

53.772/SM

104 15 / 91  
J35/91  
KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

60435

K I V O N A T

Eljárás episziolo-komplex szénhidrátot tartalmazó gyógy-  
szerkészítmény előállítására

MECT CORPORATION, TOKIO, JAPÁN,

Bejelentés napja: 1991. 02. 18.

Unió elsőbbsége: 1990. 02. 19. (39044/1990) JAPÁN

A találmány tárgya szérum diagnosztikai ké-  
szítmény, különösen rák kimutatására szolgáló szérum diag-  
nosztikai készítmény, amely episziolo-komplex szénhidrátot,  
úgy mint  $\text{epiGM}_3$ ,  $\text{epiGM}_4$ ,  $\text{epiGM}_5$  vegyületet tartalmaz. A ta-  
lálmány tárgya továbbá episziolo-komplex szénhidrátot tar-  
talmazó rákvakcina, valamint egy szérum diagnosztikai eljárás,  
különösen rák megelőzésére és terápiájára szolgáló diagnoszt-  
ikai módszer.

*Jellemezés és  
jel*

53.772/SM

10418/91

S.B.G. & K.  
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI  
ÉS SZABADALMI IRODA  
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.  
TELEFON: 153-3733

535/91

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

**60435**

"A"

REQ: AGIK 31/70  
GOIN 33/487

Eljárás episzialo-komplex szénhidrátot tartalmazó gyógy-  
szerkészítmény előállítására

MECT CORPORATION, TOKIO, JAPÁN,

Feltalálók: NAGAI Yoshitaka, TOKIO,

SUDA Isao, SAITAMA-KEN,

HINO Akihiro, SAITAMA-KEN,

SUGIMOTO Mamoru, TOKIO,

TANAKA Makoto, SAITAMA-KEN,

ITO Masayoshi, TOKIO,

OGAWA Tomoya, TOKIO, JAPÁN

Bejelentés napja: 1991. 02. 18.

Unió elsőbbsége: 1990. 02. 19. (39044/1990) JAPÁN

A találmány tárgya episzialo-komplex szénhid-  
rátot tartalmazó szérum diagnosztikai készítmény, köze-  
lebbről rák kimutatására szolgáló szérum diagnosztikai

készítmény. A találmány további tárgya rák vakcina, valamint szérum diagnosztikai eljárás, közelebbről rák megelőzésére és terápiájára szolgáló diagnosztikai eljárás.

A sejtek felületén kialakuló antigenicitás lényeges része egy szénhidrátlánc, és a sejtek felületén lévő szénhidrát\_lánc antigének rendellenessé válnak, és rák antigénné alakulnak. Az utóbbi időben mindinkább felmerült a rák terápiájának és szérum diagnózisának lehetősége rák antigénnel szembeni monoklonális antitest alkalmazásával.

Lehetséges továbbá rák jelenlétének diagnózisa oly módon, hogy rák antigénnel szembeni antitest jelenlétét vizsgáljuk a szervezetben. Szükség van arra, hogy rendelkezésre álljon a rák antigénnel reagáló antitest.

A találmány célja rák antigénnel reagáló antitest előállítása.

A találmány további célja preventív gyógyászati diagnosztikai készítmény előállítása és eljárás kidolgozása az ilyen antitestek alkalmazására.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy az állati szérumban episziáló-komplex szénhidrátot felismerő antitest van jelen.

A találmány olyan szérum diagnosztikai készítményre vonatkozik, amely episziáló-komplex szénhidrátot tartalmaz, közelebbről rák kimutatására szolgáló szérum

diagnosztikai készítményre, továbbá olyan szérum diagnosztikai eljárásra, amely szerint episzialo-komplex szénhidrátot reagáltatunk szérummal, közelebbről rák kimutatására szolgáló szérum diagnosztikai eljárásra.

A találmány egy másik megvalósítása episzialo-komplex szénhidrátot tartalmazó rákvakcina.

Az 1. ábra bemutatja egy normális egér szérumának reaktivitását  $GM_3$  és  $epiGM_3$  vegyületekkel szemben.

A 2. ábra bemutatja egy rákkal implantált egér szérumának reaktivitását  $GM_3$  és  $epiGM_3$  vegyületekkel szemben.

A 3. ábra rákkal implantált egér szérumának reaktivitását mutatja be  $GM_3$ ,  $epiGM_3$ ,  $GM_4$ ,  $epiGM_4$ ,  $GM_5$  és  $epiGM_5$  vegyületekkel szemben.

A 4. ábra bemutatja az N-acetil-neuraminsav inhibeáló hatását rákkal implantált egér szérumának  $epiGM_3$  vegyülettel szembeni reaktivitására.

A következőkben részletesebben ismertetjük a találmányt.

A gangliozidok egyfajta komplex szénhidrátok. A természetes gangliozidokban lévő acetyl-neuraminsav kötési konfigurációja  $\alpha$ -típusú. Ujabban azonban a gangliozidok kémiai szintézise útján előállítottak ugynevezett episzialo-komplex szénhidrátokat, amelyekben az acetyl-neuraminsav kötési konfigurációja  $\beta$ -típusú.

