



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 33 122 T2** 2004.04.22

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 508 472 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 122.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 106 282.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **10.04.1992**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.10.1992**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **09.07.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.04.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 5/16**

**C07K 16/30, A61K 39/395**

(30) Unionspriorität:

**7751891            10.04.1991    JP**

(73) Patentinhaber:

**Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP**

(74) Vertreter:

**Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679  
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**DE, FR, GB, IT**

(72) Erfinder:

**Fujiwara, Katsumi, Machida-shi, Tokyo, JP;  
Shitara, Kenya, Machida-shi, Tokyo, JP; Ohta, So,  
Machida-shi, Tokyo, JP; Hanai, Nobuo,  
Sagamihara-shi, Kanagawa, JP**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung von Hybridomen**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Hybridomen, das die Umwandlung („class-switching“) eines zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgM befähigten Hybridoms in ein zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG befähigten Hybridoms umfasst. Die von diesen Hybridomen produzierten monoklonalen Antikörper der Klasse IgG können im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern der Klasse IgM bei der Behandlung verschiedener Krankheiten breiter eingesetzt werden.

## Hintergrund der Erfindung

[0002] Antikörper lassen sich in die Klassen IgA, IgM, IgG, IgD und IgE klassifizieren. Darüber hinaus lassen sich Maus-Antikörper der Klasse IgG in die vier Unterklassen  $G_1$ ,  $G_{2a}$ ,  $G_{2b}$  und  $G_3$  klassifizieren (für humane Antikörper:  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  und  $G_4$ ). Wenn Tiere mit einem Antigen immunisiert werden, gehören die meisten der erhaltenen Antikörper zu den Klassen IgM oder IgG. IgG-Moleküle weisen eine dimere Struktur mit einem Molekulargewicht von etwa 160.000 auf und sind relativ leicht zu handhaben. IgM-Moleküle sind hingegen deutlich größer und weisen eine J-Ketten-verbrückte, komplizierte pentamere Struktur mit einem Molekulargewicht von etwa 900.000 auf und besitzen daher Nachteile: Zum Beispiel sind sie wegen ihrer ausgeprägten Tendenz zur Aggregation schwer zu reinigen und zu lagern; sie werden aufgrund teilweisen Abbaus durch proteolytische Enzyme (Proteasen) ohne weiteres deaktiviert, weshalb die Fab-Produktion daraus schwierig ist; ihre chemische Modifizierung, wie etwa zum Beispiel ihre Kopplung mit einem Antikrebsmittel oder einem Toxin, führt oft zu einem Verlust von Bindungsaktivität (J. W. Goding: *Monoclonal Antibodies – Principles and Practice*, Academic Press, 1986). Bezüglich der Frage, ob monoklonale Antikörper der Klasse IgG oder monoklonale Antikörper der Klasse IgM in ihrer therapeutischen Wirkung gegen Krebs überlegen sind, wurden von I. D. Bernstein et al. detaillierte Studien durchgeführt, wobei monoklonale Antikörper der Klasse IgG und monoklonale Antikörper der Klasse IgM verwendet wurden, die jeweils gegen das lymphozytäre Thy-1-Antigen gezüchtet wurden (R. H. Kennet, T. J. McKearn und K. B. Bechtol (Herausgeber): *Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, 1980, Seiten 275–291). Laut Bernstein et al. waren monoklonale Antikörper der Klasse IgM hinsichtlich ihrer Antitumor-Wirkung monoklonalen Antikörpern der Klasse IgG überlegen, die hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Thy-1-Antigenpositiven Lymphozyten zwar in einem in-vitro-Komplement-abhängigen Test auf Antitumorwirkung den ersteren vergleichbar waren; in einem in-vivo-Test auf Antitumorwirkung bei krebserkrankten Mäusen hingegen wiesen monoklonale Antikörper der Klasse IgG eine signifikante Antitumorwirkung auf, wohingegen monoklonale Antikörper der Klasse IgM keine solche Wirkung aufwiesen. Darüber hinaus zeigte eine Studie zur Halbwertszeit im Blut im Anschluss an die Verabreichung Isotopen-markierter monoklonaler Antikörper an Mäuse, dass monoklonale Antikörper der Klasse IgM im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern der Klasse IgG eine sehr kurze Halbwertszeit im Blut aufweisen. Diese experimentellen Ergebnisse deuten darauf hin, dass monoklonale Antikörper zur Klasse IgG gehören sollten, um bei Menschen klinisch brauchbar zu sein.

[0003] Es ist bekannt, dass Glykolipide wichtige Bestandteile der Zellmembran sind und auf die Verkrebsung von Zellen hin ohne weiteres quantitative und qualitative Änderungen unterliegen (*Cancer Res.*, 45, 2405 (1985)). Monoklonale Antikörper gegen solche Glykolipide wären, sofern verfügbar, bei der Behandlung und Diagnose von Krebs brauchbar, und die Wirkung solcher monoklonalen Antikörper wurde tatsächlich bei Krebspatienten untersucht (H. F. Oettgen (Herausgeber): *Gangliosides and Cancer*, VCH Publishers, 1989). Versuche, monoklonale Antikörper gegen nicht-T-Zell-abhängige Antigene, wie etwa Glykolipide, herzustellen, führen in den meisten Fällen jedoch ohne weiteres zur Bildung monoklonaler Antikörper der Klasse IgM, während monoklonale Antikörper der Klasse IgG kaum gebildet werden (A. H. Bantal und Y. Hirshaut (Herausgeber): *Methods of Hybridoma Formation*, Humana Press, 1987).  $GM_2$ , ein Gangliosid, das ein Sialinsäurerest enthaltendes Glykolipid ist, kommt in normalen Zellen nur in sehr kleinen Mengen vor, in Krebszellen jedoch in großen Mengen, zum Beispiel im Fall von Kleinzell-Lungenkarzinom, Melanom oder Neuroblastom, monoklonale Antikörper gegen  $GM_2$  werden daher bei der Behandlung solcher Krebsarten als wirksam angesehen (*Lancet*, 48, 6154 (1988)). Alle monoklonalen Antikörper gegen  $GM_2$ , über die bisher berichtet wurde, gehören jedoch zur Klasse IgM (*Cancer Res.*, 46, 4116 (1986); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 7629 (1982); *Cancer Res.*, 48, 6154 (1988); *J. Biol. Chem.*, 264, 12122 (1989)).

[0004] Sogar wenn bestimmte monoklonale Antikörper der Klasse IgM erfolgreich gebildet wurden, werden Versuche zur Bildung monoklonaler Antikörper der Klasse IgG in vielen Fällen noch von dem Standpunkt aus unternommen, dass es für therapeutische Zwecke wichtig ist, monoklonale Antikörper der Klasse IgG zu verwenden, wie oben erwähnt.

[0005] Es gibt eine Reihe von Berichten über das „class-switching“ von Hybridomen, die monoklonale Antikörper von Untergruppen der Klasse IgG produzieren (im Fall von Mäusen  $IgG_1$ ,  $IgG_{2a}$ ,  $IgG_{2b}$  und  $IgG_3$ ), für das „class-switching“ von IgM nach IgG sind Berichte jedoch nur bezüglich der folgenden zwei Arten von Antigenen

verfügbar:

(1) Phosphorylcholin wurde als Antigen verwendet und monoklonale Antikörper dagegen wurden erhalten, indem man einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgM produzierende Hybridome auf Agarose oder 96-Lochplatten klonierte und durch spontanes „class-switching“ resultierende Hybridome, die einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgG produzierten, selektierte (Eur. J. Immunol., 13, 614 (1983); J. Immunol. Methods, 74, 307 (1984); J. Immunol., 140, 2675 (1988).

(2) Von Echerichia coli abstammendes Liposaccharid wurde als Antigen verwendet und monoklonale Antikörper dagegen wurden erhalten, indem man einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgM produzierende Hybridome auf 96-Lochplatten klonierte und durch spontanes „class-switching“ resultierende Hybridome, die einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgG produzierten, selektierte (Eur. J. Immunol., 17, 413 (1987); ibid., 19, 131 (1989).

