



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 159882

(51) Int. Cl.⁴ G 01 N 33/577, A 61 K 39/395,
C 12 N 5/00

(83)

(21) Patentsøknad nr. **800793**
(22) Inngivelsesdag 19.03.80
(24) Løpedag 19.03.80
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Int. inngivelsesdag og int. søknads nr. -

(85) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 22.09.80

(44) Utlegningsdag 07.11.80

(71)(73) Søker/Patenthaver **ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION,** (72) Oppfinner **PATRICK CHUNG-SHU KUNG,**
U.S. Route #202, Bridgewater, NJ,
Raritan, NJ, GIDEON GOLOSTEIN,
USA. Short Hills, NJ,
USA.

(74) Fullmektig Siv. ing. Lars Brevig,
Bryns Patentkontor Å/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 20.03.79, US, nr. 22132.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **MONOKLONALT ANTISTOFF.**

(57) Sammendrag

Hybrid cellelinje for produksjon av monoclonalt antistoff til et antigen som finnes på alle normale T-menneskeceller. Nevnte hybrid dannes ved sammensmeltning av splenocyter fra immuniserte Balb/cJ-mus med P3X63Ag8U1 myelomaceller. Fremgangsmåte til fremstilling av nevnte monoclonale antistoff, samt diagnostiske og terapeutiske anvendelser av det monoclonale antistoff er beskrevet.

(56) Anførte publikasjoner - Nature, Vol. 256, aug. 7, 1975, side 495-497.

Foreliggende oppfinnelse vedrører monoklonalt antistoff til et antigen som finnes i alle normale humane T-celler.

5 Sammensmelting eller fusjon av myelomceller hos mus til miltceller fra immunisert mus ifølge Kohler og Milstein i 1975 (Nature 256, 495-497 (1975)) demonstrerte for første gang at det var mulig å oppnå en kontinuerlig cellelinje for dannelse av homogent antistoff (såkalt "monoklonalt" antistoff. Etter dette innledende arbeid har man konsen- 10 trert seg meget om fremstilling av forskjellige hybridceller (betegnet "hybridomer") og bruken av antistoffet fremstilt ved hjelp av disse hybridomer for forskjellige vitenskapelige undersøkelser. Se f.eks. Current Topics in Microbiology and Immunology, volum 81 - "Lymphocyte Hybridomas", F. Melchers, 15 M. Potter og N. Warner, utgiver Springer-Verlag, 1978, og deri angitte referanser; C. J. Barnstable et al., Cell, 14, 9-20 (mai 1978); P. Parham og W. F. Bodmer, Nature 276, 397-399 (november 1978); Handbook of Experimental Immunology, 3. utgave, volum 2, D. M. Wier, utgiver Blackwell, 1978, kapittel 25; og 20 Chemical and Engineering News, 1. januar 1979, 15-17. Disse referanser indikerer samtidig vellykkede resultater og komplika- sjoner i forbindelse med forsøk på å produsere monoklonalt anti- stoff fra hybridomer. Selv om den generelle teknikk er godt forstått, møter man på mange vanskeligheter og variasjoner som er nødvendig i hvert spesifikke tilfelle. Forut for forsøk 25 på å fremstille et gitt hybridom har man ingen forsikring om at det ønskede hybridom vil bli oppnådd, at det vil produsere antistoff dersom det oppnås, eller at det dannede antistoff vil ha den ønskede spesifisitet. Et heldig utfall avhenger hoved- sakelig av den type antigen som anvendes, og den utvelgelses- 30 teknikk som benyttes for å isolere det ønskede hybridom.

Forsøk på å fremstille monoklonalt antistoff til lymfocyttcelle- overflateantigener hos mennesker har bare i få tilfeller vært rapportert, se f.eks. Current Topics in Microbiology and 35 Immunology, ibid. 66-69 og 164-169. Antigenene som er be- nyttet i disse rapporterte forsøk, var dyrkede humane lymfo-

blastoide leukemicellelinjer og human kronisk lyfocytiske leukemicellelinjer. Mange oppnådde hybridomer viste seg å produsere antistoff til forskjellige antigener på alle menneskeceller. Ingen hybridom produserte antistoff mot en predefinert klasse av humane lymfocytter.

Det er to hovedklasser av lymfocytter involvert i immunsystemet hos mennesker og dyr. Den første av disse (den thymus-avledede celle eller T-celle) differensieres i thymus fra hemopoietiske stamceller. Mens de befinner seg innen thymus, betegnes de differensierende celler "thymocytter". De utviklede T-celler utgår fra thymus og resirkulerer mellom vevene, lymfekar og blodstrømmen. Disse T-celler utgjør en stor andel av mengden av resirkulerende små lymfocytter. De har immunologisk spesifisitet og er direkte involvert i celleformidlede immunreaksjoner (slik som modningsavstøtning) som effektorceller. Skjønt T-celler ikke utskiller humorale antistoffer, er de enkelte ganger nødvendige for sekresjon av disse antistoffer av den andre klassen av de nedenfor omtalte lymfocytter. Noen typer av T-celler har en regulerende funksjon i andre aspekter av immunsystemet. Mekanismen for denne prosess med cellesamvirke er enda ikke helt ut forstått.

Den andre klassen av lymfocytter (benmargavledede celler eller B-celler) er de som utskiller antistoff. De utvikles også fra hemipoietiske stamceller, men deres differensiering bestemmes ikke av thymus. Hos fugler differensieres de i et organ som er analogt med thymus, betegnet bursa fabrici. Hos pattedyr har man imidlertid ikke oppdaget noe ekvivalent organ, og det antas at disse B-celler differensierer i benmargen.