Minden szokásos szénhidrátlánc markerben  $\alpha$ -tipusu az acetil-neuraminsav kötési konfigurációja és eddig nem volt ismeretes, hogy episziáló-komplex szénhidrátok szénhidrátlánc rák markerként funkcionálhatnak.

A szénhidrát jelenleg ismert elváltozása a ráksejtekben szintetizált szénhidrogénláncokban kialakuló szénhidrát kombináció sémájának rendellenességéből származik. Az utóbbi időben ismertették továbbá, hogy ha rák keletkezik, N-glükolil-neuraminsav (NeuGc) jelenik meg. A humán szialinsavak N-acetil-típusúak a magzati periódust kivéve. N-glükolil-neuraminsavat könnyen állíthatunk elő úgy, hogy az acetil-neuraminsav 5-helyzetű N-acetil-csoportját hidroxicsoporra cseréljük. Vagyis a szénhidrát jelenleg ismert elváltozása a szénhidrátlánc szubsztituenseinek eltérésén vagy a szénhidrát kombináció sémájának eltérésén alapul.

Vagyis eddig nem volt ismeretes, hogy olyan anyag jelenik meg, amelynek rendellenes a szénhidrátlánca a konfigurációs típusból adódóan, mint amilyenek<sup>d</sup> találmány szerint alkalmazott episziáló-komplex szénhidrátok.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy egy tumoros állatból nyert szérumban megnő egy olyan antitest mennyisége, amely felismer egy episziáló-komplex szénhidrátot. Ez arra enged következtetni, hogy episziáló-komplex szénhidrátok, amelyeket eddig nem fedeztek fel normál

sejtekben, előfordulnak tumoros állatokban.

A találmány szerinti episziáló-komplex szénhidrátok olyan gangliozidok, amelyekben az acetil<sup>7</sup>neuraminsav kötési konfigurációja  $\beta$ -típusú. Az episziáló-komplex szénhidrátokra példák:  $\text{epiGM}_1$ ,  $\text{epiGM}_2$ ,  $\text{epiGM}_3$ ,  $\text{epiGM}_4$  és  $\text{epiGM}_5$ .

Az  $\text{epiGM}_3$  a (28) jelű vegyület, amelyet az 1-49354 számú japán közzétételi irat (kokoku) és a 4 968 786 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismertet, és az e leírásokban ismertetett módszerrel állítjuk elő. A  $\text{GM}_3$  és az  $\text{epiGM}_3$  kémiai szerkezete az (I), illetve a (II) képletnek felel meg.

Az  $\text{epiGM}_4$  a (27) jelű vegyület, amelyet a 61-282391 számú japán közrebocsátási irat (kokai) és a 4 751 290 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismertet, és az e leírásokban ismertetett módszerrel állítjuk elő. A  $\text{GM}_4$  és az  $\text{epiGM}_4$  kémiai szerkezete a (III), illetve a (IV) képletnek felel meg.

Az  $\text{epiGM}_5$  a (III) jelű vegyület, amelyet a 63-452931 számú japán közrebocsátási irat (kokai) és a 4 730 058 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismertet, és az e leírásokban ismertetett módszerrel állítjuk elő. A  $\text{GM}_3$  és az  $\text{epiGM}_3$  kémiai szerkezete az (V) és a (VI) képletnek felel meg.

A találmány értelmében szérumban diagnosztikát végezhetünk el, különösen rák szérumban diagnosztikát episziolo-komplex szénhidrátok felhasználásával.

Szérumban diagnosztikát episziolo-komplex szénhidrátok alkalmazásával ugyanúgy végezhetünk mint szokásos szérumban diagnosztikát. Vagyis valamely episziolo-komplex szénhidrátot állati szérumban inkubálunk, majd az episziolo-komplex szénhidráttal reakcióba lépett antitest jelenlétét, szűkeg szerint az antitest mennyiségét meghatározzuk általánosan ismert módszerrel ugyancsak ELISA és RIA eljárással.

Előnyösen diagnosztikai készítményt használunk úgy, hogy valamely episziolo-komplex szénhidrátot oldószerben, ugyancsak etanolban és metanolban, feloldunk. Az oldatban az episziolo-komplex szénhidrát koncentrációja alkalmasan például 1-1000 ng/ml között van.

A találmány szerinti szérumban diagnosztikai eljárással rákot, fertőző betegséget, genetikai betegséget és immunológiai betegséget lehet diagnosztizálni.

A találmány értelmében előállíthatunk továbbá episziolo-komplex szénhidrát(ka)t tartalmazó rákvakcinát.

Ez a rákvakcina az episziolo-komplex szénhidrát(ok) önmagában/önmagukban vagy az episziolo-komplex szénhidrát(ok) és BCG liposzóma adjuváns és hasonló elegye.

A találmány szerinti rákvakcina inokulálását előnyösen 4-8 alkalommal végezzük 1-4 hét alatt, és egy alkalommal előnyösen 1-1000  $\mu$ g episziáló-komplex szénhidrátot inokulálunk.

Az episziáló-komplex szénhidrát alkalmazásával végzett szérum diagnosztikai eljárás szerint diagnosztizálhatunk rákot, fertőző betegséget, genetikai betegséget és immunológiai betegséget.

