**KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

1005/91 57274

# ELJÁRÁS MONOKLONÁLIS ANTITESTEK ELŐÁLLITÁSÁRA KAPOSI-SZARKÓMA ELLEN

ONCOGEN Limited Partnership, Seattle, Washington és az Amerikai Egyesült Államok kormánya képviseletében a Secretary of the Department of Health and Human Services

A bejelentés napja: 1991. 03. 27.

## Kivonat

A találmány a Kaposi-szarkómát - egy AIDS-szel társuló betegséget - potencirozó onkosztatin-M gátlására alkalmazható, onkosztatin-M elleni monoklonális antitestekre vonatkozik. A találmány szerinti antitestekre jellemző, hogy képesek az onkosztatin-M-hez kapcsolódni, és ezáltal az onkosztatin-M-nek receptorhoz kötődését és/vagy az onkosztatin-M biológiai aktivitását gátolni. A találmány szerinti monoklonális antitestek felhasználhatók továbbá onkosztatin-M jelenlétének a kimutatására és/vagy az onkosztatin-M biológiai hatásainak módositására mind in vitro, mind in vivo rendszerben.

A találmány szerinti monoklonális antitestek egy olyan faktornak a hatását is gátolják, amely HTLV-II-vel transzformált T-sejtvonal kondicionált közegében van jelen, és szintén potencirozza a Kaposi-szarkómasejtek szaporodását.

Földvári

Képviselő: 1005/91

Budapesti 29.sz. Ügyvédi Munkaközösség
ADVOPATENT Szabadalmi Iroda

57274-0

**KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

N120 5 C12P21/08

# ELJÁRÁS MONOKLONÁLIS ANTITESTEK ELŐÁLLITÁSÁRA KAPOSI-SZARKÓMA ELLEN

ONCOGEN Limited Partnership, Seattle, Washington és az Amerikai Egyesült Államok kormánya képviseletében a Secretary of the Department of Health and Human Services

Feltalálók:
Salahuddin Z. Syed, South Pasadena, CA.,
Nakamura Shuji, South Pasadena, CA.,
Gallo C. Robert, Bethesda, Maryland,
Radka F. Susan, Seattle, Washington,
Linsley S. Peter, Seattle, Washington,
Shoyab Mohammed, Seattle, Washington,
Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 03. 27.
Elsőbbsége: 1990. 03. 29. (07/502,141)
Amerikai Egyesült Államok

8104

A találmány a Kaposi-szarkómát - egy AIDS-szel társuló betegséget - potencirozó onkosztatin-M gátlására alkalmazható, onkosztatin-M elleni monoklonális antitestekre vonatkozik. A találmány szerinti antitestekre jellemző, hogy képesek az onkosztatin-M-hez kapcsolódni, és ezáltal az onkosztatin-M-nek az onkosztatin-M receptorhoz kötődését és/vagy az onkosztatin-M biológiai aktivitását gátolni. A találmány szerinti monoklonális antitestek felhasználhatók továbbá onkosztatin-M jelenlétének a kimutatására és/vagy az onkosztatin-M biológiai hatásának módositására in vitro vagy in vivo rendszerben.

Jelenleg már jól ismert tény, hogy szomatikus sejthibridek fontos forrását képviselik olyan specifikus sejttermékeknek, amelyek rövid időtartamú, elsődleges (primer) tenyészetekből nem nyerhetők. Erre a legjobb példa az a rendszer, amelyet Milstein és munkatársai dolgoztak ki hibrid mielomák kialakitására egy kiválasztott antigén elleni monoklonális antitest előállitása céljából /Kohler és Milstein: Nature (London) 256, 495 (1985); valamint Galfre és munkatársai: Nature (London) 266, 550 (1977)/. Ezek a hibridek lehetővé teszik specifikus antigének elleni monoklón antitestek állandó termelődését. Ezek az antitestek reagensekként alkalmazhatók bármely olyan eljárásban, amelyekben korábban antitesteket használtak, további előnyük, hogy a megkülönböztetés nagyobb mértékét teszik lehetővé, a háttér zavaró hatása csekélyebb, és az antitestkészlet folyamatosan rendelkezésre áll.

Monoklonális antitestek előállitása általában a következő lépésekből áll: immunizálás ; az immunválaszt adó sejtek kiemelése; majd ezen sejtek fuziója - például polietilénglikolban - állandóan osztódó ("halhatatlan") daganatsejtekkel, amelyeket azon képességük alapján különitünk el, hogy immunoglobin kiválasztására nem képesek. Az igy kapott sejteket például HAT-közegben (hipoxantint, amino-pterint, timidint tartalmazó közegben) végbemenő szaporodásuk alapján különböztetjük meg. Minden egyes hibridóma olyan fuziós termék, amely egyrészt egy egyedi antitestképző sejtből, másrészt daganatsejtből áll, s igy képes egyedi antitest-fajta elválasztására, másrészt - a daganatsejt halhatatlansága következtében - folyamatosan szaporodni képes, és olyan utódsejteket hoz létre, amelyek egységes specifitású antitest állandó képzésére képesek.