Det er nå erkjent at T-celler er delt, i det minste i flere undertyper, betegnet "hjelper-", "suppressor-", og "dreper"-celler, hvilke henholdsvis har den virkning at de fremmer en reaksjon, undertrykker en reaksjon, eller dreper (lyserer) fremmede celler. Disse underklasser er fullt forstått for systemer hos musefamilien, men de har bare

helt nylig blitt beskrevet for menneske-systemer, Se f.eks. R.L. Evans, et al., Journal of Experimental Medicine, volum 145, 221-232, 1977; og L. Chess og S.F. Schlossman - "Functional Analysis of Distinct Human T-cell Subsets Bearing Unique Differentiation Antigens", i "Contemporary Topics in Immunobiology", O. Stutman, utgiver Plenum Presså 1977, volum 7, 363-379.

Evnen til å identifisere eller undertrykke klasser eller underklasser av T-celler er viktig for diagnose eller behandling av forskjellige immunoregulerende sykdommer eller tilstander.

Visse luekemier og lymfoma har varierende prognoser avhengig av om de er av B-celle- eller T-celle-opprinnelse. Vurdering av sykdomsprognosene avhenger således av en adskillelse mellom disse to lymfocytclasser. Se f.eks. A.C. Aisenberg og J.C. Long, The American Journal of Medicine, 58:300 (mars 1975); D. Belpomme et al., i "Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas", S. Thierfelder et al., utgiver Springer, Heidelberg, 1977, 33-45; og D. Belpomme et al., British Journal of Haematology, 1978, 38, 85. Visse sykdomstilstander (f.eks. rheumatoid arthritis hos unge menneskser og visse leukemia) er forbundet med en manglende balanse av T-celle-underklasser. Det er antydnet at autoimmune sykdommer generelt er forbundet med et overskudd av "hjelper" T-celler og en mangel på visse "suppressor" T-celler, mens ondarterheter vanligvis er forbundet med et overskudd av "suppressor" T-celler. Ved visse leukemia produseres overskudd av T-celler i et oppstanset trinn i utviklingen. Diagnose kan således avhenge av evnen til å påvise denne mangel på balanse eller overskudd. Se f.eks. J. Kersey, et al., "Surface Markers Define Human Lymphoid Malignancies with Differing Prognoses" i Haematology and Blood Transfusion, volum 20, Springer Verlag, 1977, 17-24, og deri angitte referanser.

På den terapeutiske side er det visse antydninger, hvilke til nå ikke er helt bevist, om at administrasjon av antistoffer mot undertypen av T-celle i overskudd kan ha terapeutisk virkning ved autoimmune sykdommer eller ondarterheter. Antisera mot hele klassen av T-mennekseceller (såkalt

antihuma thymocyt globulin eller ATG) har vært beskrevet som terapeutisk nyttige hos pasienter som mottar transplanterte organer. Siden den celleformidlede immunreaksjon (den mekanisme hvorved transplantasjoner avstøtes) avhenger av
5 T-celler, hindrer eller retarderer administrasjon av anti-stoff til T-celler denne avstøtningsprosess. Se f.eks. Cosimi, et al., "Randomized Clinical Trial of ATG in Cadaver Renal Allgraft Recipients: Importance of T Cell Monitoring", Surgery 40:155-163 (1976) og deri angitte referanser.

10 Identifikasjonen og undertrykningen av klasser og underklasser av T-menneskeceller har tidligere blitt oppnådd ved bruk av spontane antoantistoffer eller selektive antisera for T-menneskeceller oppnådd ved immunisering av dyr med T-menneskeceller, blodtaging av dyr for oppnåelse av serum, og
15 adsorpsjon av antiserum med (f.eks.) autologe, men ikke allogeneiske B-celler for å fjerne antistoffer med uønskede reaktiviteter. Fremstillingen av disse antisera er meget vanskelig, særlig i adsorpsjons- og rensingstrinnene. Endog de adsorberte og rensede antisera inneholder mange urenheter
20 i tillegg til det ønskede antistoff, av flere grunner. For det første inneholder serumet millioner av antistoff-molekyler selv før T-celleimmunisering. For det annet forårsaker immuniseringen produksjon av antistoffer mot en mengde antigener som finnes på alle injiserte T-menneskeceller. Der er ingen selek-
25 tiv produksjon av antistoff mot et enkelt antigen. For det tredje er titeren for det spesifikke antistoff som er oppnådd ved slike metoder vanligvis temmelig lav (f.eks. inaktiv ved fortyninger på over 1:100) og forholdet mellom spesifikt og ikke-spesifikt antistoff er mindre enn $1/10^6$. Se f.eks.
30 den ovenfor nevnte artikkel av Chess og Schlossman (fra side 365 og videre) og nevnte artikkel i Chemical and Engineering News, hvor manglene ved de tidligere kjente antisera og fordelene ved monoklonalt antistoff er beskrevet.

Det er nå oppdaget en ny hybridom som kan produsere nytt monoklonalt antistoff mot et antigen som finnes på vesentlig alle normale humane perifere T-celler. Det således dannede antistoff er monospesifikt for en enkelt determinant på normale humane T-celler og inneholder i det vesentlige intet annet anti-humanimmunoglobulin, i motsetning til tidligere kjente antistoff som er reaktivt overfor flere human-antigen. Denne hybridom kan dessuten dyrkes for produksjon av antistoff uten nødvendigheten av å immunisere og avlive dyr, fulgt av tungvinte og vanskelige absorpsjons- og rensingstrinn som er nødvendig for å oppnå selv de urene, tidligere kjente antisera.

Formålet med foreliggende oppfinnelse er følgelig å tilveiebringe nye antistoffer mot et antigen som finnes på vesentlig alle normale humane T-celler.