Lehetséges rákkal szembeni immunitás elérése is a találmány szerinti rákvakcina alkalmazásával.

#### Példák

A találmányt a következő példákon keresztül mutatjuk be.

#### Gangliozidok

GM<sub>3</sub> episziáló-komplex szénhidrátot és GM<sub>3</sub> gangliozidot szintetizálunk az 1-49354 számú japán közzétételi iratban (kokoku) ismertetett eljárással. GM<sub>4</sub> episziáló-komplex szénhidrátot és GM<sub>4</sub> gangliozidot szintetizálunk a 61-282391 számú japán közrebecsátási iratban (kokai) ismertetett eljárással. GM<sub>5</sub> episziáló-komplex szénhidrátot és GM<sub>5</sub> gangliozidot szintetizálunk a 63-452931 számú japán közrebecsátási iratban (kokai) ismertetett eljárással.

#### Egerek

Különféle beltenyésztett vonal egereket hasz-

nálunk, melyeket Charles River Japan Co Ltd. és Japan SLC Co. Ltd. cégektől szereztük be, és SPF körülmények között tartottunk.

#### Szérum

Szérumot úgy nyerünk, hogy az egérből szemfény módszerrel (eyeground method) gyűjtött vért megalvasztjuk és centrifugáljuk az összegyűjtött vért.

#### ELISA meghatározás

Az ELISA meghatározást a szokásos módszerrel végezzük.

Mindegyik gangliozidból - ezeket etanolban oldottuk - 100 ng mennyiséget adunk egy 96-csőves mikrotiter lemez mindegyik csövébe, majd 37 °C-on állni hagyjuk, amíg az etanol teljesen eltávozik. Blokkoló oldatot adunk a csövekbe, és a lemezt 37 °C-on 2 órán át inkubáljuk. A blokkoló oldat egy foszfátpuffer oldat (PBS), amely 5 % bovin szérum albumint (BSA) és hasonlót tartalmaz. A blokkoló oldatot eltávolítjuk és az összegyűjtött egérvért hozzáadjuk mindegyik csőhöz, és a lemezt 37 °C-on egy órán át inkubáljuk. Mindegyik csövet kimosunk egy olyan foszfátpuffer oldattal, amely 1 % BSA-t tartalmaz. Egérrel szembeni (anti-mouse) IgG, IgM és IgA antitesteket - amelyeket peroxidázzal jeleztünk - adunk mindegyik csőhöz, és a lemezt 37 °C-on 1 órán át inkubáljuk. Mindegyik csövet mossuk

egy olyan foszfátpuffer oldattal, amely 1 % BSA-t tartalmaz. Egy szubsztrát oldatot - amely  $400 \mu\text{g/g}$  o-fenilén-diamint és 0,0001 % hidrogén-peroxidot tartalmaz - adunk mind-egyik csőhöz, és a reakciót szobahőmérsékleten 15 percig végezzük. 8N kénsavat adunk hozzá a reakció leállítására céljából, majd 490 nm-en megmérjük mindegyik csőben a reakcióelegy abszorpcióját egy mikrolemezek értékelésére alkalmas spektrofotométerrel.

#### Eredmények

(1) Egérszérum reakcióképessége  $\text{epiGM}_3$ -mal szemben

Amint az az 1. ábrán látható, a C57BL/6 nőstény egerekből (9 hetesek) származó normál szérum reagált az  $\text{epiGM}_3$ -mal (ezt a folytonos vonal mutatja). A C57BL/6 nőstény egerekből származó normál szérum azonban nem reagált  $\text{GM}_3$ -mal (ezt a szaggatott vonal mutatja).

Amint az a 2. ábrán látható, azok a szérumok, amelyek olyan C57BL/6 nőstény egerekből (9 hetesek) származtak, amelyek B16 melanoma sejtekkel voltak implantálva (2 héttel az implantálás után), szintén reagáltak  $\text{epiGM}_3$ -mal (folytonos vonal mutatja). A reakció szintje figyelemreméltóan megnövekedett. Ezek a szérumok azonban nem reagáltak  $\text{GM}_3$ -mal (szaggatott vonal mutatja). A 2. ábrán a ●, △, ▲ és □ jelek az olyan tumorokból származó szérumokkal kapott oldatokat mutatják, amely tumorok átmérője 5 mm vagy kisebb,

6 mm, 8 mm és 16 mm.

Ha összehasonlítjuk az 1. ábrán szereplő eredményeket a 2. ábra szerinti eredményekkel, látható, hogy a tumorsejtekkel implantált egerekből származó szérum  $\text{epiGM}_3$ -mal szembeni reakcióképessége nagyobb mint a normál egerből származó szérumé.

Az 1. és 2. ábrákon bemutatott értéket úgy kaptuk, hogy levontuk a háttér értéket és három cső átlagát vettük.

(2) Az egérszérum reakcióképessége  $\text{epiGM}_3$ -tól eltérő gangliozidokkal szemben.

