird eine Lösung von 0,187 mg N-Succinimidyl-3-(pyrid-2-ylthio)propionat (Pharmacia) zugegeben. Nach 30 min wird die Lösung gegen PBS bei 4°C dialysiert. Der aktivierte Antikörper wird mit 0,5 ml einer PBS-Lösung, die 3,0 mg von durch Gelchromatographie an

Sephadex G 25 gereinigtem Ricin A enthält, gemischt und 20 h bei Raumtemperatur gehalten. Das Reaktionsgemisch wird an einer Kolonne mit Sephadex G 100-Gel chromatographiert. Die Fraktionen werden durch Messung der optischen Dichte auf ihren Antikörpergehalt und durch Messung der Inhibitionskraft der Proteinsynthese in einem azellulären System auf Ricin A analysiert. Identische Fraktionen werden vereinigt und liefern etwa 1 mg Konjugat mit durchschnittlich etwa 1,5 Mol Ricin A je Mol Antikörper im Konjugat.

Beispiel 12

Herstellung von mit ^{125}I markiertem Antikörper 1018S19.11

40 µg Antikörper 1018S19.11 werden mit 0,5 mCi (^{125}I)Natriumiodid und Chloramin T nach dem allgemeinen Verfahren von F. C. Greenwood et al., Biochem. J. **89** 114 (1963) iodiert. Das Reaktionsprodukt wird durch Chromatographie an dem Ionenaustauscherharz Bio Rad AG 1 × 8 gereinigt.

Beispiel 13

Lokalisierung von Humantumoren an nackten Mäusen mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern

13.1 Szintigraphie

Transplantierbarer menschlicher Brustkrebs wird subkutan in nackten Mäusen gezüchtet, wie bei H. H. Fiebig und G. W. Löhr, Medwelt $\frac{1}{2}$, 92–106 (1984) beschrieben. Dem Trinkwasser der Mäuse wird Kaliumiodid (0,05%) zugesetzt. Nach 2 Tagen werden 30 µCi (ca. 4 µg) (^{125}I)-markierter Antikörper 1018S19.11 hergestellt wie in Beispiel 12 beschrieben, intravenös verabreicht. 2 bis 10 Tage später wird mit einer Gamma-Kamera nach Anger eine Szintigraphie durchgeführt. Während der Szintigraphie wird das Tier mit 0,04 mg/g Körpergewicht Nembutal (Abbott) anästhesiert. Der radioaktiv markierte Antikörper zeichnet sich auf dem Szintigramm deutlich im Gebiet des makroskopisch sichtbaren Tumors ab. Diese Ansammlung wird mit Regionen der Maus verglichen, von denen man weiß, daß sie tumorfrei sind, und mit Tieren, die mit einem irrelevanten radioaktiv markierten Antikörper behandelt wurden, von dem man weiß, daß er sich nicht an den Tumor bindet.

13.2 Radioaktivität exziserter Organe

Der Grad der Lokalisierung des radioaktiv markierten Antikörpers wird durch direkte Zählung der Radioaktivität des Tumors und einem Vergleich der Radioaktivität anderer Gewebe bestimmt. Die spezifische Radioaktivität (Radioaktivität pro Gewebegewicht in cpm/mg), die in den Organen und Flüssigkeiten eines wie in Beispiel 13.1 beschrieben behandelten Tieres gefunden wird, beträgt 1050 (Brustkrebstumor), 70 (Milz), 107 (Niere), 182 (Lunge), 58 (Darm), 106 (Leber) und 488 (Blut). Diese Zahlen werden auch mit der in Organen und Blut von mit einem irrelevanten radioaktiv markierten Antikörper behandelten Tieren gefundenen spezifischen Radioaktivität verglichen.

13.3 Autoradiographie von Kryoschnitten exziserter Gewebe

Kryoschnitte gleichmäßiger Dicke (10–40 µm) werden aus den exzisierten Organen und Tumoren hergestellt. Die Schnitte werden 5 min bei 50°C getrocknet, 5 min in PBS gewaschen, getrocknet und auf einen Röntgenfilm gelegt (Ultrafilm- ^3H , LKB, Bromma, Schweden). Der Grad der Lokalisierung der Tumore wird nach der Schwärzung des entwickelten Films bewertet, verglichen mit Filmen, die mit normalen Geweben exponiert wurden, und die mit Geweben von Tieren, die mit irrelevanten radioaktiv markierten Antikörpern behandelt wurden, exponiert wurden. Typisch wird bei Filmen, die mit normalem Gewebe exponiert wurden, eine schwache gleichmäßige Schwärzung beobachtet, während bei Filmen, die mit Tumorgeweben von Tieren, wie die in Beispiel 13.1 behandelt wurden, starke, oft fleckige Schwärzung beobachtet wird.