[0006] Die in diesen geschilderten Arbeiten verwendeten Verfahren umfassen jedoch nicht ein sichergestelltes „class-switching“ von monoklonale Antikörper der Klasse IgM produzierenden Hybridomen zu monoklonale Antikörper der Klasse IgG produzierenden Hybridomen, sondern umfassen lediglich das Auswählen von Hybridomen, die durch spontanes „class-switching“ resultieren. Diese Verfahren sind daher nur anwendbar, wenn das Antigen derart beschaffen ist, dass monoklonale Antikörper der Klasse IgG ohne weiteres dagegen gebildet werden; diese Verfahren können nicht angewendet werden, wenn das Antigen zum Beispiel ein Glykolipid ist, das, wie oben erwähnt, die Bildung monoklonaler Antikörper der Klasse IgG kaum induziert.

[0007] Whitmore et al. untersuchten, welche Behandlung zu einer hohen Häufigkeit von „class-switching“ von Lymphom-B-Zellen, die einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgM gegen Phosphorylcholin produzieren, führen könnte (Int. Immunol., 3, 95 (1991)). Whitmore et al. versuchten somit, Lymphom-B-Zellen in Gegenwart von Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-6, Interferon- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , Hydroxyharnstoff, Cholera toxin oder Schaf-Erythrozyten (ein nicht gereinigtes Antigen) zu kultivieren. Im Ergebnis fand man, dass bei Verwendung von TGF- $\beta$  das „class-switching“ von der Klasse IgM zur Klasse IgA mit einer großen Häufigkeit auftrat und dass bei Verwendung von Interleukin-4 oder Cholera toxin ebenfalls eine erhöhte Häufigkeit des „class-switching“ von der Klasse IgM zur Klasse IgA resultierte. Für das „class-switching“ von IgM zu IgG tendierte die Behandlung mit Interleukin-4, TGF- $\beta$  oder Cholera toxin andererseits dazu, zu einem gewissen Grad wirksam zu sein, die Produktion einer ausreichenden Menge an Immunglobulin der Klasse IgG wurde jedoch nicht erreicht; es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe. Somit wurde bisher nicht einmal für Lymphom-B-Zellen, von denen man annimmt, dass sie einem „class-switching“ leichter unterliegen als Hybridome, über ein Verfahren berichtet, das in der Lage wäre, ein „class-switching“ von IgM nach IgG mit hoher Häufigkeit zu induzieren.

[0008] Hybridome sollen sich spontan in Hybridome umwandeln, die einen „class-switched“ monoklonalen Antikörper produzieren, und zwar mit einer Wahrscheinlichkeit von Eins zu einigen Zehntausend bis zu Duzenden von Milliarden (Eur. J. Immunol., 17, 413 (1987)). Zur Herstellung „class-switched“ monoklonaler Antikörper ist es daher notwendig, ein Hybridom, das sich in der obigen Weise spontan verändert hat, aus einer großen Masse unveränderter Hybridome auszuwählen und es einzeln zu vermehren. Für eine solche Auswahl ist das Sib-Selektionsverfahren bekannt, das das Klonieren von Hybridomen unter Verwendung von Agarose oder 96-Lochplatten und die Suche, und zwar einzeln, nach Hybridomen, die sich verändert haben, umfasst (J. Immunol., 131, 877 (1983)), und das Verfahren, das die Verwendung von Durchflusszytometrie zum Sammeln, und zwar mit einem Mal, von mehreren Hundert bis mehreren Tausend Hybridomzellen, die sich verändert haben, umfasst (J. Immunol. Methods, 52, 1 (1982)). Die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Änderung von Hybridomen ist jedoch an sich niedrig, so dass beide Verfahren kaum zum „class-switching“ von der Klasse IgM zur Klasse IgG, von dem angenommen wird, dass es mit besonders geringer Wahrscheinlichkeit auftritt, verwendet werden können. Diese Verfahren sind daher nicht anwendbar, wenn das Antigen ein Glykolipid oder dergleichen ist, mit dem monoklonale Antikörper der Klasse IgG schwierig zu erhalten sind.

[0009] Die WO-A-90/02795 offenbart ein Verfahren zur Herstellung eines einen monoklonalen IgG-Antikörper produzierenden Hybridoms, das durch die Immunisierung von Lymphozyten mit T-Zell-abhängigem oder T-Zell-unabhängigem Antigen gekennzeichnet ist.

[0010] Miyake et al. offenbaren in Cancer Research 1988, Band 48, Seiten 6154-6160 und Cancer 1990, Band 65, Seiten 499-505 die Herstellung monoklonaler Antikörper vom Typ IgM, die auf N-Acetyl- oder N-Glycolyl-GM<sub>2</sub>-Ganglioside ansprechen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

[0011] Dementsprechend ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von Hybridomen, die zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG gegen ein Glykolipid-Antigen oder dergleichen befähigt sind, bereitzustellen.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Hybridomen, die zur Herstellung

eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG befähigt sind, umfassend die Kultivierung eines Hybridoms, das einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgM in Gegenwart eines Antigens, das mit dem Antikörper reagiert, sowie in Gegenwart von Thymozyten produziert; und Isolierung der IgG-produzierenden Hybridome. Die Erfindung betrifft auch Hybridome, die zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG, der mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> reagiert, befähigt sind, und durch diese Hybridome produzierte Antikörper; sowie pharmazeutische Mittel, die die Antikörper enthalten; und die Verwendung der Antikörper zur Herstellung pharmazeutischer Mittel zur Behandlung von Tumoren.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0013] **Fig. 1** zeigt die Ergebnisse der Messung der Fluoreszenzintensität durch Durchflusszytometrie im Anschluss an die Umsetzung von FITC-Anti-Protein A mit dem Hybridom KM-697. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Zellen und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt das Muster für das Hybridom, das mit FITC-Anti-Protein A umgesetzt wurde, während die gestrichelte Linie das Muster für das Hybridom zeigt, das keiner Umsetzung mit FITC-Anti-Protein A unterlag. A zeigt das Muster für das Hybridom KM-697 ohne Antigen-Stimulation, B zeigt das Muster für das Hybridom KM-697 nach fünfmaliger Antigen-Stimulation und C zeigt das Muster für das Hybridom KM-697 nach sechsmaliger Antigen-Stimulation.

[0014] **Fig. 2** zeigt das Muster einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese einer gereinigten Probe des monoklonalen Antikörpers KM-750 (unter Verwendung eines Gels mit einem Gradienten von 4–15). Dargestellt sind von links die elektrophoretischen Muster eines Molekulargewichtsmarkers, einer IgG-Standardprobe, einer IgM-Standardprobe bzw. des monoklonalen Antikörpers KM-750. A zeigt die Ergebnisse einer unter reduzierenden Bedingungen durchgeführten Elektrophorese, während B die Ergebnisse einer Elektrophorese zeigt, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde.

[0015] **Fig. 3** zeigt die Reaktivitäten einiger gereinigter monoklonaler Antikörper einer Verdünnungsreihe (0,05–25 µg/ml) für 20 pmol/Loch GM<sub>2</sub>. Das Zeichen ? steht für KM-750, ○ für KM-796 und Δ für KM-737.

[0016] **Fig. 4** zeigt die Reaktivitäten einiger gereinigter monoklonaler Antikörper bei einer Konzentration von 10 µg/ml für eine Verdünnungsreihe (0,04–20 pmol/Loch) von GM<sub>2</sub>. Das Symbol □ steht für KM-750, ○ für KM-796 und Δ für KM-737.

[0017] **Fig. 5** zeigt die Komplement-abhängige Zytotoxizität der monoklonalen Antikörper gegen das Neurozytoma IMR32, das das Gangliosid GM<sub>2</sub> exprimiert. Auf der Abszisse ist die Konzentration des zugegebenen Antikörpers aufgetragen. Das Symbol • steht für KM-750 und ○ für KM-737.