Antistoffene er egnet til diagnose av sykdommer under anvendelse av disse antistoffer.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det således tilveiebragt et monoklonalt antistoff for bruk som diagnostisk middel, tilhørende klasse IgG, og fremstilt fra en hybridom dannet ved sammensmelting av miltceller fra en mus på forhånd immunisert med humane T-celler og celler fra en musemyelomlinje, kjennetegnet ved at antistoffet

(a) reagerer med vesentlig alle normale perifere humane T-celler, men ikke med normale perifere humane B-celler, null-celler eller makrofager;

(b) reagerer med fra ca. 5 til ca. 10% normale humane thymocytter;

(c) reagerer med leukemiceller fra mennsker med

159882

6

kronisk T-celle-lymfoblastisk leukemi, men reagerer ikke med leukemiceller fra mennsker med akutt T-celle-lymfoblastisk leukemi;

5 (d) utviser er reaktivitetsmønster med de humane T-cellelinjene HJD-1, CEM og HSB-2 som er vist på fig. 4; og

(e) reagerer ikke med Epstein-Barr virus-transformerte humane B-cellelinjer.

10

Det er foretrukket at foreliggende monoklonale antistoff er produsert fra en hybridom med ATCC nr. CRL 8000.

Fremstilling av det ovenfor angitte monoklonale antistoff kan hensiktsmessig utføres ved at man:

15

(i) immuniserer mus med E-rosett-positive rene humane T-celler;

20

(ii) fjerner milten fra nevnte mus og danner en suspensjon av miltceller;

25

(iii) sammensmelter nevnte miltceller med musemyelomceller i nærvær av en sammensmeltingspromotor;

(iv) fortynner og dyrker de sammensmeltede cellene i separate brønner i et medium som ikke vil understøtte de ikke-sammensmeltede myelomceller;

30

(v) bedømmer supernatanten i hver brønn inneholdende en hybridom for nærvær av det ønskede antistoff;

35

(vi) selekterer og kloner hybridomer som produserer det ønskede antistoff; og

(vii) utvinner antistoffet fra supernatanten over nevnte

kloner.

Hybridommaterialet ble fremstilt generelt ved å følge metoden ifølge Milstein & Kohler. Etter immunisering av mus med normale E-rosett-positive humane T-celler ble miltceller hos de immuniserte mus sammensmeltet med celler fra en musemyelomlinje og de resulterende hybridomer undersøkt med henblikk på de med supernatanter inneholdende antistoff som ga selektiv binding til normale E-rosett-positive humane T-celler. De 5
10
15
ønskede hybridomer ble deretter klonet og karakterisert. Som et resultat ble det oppnådd et hybridom som produserer antistoff (betegnet OKT1) mot et antigen på vesentlig alle normale humane T-celler. Dette antistoff reagerer med vesentlig alle normale perifere humane T-celler, men ikke med andre normale perifere blodlymfoidceller. Videre påvises celle-overflateantigenet som gjenkjennes av dette antistoff bare på utviklede thymocytter og mangler fullstendig på over 90% av normale humane thymocytter.

20 I betraktning av de omtalte vanskeligheter ved den tidligere kjente teknikk og manglende hell som er rapportert under anvendelse av ondartede cellelinjer som antigen, var det overraskende at foreliggende fremgangsmåte ga det ønskede hybridom. Det skal påpekes at den uoverskuelige natur når det gjelder 25
30
hybridcellefremstilling ikke gir anledning til ekstrapolering fra et antigen eller cellesystem til et annet. Man har faktisk oppdaget at anvendelse av en T-celle-ondartet cellelinje som antigen forårsaket dannelse av hybridomer som ikke produserer det ønskede antistoff. Forsøk på å benytte rensede antigener fra celleoverflatene falt heller ikke heldig ut.

Fremstillingen og karakteriseringen av hybridommaterialet og det resulterende antistoff vil bedre forstås under henvisning til 35
det nedenstående og de angitte eksempler.

Fremstilling av hybridommaterialet omfatter generelt følgende trinn:

- A. Immunisering av mus med E-rosett - positive, rensede, normale, perifere humane T-celler. Mens det er funnet at Balb/cJ-hunnmus er foretrukket, vil man også kunne anvende andre musestammer. Immuniseringsprogrammet og T-cellekonsentrasjonen bør være slik at det produseres 5 egnede mengder av primede splenocytter. Tre immuniseringer ved intervaller på 14 dager med 2×10^7 celler/mus/injeksjon i 0,2 ml fosfatbufret saltoppløsning er funnet å være effektiv.
- 10 B. Fjerning av milten fra de immuniserte mus og fremstilling av en miltsuspensjon i et passende medium. Omkring 1 ml medium pr. milt er tilstrekkelig. Disse forsøkteknikker er velkjente.
- 15 C. Sammensetning av de suspenderte miltceller med musemyelomceller fra en egnet cellelinje ved bruk av passende sammensmeltingsfremmende middel. Det foretrukne forhold er omkring 5 miltceller pr. myelomcelle. Et totalt volum på ca. 0,5-1,0 ml sammensmeltingsmedium er passende for omkring 10^8 20 splenocytter. Mange myelomcellelinjer fra mus er kjente og tilgjengelige, f.eks. fra Salk Institute Cell Distribution Center, La Jolla, CA. Den benyttede cellelinje bør fortrinnsvis være av den såkalte "legemiddel-resistente" type slik at usammensmeltede myelomceller ikke vil overleve i et selektivt medium, mens hybrider vil overleve. Den mest vanlige 25 klassen er 8-azaguanin-resistente cellelinjer som mangler enzymet hypoxantinguaninfosforibosyl-transferase og som således ikke vil understøttes av HAT (hypoxantin, aminopterin og thymidin)-medium. Det er også generelt foretrukket at den 30 benyttede myelomcellelinje er av den såkalte "ikke-utskillende" type, idet den ikke selv produserer noe antistoff, skjønt utskillende typer kan anvendes. I visse tilfeller kan imidlertid utskillende myelomlinjer være foretrukket. Mens det foretrukne sammensmeltingsfremmende middel er polyetylen- 35 glykol med en midlere molekylvekt på fra ca. 1000 til ca. 4000 (kommersielt tilgjengelig som "PEG 1000", osv.), kan andre kjente sammensmeltingsfremmende midler anvendes.

