



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2018/85

(51) Int.Cl.5

C 07 K 15/28

(22) Indleveringsdag: 06 maj 1985

C 12 N 5/18

(41) Alm. tilgængelig: 08 nov 1985

C 12 N 15/06

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 14 nov 1994

C 12 P 21/08

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 07 maj 1984 DE 3416774

(73) Patenthaver: \*BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT; D-3550 Marburg 1, DE

(72) Opfinder: Klaus \*Bosslet; DE, Hans-Harald \*Sedlacek; DE

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou &amp; Co. A/S

(54) Monoklonale antistoffer, epitop, der genkendes deraf, fremgangsmåde til fremstilling af antistofferne samt deres anvendelse i et in vitro-diagnostikum, som bærere for et farmaceutisk virksomt stof og til fremstilling af et terapeutikum

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag:

2018-85

Et monoklonalt antistof, der genkender et protein-antigen (AG 1) med en molekylvægt på  $72 \pm 3$  KD under ikke-reducerende betingelser eller reducerende betingelser, et glycoprotein-antigen (AG 2) med en molekylvægt større end 200 KD under ikke-reducerende betingelser, og som serologisk ikke er identisk med F VIIIIR:AG, glycoprotein-antigener (AG 3) med en molekylvægt på  $180 \pm 10$  KD,  $95 \pm 10$  KD og  $55 \pm 10$  KD under ikke-reducerende betingelser, eller et glycoprotein-antigen (AG 4) med en molekylvægt større end 200 KD under ikke-reducerende betingelser, og som ikke er identisk med EMA, fremstilles ved, at pattedyr immuniseres med celler af Oat-75-cellelinien, Pa-Tu-I-cellelinien eller et CEA-positivt adeno-carcinom eller carcinoembryonalt antigen (CEA), miltceller udtages fra et således immuniseret dyr og fusioneres med cellelinien X63-Ag8653, hydridomerne selektioneres, og det monoklonale antistof udvindes.

Opfindelsen angår monoklonale antistoffer, en epitop, der genkendes deraf, en fremgangsmåde til fremstilling af antistofferne samt deres anvendelse i et in vitro-diagnostikum, som bærer for et farmaceutisk virksomt stof og til fremstilling af et terapeutikum.

Opfindelsen angår således monoklonale antistoffer (MAK), der bindes til definerede cytoplasmatiske, membran-associerede og secernerede antigener. Disse antistoffer kan anvendes som diagnostikum eller som virksomt stof eller bærer for virksomt stof.

Immuniseringsteknikken med definerede, isolerede antigener og produktionen af antistoffer mod sådanne antigener er kendt. Det er også kendt at immunisere med urensset antigenmateriale og at selekttere de antistoffer, der genkender en bestemt komponent i en sådan antigenblanding.

Ved forsøg på at inducere sådanne antistoffer er det lykkedes at selekttere monoklonale antistoffer, som under ikke-reducerende betingelser reagerer med en bestemt epitop.

Antigen 2 er et glycoproteinkompleks med MW>200 KD og bærer en epitop, der på cellemembranen af den Oat-75 småcellede lungecarcinom-cellelinie samt på af Oat-75 afledte og på den nøgne mus transplanterede tumorer er tilgængelig for MAK 287/105 IgG<sub>3</sub>-isotypen. Epitopen skal eftervises i kar, f.eks. i kryostat-snit såvel som på formaldehyd-behandlede, paraffin-indlejrede materialer af normal- og tumorvæv. Den kan her fortrinsvis træffes i endothelceller, men kan dog også træffes i extracellulære områder, f.eks. i dele af basalmembranen eller af Lamina elastica interna. Den kan ikke påvises i megakaryocyter, men derimod i kapillarslynge-endothel af glomeruli (i modsætning til F VIIIIR:AG). Epithelet i den Bowmann'ske kapsel er ikke reaktivt. Den er naturligvis særlig koncentreret i tumorer i karsystemet. Epitopen er eksempelvis også påviselig i humane navlestreng-endothelceller samt på cellemembranen (efter glutaraldehyd-fiksering) såvel som i cytoplasmaet (punktfor-

mige komponenter omkring kernen og intracytoplasmatisk granulær fordeling).

Endvidere eksprimerer humane hoftebenkamvene-  
-endothelceller epitopen, hvorimod epitopen ikke er på-  
5 viselig i okselungeaorta-endothelceller.

På cellemembranen af humane perifere blodleukocyt-  
er kan epitopen ikke påvises. Udover den ovenfor antydede  
resistens af epitopen i væv mod formaldehyd-fiksering og  
paraffin-inlejring er den endvidere resistent mod neuro-  
10 minidase-behandling, men følsom overfor periodsyre-oxida-  
tion.

Antistoffet MAK 278/105 synes på grund af dets  
egenskaber at være egnet til genkendelse af tumorer afledt  
af endothel samt ved kroniske betændelsestilstande.