Beispiel 14

Injektionslösung

120 mg gemäß Beispiel 4 hergestellten monoklonalen Antikörpers 1018S19.11 werden in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Lösung wird durch ein Bakterienfilter filtriert und das Filtrat unter aseptischen Bedingungen in eine Ampulle gefüllt. Die Ampulle wird vorzugsweise in der Kälte, beispielsweise bei –20°C, aufbewahrt.

Ebenso werden Ampullen hergestellt, die die monoklonalen Antikörper 1018S69.4, 1021S11.28, 1022S25.17, 1022S23.24 und das Konjugat des Antikörpers 1018S19.11 mit Ricin A (Beispiel 11) enthalten.

Die erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper werden bezüglich ihres Bindungsverhaltens gegenüber Glycosphingolipidgemischen unterschiedlicher Zusammensetzung, ihrer Bindungsfähigkeit gegenüber Gewebeschnitten, der darin enthaltenen Zelltypen normaler und maligner Gewebeproben aus verschiedenen Organen, ihrer Bindungsfähigkeiten gegenüber ganzen Zellen aus manifesten Tumorzelllinien, ihrer Bindungsfähigkeit gegenüber Speichel verschiedener Spender und ihrer Immunglobulinklasse oder Unterklasse analysiert.

Das Bindungsmuster monoklonaler Antikörper an Glycosphingolipid-(GSL)-Gemische kann z. B. durch den sogenannten GSL-Löschblattest bestimmt werden. Die Glycosphingolipidgemische werden nach bekannten Methoden erhalten, z. B. durch Lösungsmittelextraktion, Lösungsmittelverteilung und chromatographische Methoden aus verschiedenen Geweben, wie Brust, Leber, Nieren, Tonsillengewebe, auch Tumorgewebe, z. B. Mammakarzinom, Lungentumoren usw., aus Erythrozyten und anderen Zellquellen, z. B. Meconium, d. h. den Faeces von Neugeborenen. Das GSL-Gemisch wird durch Dünnschichtchromatographie getrennt und das gesamte chromatographische Muster auf Nitrocellulose übertragen. Zu diesem Zweck wird die Dünnschichtplatte mit einem geeigneten Lösungsmittel, wie z. B. einem wäßrigen niederen Alkohol, befeuchtet und auf ein Blatt poröser Nitrocellulose gedrückt. Der erhaltene Abdruck auf Nitrocellulose wird wahlweise in Streifen geschnitten und mit Lösungen monoklonaler Antikörper inkubiert. Die Immunreaktion der Antikörper mit den auf der Nitrocellulose adsorbierten Glycosphingolipiden wird mit bekannten Methoden nachgewiesen, z. B. durch Entwicklung mit einem zweiten Antikörper, der an ein Enzym gebunden ist, und anschließend mit einem Enzymsubstrat oder durch Entwicklung mit einem radioaktiv markierten zweiten Antikörper.

Die monoklonalen Antikörper der Erfindung werden durch GSL-Löschblatttest auf ihr Bindungsmuster gegenüber GSL-Gemischen aus Brusttumor-Biopsiematerialien von 19 Personen analysiert. Die monoklonalen Antikörper der Erfindung binden sich an das GSL in den meisten der untersuchten GSL-Gemische, jedoch nicht an Ganglioside, d. h. sialinsäurehaltiges GSL. Die ungefähre Anzahl der Monosaccharideinheiten der Kohlenhydratkette der antigenen neutralen GSL-Kette ist in der Tabelle angegeben.