A jelen találmány révén lehetővé válik onkosztatin-M-re specifikus monoklonális antitestek felhasználása az onkosztatin-M-nek az AIDS-szel társuló Kaposi-szarkóma növekvésére kifejtett potencirozó hatásának gátlására. Az alábbiakban leirjuk a találmány szerinti monoklonális antitestek előállitását sejthibridizálás utján, a találmány oltalmi köre azonban nem korlátozódik e sejthibridizáló eljárás alkalmazására. Bármely monoklonális antitest vagy annak valamely fragmentuma, amely az alábbiakban leirt monoklonális antitestek jellemzőivel rendelkezik, a találmány oltalmi körébe tartozik.

A találmányt példákkal illusztráljuk, amelyekben a hibridóma-eljárást alkalmazzuk a találmány szerinti

onkosztatin-M elleni antitestek (az "onkosztatin-M elleni antitestek" kifejezést az alábbiakban "onkosztatin-M antitestek" kifejezéssel röviditjük) kialakitása céljából; ezeket az antitesteket aszerint csoportositjuk, hogy immunprecipitátumot képeznek-e nativ (természetes eredetü) onkosztatin-M-mel vagy denaturált onkosztatin-M-mel vagy mindkét anyaggal. Mindegyik csoportot azon képessége alapján jellemezzük tovább, hogy képesek-e blokkolni az onkosztatin-M szaporodást gátló biológiai aktivitását és/vagy az onkosztatin-M kötődését sejtfelületi receptoraihoz.

A példákban azt is megmutatjuk, hogy az onkosztatin-M ellen ható, közömbösitő antitestek gátolják a Kaposi-szarkómából származó AIDS-KS sejtek szaporodását, amelyet potenciroz és fenntart az onkosztatin-M vagy egy olyan faktor, amely HTLV-II-vel transzformált T-sejtvonal kondicionált közegében található.

A találmány szerinti monoklonális antitestek - vagy valamely fragmentumok, amely felismeri az antigéndeterminánst - ugy adagolhatók, hogy in vivo hatásos szérumkoncentrációkat kapjunk, e koncentrációk az alábbiakban leirt in vitro mérőrendszerekkel meghatározhatók.

Az 1. ábra mutatja $^{35}$S-metioninnal és $^{35}$S-ciszteinnel jelzett onkosztatin-M immunprecipitációját (immunkicsapását) olyan felüluszóból, amely a kínai hörcsög petefészek (Chinese Hamster Ovary; a továbbiakban röviditve: CHO) onkosztatin-M-et kódoló cDNS-vel stabilan átfertőzött sejtvonalából származik. Az 1A. ábra szemlélteti onko-

sztatin-M elleni monoklonális antitestek sorozatának reakcióképességét nativ (természetes eredetü), metabolikusan jelzett onkosztatin-M-mel (a felülúszót metabolikusan jelzett CHO transzfektánsokból gyüjtöttük). Az 1B. ábra mutatja ugyanezeknek az antitesteknek a reakcióképességét olyan metabolikusan jelzett CHO sejtekből gyüjtött felülúszóval, amelyeket SDS-vel vagy 2-merkapto-etanollal kezelve denaturáltunk, és inkubálás előtt a monoklonális **antitestek**kel forraltunk. Az ábrán: az 1. vonal: negativ kontroll antitest; 2. vonal: 1R10F11; 3. vonal: 3R9D9; 4. vonal: 3R13F4; 5. vonal: 4R12C7; 6. vonal: 11R2F8; 7. vonal: 12R13 B5; 8. vonal: 12R13D7; 9. vonal: 12R19E3.

A 2. ábrában feltüntetjük két különböző monoklonális onkosztatin-M antitest közömbösitő hatását A375 melanóma-sejtvonalon végzett, növekedést gátló vizsgálatban ("Growth Inhibition Assay" az alábbiakban röviden: "GIA"), a 2A. ábra szemlélteti 11R2F8 különböző koncentrációinak a hatását, a 2B. ábra 1R10F11 különböző koncentrációinak a hatását mutatja.

A 3. ábra több monoklonális onkosztatin-M antitest hatását illusztrálja a $[^{125}J]$-onkosztatin-M kötődésére a H2981 tüdőkarcinóma-sejtvonalhoz radioreceptoros vizsgálat során.

A 4. ábra mutatja két különböző monoklonális onkosztatin-M antitest enzimmeghatározási módszerrel (EIA-val) kimutatott kötődését: ezeket az antitesteket aminosav-deléciókat vagy aminosav-változtatásokat tartalmazó onkosztatin-M mutánsok sorozatával átfertőzött COS sejtek

választották ki. Az adatokat az $OD_{460}$-nál (460 nm-nél mért optikai sürüség) megfigyelt összes abszorbancia egységeiben fejeztük ki, a háttérben jelentkező kötődést nem vontuk le. Ebben az ábrában a "del" a C-terminálisból törölt utolsó aminosavat jelzi, mig az ABC betűi jelzik a végzett aminosavváltoztatást.

Az 5. ábrában összehasonlitjuk különböző onkosztatin-M monoklonális antitestek képességét olyan onkosztatin-M immunkicsapására, amelyet az anyasejt ("SPOM") vagy annak Δ 44-47 delécios mutánsa választ el. 1. vonal: negativ kontroll antitest; 2. vonal: 1R10F11; 3. vonal: 11R2F8; 4. vonal: 12R13D7.