Azt a szérumot, amely 6 mm átmérőjű tumort hordozó egerből származott, és amely a legnagyobb reakcióképességet mutatta azok között a szérumok között, amelyeket B16 melanomasejtekkel implantált C57BL/6 nőstény (9 hetes) egerekből vettük le a fenti (1) pont szerint, 200-szorosára hígítjuk, és megvizsgáljuk a reakcióképességét a  $\text{GM}_3$ ,  $\text{epiGM}_3$ ,  $\text{GM}_4$ ,  $\text{epiGM}_4$ ,  $\text{GM}_5$  és  $\text{epiGM}_5$  vegyületekkel szemben. Amint azt a 3. ábra mutatja, a reakcióképesség az  $\text{epiGM}_3$ -mal szemben a legerősebb, és ezt követi az  $\text{epiGM}_4$ -gyel szembeni reakcióképesség.

A 3. ábra szerinti értékeket úgy kaptuk, hogy levontuk a háttér értéket, és három cső átlagát vettük.

(3) Egérszérum  $\text{epiGM}_3$ -mal szembeni reakció-

képességének inhibíciója acetil-neuraminsavval.

Különbözo koncentrációju nátrium-N-acetil-neuraminát oldatokat adunk ugyanolyan egérszérumokhoz, mint amilyeneket a fenti (2) pontban használtunk. A 4. ábrán bemutatjuk az  $\text{epiGM}_3$ -mal szembeni reakcióképességet (a folytonos vonal mutatja) és a  $\text{GM}_3$ -mal szembeni reakcióképességet (a szaggatott vonal mutatja). A 4. ábrán bemutatott eredményeket úgy kaptuk, hogy levontuk a háttér értéket, és három cső átlagát vettük. A reakcióoldatban fellépő pH-érték csökkenés hatásának elkerülése érdekében az acetil-neuraminsav nátriumsóját használtuk.

Amint az a 4. ábra eredményeiből látható, az egérszérumnak az  $\text{epiGM}_3$ -mal szembeni reakcióképességét inhibeálja az az N-acetil-neuraminsav, amelynek a hidroxicsoportja  $\beta$ -típusu konfigurációju. Ebből arra következtetünk, hogy az egérszérumnak az  $\text{epiGM}_3$ -mal szembeni nagy reakcióképességét az  $\text{epiGM}_3$ -ban lévő acetil-neuraminsav-csoport  $\beta$ -konfigurációja eredményezi.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Szérum diagnosztikai készítmény, amely legalább egy episziáló-komplex szénhidrátot tartalmaz.
2. Az 1. igénypont szerinti szérum diagnosztikai készítmény, melyben az episziáló-komplex szénhidrát  $\text{epiGM}_3$  vagy  $\text{epiGM}_4$  vagy  $\text{epiGM}_5$ .
3. Szérum diagnosztikai készítmény rák kimutatására, amely legalább egy episziáló-komplex szénhidrátot tartalmaz.
4. A 3. igénypont szerinti szérum diagnosztikai készítmény, amelyben az episziáló-komplex szénhidrát  $\text{epiGM}_3$  vagy  $\text{epiGM}_4$  vagy  $\text{epiGM}_5$ .
5. Rákvakcina, amely legalább egy episziáló-komplex szénhidrátot tartalmaz.
6. Az 5. igénypont szerinti rákvakcina, melyben az episziáló-komplex szénhidrát  $\text{epiGM}_3$  vagy  $\text{epiGM}_4$  vagy  $\text{epiGM}_5$ .
7. Szérum diagnosztikai eljárás, azzal jellemezve, hogy valamely szérumot episziáló-komplex szénhidráttal reagáltatunk.
8. A 7. igénypont szerinti szérum diagnosztikai eljárás, azzal jellemezve, hogy episziáló-komplex szénhidrátként  $\text{epiGM}_3$ -at vagy  $\text{epiGM}_4$ -et vagy  $\text{epiGM}_5$ -öt alkalmazunk.

9. Eljárás rák diagnosztizálására, azzal jellemezve, hogy valamely szérumot episziáló-komplex szénhidráttal reagáltatunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy episziáló-komplex szénhidrátként  $\text{epiGM}_3$ -at vagy  $\text{epiGM}_4$ -et vagy  $\text{epiGM}_5$ -öt alkalmazunk.

A meghatalmazott

S. G. & K.  
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI  
ÉS SZABADALMI IRODA  
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.  
TELEFON: 153-3733