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft Hybridome, die monoklonale Antikörper der Klasse IgG produzieren, die durch die Kultivierung eines Hybridoms, das einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgM produziert, in Gegenwart eines Antigens, das mit dem IgM-Antikörper reagiert, sowie in Gegenwart von Thymozyten hergestellt werden.

##### (1) Stimulation von Hybridomen mit einem Antigen

[0019]  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter eines Hybridomstamms, der einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgM produziert, werden in Gegenwart von Thymozyten kultiviert. Als Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgM produziert, seien zum Beispiel Hybridome genannt, die einen monoklonalen Antikörper gegen ein Glykolipid, wie etwa das Gangliosid GM<sub>2</sub>, sialyliertes Le<sup>x</sup>, Le<sup>x</sup> oder Le<sup>y</sup>, produzieren. Als Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper gegen ein als Antigen verwendetes Glykolipid produziert, seien unter anderem die Ratten-Hybridome KM-602, KM-603, KM-604, KM-605 und KM-606 und die Maus-Hybridome KM-531, KM-693, KM-694, KM-695, KM-696 und KM-697 genannt, von denen jedes zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers, der mit dem Gangliosid GM<sub>2</sub> reagiert, befähigt ist. Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Hybridome der Klasse IgM können durch Herstellungsverfahren gewonnen werden, wie sie herkömmlicherweise zur Herstellung bekannter Hybridomstämme verwendet werden. Die Ratten-Hybridome KM-602, KM-603, KM-604, KM-605 und KM-606 und die Maus-Hybridome KM-531, KM-693, KM-694, KM-695, KM-696 und KM-697 können zum Beispiel durch dasselbe Verfahren, wie in der JP-A-4-1138 beschrieben, oder durch ein modifiziertes Verfahren hergestellt werden. Die Hybridome KM-531 und KM-603 sind seit 14. September 1989 bzw. 31. Oktober 1989 und KM-696 und KM-607 seit 2. April 1991 beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, 1–3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibarake, Japan unter den Hinterlegungsnummern FERM BP-2597, FERM BP-2636, FERM BP-3337 bzw. FERM BP-3338 gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt. Als Thymozyten seien von Mäusen abstammende Thymozyten genannt, die hauptsächlich T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen umfassen, diese werden

bei  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen/ml verwendet. Wenn ein Hybridom in Gegenwart von Thymozyten kultiviert wird, wird die Antigen-Stimulation durch Zugabe eines Antigens, das mit dem von dem Hybridom produzierten Antikörper reagiert, zu der Kulturflüssigkeit erreicht. Die Antigen-Konzentration beträgt 10 bis  $1 \times 10^3$  ng/ml, und die für eine Antigen-Stimulation benötigte Kultivierungsdauer beträgt 5 bis 7 Tage. Das Antigen wird vorzugsweise in einer in Liposomen eingeschlossenen Form zu der Kulturflüssigkeit hinzugegeben. Die Liposomen werden unter Verwendung eines Phospholipids, wie etwa Dipalmitoylphosphatidylcholin oder Dipalmitoylphosphatidylsäure und Cholesterin hergestellt. Bevorzugt verwendet man eine Kombination mehrerer Arten Phospholipide und Cholesterin. Die Zugabe eines Mitogens, wie etwa Lipid A, zu den Liposomen kann zu einer wirksameren Antigen-Stimulation führen. Im Allgemeinen reicht nur eine Antigen-Stimulation nicht aus, sondern ist eine etwa 6- bis 10malige Wiederholung der Antigen-Stimulation notwendig.

### (2) Isolierung der aus dem „class-switching“ resultierenden Hybridome

[0020] Von den Hybridomen, die einer Antigen-Stimulation, wie unter (1) beschrieben, unterzogen wurden, werden die Hybridome, die einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgG produzieren, isoliert. Zur Isolation können das Sib-Selektionsverfahren, bei dem Hybridome unter Verwendung eines Agarose-Mediums oder von 96-Lochplatten kloniert und einzeln auf Hybridome geprüft werden, die sich verändert haben (J. Immunol., 131, 877 (1983)), und das Verfahren, bei dem die Durchflusszytometrie zum Sammeln von mehreren Hundert bis mehreren Tausend Hybridomzellen, die sich verändert haben, verwendet wird (J. Immunol. Methods, 52, 1 (1982)), verwendet werden. Für eine effiziente Isolierung ist das Verfahren unter Verwendung von Durchflusszytometrie bevorzugt, folglich wird dieses Verfahren unten ausführlicher beschrieben.

[0021] Zur Isolierung mittels Durchflusszytometrie ist es notwendig, dass die Oberfläche der Hybridomzellen, die einem „class-switching“ unterzogen werden sollen, Immunglobulin-Moleküle derselben Klasse und derselben Bindungsspezifität wie der durch die Zellen sekretierte monoklonale Antikörper aufweisen. Vor der Stimulation mit einem Antigen wird daher untersucht, ob Immunglobulin-Moleküle auf der Zelloberfläche vorhanden sind oder nicht, wobei ein Anti-IgM-Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff, wie etwa FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) (nachfolgend FITC-Anti-IgM), markiert ist, verwendet wird. Somit lässt man FITC-Anti-IgM mit Hybridomen reagieren und misst die Fluoreszenzintensität der Zelloberfläche durch Beobachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop oder mittels durchflusszytometrischer Analyse; man wählt Hybridome aus, die eine ausreichende Anzahl Immunglobulin-Moleküle der Klasse IgM auf der Zelloberfläche aufweisen.

[0022] Nach vollständiger, unter (1) beschriebener Antigen-Stimulation lässt man einen mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierten Anti-IgG-Antikörper (nachfolgend FITC-Anti-IgG), ein mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiertes Protein A (nachfolgend FITC-Protein A) oder ein mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiertes Protein G (nachfolgende FITC-Protein G) mit 10 Millionen bis 1000 Millionen Hybridomen reagieren. Nach der Umsetzung werden die Hybridome einer Durchflusszytometrie unterzogen, die Messung der Fluoreszenzintensität wird im Anschluss an die Einwirkung von Laserstrahlen durchgeführt. Eine positive oder negative elektrische Ladung wird Hybridomen, die eine hohe Fluoreszenzintensität aufweisen, verliehen und lässt die Hybridome mit einer großen Geschwindigkeit zwischen Ablenkplatten fließen, um geladene Hybridome selektiv zu sammeln. Für den Fall, dass die Anzahl an Wiederholungen der Antigen-Stimulation nicht ausreichend ist, sind wenige Hybridome mit einer hohen Fluoreszenzintensität zu detektieren. Eine Gruppe von Zellen (mehrere Prozent aller Hybridomzellen), die eine Verschiebung zu der Seite höherer Fluoreszenzintensität relativ zu einer durch Auftragung der Fluoreszenzintensität (auf der Abszisse) gegen die Anzahl von Zellen (auf der Ordinate) gewonnenen Verteilungskurve aufweisen, werden in jedem Fall gesammelt und erneut einer Antigen-Stimulation und anschließend einer Durchflusszytometrie unterzogen. Mit zunehmender Anzahl der Wiederholungen der Antigen-Stimulation tritt eine Zellgruppe mit einer hohen Fluoreszenzintensität deutlicher hervor und die Verteilungskurve zeigt zwei Peaks. In diesem Stadium werden Zellen, die zu dem Peak höherer Fluoreszenzintensität gehören, gesammelt.