Die Bindungsfähigkeit der monoklonalen Antikörper der Erfindung gegenüber verschiedenen Gewebeschnitten und den darin enthaltenen Zelltypen wird nach bekannten Methoden bestimmt, z. B. durch immunhistochemische Einfärbung. Zu diesem Zweck werden Kryoschnitte von normalem Brust-, Leber-, Nieren-, Milz-, Lungen-, Dickdarm- und Tonsillengewebe sowie von Dickdarm-, Brust-, Lungen- und Epithelzysten-Tumorgewebe mit monoklonalen Antikörpern der Erfindung inkubiert und z. B. mit einem enzymkonjugierten zweiten Antikörper entwickelt, welcher auf die monoklonalen Antikörper der Erfindung anspricht und bindet. Eine geeignete Farbreaktion eines Enzymsubstrats macht dann die Immunreaktion der monoklonalen Antikörper mit den in den Zelloberflächenmembranen des Gewebes enthaltenen Glycokonjugaten sichtbar. Ausnahmslos ist die Bindung auf Epithelzellmembranen beschränkt, d. h. sie wird nicht bei Membranen anderer Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelium, Erythrozyten, Lymphozyten, Muskelzellen usw. beobachtet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Die Bindungsfähigkeit der monoklonalen Antikörper der Erfindung gegenüber ganzen Zellen manifester Tumorzelllinien von Mamma-, Dickdarm- und Lungenkrebs wird ebenso, d. h. durch immunhistochemische Einfärbung bestimmt.

Die Bindungsfähigkeit der monoklonalen Antikörper der Erfindung gegenüber Speichel verschiedener Spender mit bekannter ABO und Lewis-Blutgruppe hilft, die vermuteten Beziehungen zwischen antigenen Glycokonjugaten, die an malignen Epithelzellen gefunden werden, und den im Speichel vorhandenen Blutgruppenmerkmalen nachzuweisen, und ist außerdem ein einfaches Mittel zum Nachweis der Nichtidentität der getesteten Antikörper. Der Test basiert auf dem bekannten Punkt-Immunbindungstest mit Speichelpunkten auf Nitrocelluloseblättern unter Verwendung eines zweiten enzymkonjugierten Antikörpers, der auf den monoklonalen Antikörper der Erfindung anspricht und bindet.

Die Immunglobulinklasse und Unterklasse der monoklonalen Antikörper der Erfindung wird nach bekannten Methoden bestimmt, z. B. der Ouchterlony-Technik der Immundiffusion mit klassenspezifischen zweiten Antikörpern.

In den Tabellen bedeuten

- x nicht untersucht
- keine Reaktion
- (+) zweifelhaft
- + schwach
- ++ deutlich

Tabellen

Charakteristik der monoklonalen Antikörper

Bezeichnung des Antikörpers	1018S 19.11	1018S 69.4	1021S 11.28	1022S 25.17	1022S 23.24
Quelle des für die Immunisierung verwendeten Antigens (Beispiel 1 und 2)	Mammakarzinom			Meconium	
Antikörperklasse (Beispiel 5)	IgG ₁	IgG ₃	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG _{2b}
Bindung an GSL aus verschiedenen Mammabiopsien (Beispiel 6)	11/19	17/19	11/16	x	15/16
Ungefähre Anzahl der Monosaccha- ride in antigenem neutralem GSL	5	6	5	5	5
Bindung an Epithelzellen normaler Gewebschnitte (Beispiel 8)					
Brust	3/5	4/5	3/5	5/5	5/5
Leber	0/1	1/1	x	x	x
Niere	0/1	1/1	x	x	x
Milz	0/1	0/1	x	x	x
Lunge	1/1	1/1	1/2	1/2	1/2
Dickdarm	4/5	3/5	4/5	5/5	5/5
Tonsillen	1/1	1/1	x	x	x
Bindung an Epithelzellen von Tumorgewebschnitten (Beispiel 8)					
Dickdarm	11/12	1/3	2/5	5/5	4/4
Brust	4/6	2/4	1/5	2/4	4/4
Lunge	4/11	1/1	x	x	x
Epithelzysten	1/1	1/1	x	x	x
Bindung an Tumorzelllinien (Beispiel 9)					
Brust: BT-20	-	-	+	-	-
MCF-7	-	+	-	-	-
ZR-75-1	(+)	(+)	+	+	(+)
MDA-MB 231	-	-	+	(+)	(+)

Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Bezeichnung des Antikörpers	1018S 19.11	1018S 69.4	1021S 11.28	1022S 25.17	1022S 23.24
Dickdarm: SW 1222 NU	++	++	—	(+)	++
SW 948 NU	++	+	(+)	++	++
Lunge: A 549	—	—	—	—	—
MBA 9812	(+)	—	—	+	+
Bindung an Speichel (Beispiel 10)					
ABO-Blutgruppe der Speichel- spender	A, O	A	—	A, B, O,	A, B, O
Lewis-Gruppe der Speichelspender	a, b	b	—	a, b	a, b

11/19 = 11 von 19 positiv