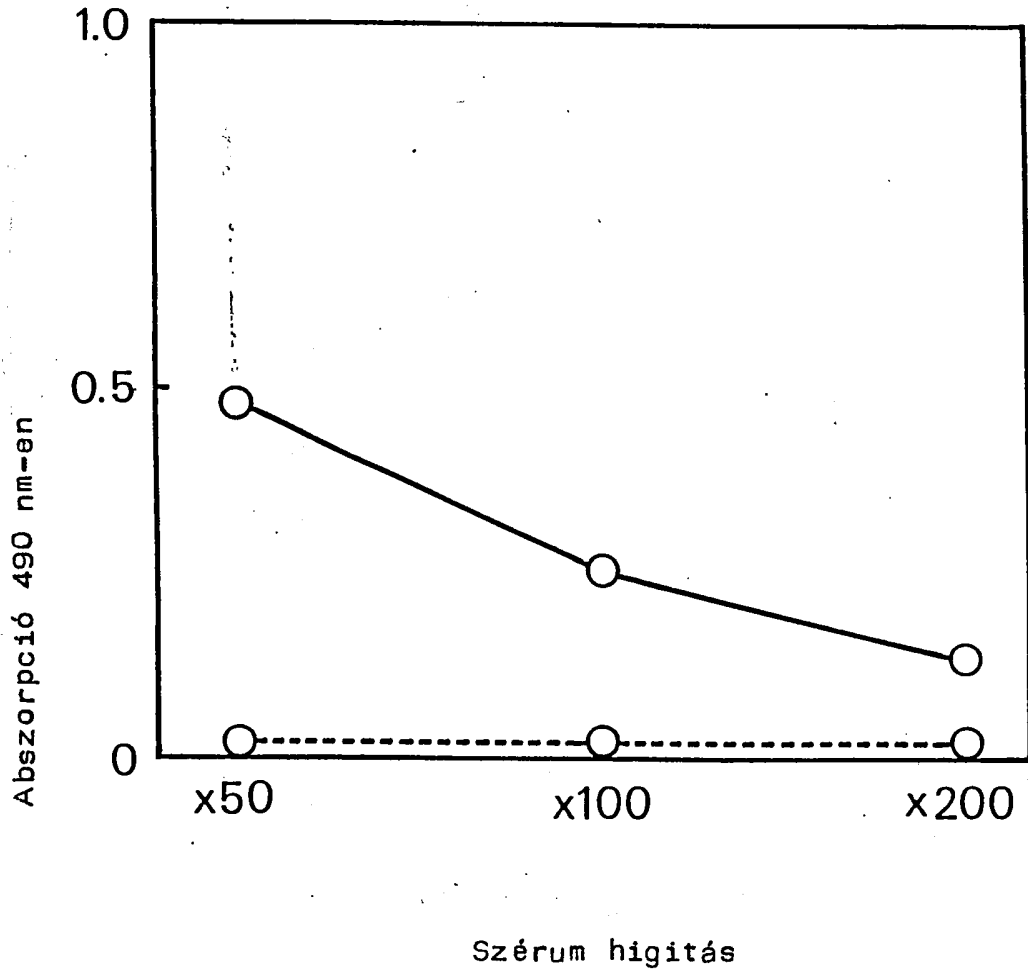
13 oldal + 6 táblával

RD'