### (3) Klonieren

[0023] Die wie unter (2) beschrieben erhaltenen Hybridomzellen mit einer hohen Fluoreszenzintensität werden auf eine passende Zelldichte verdünnt, in die Löcher von 96-Lochplatten verteilt und kultiviert. Die Zelldichte sollte vorzugsweise eine Zelle pro Loch oder pro zwei Löcher betragen (Klonieren mittels der limitierten Verdünnungsmethode). Um eine bessere Effizienz der Kultivierung zu erzielen, sollte die Kultivierung vorzugsweise in Gegenwart von  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^7$  Thymozyten pro ml ausgeführt werden. Nach 1 bis 2 Wochen Kultivierung werden Proben von den Kulturüberständen genommen, und der Anteil Löcher, in denen ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgG produziert wird, und der Anteil der Löcher, in denen ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgM produziert wird, wird zum Beispiel durch enzymatischen Immunoassay untersucht. In dem Fall, dass Löcher, in denen ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgM produziert wird, gefunden werden,

werden die Hybridome in den Löchern, in denen ein monoklonalen Antikörper der Klasse IgG produziert wird, erneut mittels der limitierenden Verdünnungsmethode kloniert. Das Klonieren mittels limitierender Verdünnungsmethode wird auf diese Weise wiederholt, bis keine Löcher, in denen ein monoklonalen Antikörper der Klasse IgM produziert wird, mehr gefunden werden und die Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG in nicht weniger als 90% der Löcher detektiert wird. Schließlich werden die Hybridome in denjenigen Löchern, in denen ein monoklonalen Antikörper der Klasse IgG am reichlichsten produziert wird, als „class-switched“-Hybridome ausgewählt. Als „class-switched“-Hybridome, die zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG befähigt sind, seien Hybridome genannt, die einen monoklonalen Antikörper gegen das Gangliosid GM<sub>2</sub> produzieren, wie etwa KM-750 und KM-796. Die Hybridome KM-750 und KM-796 sind seit dem 2. April 1991 beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology unter den Hinterlegungsnummern FERM BP-3339 bzw. FERM BP-3340 gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt.

#### (4) Herstellung monoklonaler Antikörper

[0024] Die wie oben unter (3) beschrieben selektierten „class-switched“ Hybridome werden 2 bis 7 Tage unter Verwendung von Roller-Flaschen oder Spinner kultiviert. Man sammelt jeden Kulturüberstand durch Zentrifugation und bringt ihn auf eine Protein-A-Kolonnen oder eine Protein-G-Kolonnen auf. Der adsorbierte monoklonale Antikörper der Klasse IgG wird dann eluiert. Als solchermaßen gereinigte monoklonale Antikörper seien zum Beispiel die monoklonalen Antikörper KM-750 und KM-796 genannt, die von den Hybridomen KM-750 beziehungsweise KM-796 gegen das Gangliosid GM<sub>2</sub> produziert werden. Dass der erhaltene monoklonale Antikörper zur Klasse IgG gehört, wird zum Beispiel durch SDS-Elektrophorese überprüft. Ein solcher gereinigter Antikörper lässt sich auch herstellen, indem man Mäusen intraperitoneal 0,5 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) verabreicht, sie 3 Tage bis 2 Wochen füttert, ihnen danach intraperitoneal das Hybridom verabreicht, die resultierende aszitische Flüssigkeit aus ihnen sammelt und den in der aszitischen Flüssigkeit enthaltenen Antikörper unter Verwendung einer Protein-A- oder Protein-G-Kolonnen aufreingt. Die Unterklasse des monoklonalen Antikörpers kann durch Enzymimmunoassay unter Verwendung eines Unterklasse-Typisierungskits oder durch das Ouchterlony-Verfahren, das auf Immunpräzipitation basiert, bestimmt werden. Die Proteinmenge wird durch das Lowry-Verfahren oder durch Berechnung auf Basis der optischen Dichte bei 280 nm bestimmt.

#### (5) Untersuchung der Aktivität und Reaktionspezifität der monoklonalen Antikörper

[0025] Die Aktivität und Reaktionspezifität jedes erhaltenen monoklonalen Antikörpers werden mittels Enzymimmunoassay oder Radioimmunoassay (E. Harlow und D. Lane (Herausgeber): Antibodies – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) untersucht.

[0026] Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können alleine als Antitumormittel verwendet werden. Sie können zusammen mit wenigstens einem pharmazeutisch verträglichen Träger in ein Antitumormittel formuliert werden. Die monoklonalen Antikörper werden zum Beispiel in physiologischer Salzlösung, einer wässrigen Lösung von Glucose, Lactose oder Mannitol und dergleichen, gelöst. Das Pulver der monoklonalen Antikörper zur Injektion kann durch Lyophilisierung der monoklonalen Antikörper gemäß des herkömmlichen Verfahrens und Mischen der lyophilisierten Produkte mit Natriumchlorid hergestellt werden. Das Antitumormittel kann des Weiteren herkömmlicherweise verwendete Additive, die auf dem Gebiet der medizinischen Herstellung bekannt sind, enthalten, zum Beispiel pharmazeutisch verträgliche Salze.

[0027] Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können in Form des oben beschriebenen Antitumormittels an Säugetiere, einschließlich Menschen in einer Dosis von 0,2 bis 20 mg/kg/Tag verabreicht werden. Die Dosis kann in Abhängigkeit von Alter, Zustand etc. der Patienten variieren. Die Verabreichung des Antitumormittels kann durch intravenöse Injektion einmal am Tag (einzelne Verabreichung oder aufeinander folgende Verabreichung) oder mit Unterbrechungen ein- bis dreimal die Woche oder einmal alle zwei bis drei Wochen durchgeführt werden.

[0028] Das Antitumormittel sollte zur Behandlung von Tumoren, wie etwa Lungenkarzinom, Cerebroma und Melanom, brauchbar sein.

[0029] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die vorliegende Erfindung des Weiteren.

#### Beispiele

##### (1) Hybridom-Selektion

[0030] Die Ratten-Hybridome KM-602, KM-603, KM-604, KM-605 und KM-606 und die Maus-Hybridome KM-531, KM-693, KM-694, KM-695, KM-696 und KM-697, von denen jedes einen mit dem Gangliosid GM<sub>2</sub> re-

agierenden monoklonalen Antikörper der Klasse IgM produziert, wurden gemäß dem in der JP-A-4-1138 beschriebenen Verfahren hergestellt und auf Gegenwart oder Abwesenheit eines Immunglobulins auf der Zelloberfläche hin untersucht. Somit wurden für jedes Hybridom 200 µl einer 32fachen Verdünnung von FITC-Anti-Maus-IgG (H + L) (0,5 mg/ml; Funakoshi) oder eine 200fache Verdünnung von FITC-Anti-Ratten-IgG (N + L) (DAKO) zu etwa 10<sup>6</sup> Zellen zugegeben; die Reaktion wurde bei 4°C 30 Minuten ausgeführt. Anschließend wurden die Hybridomzellen mit zwei Teilen gekühltem PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,2) gewaschen und in etwa 6 ml PBS suspendiert. Die Fluoreszenzintensität wurde unter Verwendung eines Durchflusszytometers (FCS-1, Nippon Bunko) gemessen. Im Ergebnis wurden weder Immunglobuline der Klasse IgM noch Immunglobuline der Klasse IgG auf der Zelloberfläche irgendeines der Hybridome KM-602, KM-603, KM-604, KM-605 und KM-606 gefunden. Für die Hybridome KM-531, KM-693, KM-694, KM-695, KM-696 und KM-697 wurden Signale für Immunglobuline der Klasse IgM auf der Zelloberfläche in für die Zellsammlung mittels Durchflusszytometrie ausreichender Anzahl beobachtet. Bei diesen Hybridomen war die Zelloberfläche jedoch weitgehend frei von jeglichen Immunglobulinen der Klasse IgG, die mit der FITC-Anti-Maus-γ-Kette (Funakoshi) reagieren. Unter den Zelloberflächen-Immunglobulin-positiven Hybridomen wurden KM-696 und KM-697, die eine große Reaktivität mit dem Antigen und eine hohe Antigenspezifität aufwiesen, für die nachfolgenden Experimente ausgewählt. Der monoklonale Antikörper KM-696, der durch das Hybridom KM-696 produziert wurde, reagierte spezifisch mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub>, jedoch nicht mit anderen Gangliosiden, wie etwa N-Acetyl-GM<sub>3</sub>, N-Glykolyl-GM<sub>3</sub>, N-Glykolyl-GM<sub>2</sub>, GM<sub>1</sub>, GD<sub>1</sub>, GD<sub>2</sub>, GD<sub>3</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>, GT<sub>1b</sub> und GQ<sub>1b</sub>. Der monoklonale Antikörper KM-697, der durch das Hybridom KM-697 produziert wurde, reagierte spezifisch mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> und N-Glykolyl-GM<sub>2</sub>, jedoch nicht mit anderen Gangliosiden, wie etwa N-Acetyl-GM<sub>3</sub>, N-Glykolyl-GM<sub>3</sub>, GM<sub>1</sub>, GD<sub>1</sub>, GD<sub>2</sub>, GD<sub>3</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>, GT<sub>1b</sub> und GQ<sub>1b</sub>.