D. Fortynning og dyrking i separerte beholdere, blanding av ikke-sammensmeltede miltceller, ikke-sammensmeltede myelomceller og sammensmeltede celler i et selektivt medium som ikke vil understøtte de ikke-sammensmeltede myelomceller i et tidsrom som er tilstrekkelig til å tillate celledød av de ikke-sammensmeltede celler (omkring 1 uke). Fortynningen kan være begrenset hvorved volumet av fortynningsmiddelet beregnes statistikk for å isolere et visst antall celler (f.eks. 1-4) i hver separate beholder (f.eks. hver brønn i en mikrotiterplate). Mediet som benyttes (f.eks. HAT-medium) er et som ikke vil understøtte den legemiddelresistente (f.eks. 8-azaguanin-resistente) ikke-sammensmeltede myelomcellelinje. Disse myelomceller vil således gå tapt. Siden de ikke-sammensmeltede miltceller er ikke-ondartede, har de bare et bestemt antall av generasjoner. Således, etter en bestemt tidsperiode (omkring 1 uke) vil disse ikke-sammensmeltede miltceller ikke reproduseres. De sammensmeltede celler fortsetter, på den annen side, å reproduseres fordi de er i besittelse av den ondartede egenskap til de opphavelige myelomceller og evnen til å overleve i det selektive medium for de opphavelige miltceller.

E. Vurdering av supernatanten i hver beholder inneholdende et hybridom for tilstedeværelse av antistoff til E-rosett-positive, rensede, humane T-celler.

F. Utvalg (f.eks. ved begrensende fortynning) og kloning av hybridomer under dannelse av det ønskede antistoff.

30 Når først den ønskede hybridom er valgt og klonet, kan det resulterende antistoff produseres på en av to måter. Det rensede monoklonale antistoff produseres ved in vitro dyrking av den ønskede hybridom i et passende medium i et passende tidsrom, fulgt av utvinning av det ønskede antistoff fra

35 supernatanten. Det passende medium og den passende dyrknings-tid er kjent eller lett å bestemme. Denne in vitro teknikk produserer vesentlig monospesifikt monoklonalt antistoff som er vesentlig fritt for annet spesifikt antihuman, immuno-

globulin. Det er en liten mengde av annet immunoglobulin til stede fordi mediet inneholder xenogenet serum (f.eks. kalvefosterserum). Det kan imidlertid hende at denne in vitro-metode ikke produserer en tilstrekkelig mengde eller konsentrasjon av antistoff for enkelte formål fordi konsen-
5 konsentrasjonen av monoklonalt antistoff bare er ca. 50 µg/ml.

For å oppnå en meget større konsentrasjon av noe mindre rent monoklonalt antistoff, kan det ønskede hybridom injiseres i
10 mus, fortrinnsvis syngeniske eller semi-syngeniske mus. Hybridomaterialet vil forårsake dannelse av antistoffproduserende tumorer etter en passende inkubasjonstid, hvilket vil resultere i en høy konsentrasjon av det ønskede antistoff (ca. 5-20mg/ml) i blodstrømmen og det peritoneale
15 eksudat (asciter) hos vertsmusen. Selv om disse vertsmus også har normale antistoffer i deres blod og asciter, er konsentrasjonen av disse normale antistoffer bare ca. 5% av den monoklonale antistoff-konsentrasjon. Dessuten, siden disse normale antistoffer ikke er antihumane i deres spesifisitet,
20 er det monoklonale antistoff oppnådd fra de innhøstede asciter eller fra serumet vesentlig fritt for noe forurensende antihuman immunoglobulin. Dette monoklonale antistoff har høy titer (aktivt ved fortyninger på 1:30.000 eller høyere) og høyt forhold av spesifikt til ikke-spesifikt immunoglobulin
25 (ca. 1/20). Fremstilt immunoglobulin inneholdende κ-lette myelomkjeder er ikke-spesifikke, "nonsense"-peptider som bare fortynner det monoklonale antistoff uten å forringe dets spesifisitet.

30

Eksempel I

Fremstilling av monoklonale antistoffer

A. Immunisering og somatisk cellehybridisering

35 Balb/cJ hunnmus (6-8 uker gamle) ble immunisert intraperitonealt med 2×10^7 E-rosettensede T-celler i 0,2 ml fosfatbufret saltoppløsning ved intervaller på 12 dager. 4 dager etter den tredje immunisering ble milten fjernet fra musene

og en enkelt cellesuspensjon ble laget ved å presse vevet gjennom et rustfritt stålnett.

5 Cellesammensmelting ble utført ifølge metoden utviklet av Kohler og Milstein. 1×10^8 splenocytter ble sammensmeltet i 0,5 ml av et sammensmeltingsmedium omfattende 35% polyetylenglykol (PEG 1000) og 5% dimetylsulfoksyd i "RPMI 1640"-medium med 2×10^7 P3X63Ag8II myelomceller. Disse myelomceller utskiller IgG₁ κ-lette kjeder.