A 6. ábra mutatja onkosztatin-M potencirozó hatását a Kaposi-szarkóma sejtvonal növekvésére (üres körök), valamint olyan simaizomsejtek (N 1072 sejtek) növekvésére, amelyek rosszindulatú mediasztinális limfómában szenvedő beteg tüdőizzadmányából származnak (fekete körök).

A CHO sejtekben kifejezett rekombináns onkosztatin-M-et növekvő koncentrációkban adagoltuk.

A 7. ábra illusztrálja onkosztatin-M monoklonális antitestek hatását olyan Kaposi-szarkóma sejtvonalra, amelyet in vitro tisztitott onkosztatin-M-mel (fekete körök) vagy olyan kondicionált közeggel ("CM") kezeltünk, amely # 38-ból, egy HTLV-II-vel fertőzött sejtvonalból (üres körök) származik. A tisztitott onkosztatin-M vagy a #38 kondicionált közeg jelenlétében tenyésztett sejtekhez

növekvő koncentrációkban adagoltuk az 1R10F11 (Aab) vagy 11R2F8 (Bab) anyagot.

A jelen találmány olyan készitményekre és azok alkalmazására vonatkozik, amelyek az onkosztatin-M hatását közömbösitik, s igy az AIDS-szel társuló Kaposi-szarkóma növekvését gátolják. A találmány szerinti monoklonális antitesteket, jellemzésüket és alkalmazásukat az alábbiakban leirjuk és példákkal illusztráljuk.

AZ ONKOSZTATIN-M ANTIGÉN FELISMERÉSE

Az onkosztatin-M-et - amelyet eredetileg emberi daganat-sejtvonalakra kifejtett gátló hatásai alapján azonositottak - első ízben forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (röviditve: PMA) indukált humán hisztiocitás limfómasejtekből [Zarling és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 83, 9739 (1986)], valamint aktivált T-limfocitákból [Brown és munkatársai: J.Immunol. 139, 2977 (1987)] izolálták. Az onkosztatin-M molekula hővel és savval szemben stabilis fehérje, amely egyetlen polipeptidláncból áll, és relativ molekulatömege 28000. Más, természetes eredetü, növekvést szabályozó anyagokhoz hasonlóan az onkosztatin-M többféle biológiai hatást fejt ki. Egyes - de nem mindegyik - emberi daganatsejtvonalak növekvését gátolja, viszont éppen ellenkezőleg, egyes normális fibroblasztok - például az emberi fityma-fibroblasztok vagy WI-38 sejtek - növekvését serkenti [Zarling és munkatársai: Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 83, 9739 (1986)]. Az onkosztatin-M-ért felelős gént klónozták és szekvenálták, és ujabban a rekombináns onkosztatin-M egy aktiv formáját emlőssejtekben kifejezték (lásd az

1985. január 15-én benyujtott 144,574 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentést, amelynek ekvivalense a 0 290 948 számú európai közrebocsátási irat, amelyet 1988. november 17-én hoztak nyilvánosságra, s amelynek teljes tartalmát hivatkozásként beépitjük e bejelentésünkbe). A szignál-peptid hasitása után kialakuló érett forma 227 aminosavat tartalmazó glikoprotein, ezek közül 5 ciszteinmaradék. E fehérjének rendkivül hidrofil karboxi-terminális területe van. Jóllehet az onkosztatin-M más citokinekkel nem áll szerkezeti rokonságban, mRNS-e nem transzlatált 3'-végén AU-ban gazdag szakaszt tartalmaz. Az onkosztatin-M üzenetében ez a szakasz homológ számos citokin, limfokin és más, szaporodást szabályozó molekula megfelelő szakaszával, s ez arra mutat, hogy a génkifejeződést szabályozó müködésük közös. Többféle emlőssejtben találtak az onkosztatin-M kötésére megfelelő sejt-receptort. A legfontosabb onkosztatin-M receptormolekula egy 150000-160000 relativ molekulatömegü, specifikus fehérje /Linsley és munkatársai: J.Biol.Chem. 264, 6528 (1989)/.

Az onkosztatin-M az e szakterületen jól ismert eljárásokkal nyerhető többféle sejtforrásból, amelyek bioaktiv onkosztatin-M-et szintetizálnak - beleértve például azokat a sejteket is, amelyek természetes uton termelik az onkosztatin-M-et, valamint azokat a sejteket is, amelyek az onkosztatin-M szintézisét és/vagy elválasztását irányitó rekombináns DNS molekulákkal fertőztek át. Az onkosztatin-M azonban kémiai szintetikus módszerekkel is szintetizálható:

igy például szilárd fázisú peptidszintézissel (ami azonban nem jelent korlátozást). Az onkosztatin-M előállitási eljárásait közli az egyidejüleg vizsgálat alatt lévő, 1988. január 15-én 144,574 számmal benyujtott Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, amely ekvivalens a 0 290 948 számú (1988. november 17-én publikált) európai közrebocsátási irattal, s amelyet hivatkozásként beépitünk.