## (2) Antigen-Stimulation von Hybridomen und Isolierung durch Durchflusszytometrie

[0031] Zunächst wurden GM<sub>2</sub>-enthaltende Liposomen auf die folgende Weise hergestellt. Man löste 0,5 µmol Dipalmitoylphosphatidylcholin (Sigma); 0,05 µmol Dipalmitoylphosphatidylsäure (Sigma); 0,5 µmol Cholesterin (Nakarai Tesque); 2,5 µg Lipid A (Funakoshi) und 2,0 µg des Gangliosids GM<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim) in Chloroform. Das Lösungsmittel wurde dann unter vermindertem Druck abdestilliert, wobei ein dünner Film erhalten wurde. Dazu gab man 0,5 ml PBS. Der Inhalt des Behälters wurde auf 50 bis 60°C erhitzt und anschließend einem Rühren mit einem Mixer und einer 10minütigen Ultraschallbehandlung unterzogen, so dass GM<sub>2</sub>-enthaltende Liposomen erhalten wurden.

[0032] Anschließend ließ man 20 bis 30 Millionen noch nicht mit dem Antigen stimulierte Zellen des Hybridoms KM-696 oder KM-697 mit 200 µl einer 20fachen Verdünnung FITC-Anti-Protein A (5 mg/ml; Boehringer Mannheim) 30 Minuten bei 4°C reagieren. Die Hybridomzellen wurden zweimal mit gekühltem PBS gewaschen, in 6 ml PBS suspendiert und einer Durchflusszytometrie unterzogen.

[0033] Bei der Durchflusszytometrie wurde eine Gruppe von mehreren Hunderttausend Zellen, die eine Verschiebung zu der Seite höherer Fluoreszenzintensität gegenüber einer durch Auftragung der Fluoreszenzintensität (Abszisse) gegen die Anzahl von Zellen (Ordinate) gewonnenen Verteilungskurve aufwiesen, gesammelt, obwohl eine Gruppe Hybridomzellen, die eine hohe Fluoreszenzintensität aufwies, nicht detektiert werden konnte.

[0034] Unter Verwendung einer 24-Lochplatte (Nunc) wurden die mehreren Hunderttausend Zellen jedes Hybridoms, die wie in der obigen Weise gesammelt wurden, in 1 bis 1,5 ml RPMI-1640-Medium (Nissui Pharmaceutical), das mit 10% fötalem Kälberserum (CSL) versetzt war, in Gegenwart von Mausthymozyten kultiviert (die Anzahl der Zellen betrug etwa ein Fünftel der Gesamtzahl an Thymozyten einer 3 bis 4 Wochen alten Maus). Dabei wurde die Antigen-Stimulation erreicht, indem man die GM<sub>2</sub>-enthaltenen Liposomen bis zu einer Endkonzentration an GM<sub>2</sub> von 500 ng/ml zugab. Bei Kontrolldurchgängen wurde die Kultivierung ohne Antigen-Stimulation ausgeführt, anschließend ließ man die Zellen mit FITC-Anti-Protein A reagieren und unterzog sie einer Durchflusszytometrie; dieses Verfahren wurde 15mal für jedes Hybridom wiederholt. Bei dieser Kultivierung ohne Antigen-Stimulation zeigte sich keine Gruppe von Zellen, die mit FITC-Anti-Protein A reagiert und eine erhöhte Fluoreszenzintensität ergibt.

[0035] Die Kultivierung zur Antigen-Stimulation in Gegenwart GM<sub>2</sub>-enthaltender Liposomen wurde 6 bis 7 Tage bei 37°C in Gegenwart von 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Nach der Antigen-Stimulation, als die Anzahl der Hybridomzellen 20 bis 30 Millionen erreichte, ließ man die Zellen mit FITC-Anti-Protein A reagieren, wusch sie anschließend mit PBS, suspendierte sie in 6 ml PBS und unterzog sie einer Durchflusszytometrie, um dadurch eine Gruppe von mehreren Hunderttausend Zellen, die eine Verschiebung zur Seite höherer Fluoreszenzintensität aufwies, zu sammeln. Nach drei Wiederholungen der Kultivierung zur Antigen-Stimulation mit anschließendem Sortieren mittels Durchflusszytometrie wurde die Kultivierung ohne Antigen-Stimulation mit anschließendem Sortieren mittels Durchflusszytometrie zweimal für das Hybridom KM-696 und dreimal für das Hybridom KM-697 wiederholt. Für jedes Hybridom wurde die Kultivierung mit Antigen-Stimulation und anschließendem Sortieren mittels Durchflusszytometrie des Weiteren zweimal wiederholt, woraufhin sich eine Gruppe von

Zellen, die mit FITC-Anti-Protein A reagiert und eine erhöhte Fluoreszenzintensität ergab, sowohl für das Hybridom KM-696 als auch für das Hybridom KM-697 zeigte. Beide Zellgruppen wurden mittels Durchflusszytometrie aussortiert und ein weiteres Mal einer Antigen-Stimulation und Kultivierung unterzogen, wonach alle Zellen des Hybridoms KM-696 und alle Zellen des Hybridoms KM-697 zu den jeweiligen Zellgruppen gehörten, die mit FITC-Anti-Protein A reagierten und eine hohe Fluoreszenzintensität ergaben. **Fig. 1** zeigt das Fluoreszenzintensitätsmuster bei der Durchflusszytometrie des Hybridoms KM-697.

### (3) Klonieren

[0036] Für beide Hybridome KM-696 und KM-697 führte die fortgesetzte Kultivierung der Gruppe von Zellen, die mit FITC-Anti-Protein A reagierten und eine hohe Fluoreszenzintensität ergaben, dazu, dass eine Gruppe von Zellen, die nicht mit FITC-Anti-Protein A reagierten, erneut erschien, und anschließend dazu, dass die Anzahl solcher Zellen anstieg. Daher wurde jede Gruppe von Zellen, die mit FITC-Anti-Protein A reagierten und eine hohe Fluoreszenzintensität ergaben, kloniert. Zunächst wurden die Zellen in Form einer verdünnten Zellsuspension in die Löcher von 96-Lochplatten verteilt, so dass jedes Loch oder jeweils zwei Löcher eine Zelle enthielten, und in Gegenwart von etwa einer Million Thymozyten kultiviert. Nach einer Kultivierung von etwa 10 Tagen wurden von den Kulturüberständen Proben genommen. Die Proben wurden mittels des unten genannten Enzymimmunoassayverfahrens getestet und der Anteil von Löchern, in denen ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgG produziert wurde, und derjenige von Löchern, in denen ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgM produziert wurde, wurden untersucht. Beim ersten Klonieren wurden Löcher, in denen ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgM produziert wurde, gefunden. Daher wurden die Hybridome in Löchern, in denen ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgG produziert wurde, erneut mittels der limitierenden Verdünnungsmethode kloniert. Beim zweiten Klonieren wurde in keinem der Löcher ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgM produziert und die Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG wurde in nicht weniger als 90% der Löcher festgestellt. Schließlich wurden die Löcher, in denen ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgG am reichlichsten produziert wurde, ausgewählt. Somit wurde das Hybridom KM-750 als ein vom Hybridom KM-697 ausgehendes „class-switching“-Produkt und das Hybridom KM-796 als ein vom Hybridom KM-696 ausgehendes „class-switching“-Produkt ausgewählt.