10

B. Utvalg og vekst av hybridomer

Etter cellesammensmelting ble cellene dyrket i HAT-medium
15 (hypoxantin, aminopterin og thymidin) ved 37°C med 5% CO₂ i en fuktig atmosfære. Flere uker senere ble 40-100 µl supernatant fra kulturer inneholdende hybridomer tilsatt til en pellet av 10^6 perifere lymfocytter separert i E-rosett-positive (E⁺) og E-rosett-negative (E⁻) populasjoner som var
20 preparert fra blod hos friske mennesker som beskrevet av Mendes (J. Immunol. 111:860, 1973). Påvisning av musehybridomantistoffer som var bundet til disse celler, ble bestemt ved radioimmunoforsøk og/eller indirekte immunofluorescens. I den første metoden ble cellene til å begynne med omsatt
25 med 100 µl affinitetsrenset ¹²⁵I geit-anti-mus IgG (10^6 cmp./µg; 500 µg/µl). (Detaljer med hensyn til iodering av geit-anti-mus er beskrevet av Kung, et al., J. Biol. Chem, 251(8):2399, 1976). Celler inkubert med kultursupernatanter ble alternativt farget med et fluoresceinbehandlet geit-anti-mus IgG
30 (G/M FITC) (Meloy Laboratoires, Springfield, VA; F/- 2 2,5), og de fluorescerende antistoff-belagte celler ble deretter analysert på "cytoflyorograf FC200/4800A" som beskrevet i eksempel III. Hybridomkulturer inneholdende antistoffer som reagerte spesifikt med E⁺-lymfocytter (T-celler) ble ut-
35 valgt og klonet. Deretter ble klonene overført intraperitonealt ved injeksjon av 1×10^7 celler av en gitt klon (0,2 ml volum) i Balb/cJ-mus primet med 2,6,10,14-tetrametylpentadecan ("Pristine"). De ondartede asciter fra disse mus

ble deretter benyttet for å karakterisere lymfocytter som beskrevet nedenfor i eksempel II. Det aktuelle hybrid-antistoff OKT1 ble ved hjelp av standardteknikker vist å tilhøre underklassen IgG₁.

5

Eksempel II

Karakterisering av OKT1-reaktivitet

A. Isolering av lymfocyttopulasjoner

10

Perifere, mononukleære blodceller fra menneske ble isolert fra friske frivillige givere (alder 15-40) ved Ficoll-Hypaque-sentrifugering med tetthetsgradient fulgt av teknikken ifølge Boyum, Scand., J. Clin. Lab. Invest. 21 (suppl. 97): 77, 1968.

15

Ufraksjonerte mononukleære celler ble separert i overflate Ig⁺ (B) og Ig⁻ (T-pluss null) populasjoner ved hjelp av "Sephadex G-2pp" anti-F(ab')₂ kolonnekromatografi som beskrevet av Chess, et al., J. Immunol. 113:1113 (1974). T-celler ble utvunnet ved E-rosettdannelse av Ig⁻-populasjonen

20

med 5% saue-erythrocytter. Den rosettdannede blanding ble lagt i sjikt over Ficoll-Hypaque, og den utvunne E⁺-pellet behandlet med 0,155M NH₄Cl (10 ml pr. 10⁸ celler). Den således oppnådde T-celle-populasjon var <2% EAC rosett-positiv og >95% E-rosett-positiv som bestemt ved standardmetoder. I

25

tilsetning til dette ble den ikke-rosettdannende Ig⁻ (null-celle) populasjon innhøstet fra Ficoll-grenseflaten. Denne sistnevnte populasjon var <5% E⁺ og <5% Ig⁺. Overflate Ig⁺(B)-populasjonen ble oppnådd fra "Sephadex G-200"-kolonnen etter eluering med normalt menneske-gammaglobulin som beskrevet tidligere. Denne populasjon var >95% Ig⁺ og <5% E⁺.

30

Normale menneskemakrofager ble oppnådd fra den mononukleære populasjon ved adhesjon til polystyren. Mononukleære celler ble således resuspendert i sluttkulturmedia (RPMI 1640, 35 2,5 mM HEPES [4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinpropansulfonsyre]-buffer, 0,5% natriumbikarbonat, 200 mM L-glutamin og 1% penicillinstreptomycin, supplert med 20% varmeinaktivert menneske AB-serum) ved en konsentrasjon på 2 x 10⁶ celler

normale, perifere humane T-celler, mens det er ikke-reaktivt med antigener som befinner seg på overflaten av de andre tre celletyper som er vist på fig. 1. Denne forskjellige reaktivitet er en test ved hjelp av hvilken det aktuelle antistoff OKT1 kan påvises og skilles fra andre antistoffer.

Som vist på fig. 2 er hovedmengden av normale humanthymocytter fra et 6 måneders gammelt barn fullstendig ikke-reaktivt med OKT1, mens omkring 5-10% av thymocytene er reaktive. Dette funn tyder på at thymocytene under differensieringsprosessen hvorved stamcellene omdannes til utviklede T-celler, ved et eller annet trinn oppnår det samme overflate-antigen som finnes på T-celler, og som er reaktivt med OKT1. Det antas at disse thymocytter er i de senere differensieringstrinn like før emergens fra thymus i blodstrømmen. Lignende resultater (5-10% reaktivitet) ble oppnådd under anvendelse av 6 ytterligere thymusprøver fra normale individer med en alder på fra 2 måneder til 19 år. Reaktivitetsmønsteret på fig. 2 gir en annen metode for å påvise det aktuelle antistoff OKT1 og skille dette fra andre antistoffer.