Az onkosztatin-M-mel szemben affinitással biró monoklonális antitesteket úgy különithetjük el, hogy megvizsgáljuk onkosztatin-M-et kötő képességüket. Erre a célra több immunológiai mérőmódszert alkalmazhatunk, ilyen például az enzimkötéses immunszorbens meghatározás (röviden: ELISA), azonban ez nem jelent korlátozást, e célra alkalmas módszer továbbá az immunkicsapás, a Western-féle foltanalizis, a radioimmunometriás mérések, valamint a kompetitiv és nem-kompetitiv immunmérőmódszerek. Igy például könnyen alkalmazható az alábbiakban leirt, szilárd fázisú mikro-enzimmeghatározó módszer (röviditve: mikroEIA). Ez röviden abban áll, hogy hibridek felülúszójában talált antitesteket azon képességük alapján értékelünk ki, hogy üregekben lévő szilárd felületet boritó onkosztatin-M-hez kötődnek. A titráló üregbe a felülúszó hozzáadása után peroxidázzal konjugált kecske anti-egér-Ig $F(ab')_2$-t adunk. A meg nem kötött anyagok kimosása után a kötött enzimet olyan szubsztrátum hozzáadásával tesszük láthatóvá, amelynek színe változik. A színváltozás közvetlenül jelzi, hogy az üregben monoklonális antitestből és onkosztatin-M-ből kialakult komplex van jelen.

AZ ONKOSZTATIN-M AKTIVITÁSÁNAK A GÁTLÁSA

Az onkosztatin-M biológiai hatását gátló antitestek elsősorban terápiásan alkalmazhatók. Ezek az antitestek az alábbiakban leirt GIA (szaporodás gátlását meghatározó) módszerrel azonosithatók. Röviden összefoglalva: a GIA olyan tesztrendszer, amelynek a végén kiértékelhető egy antitest azon képessége, hogy az onkosztatin-M-nek a célsejtek növekedésére és burjánzására kifejtett gátló hatásait közömbösiti.

AZ ONKOSZTATIN-M RECEPTORON VÉGBEMENŐ KÖTŐDÉS GÁTLÁSA

A sejtfelületi receptorok ligandumok iránt különösen erős affinitással rendelkeznek. A ligandumnak a specifikus sejtfelületi receptorral végbemenő kötődése a sejtben végbemenő különböző folyamatok kontrollját kezdeményezi. Az onkosztatin-M-nek membránreceptoron végbemenő kötődését az alábbi radioreceptor-vizsgálat alkalmazásával igazolták (lásd a 144,574 számon 1988. január 15-én benyujtott Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentést). Többek között a következő emberi daganatsejteket vizsgálták: A375 (melanóma); A875 (melanóma); Me1109 (melanóma); T24 (hólyagkarcinóma); A549 (tüdő-adenokarcinóma); H1477 (melanóma); Me180 (melanóma); és MCF (emlőrák). A $[^{125}J]$-onkosztatin-M kötődése specifikusnak és telithetőnek bizonyult, és ezt egyéb, ismert, polipeptidjellegü növekvésszabályzók nem gátolták. A kötési adatok Scatchard-elemzése - amelyeket különböző sejtvonalak alkalmazásával kaptunk - azt mutatta, hogy a $[^{125}J]$-onkosztatin-M sejtenként $1\text{-}2\times10^4$

helyen megközelitőleg $10^{-9}$ M $K_d$-értékkel kötődött. A találmány szerinti hibrid sejtvonalak által termelt monoklonális antitesteket az alábbiakban leirt radioreceptor-vizsgálatban értékeltük ki: vizsgáltuk az onkosztatin-M kötődésének gátlását sejtfelületi receptorához.

Az onkosztatin-M elleni monoklonális antitestek gátolják az onkosztatin-M-nek Kaposi-szarkómából származó AIDS-KS sejtek növekvését potencirozó hatását.

A Kaposi-szarkóma egyik alakja az 1. tipusú humán immunhiányt előidéző virussal (HIV-1 virussal) fertőzött betegeken jelenik meg. Bár nyilvánvaló korreláció áll fenn a HIV-1 fertőzés és az AIDS-kapcsolatú Kaposi-szarkóma között, a Kaposi-szarkóma szövetben mindeddig nem mutattak ki a HIV-1-ből vagy bármely más virusból származó genomikus szekvenciát [Civantos és munkatársai: J. Invest. Dermatol. 79, 79 (1982)]. Ujabban HTLV-II-vel transzformált T-sejtvonalból származó kondicionált tápközeg jelenlétében tenyésztett AIDS-Kaposi-szarkóma sejtekben olyan növekedési faktort mutattak ki, amely a Kaposi-szarkóma sejtvonal szaporodását serkentő és fenntartó közegben volt jelen [Nakamura és munkatársai: Science 242, 426 (1988. október 21.)].

Az alábbiakban leirt kisérleteink igazolják, hogy az onkosztatin-M a Kaposi-szarkómasejtek szaporodására potencirozó hatást is kifejt (lásd a 6. ábrát).