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

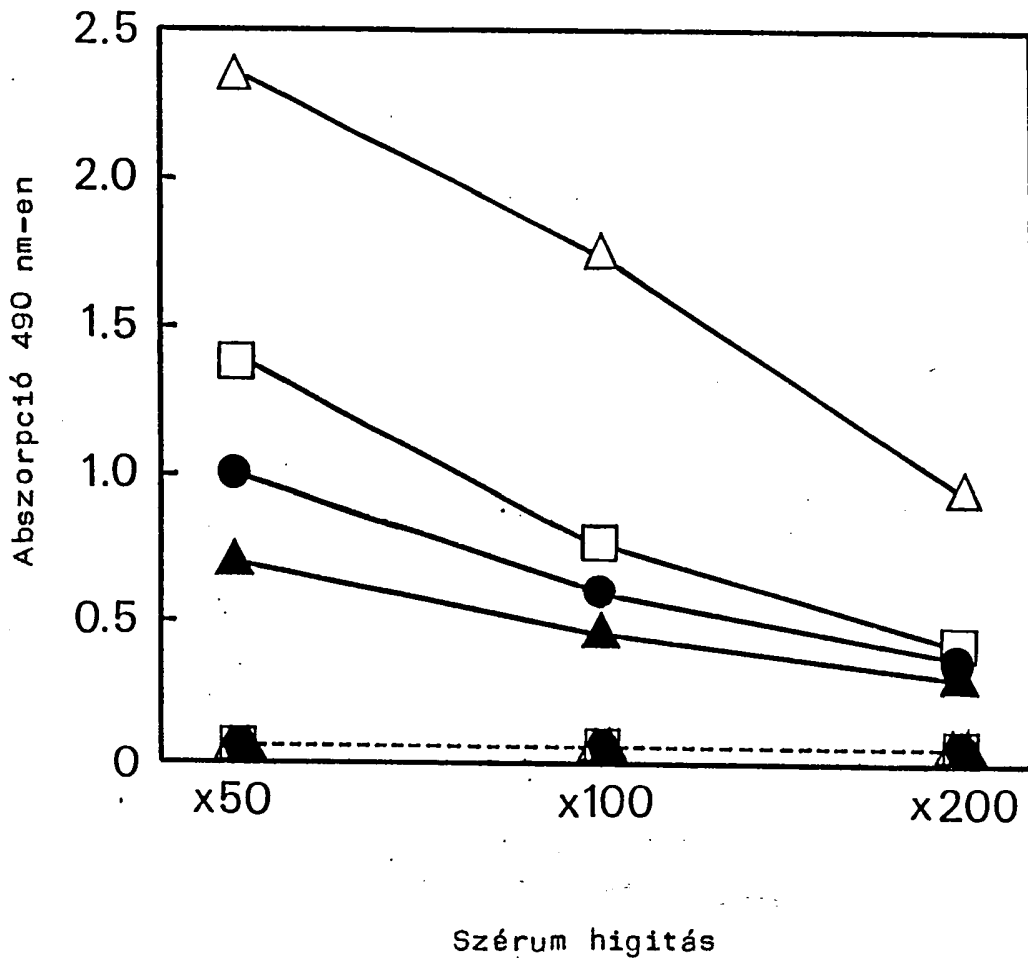
FSV/ 91

1. ÁBRA



**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

2. ÁBRA



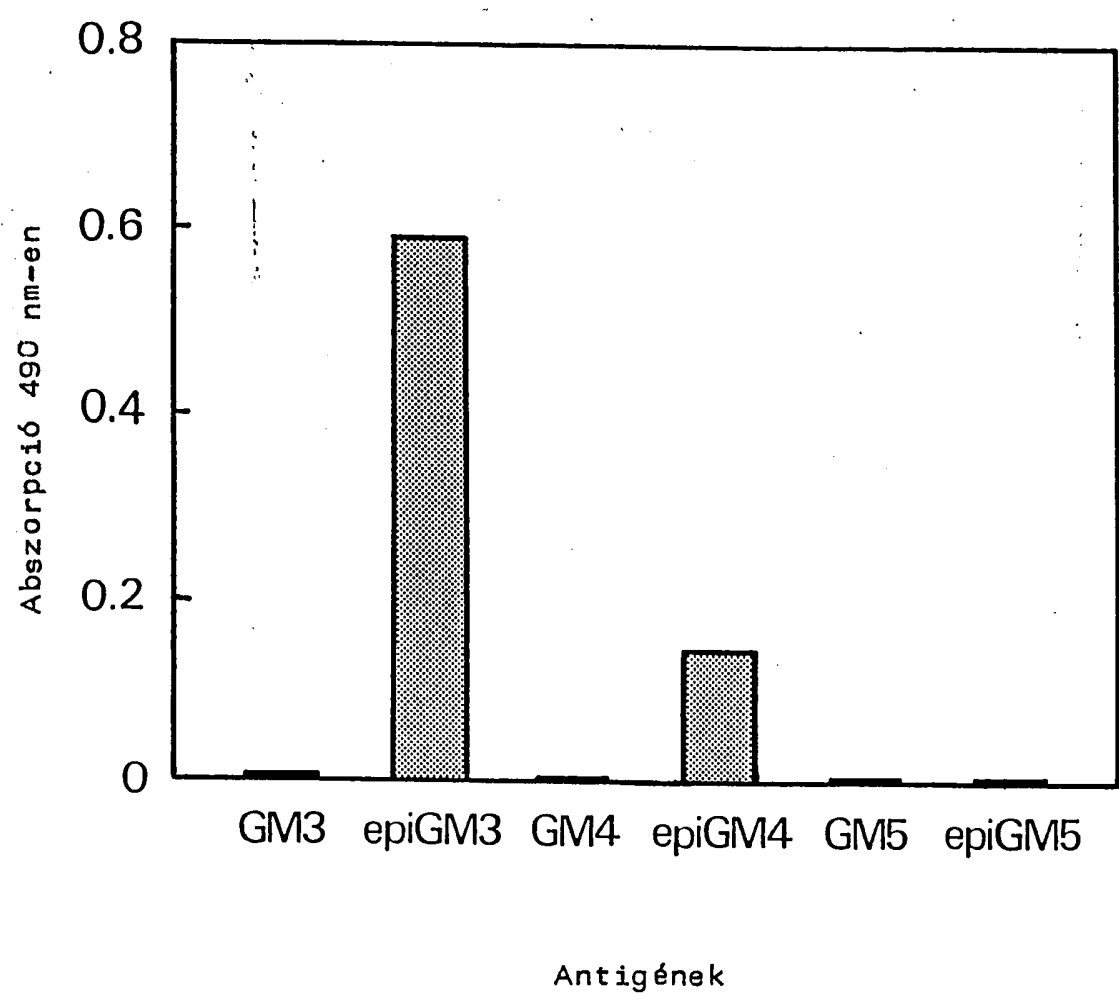
104 13 / 91

137 / 91

6/3

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

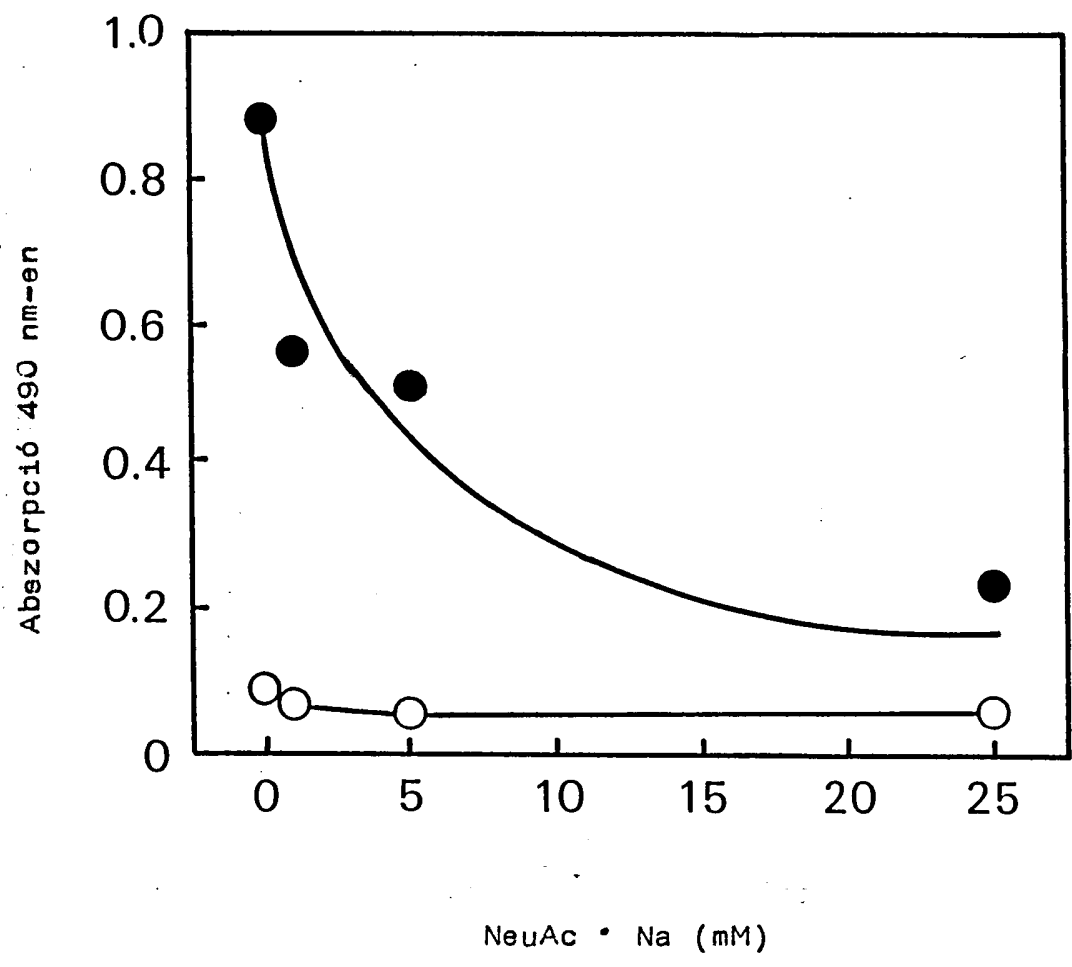