15 En applikation er den ikke-invasive påvisning af  
lymfeknude-metastaser ved mamma-carcinom ved injektion af  
det radioaktivt mærkede MAK i interdigital-folderne, i de  
afdrænende lymfebaner eller intavenøst. Yderligere anven-  
delsesområder er immunscintigrafi og immunterapien af først  
20 og fremmest pladeepithel-carcinomer i lungen, men også  
andre histologiske lunge-carcinom-typer, det duktale mamma-  
-carcinom samt bestemte exokrine pancreas-carcinomer.

Den til opnåelsen af de ovennævnte monoklonale anti-  
stoffer anvendte metodik er beskrevet i DE offentliggørelses-  
25 skrift nr. 3.329.184 (EP-A-141.079) på siderne 3, 4 og 5.

Opfindelsen angår monoklonale antistoffer, der genken-  
der en epitop, som er påviselig på cellemembranen af den  
OAT-75 småcellede lungecarcinomcellelinie, på af OAT-75  
afledte og på den nøgne mus transplanterede tumorer, i kar,  
30 i kapillarslyngeendothel af glomeruli, i hoftebenkamvene-  
endothelceller og på et glycoprotein-antigen (AG 2) med en  
molekylvægt > 200 kD under ikke-reducerende betingelser, og  
som serologisk ikke er identisk med FVIIIIR:AG, hvilke anti-  
stoffer fremstilles gennem immunisering af pattedyr med  
35 celler fra cellelinien OAT-75.

Dette antigen er entydigt karakteriseret ved den  
ovenfor beskrevne forekomst på bestemte celler og væv samt

karakteriseret ved egenskaberne af de på dette antigen forekommende, ved hjælp af de hver gang tilstedeværende MAK definerede epitoper.

Opfindelsen angår desuden en fremgangsmåde til fremstilling af et af de ovenfor beskrevne monoklonale antistoffer, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at pattedyr immuniseres med celler af Oat-75-cellelinien, hvorpå miltceller udtages fra et således immuniseret dyr, fusioneres med cellelinien X 63-Ag8653, hybridomerne selektioneres, og de monoklonale antistoffer udvindes.

Som immunogen til induktion af MAK 278/105 tjener Oat-75-cellelinien.

Pattedyr, fortrinsvis mus, immuniseres med celler eller antigener af én eller flere af disse cellelinier, og miltcellerne fra sådanne dyr fusioneres med X63-Ag8653-cellelinien.

Der kan f.eks. udtages humane lymfoide celler fra tumorpatienter eller fra sunde mennesker, og disse celler immuniseres in vitro og fusioneres med en human myelomcelle. Også EBV-transformationsteknikken eller transformationen med DNA (onkogen overførsel) kan anvendes til aktivering af de humane lymfoide celler til permanent deling.

De fremkomne hybridomer testes til undersøgelse af, hvorvidt de indeholder antistoffer med den ønskede specificitet. Blandt de testede ovenstående hybridomer findes der nogle, der indeholder antistoffer med de ovenfor beskrevne specificiteter. Hybridomerne, der secernerer disse antistoffer, klones, og de ud fra disse hybridomkloner udvundne monoklonale antistoffer anvendes til immunkemisk karakterisering af det af dem genkendte antigen. Molekylvægten bestemmes ved sammenligning med kommercielt tilgængelige markører. Antigerne kan renses affinitetschromatografisk.

Endvidere måles bindingen af de monoklonale antistoffer til histologiske præparater ved hjælp af den indirekte

immunperoxidaseteknik, jf. J.Clin.Pathol. 32, 971 (1979).

Endvidere gennemføres den molekylære karakterisering af det af de monoklonale antistoffer genkendte antigen ud over ved hjælp af Western blot-analyse ved radioimmulfældning  
5 (Behring Mitteilungen 74, 27-34 (1984)).

Den molekylære karakterisering af de af antistoffet MAK genkendte epitoper på humant væv sker som beskrevet i det følgende:

4-6  $\mu$ m tykke snit af kryopræservede humane væv,  
10 der bærer de tilsvarende epitoper, fikseres efter tørring på objektbæreren (30-60 minutter ved stuetemperatur) i 1-2 sekunder i acetone. Derefter  
a) vaskes de til periodat-oxidation i PBS, pH=7,2, med 1 gram BSA pr. liter i 10 minutter, neddyppes kortvarigt i  
15 BPS, pH=7,2 (skylles) og inkuberes i 1 time ved stuetemperatur i et fugtigt kammer med 1 gram pr. 100 ml periodosyre i PBS, pH=7,2. Derpå vaskes der i 3 x 5 minutter i 1 gram pr. liter BSA i PBS, pH=7,2, og snittene inkuberes med gede-normalserum, viderebehandles som beskrevet i  
20 J.Clin.Pathol. 32, 971 (1979) med det MAK, der skal testes, og deres binding til vævene påvises ved hjælp af den indirekte immunperoxidaseteknik.  
b) Der vaskes til neuraminidase-behandling i 2 x 10 minutter i 0,05 M Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>-acetatpuffer, pH=5,5, og der inkuberes i 1 time med forskellige mængder af Vibrio cholerae-  
25 -neuraminidase (100 enheder pr. ml, 10 enheder pr. ml, 1 enhed pr. ml, 0,1 enhed pr. ml) i den ovennævnte acetatpuffer ved stuetemperatur i fugtigt kammer. Efter to gange vask i acetatpuffer og to gange vask i PBS, pH=7,2, med  
30 1 gram BSA pr. liter, inkuberes snittene med gede-normalserum, viderebehandles som beskrevet i J.Clin.Pathol. 32, 971 (1979) med det MAK, der skal testes, og deres binding til vævene påvises ved hjælp af den indirekte immunperoxidaseteknik.