Amint ezt a következőkben kimutatjuk (például GIA elemzés alapján), a találmány szerinti közömbösitő monoklonális antitest mind az onkosztatin-M-nek, mind a HTLV-II-vel transzformált T-sejtvonal kondicionált közegé-

nek az AIDS-KS sejtek növekvésére kifejtett potencirozó hatását gátolja (lásd a 7. ábrát).

ELJÁRÁSOK MONOKLONÁLIS ONKOSZTATIN-M ANTITESTEK ELŐÁLLITÁSÁRA

A találmány szerinti onkosztatin-M antitestek többféle módszerrel állithatók elő, amelyek során az onkosztatin-M-et immunogénként emlős gazdaszervezetbe fecskendezzük - e célra például egeret, tehenet, kecskét, birkát, nyúlat alkalmazhatunk - különösen adjuvánssal, például a Freund- féle teljes adjuvánssal vagy aluminium-hidroxid-géllel. Ezt követően a gazdaállatot elvéreztetjük, és a vérét alkalmazzuk poliklón antitestek izolálására. Eljárhatunk azonban ugy is, hogy a perifériás vérből származó limfocitákat, lépből származó limfocitákat (B-sejteket) vagy nyirokcsomó-limfocitákat fuzionálunk megfelelő mielóma-sejttel, s igy "immortalizáljuk" ("halhatatlanná tesszük") az onkosztatin-M-re nézve specifikus antitestek monoklonális kifejezéséért felelős kromoszómákat.

Jóllehet találmányunkat olyan példákkal illusztráljuk, amelyek során egérből származó monoklonális antitesteket alkalmazunk, a találmány nem korlátozódik erre az eljárásra, és - például - emberi antitestek alkalmazására is vonatkozik. Ilyen antitestek kaphatók például emberi hibridómák felhasználásával [Cote és munkatársai: Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 80, 2026 (1983)] vagy emberi B-sejtek EBV virussal in vitro végrehajtott transzformálása utján [Cole és munkatársai a következő helyen: "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", szerk. Alan R. Liss, 77-96.

old. (1985)7. Ennek során az ujabban "kiméra antitestek" termelésére kidolgozott eljárás alkalmazható /Morrison és munkatársai: Proc.Natl.Acad.Sci. (USA), 81, 6851 (1984); Neuberger és munkatársai: Nature 312, 604 (1984); valamint Takeda és munkatársai: Nature 314, 452 (1985)7. Ezekben az utóbbi eljárásokban egy megfelelő antigén-specifitásu, egérből származó antitestmolekulából eredő géneket megfelelő biológiai hatású emberi antitestmolekulából eredő génekkel kapcsolunk össze.

Egy ujonnan leirt módszer alkalmazható az onkosztatin-M-et meghatározva monoklonális antitestek készletének a kialakitására /Sastry és munkatársai: Proc.Natl.Acad. Sci. 86, 5728 (1989) ; valamint Huse és munkatársai: Science 246, 1275 (1989)7. Ennek megfelelően onkosztatin-M-mel beinditott állatok lép-DNS-éből származó Fab fragmentumok cDNS-tárát bakteriális gazdasejtekben alakithatjuk ki.

A találmány szerinti monoklonális antitestek megfelelő proteázokkal - például pepszinnel vagy papainnal - kezelve ugy módosithatók, hogy Fab, $F(ab')_2$ vagy $F_v$ fragmentumok keletkeznek, amelyek immmunspecifikus módon kötődnek az onkosztatin-M-hez.

Ezen tulmenően a teljes antitestmolekula vagy annak Fab, $F(ab')_2$ vagy $F_v$ fragmentuma többféle vegyület egyikéhez, például valamely jelző vegyülethez, igy fluoreszkáló, radioaktivan jelzett vegyülethez, kromofór anyaghoz, enzimhez, kemolumineszcens vagy biolumineszcens molekulához kapcsolható. Eljárhatunk ugy is, hogy a teljes antitesteket, annak Fab, $F(ab')_2$ vagy $F_v$ fragmentumát valamilyen növekedé-

si faktorral konjugáljuk, amely az onkosztatin-M biológiai aktivitását fokozza vagy gátolja, vagy azokat toxinokkal kapcsolhatjuk, s így azokat a sejteket, amelyek felületükön onkosztatin-M prekurzorokat fejeznek ki, szelektiven elölhetjük. Jól ismertek azok a módszerek, amelyek antitestek és fragmentumaik jelzőanyagokkal, fehérjékkel, toxinokkal végbemenő konjugálására (kapcsolására) alkalmazhatók (lásd például a 4,220.450, 4,235.869, 3,935.074 és 3,996.345 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leirásokat).