En diagnostisk anvendelse av det aktuelle antistoff er illustrert i fig. 3, hvori det er vist at leukemiceller fra T-akutt-lymfoblastiske leukemi (T-ALL) pasienter var ikke-reaktive med OKT1, mens derimot leukemiceller fra T-kronisk, lymfoblastisk leukemi (T-CLL) pasienter var reaktive med OKT1. Det angjeldende antistoff tilveiebringer derfor en metode for å skille mellom disse to former for leukemi. Siden det er vanskelig å skille mellom visse trinn i T-ALL og T-CLL, og siden begge prognosene og behandlingsregime er vesentlig forskjellig mellom disse to former for leukemi, kan man se at en likefrem metode for å skille mellom de to tilveiebragt ved bruk av det angjeldende antistoff, representerer et betydelig fremskritt.

En ytterligere karakterisering av det angjeldende antistoff OKT1 er vist ved reaktiviteten mot forskjellige T-menneske-cellelinjer illustrert på fig. 1. Det fremgår at reaktiviteten

for det aktuelle antigen overfor T-menneskecellelinjer var heterogen, idet den var sterk for linjen HJD-1, moderat for linjen CEM, og ikke eksisterende for linjen HSB-2.

- 5 Denne reaktivitetsforskjell for OKT1 overfor forskjellige lett tilgjengelige humane T-cellelinjer gir enda en annen metode for å karakterisere og beskrive det aktuelle antistoff.

- Fig. 5 illustrerer mangelen på reaksjon av OKT1 med B-
10 menneskecellelinjen Laz 007. Et identisk mønster ble oppnådd med de andre testede EBV-transformerte B-cellelinjer. Dette understøtter ytterligere mangelen på reaktivitet for OKT1 med B-celler oppnådd fra det perifere blod hos en normal menneskepopulasjon og gir ytterligere en annen metode for å
15 karakterisere og adskille det angjeldende antistoff OKT1.

- Det ble foretatt funksjonelle studier på lymfoidpopulasjoner som var separert ved hjelp av en separator for fluorescens-aktiverte celler (FACS). Resultatene fra disse studier er
20 vist i tabellene I-III nedenfor og gir ytterligere støtte for den tidligere nevnte karakterisering av foreliggende monoklonale antistoff.

- Vesentlig all reaktivitet overfor PHA, Con A, oppløselige
25 antigener og alloantigen i blandet lymfocyttkultur (MLC) ligger som vist i tabell I i populasjon av celler som reagerer overfor OKT1. Den populasjon som var ikke-reaktiv overfor OKT1 viste seg ikke å bevirke noen av disse T-cellefunksjoner, idet den svake reaksjon skyldes mulig forurensning med OKT1⁺-celler.
30 Disse funksjonelle studier gir en ytterligere illustrasjon på at antigenet overfor hvilket OKT1 reagerer, bare befinner seg på T-celler, fordi denne reaktive populasjon utviser T-cellefunksjoner, mens den populasjon som ikke er så reaktiv, ikke utviser noen av disse funksjoner. Tabell II illustrerer
35 at ingen funksjonelle forskjeller i mitogen- eller alloantigen-reaksjon eksisterer mellom de sterkt OKT1-reaktive og svakt OKT1-reaktive T-celler separert på FAC. Begge populasjoner profilerte like godt og på en måte som er identisk med den

ufraksjonerte T-celle-populasjon. Tabell III antyder at overflateantigenet med hvilket OKT1 reagerer bare er til stede på ferdigutviklede thymocytter, fordi aktiviteten for hele området av thymocytter i MLC-prøven nesten fullstendig skyldes en del av thymocyttopulasjonen som er reaktiv med OKT1. Tabell III viser også den funksjonelle forskjell mellom OKT1⁺-lymfocytter og OKT1⁺-perifere T-celler fordi de førstnevnte mangler mitogenreaktivitet.

10 Ifølge foreliggende beskrivelse er det tilveiebragt en hybridom som kan produsere antistoff mot et antigen som finnes på vesentlig alle normale humane T-celler, en fremgangsmåte for fremstilling av denne hybridom; monoklonalt antistoff mot et antigen som finnes på vesentlig alle humane T-celler; fremgangs-
15 måter til fremstilling av antistoffet, og fremgangsmåter for diagnose av sykdom under anvendelse av dette antistoff.

Selvom det bare er beskrevet en enkelt hybridom som produserer et enkelt monoklonalt antistoff mot humant T-celleantigen, er det klart at foreliggende oppfinnelse omfatter alle monoklonale antistoffer som utviser de heri beskrevne karakteristika. Det ble bestemt at foreliggende antistoff OKT1 tilhører underklassen IgG₁, som er en av fire underklasser av murin IgG. Disse underklasser av immunoglobulin G adskiller seg fra hverandre i de såkalte "faste" områder, skjønt et antistoff overfor hvilket et spesifikt antigen vil ha et såkalt "variabelt" område som er funksjonelt identisk uansett hvilken underklasse av immunoglobulin G det tilhører. Det vil si, et monoklonalt antistoff som utviser de heri beskrevne karakteristika, kan være av underklassen IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} eller IgG₃, eller av klassene IgM, IgA, eller andre kjente Ig-klasser. Forskjellene mellom disse klasser eller underklasser vil ikke påvirke selektiviteten for antistoffets reaksjonsmønster, men kan påvirke den videre reaksjon av antistoffet med andre materialer, slik som (f.eks.) komplement eller anti-muse-antistoffer. Selvom foreliggende antistoff er spesifikt IgG₁, er det klart at antistoffer med reaktivitets-

mønstre som heri illustrert, omfattes av foreliggende oppfinnelse uansett hvilken immunoglobulinklasse eller -underklasse de tilhører.