3. ÁBRA



S.B.G. & K.  
BUDAPESTI NEMZETI ÜGYVÉDI  
ÉS SZABADGÉPÉSZETI  
1051 BUDAPEST, ÁLL. ÖK. 10.  
TELEFON: 153-5733

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

4. ÁBRA



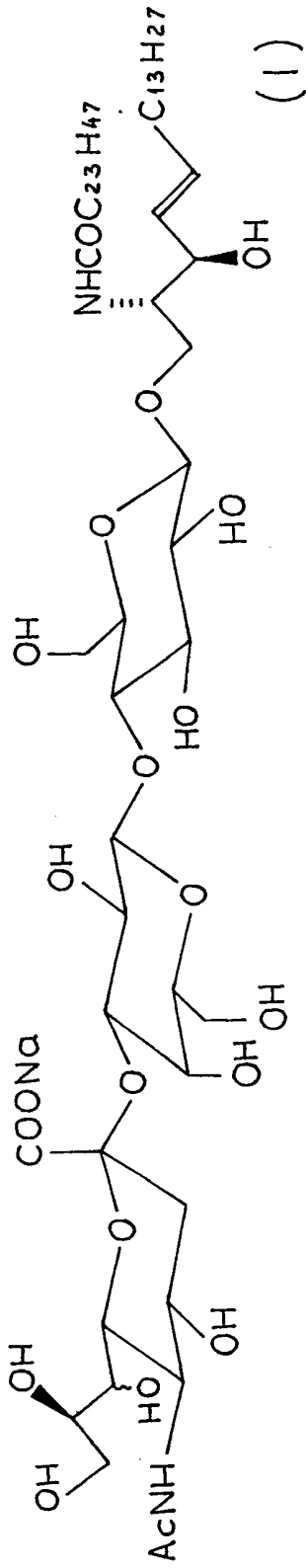
10415/97

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

16/97