A MONOKLONÁLIS ONKOSZTATIN-M ANTITESTEK ALKALMAZÁSAI

A találmány szerinti antitestek kedvezően alkalmazhatók természetes vagy rekombináns onkosztatin-M nativ vagy denaturált alakjainak kimutatására, vagy onkosztatin-M jelenlétének kimutatására szérummintákban, ahol az onkosztatin-M szabad formában vagy kötőfehérjével összekapcsolva fordulhat elő. A találmány szerinti antitestek továbbá in vivo alkalmazhatók az onkosztatin-M biológiai hatásainak a gátlására. Az onkosztatin-M-nek valamilyen mintában - például sejtekben vagy fiziológiai folyadékban, például vérben - történő kimutatására mind poliklonális, mind monoklonális antitestek felhasználhatók. Az onkosztatin-M valamilyen testfolyadékban kimutatott jelenléte daganatsejt jelenlétének a jelzésére is alkalmazható. Ebben a vonatkozásban az onkosztatin-M antitestek hasznosak lehetnek a rák és/vagy más, sejtszaporodással kapcsolatos betegségek diagnózisában és/vagy prognózisában. Az antitestek felhasználhatók affinitásos kromatográfia során természetes eredetü vagy szintetikus forrásokból származó onkosztatin-M izolálá-

sára és tisztitására is. Az antitestek továbbá a tenyészetben vagy in vivo jelenlévő sejtekkel kapcsolt onkosztatin-M mennyiségének a szabályzására is alkalmazhatók, aminek során a sejtek szaporodását specifikus antitest képzésével módosithatjuk: ilyen az onkosztatin-M komplexe, amely az onkosztatin-M : onkosztatin-M receptorkötés kompetitiv gátlását eredményezi. Mindezek alapján a találmány szerinti antitestek terápiás szerekként alkalmazhatók sejtburjánzással kapcsolatos olyan betegségek kezelésére, ahol az onkosztatin-M sejtszaporodást serkentő hatása az egyik kórokozó tényező.

AZ ANTI-ONKOSZTATIN-M ANTITEST ALKALMAZÁSA KAPOSI-SZARKÓMA NÖVEKVÉSÉNEK A GÁTLÁSÁRA

Különösen jelentős a találmány szerinti anti-onkosztatin-M antitestek használata az onkosztatin-M által serkentett sejtszaporodás gátlása céljából. Az alábbiakban bemutatjuk a Kaposi-szarkóma-sejtvonal onkosztatin-M által potencirozott szaporodását in vitro vizsgálva. Ha a vizsgálat során közömbösitő anti-onkosztatin-M antitestek vannak jelen, akkor a monoklonális antitestek az onkosztatin-M potencirozó hatását gátolják. Ennek alapján a találmány szerinti közömbösitő antitestek terápiásan alkalmazhatók a Kaposi-szarkóma kezelésére. E kezelés során a közömbösitő anti-onkosztatin-M antitestet vagy annak valamely fragmentumát terápiásan hatásos dózisban in vivo adagoljuk. Az in vitro körülmények között meghatározott mennyiségben adagolhatjuk az antitestet vagy annak valamilyen fragmentumát olyan szérumkoncentráció elérése céljából, amellyel az onkosztatin-M hatása gátolható.

AZ ONKOSZTATIN-M HATÁSAIT UTÁNZÓ ANTI-IDIOTIPUSOK KIALAKITÁSA.

A találmány szerinti monoklonális antitestek felhasználhatók olyan anti-idiotipusos antitestek kialakitására is, amelyek az onkosztatin-M biológiai hatásait utánozni képesek. Az anti-idiotipusos antitestek, röviden anti-idiotipusok olyan antitestek, amelyek egy másik antitest-molekula antigénnel kapcsolódó szakaszára vagy változtatható szakaszára (amelyet idiotipusnak neveznek) irányulnak. Elméletileg a Jerne-féle, idiotipusos viszonyokat kifejező hálós modell alapján /N.K. Jerne: Ann.Immunol. (Paris) 125, 373 (1974) ; valamint EMBO 234 (1982)/ egy adott antigén paratópját (antigénnel kapcsolódó helyét) kifejező antitest-molekulával végzett immunizálás anti-idiotipusos antitestek egy csoportját kell, hogy kialakitsa, amelyek közül egyesek az antigénnel egy, a paratóppal komplementer szerkezetben osztoznak. Olyan monoklonális antitestekkel végzett immunizálás viszont, amely az onkosztatin-M-nek receptorához való kötődését gátolja, olyan anti-idiotipusokat hoz létre, amelyek utánozzák az onkosztatin-M-et, és az onkosztatin-M receptorhoz kötődnek. Ennek alapján a találmány oltalmi köre magában foglalja, hogy ezek az anti-idiotipusok létrehozhatók az onkosztatin-M elleni monoklonális antitestekkel, és ezek az anti-idiotipusok az onkosztatin-M in vivo és in vitro hatásait egyaránt utánozni képesek. Ugyanigy az onkosztatin-M-hez kapcsolódó anti-idiotipusos antitestek beletartoznak az olyan monoklonális antitestek definiciójába, amelyet az onkosztatin-M határoz meg.

A találmányt az alábbi, nem korlátozó jellegü példákban további részletekkel illusztráljuk.