### Enzymimmunoassay (ELISA)

[0037] GM<sub>2</sub> (2 ng; Boehringer Mannheim) oder 2 ng eines anderen Gangliosids wurden in 2 µl einer Ethanol-lösung, die 5 ng Phosphatidylcholin (Sigma) und 2,5 ng Cholesterin (Sigma) enthielt, gelöst. Diese Lösung oder eine Verdünnung davon wurde in 20 µl-Portionen in die Löcher einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Greiner) verteilt; nach Lufttrocknung wurde unter Verwendung von 1% BSA-enthaltendem PBS geblockt. Ein Hybridomkulturüberstand oder ein gereinigter monoklonaler Antikörper wurde zu der Platte zugegeben (50 bis 100 µl pro Loch) und die Reaktion wurde 10 Stunden bei 4°C ausgeführt. Anschließend wurden die Löcher gut mit PBS gewaschen, Peroxidase-markierte Gamma-Kette von Anti-Maus-Antikörper (Funakoshi) oder Peroxidase-markiertes Protein A (Funakoshi) wurde zugegeben (50 bis 100 µl pro Loch) und die Reaktion wurde 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur ausgeführt. Nach Waschen mit PBS wurden 50 bis 100 µl einer ABTS-Substratlösung (hergestellt durch Lösen von 550 mg 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz in 0,1 M Citratpuffer (pH 4,2) und Zugabe, und zwar unmittelbar vor der Verwendung, von Wasserstoffperoxid in einer Menge von 1 µl/ml) für die Farbentwicklung zu jedem Loch zugegeben. Anschließend wurde die optische Dichte bei 415 nm (OD<sub>415</sub>) gemessen.

### (4) Herstellung monoklonaler Antikörper

[0038] Die Hybridome KM-750 beziehungsweise KM-796 wurden 3 Tage in 1 bis 2 Liter Rotations-Inkubatoren kultiviert, um Kulturüberstände in großen Mengen zu erhalten. Jeder gewonnene Kulturüberstand wurde auf eine Protein-A-Sepharose-4B-Kolonnen (Pharmacia) aufgetragen und der adsorbierte monoklonale Antikörper der Klasse IgG wurde mit 0,1 M Citratpuffer (pH 4,0) eluiert. Das Eluat wurde gegen PBS dialysiert, so dass ein aufgereinigter monoklonaler Antikörper erhalten wurde. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese belegte, dass der aufgereinigte monoklonale Antikörper zur Klasse IgG gehörte. Das verwendete Gel war ein Gel mit einem Gradienten von 4–15% (Daiichi Kagaku). **Fig. 2** zeigt die Ergebnisse der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von KM-750. Die Bestimmung der Antikörperunterklasse mittels Enzymimmunoassay unter Verwendung eines Maus-Unterklassen-Typisierungskits (Zymed) zeigte auf, dass der von Hybridom KM-750 produzierte monoklonale Antikörper KM-750 und der von Hybridom KM-796 produzierte monoklonale Antikörper KM-796 beide zur Unterklasse IgG<sub>3</sub> gehörten. Proteinquantifizierung wurde unter Verwendung eines BCA-Reagenzes (Pierce) durchgeführt.

## (5) Aktivitätsassay monoklonaler Antikörper

[0039] Die aufgereinigten monoklonalen Antikörper wurden jeweils in Verdünnungsreihen (0,05 bis 25 µg/ml) auf die Reaktivität mit 20 pmol/Loch GM<sub>2</sub> mittels ELISA-Verfahren getestet. Zum Vergleich wurde die Reaktivität des monoklonalen Antikörpers KM-737 (der Klasse IgG<sub>3</sub>), der ein monoklonaler Antikörper gegen das Lachs-Wachstumshormon ist, gegenüber GM<sub>2</sub> ebenfalls bestimmt. Wie in **Fig. 3** gezeigt, wiesen beide monoklonalen Antikörper KM-750 und KM-796 einen hohen Grad der Bindung an GM<sub>2</sub> in einer von der Antikörperkonzentration abhängigen Weise auf, wohingegen der monoklonale Antikörper KM-737 nicht an GM<sub>2</sub> gebunden wurde.

[0040] Anschließend wurde die Reaktivität jedes gereinigten monoklonalen Antikörpers bei einer Konzentration von 10 µg/ml mit Verdünnungsreihen (0,04 bis 20 pmol/Loch) von GM<sub>2</sub> mittels des ELISA-Verfahrens abgeschätzt. Zum Vergleich wurde auch die Reaktivität des monoklonalen Antikörpers KM-737 untersucht. Wie in **Fig. 4** gezeigt, wiesen beide monoklonalen Antikörper KM-750 und KM-796 eine hohe Bindungsaktivität gegenüber GM<sub>2</sub> in einer von der Antigenkonzentration abhängigen Weise auf, während der monoklonale Antikörper KM-737 keine Bindungsaktivität für GM<sub>2</sub> aufwies.

## (6) Test auf Reaktivitätsspezifität

[0041] Die monoklonalen Antikörper KM-750 und KM-796 wurden mittels des E-LISA-Verfahrens auf Reaktivität mit den Gangliosiden GM<sub>1</sub>, N-Acetyl-GM<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim), N-Glykolyl-GM<sub>2</sub>, N-Acetyl-GM<sub>3</sub>, N-Glykolyl-GM<sub>3</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> (latron), GD<sub>2</sub>, GD<sub>3</sub> (latron), GT<sub>1b</sub> (Funakoshi) und GQ<sub>1b</sub> (latron) getestet. GM<sub>1</sub> und GD<sub>1a</sub> wurden aus Rinderhirn gereinigt, N-Glykolyl-GM<sub>2</sub> und N-Glykolyl-GM<sub>3</sub> aus der Mäuseleber, N-Acetyl-GM<sub>3</sub> wurde aus Hundeerythrozyten gereinigt und GD<sub>2</sub> aus der kultivierten Zelllinie IMR32 (ATCC CCL127), und zwar im Wesentlichen mittels eines per se bekannten Verfahrens (J. Biol. Chem., 263, 10915 (1988)). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Wie in Tabelle 1 gezeigt, reagierte KM-750 nur mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> und N-Glykolyl-GM<sub>2</sub>, jedoch nicht mit den anderen Gangliosiden. Diese Reaktionsspezifität ist dieselbe wie diejenige des monoklonalen Antikörpers KM-697 vor dem „class-switching“, was darauf hinweist, dass die Reaktionsspezifität auch nach dem „class-switching“ zu IgG unverändert blieb. KM-796 reagierte nur mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub>, nicht jedoch mit den anderen Gangliosiden. Diese Reaktionsspezifität ist dieselbe wie diejenige des monoklonalen Antikörpers KM-696 vor dem „class-switching“; somit blieb gleichermaßen für KM-796 die Reaktionsspezifität auch nach dem „class-switching“ zu IgG unverändert.