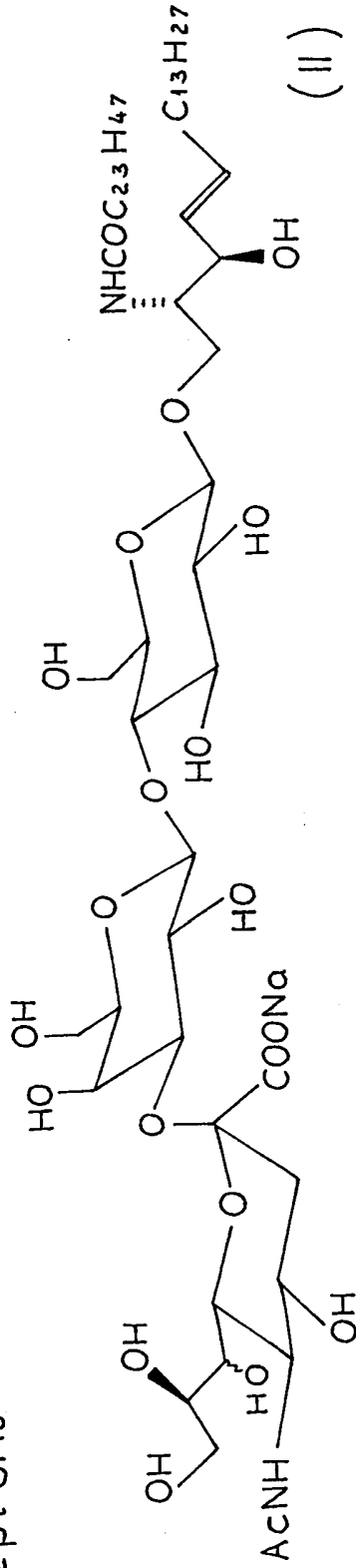
6/5

GM<sub>3</sub>



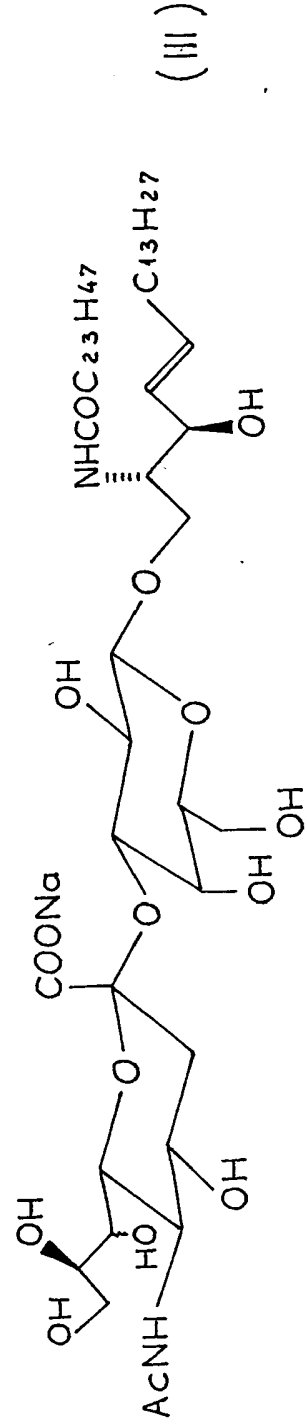
(I)

epi GM<sub>3</sub>



(II)

GM<sub>4</sub>

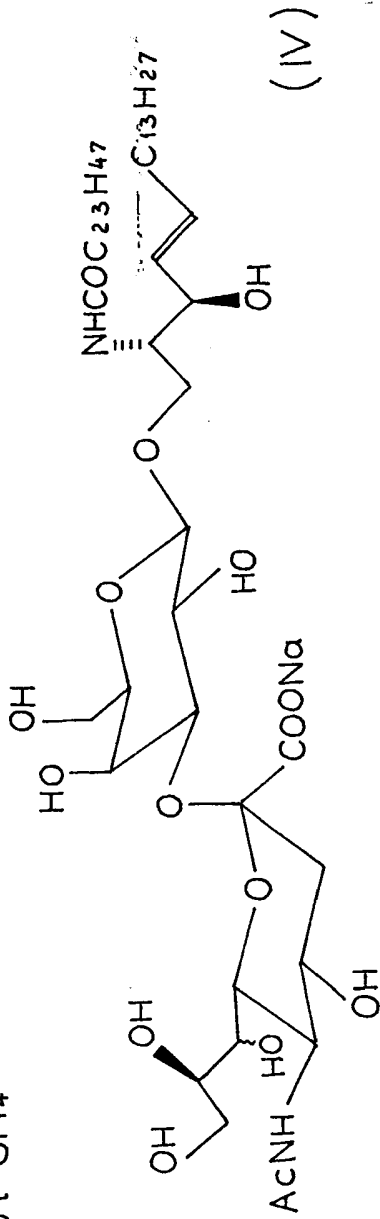


(III)

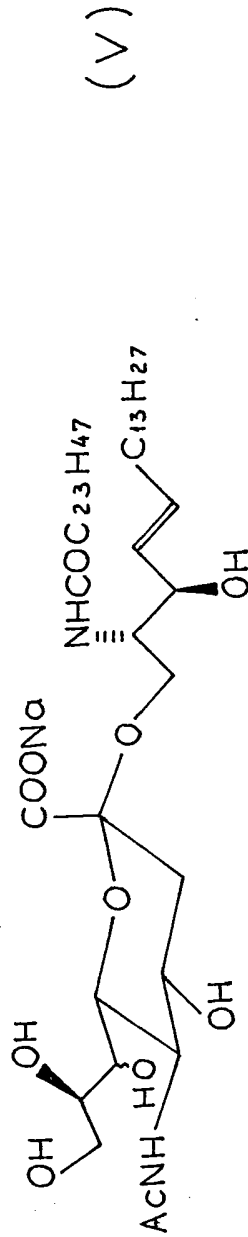
KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

135/91

epi GM4



GM5



epi GM5