Monoklonális onkosztatin-M antitestek előállitása

A. Immunizálás és fuzió

A hibridómákat úgy állitottuk elő, hogy 4 Balb/c egeret 5 µg vagy 10 µg fentiek szerint tisztitott, rekombináns onkosztatin-M-mel immunizáltunk [Zarling és munkatársai: Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 83, 9739 (1986)]. Röviden összefoglalva: az onkosztatin-M-et PBS-ban (foszfáttal pufferolt konyhasóoldatban) reszuszpendáltuk, egyenlő térfogatu teljes Freund-adjuvánssal emulgeáltuk, és az állat egyik hátsó talpába intradermálisan 25 µg emulziót fecskendeztünk. Két héttel később ugyanezt az immunizáló eljárást hajtottuk végre az állatnak azonos hátsó talpán, és ennek során az onkosztatin-M ugyanolyan koncentrációját alkalmaztuk, mint az első immunizálás során. A második immunizálás után két héttel az állatok azonos hátsó talpába egy harmadik onkosztatin-M készitményt fecskendeztünk, amelyet azonban nem teljes Freund-adjuvánssal emulgeáltunk. Az utolsó immunizálás után 3 nappal a térdhajlati nyirokcsomót eltávolitottuk, és a nyirokcsomósejteket 653/AG8 egér-mielóma-sejtekkel fuzionáltuk (a nyirokcsomósejteket a mielómasejtekhez viszonyitva 1:1 arányban vettük), aminek során fuziós szerként 40%-os polietilénglikolt alkalmaztunk. A fuziós termékeket üregenként 5 x $10^4$ sejt koncentrációban 96-üreges lemezekre oltottuk, amely szelekciós szerként hipoxantin-amino-pterin-timidin közeget tartalmazott a Dulbecco-féle módositott Eagle közeg Iscoves-féle módositott vál-

tozatában, s amelyet 10%-os borjúmagzatszérummal, nátrium--piruváttal és L-glutaminnal egészitettünk ki. Egy hét elmúltával az eredeti közeget friss közegre cseréltük, amely szelekciós szert tartalmazott. A hibrideket szilárd fázisú enzimkötéses mikromeghatározással ("Mikro-EIA") az alábbiak szerint vizsgáltuk, amikor már a hibridek makroszkóposan láthatóvá lettek.

B. Az enzimkötéses mikromeghatározó módszer (mikro-EIA)

Az alábbiak szerint a mikro-EIA módszert alkalmaztuk a hibridómák által termelt, onkosztatin-M elleni antitestek specifitásának a jellemzése céljából. A hibridómafelülúszók aktivitását mikroteszt-lemezek (beszerzési hely: Robbins Scientific, San Francisco) használatára adaptált, szilárd fázisú EIA segitségével vizsgáltuk. Tisztitott onkosztatin-M-et 2-4 µg/ml koncentrációban üregenként 5 µl térfogatban oltottunk a lemezre, másnapig levegőn száritottuk, majd egy órán át blokkoltuk 5 % nemzsiros, száritott tejport és 0,1 % nátrium-azidot tartalmazó PBS-val, utána a hibrid-felülúszókat 1 µl térfogatban adtuk hozzá, és szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. A lemezeket PBS-ba mártva hatszor mostuk. Minden egyes üregbe PBS + 2% BSA-ban lévő, peroxidázzal konjugált kecske anti-egér IgG $F(ab')_2$ termékét adtuk (beszerzési helye: Pel-Freez, Rogers AK) 1:1500 koncentrációban, 5 µl térfogatban. Egy órányi inkubálás után a lemezeket a fentiek szerint hatszor mostuk, 10 µl 2,2'-azino-bisz(3-etil-benztiazolin-6-szulfonsav)-at (röviditve: ABTS, beszerzési helye: Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.) adtunk hozzá szubsztrátumként, majd a leme-

zeken 660 nm hullámhosszon 20 perc múlva leolvastuk az optikai sürüség (OD) értékeit. A pozitiv üregeket azon az alapon határoztuk meg, hogy a háttérzavaron felül szignált mutattak az előzőleg onkosztatin-M ellen kialakitott nyul-antiszérum szignáljához viszonyitva. A pozitiv hibrideket lágy agar-agaron klónoztuk.

C. Immunkicsapás

Onkosztatin-M-et kódoló cDNS-sel átfertőzött CHO sejteket 4-8 órán át 200-200 µCi $^{35}$S-metioninnal és $^{35}$S--ciszteinnel 4 ml térfogatban 60 x 13 cm méretü Petri--csészében inkubáltunk. A felülúszókat összegyüjtöttük és szürtük, majd 10 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (röviditve: PMSF) és 100 mM tozil-lizin-(klór-metil)-ketont (röviditve: TLCK) adtunk hozzá a proteázok gátlása céljából. Immunkicsapás céljára 100-200 µl jelzett felülúszót egy éjszakán át 4 C°-on inkubáltunk 200 µl olyan használt felülúszóval keverve, amely a monoklonális antitestet kiválasztó hibridekből származott. Az antigén-antitest komplexeket Reactigel gyöngyökhöz kovalensen kötött monoklonális patkány-anti-egér K könnyüláncú monoklonális antitesttel inkubálva izoláltuk. Kimosás után az antigén-antitest komplexeket azonos, 1% SDS-t és 5% 2-merkapto-etanolt tartalmazó puffer-oldattal forralva eluáltuk. Az eluált anyagot 15% SDS-PAGE-ben elektroforézisnek vetettük alá. A géleket fluorográfiásan kezeltük Amplify™ segitségével (beszerzési helye: Amersham Corp., Arlington Heights, IL), majd száritottuk, és Kodak X-AR5 röntgenfilmen autoradiográfiával vizsgáltuk.