- 5 Selvom der bare er angitt ett eksempel på en hybridom, er det klart at en fagmann kan følge de heri angitte immuniserings-, sammensmeltings- og utvelgelsesmetoder og oppnå andre hybridommaterialer som kan produsere antistoffer med de beskrevne reaktivitetskaraktistika. Siden den individuelle hybridom
- 10 som fremstilles fra en kjent musemyelom-cellelinje og miltceller fra en kjent museart, alle kan ytterligere identifiseres uten ved henvisning til det antistoff som produseres fra hybridommateriale, er det klart at alle hybridomer som produserer antistoff med de ovenfor beskrevne reaktivitets-
- 15 karakteristika, omfattes av foreliggende oppfinnelse, hvilket også gjelder fremgangsmåter for fremstilling av dette antistoff under anvendelse av nevnte hybridom.

- Ved diagnose av sykdom anvendes det monoklonale antistoff OKT1 eller et hvilket som helst annet monoklonalt antistoff som utviser det angitte reaktivitetsmønster. Som nevnt ovenfor tillater foreliggende antistoff at man kan skille mellom T-celle, kronisk lymfoblastisk leukemi og T-celle, akutt lymfoblastisk leukemi, og tillater videre
- 25 behandling av pasienter som gjennomgår transplantasjon av organer for å redusere eller eliminere avstøtningen av disse organer.

TABELL I

FUNKSJONELL SAMMENLIGNING MELLOM FACS-SEPARERTE OKT1⁺ OG OKT1⁻ PERIFERE LYMFOCYTER

Proliferativ stimulus	Hel mononuclear	Hel mononuclear OKT1 + G/M FITC Behandlet	
		OKT1 ⁺	OKT1 ⁻
Con A	146,032 ± 1,556	137,229 ± 3,600	133,557 ± 6,088
PHA	32,001 ± 2,659	36,326 ± 3,311	29,877 ± 1,043
MLC	122,958 ± 2,315	136,141 ± 1,056	148,235 ± 2,666
Tetanus toxoid	25,821 ± 4,132	28,756 ± 1,526	30,184 ± 563
Media kontroll	482 ± 16	734 ± 65	533 ± 87

TABELL II

FUNKSJONELL SAMMENLIGNING MELLOM T-CELLER STERKT REAGERENDE MED OG SVAKT REAGERENDE MED OKT1.

Proliferativ stimulus	Ufraksjonerte		Ufraksjonerte		T-celler sterkt reaktive med OKT1	T-celler svakt reaktive med OKT1
	T-celler	T-celler OKT1 + G/M FITC Behandlet	T-celler OKT1 + G/M FITC Behandlet	T-celler reaktive med OKT1		
	<u>Forsøk nr. 1</u>					
Con A	59,499 ± 9,699	56,248 ± 3,057	64,656 ± 6,076	54,478 ± 5,173		
PHA	116,062 ± 5,910	106,412 ± 5,348	112,246 ± 3,716	90,857 ± 5,500		
MLC	95,261 ± 4,663	107,365 ± 12,001	119,605 ± 5,333	100,650 ± 8,215		
Media	365 ± 22	399 ± 46	488 ± 23	402 ± 57		
	<u>Forsøk nr. 2</u>					
Con A	88,603 ± 2,133	104,241 ± 1,951	99,617 ± 7,213	177,672 ± 12,315		
PHA	79,235 ± 2,615	65,803 ± 6,163	73,108 ± 2,226	67,159 ± 6,316		
MLC	39,096 ± 5,776	35,929 ± 2,102	55,009 ± 8,333	42,165 ± 4,559		
Media	157 ± 28	292 ± 6	322 ± 33	345 ± 25		

TABELL III

FUNKSJONELLE EGENSKAPER HOS MÆNNESKETHYMOCYT-POPULASJONER

Proliferativ stimulus	Ufraksjonerte thymocyter	Ufraksjonerte thymocyter OKT1 + G/M FITC, behandlet	OKT1 ⁺ thymocyter	OKT1 ⁻ thymocyter
	<u>Forsøk nr. 1</u>			
MLC	7,085 ± 901	6,224 ± 823	6,556 ± 987	244 ± 10
Con A	88 ± 10	94 ± 2	38 ± 2	36 ± 3
PHA	55 ± 6	78 ± 10	22 ± 2	51 ± 4
Media	40 ± 5	46 ± 10	10 ± 2	65 ± 11
	<u>Forsøk nr. 2</u>			
MLC	3,815 ± 772	4,778 ± 623	5,727 ± 239	425 ± 81
Con A	46 ± 8	47 ± 10	100 ± 22	67 ± 32
PHA	66 ± 4	60 ± 4	142 ± 4	22 ± 4
Media	80 ± 15	67 ± 12	80 ± 18	200 ± 16

P a t e n t k r a v

1. Monoklonalt antistoff for bruk som in-vitro diagnostisk middel, tilhørende klasse IgG, og fremstilt fra en hybridom
5 dannet ved sammensetning av miltceller fra en mus på forhånd immunisert med humane T-celler og celler fra musemyelomlinje, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet

(a) reagerer med vesentlig alle normale perifere humane
10 T-celler, men ikke med normale perifere humane B-celler, null-celler eller makrofager;

(b) reagerer med fra ca. 5 til ca. 10% normale humane thymocytter;

15 (c) reagerer med leukemiceller fra mennesker med kronisk T-celle-lymfoblastisk leukemi, men reagerer ikke med leukemiceller fra mennesker med akutt T-celle-lymfoblast leukemi;

20 (d) utviser et reaktivitetsmønster med de humane T-cellelinjene HJD-1, CEM og HSB-2 som vist på fig. 4; og

(e) reagerer ikke med Epstein-Barr virus-transformerte
25 humane B-cellelinjer.

2. Monoklonalt antistoff ifølge krav 1, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at det er produsert fra et hybridom med ATCC nummer CRL 8000 (OKT1).