Tabelle 1

Gangliosid	OD <sub>415</sub>	
	KM-750	KM-796
N-Acetyl-GM <sub>3</sub>	0,099	0,031
N-Glykolyl-GM <sub>3</sub>	0,052	0,014
N-Acetyl-GM <sub>2</sub>	1,239	0,579
N-Glykolyl-GM <sub>2</sub>	0,594	0,022
GM <sub>1</sub>	0,039	0,004
GD <sub>2</sub>	0,077	0,035
GD <sub>3</sub>	0,044	0,010
GD <sub>1a</sub>	0,056	0,019
GD <sub>1b</sub>	0,038	0,004
GT <sub>1b</sub>	0,067	0,044
GQ <sub>1b</sub>	0,021	0,017

## (7) Test auf komplement-abhängige Cytotoxizität (CDC)

## (a) Herstellung der Zielzellen

[0042] Das Neurozytoma IMR32 (ATCC CCL 127), das das Gangliosid GM<sub>2</sub> exprimiert, wurde in dem mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) versetzten RPM11640-Medium suspendiert und auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt, um als Zielzellen zu dienen. Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> wurde bis zu 100 µCi/ $1 \times 10^7$  Zellen dazugegeben und das Medium wurde bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Die Zellen wurden mit dem mit 10% FCS versetzten RPM11640-Medium dreimal gewaschen. Man ließ die intakten Zellen zur Dissoziation 30 Minuten bei 4°C in dem mit 10% FCS versetzten RPM11640-Medium stehen. Nach Zentrifugation bei 1200 Upm für 10 Minuten wurde die Zelldichte durch Zugabe des mit 10% FCS versetzten RPM11640-Mediums auf  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

## (b) Herstellung des Komplements

[0043] Die unter obigem (a) hergestellten Zielzellen ( $2 \times 10^7$  Zellen) wurden zu 1 ml Kaninchen-Komplement (Cederane Laboratory) zugegeben und 1 Stunde bei 4°C umgesetzt. Die Zellen wurden abfiltriert, so dass eine Komplementlösung erhalten wurde.

## (c) Messung der CDC-Aktivität

[0044] Die monoklonalen Antikörper KM-750 und KM-737 wurden jeweils zu den Löchern der 96-Lochplatte mit U-Boden bis zu einer Endkonzentration im Bereich von 0,05 bis 50 µg/ml gegeben, weiterhin wurden  $2 \times 10^5$  Zellen der Zielzellen zu jedem Loch zugegeben. Nach 1 stündiger Umsetzung bei Raumtemperatur wurde 5 Minuten bei 1200 Upm zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen. Die unter (b) oben hergestellte Komplementlösung wurde mit dem mit 10% FCS versetzten RPM11640-Medium 9fach verdünnt und eine 150 µl-Portion der Verdünnung wurde zu jedem Loch zugegeben. Man führte eine 1stündige Umsetzung bei Raumtemperatur aus, anschließend wurden die Zellen durch 5minütige Zentrifugation bei 1200 Upm entfernt. Die

Menge an  $^{51}\text{Cr}$  in 75  $\mu\text{l}$  des Überstands wurde mittels eines  $\gamma$ -Zählers bestimmt. Die Menge an natürlich zerfallenen  $^{51}\text{Cr}$  wurde auf dieselbe Weise, wie oben beschrieben, bestimmt, mit der Ausnahme, dass allein das mit 10% FCS versetzte RPM11640-Medium, das weder monoklonalen Antikörper noch Komplement enthielt, zu den Zielzellen zugegeben wurde. Die Gesamtmenge an zerfallenem  $^{51}\text{Cr}$  wurde auf die gleiche Weise, wie oben beschrieben, bestimmt, mit der Ausnahme, dass 5N Natriumhydroxidlösung an Stelle der monoklonalen Antikörper und der Komplementlösung zu den Zielzellen zugegeben wurde. Die CDC-Aktivität wurde mittels der folgenden Gleichung berechnet.

$$\text{CDC-Aktivität (\%)} = \frac{\text{Menge an } ^{51}\text{Cr} \text{ im Überstand der Probe} - \text{Menge an natürlich zerfallenem } ^{51}\text{Cr}}{\text{Gesamtmenge an zerfallenem } ^{51}\text{Cr} - \text{Menge an natürlich zerfallenem } ^{51}\text{Cr}} \times 100$$

[0045] Die Ergebnisse sind in **Fig. 5** gezeigt. Wie in **Fig. 5** gezeigt, ist ersichtlich, dass der monoklonale Antikörper KM-750 eine CDC-Aktivität gegenüber Neurozytoma IMR32 aufweist.

[0046] Wie hierin oben ausführlich beschrieben, betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Hybridomen, bei dem Hybridome, die einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgM produzieren, einem „class-switching“ zu Hybridomen, die einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgG produzieren, unterzogen werden. Die monoklonalen Antikörper der Klasse IgG, die durch die Hybridome produziert werden, können weitreichend bei der Behandlung verschiedener Krankheiten verwendet werden.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Hybridoms, welches zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG befähigt ist, umfassend:

(1) die Kultivierung eines Hybridoms, welches zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgM befähigt ist, in Gegenwart eines Antigens, das mit letzterem Antikörper reagiert sowie in Gegenwart von Thymocyten; und

(2) Isolierung der IgG-produzierenden Hybridome.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die isolierten Hybridome außerdem, gegebenenfalls in Gegenwart von Thymocyten, kultiviert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin die isolierten Hybridome unter Anwendung der limitierenden Verdünnungsmethode kloniert werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Hybridom, das die Fähigkeit zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgM besitzt, ein Hybridom ist, welches die Fähigkeit besitzt, einen monoklonalen Antikörper zu produzieren, der mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> und/oder N-Glycolyl-GM<sub>2</sub> reagiert.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Hybridom, welches die Fähigkeit zur Produktion eines Antikörpers der Klasse IgM besitzt, ausgewählt ist unter den Hybridomen KM-531 (FERM BP-2597), KM-696 (FERM BP-3337) und KM-697 (FERM BP-3338).

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin das Antigen der Hybridom-Kultur in Form von Liposomen zugesetzt wird.

7. Hybridom, welches die Fähigkeit zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG besitzt und mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> reagiert.

8. Hybridom, welches die Fähigkeit zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Klasse IgG besitzt, welcher mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> und N-Glycolyl-GM<sub>2</sub> reagiert.

9. Die Hybridomzelllinie KM-796 (FERM BP-3340).

10. Die Hybridomzelllinie KM-750 (FERM BP-3339).

11. Monoklonaler Antikörper der Klasse IgG, der mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> reagiert.
12. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 11, der von der Hybridomzelllinie KM-796 (FERM BP-3340) produziert wird.
13. Monoklonaler Antikörper der Klasse IgG, der mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> und N-Glycolyl-GM<sub>2</sub> reagiert.
14. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 13, der von der Hybridomzelllinie KM-750 (FERM BP-3339) produziert wird.
15. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgG, der mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> reagiert, sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
16. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend einen monoklonalen Antikörper der Klasse IgG, der mit N-Acetyl-GM<sub>2</sub> und N-Glycolyl-GM<sub>2</sub> reagiert, und einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
17. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 11 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Behandlung von Tumoren.
18. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 13 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Behandlung von Tumoren.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

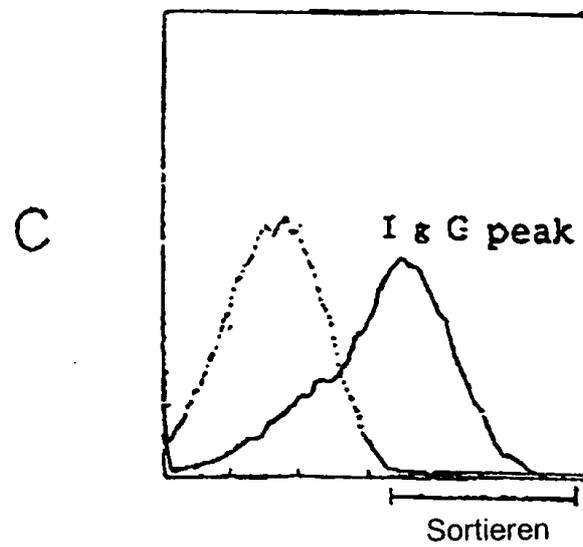
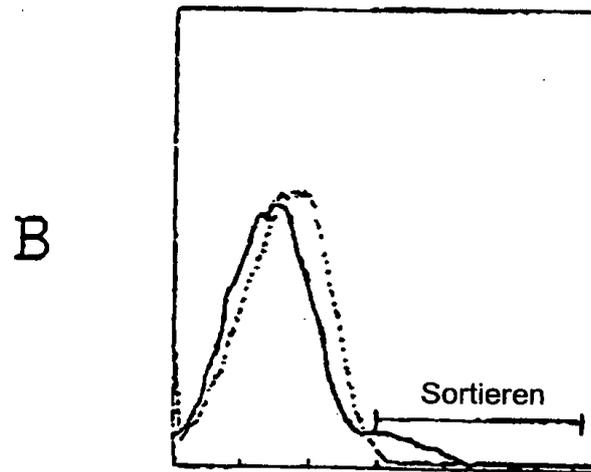
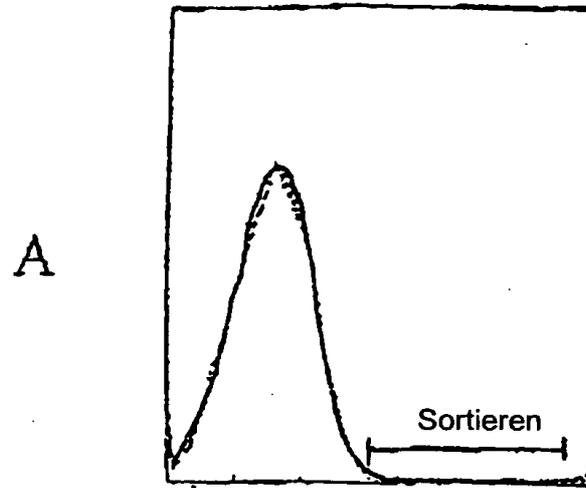