35 I stedet for 4-6  $\mu$ m tykke, kryopræservede vævs-snit anvendes der til testning af formaldehyd- og paraffin-

resistensen af den af det tilsvarende MAK genkendte epitop i formaldehyd fikserede og paraffin-indlejrede væv, som snittes i en mikrotom, deparaffineres (B.Romeis, Mikroskopische Techniken, 16.oplag, side 145, kapitel 564, 1968) og viderebehandles som beskrevet i J.Clin.Pathol. 32, 971 (1979) til den indirekte immunperoxidaseteknik.

På grund af deres reaktivitet med antigen 1 kan de karakteriserede monoklonale antistoffer anvendes til diagnostisk genkendelse og skelnen mellem de 72 kD-antigen bærende småcellede lungetumorer af andre antigen 1-negative tumorer.

De på grund af deres reaktivitet med antigen 2 karakteriserede monoklonale antistoffer kan anvendes til diagnostisk genkendelse og skelnen af de > 200 kD-antigen bærende væv (endothelier, kartumorer) fra andre antigen 2-negative væv.

Endvidere kan alle de det ovenfor beskrevne antigen genkendende antistoffer anvendes til at påvise det af dem genkendte antigen i legemsvæsker eller til i radioaktivt mærket form at bindes til det væv, der bærer antigenet, in vivo og påvisning af antigenerne (immunsintigrafi). Yderligere kan disse monoklonale antistoffer anvendes som bærere for virksomme stoffer og til terapi af maligne lidelser. En yderligere anvendelsesmulighed er hæmningen af tumorcelle-metastaseringen efter applikation in vivo og binding af de monoklonale antistoffer til antigen-bærende, metastaserende tumorceller. Ydermere kan disse monoklonale antistoffer uden nærværelsen af andre toksiner være toksiske for de antigen-bærende tumorceller og efter binding til tumorcelle-membranen føre til differentieringsprocesser, som omdanner ondartede tumorceller til benigne celler.

Til diagnostiske formål kan de monoklonale antistoffer alt efter testning deraf anvendes i en koncentration på fra 0,001 µg pr. ml til 100 µg pr. ml.

Terapeutiske virkninger opnås ved anvendelse af nægder på fra 200 µg pr. kg til 100 mg pr. kg legemsvægt.

P a t e n t k r a v :

1. Monoklonale antistoffer, der genkender en epitop, som er påviselig på cellemembranen af den OAT-75 småcellede lungecarcinomcellelinie, på af OAT-75 afledte og på den  
5 nøgne mus transplanterede tumorer, i kar, i kapillarslynge-  
endothel af glomeruli, i hoftebenkamvene-endothelceller og  
på et glycoprotein-antigen (AG 2) med en molekylvægt > 200  
kD under ikke-reducerende betingelser, og som serologisk  
ikke er identisk med FVIIIIR:AG, hvilke antistoffer fremstil-  
10 les gennem immunisering af pattedyr med celler fra celle-  
linien OAT-75.

2. Epitop, der er påviselig på på cellemembranen af den OAT-75 småcellede lungecarcinomcellelinie, på af OAT-75 afledte og på den nøgne mus transplanterede tumorer, i kar,  
15 i kapillarslyngeendothel af glomeruli, i hoftebenkamvene-  
endothelceller og på et glycoprotein-antigen (AG 2) med en  
molekylvægt > 200 kD under ikke-reducerende betingelser, og  
som serologisk ikke er identisk med FVIIIIR:AG, k e n d e -  
t e g n e t ved, at den genkendes af monoklonale antistoffer  
20 ifølge krav 1.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af monoklonale antistoffer ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pattedyr immuniseres med celler af OAT-75-cellelinien, hvorpå miltceller udtages fra et således immuniseret dyr og fusione-  
25 res med cellelinien X63-Ag8653, hybridomerne selektioneres,  
og de monoklonale antistoffer udvindes.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g -  
n e t ved, at der som de nævnte pattedyr anvendes mus.

5. Anvendelse af monoklonale antistoffer ifølge krav  
30 1 i et in vitro-diagnostikum.

6. Anvendelse af monoklonale antistoffer ifølge krav 1 som bærere for et farmaceutisk virksomt stof.

7. Anvendelse af et monoklonalt antistof ifølge krav 1 til fremstilling af et terapeutikum.