30

35

159882

Fig. 1

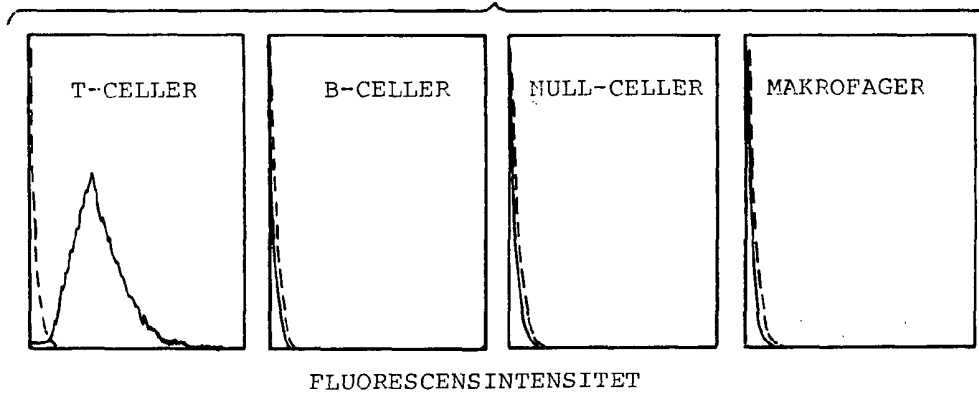


Fig. 2

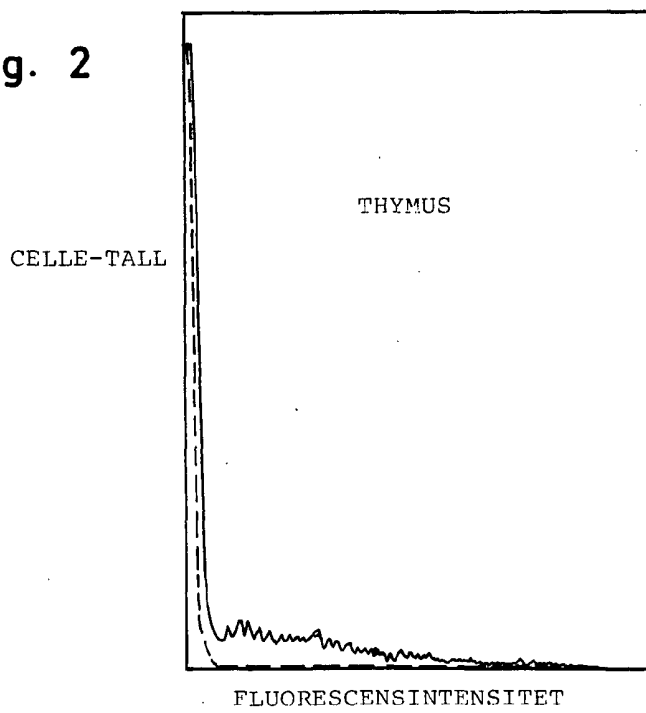


Fig. 3

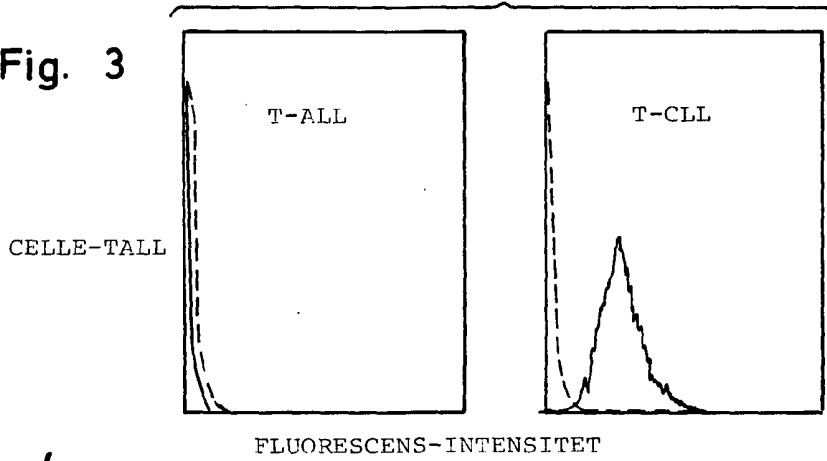


Fig. 4

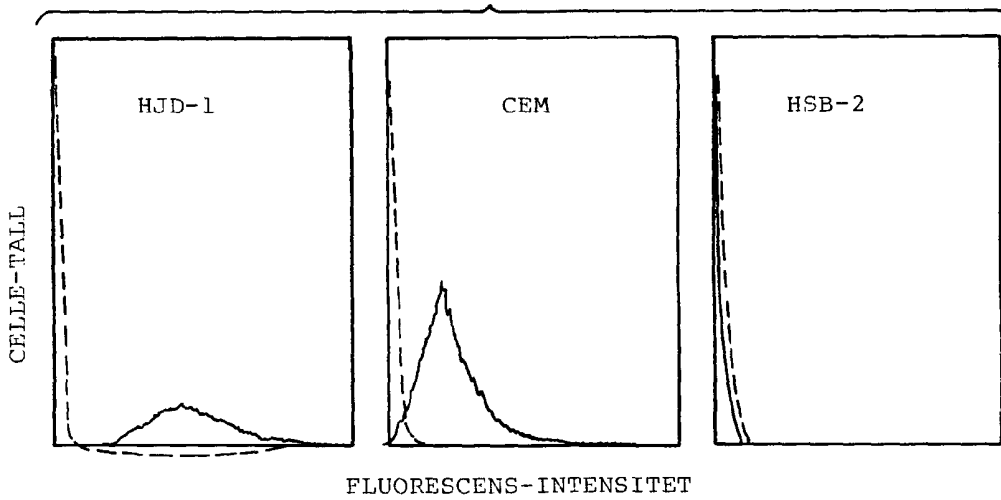


Fig. 5