Fig. 2

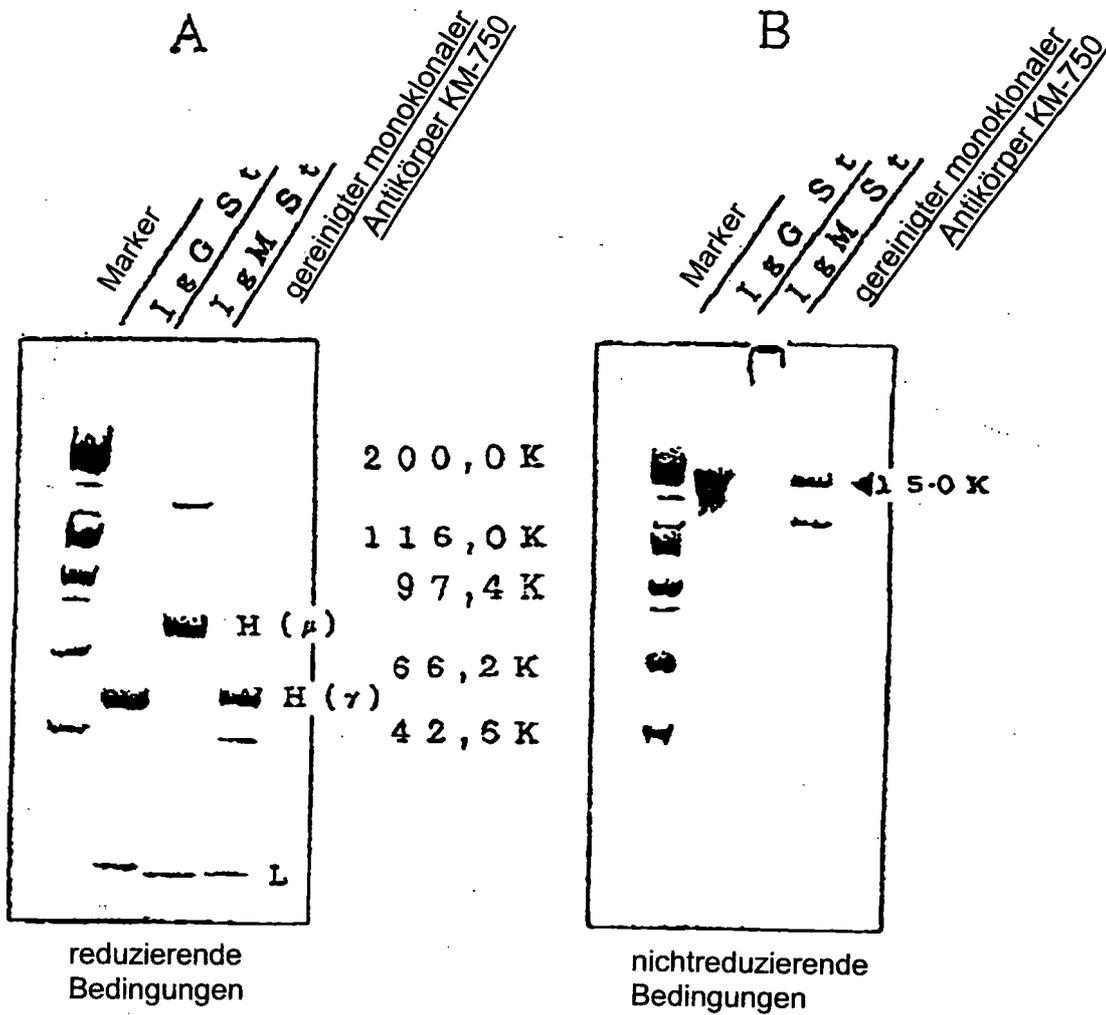


Fig. 3

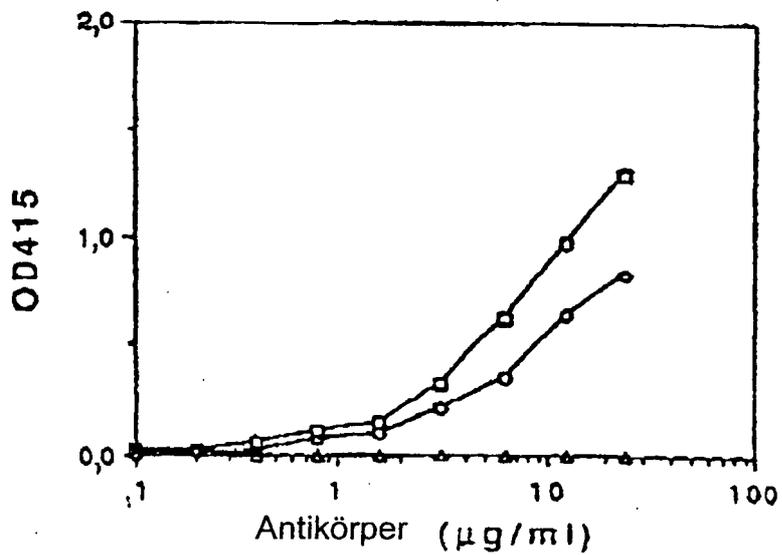


Fig. 4

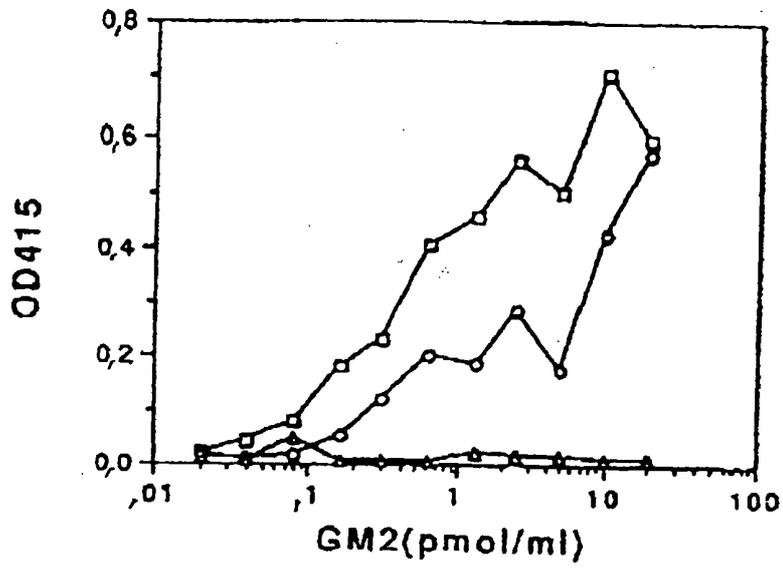


Fig. 5