D. A növekedés gátlásának vizsgálata

Vizsgáltuk az antitesteket annak megállapitása céljából, hogy képesek-e az onkosztatin-M gátló hatásának közömbösitésére a növekedés-gátlási vizsgálat (GIA) során. A GIA vizsgálatban indikátorsejtekként A375 melanómasejteket alkalmaztunk (50 µl térfogatban 4 x $10^3$ sejtet). Az A375 sejteket 4 órán át 96-üreges, laposfenekü szövettenyésztő lemezeken tenyésztettük (beszerzési helye: Costar 3595, Cambridge, MA) Dulbecco-féle módositott Eagle-közeget tartalmazó tenyésztőközegben ("DMEM"), amelyet 10%-os, hevitéssel inaktivált borjúmagzatszérummal és penicillin/sztreptomicinnel egészitettünk ki. Az onkosztatin-M-et a tenyésztőközegbe higitottuk, és három párhuzamos kisérletben vizsgáltuk a növekedési gátlását úgy, hogy a higitott minta 50 µl térfogatát adtuk minden egyes üregbe. Ezután a sejteket 72 órán át 37 $C^o$-on inkubáltuk. Az inkubálási időszak végén minden egyes üreget 24 órán át 100 µl [$^{125}$J]-5-jód-2'-dezoxiuridint tartalmazó tenyésztőközeggel (üregenként 0,05 µCi, beszerzési hely: Amersham Corp., Arlington Heights, IL) kezeltük. A monorétegeket foszfáttal pufferolt konyhasóoldattal (röviditve: PBS) mostuk, 95%-os metanolban fixáltuk, majd levegőn száritottuk. A sejtekbe épült [$^{125}$J]-5-jód--2'-dezoxiuridint 200 µl 1 n nátrium-hidroxiddal szolubilizáltuk, és a sejtszaporulatot az aktivan szaporodó sejtek DNS-ébe beépült, jelzett jód-dezoxi-uridin mennyiségével mértük. Definiciónk szerint az aktivitás 1 egysége az onkosztatin-M-nek az a mennyisége, amely a kezeletlen sejtek-

hez viszonyitva az A375 sejtek szaporodását 50%-ban gátolja.

E. Az onkosztatin-M radioreceptoros vizsgálata

Radioreceptoros kisérletben vizsgáltuk az antitesteknek azon képességét, hogy gátolják a $^{125}$-vel jelzett onkosztatin-M kötődését az emberi H2981 karcinóma-sejtvonal sejtjeinek felületi onkosztatin-M receptoraihoz. A H2981 sejteket 48-üreges lemezekre oltottuk úgy, hogy minden egyes üregbe 2 x $10^5$ sejtet oltottunk, majd a lemezt a vizsgálat megkezdése előtt 16-24 órán át 37 $C^o$ hőmérsékleten tartottuk. A sejt-monorétegeket ezután kötési pufferoldattal [Linsley és munkatársai: Biochemistry 25, 2978 (1986)] egyszer mostuk. A teljes kötődés értékének mérése céljából 0,5-100 ng/ml koncentrációban [$^{125}$]-onkosztatin-M-et adtunk hozzá. A nemspecifikus kötés mérése végett a [$^{125}$]-onkosztatin-M-mel egyidejüleg nemjelzett onkosztatin-M-et adtunk hozzá egy replika lemezhez, a [$^{125}$]-onkosztatin-M koncentrációjánál 20-100-szor nagyobb koncentrációban. A kötődést 2-5 órán át 23 $C^o$ hőmérsékleten hagytuk lejátszódni, majd a monorétegeket négyszer mostuk kötési pufferoldattal. A sejten kötődött radioaktivitást 1 n nátrium-hidroxiddal oldatba vittük, és gamma-számlálóműszerrel vizsgáltuk. A specifikus kötődést úgy számitottuk ki, hogy a teljes kötődés értékéből a nemspecifikus kötődés értékét levontuk. A disszociációs állandót ($K_d$) és a kötési kapacitást Scatchard-elemzéssel határoztuk meg [Scatchard: Ann.N.Y. Acad.Sci. 51, 660 (1949)].

F. Onkosztatin-M mutánsok

Anti-onkosztatin-M monoklonális antitesteket tesz-

teltünk olyan rekombináns onkosztatin-M mutánsok sorozatán, amelyek a DNS szinten kialakult betoldásokat, delációkat vagy helyettesitéseket tartalmaztak. Az antitesteket COS sejtekből származó tápközegek használt felülúszóiban vizsgáltuk EIA módszerrel, a COS sejtek olyan sejtek voltak, amelyek átmenetileg át voltak fertőzve különböző szülő-, illetve mutáns konstrukciókkal.

G. Az onkosztatin-M kimutatása szérumban monoklonális antitestekkel

Az onkosztatin-M jelenlétét szérumban az alábbi módon mutattuk ki.

Emberi szérummintákat előbb S-300 méret szerint szelektáló oszlopra vittünk a szérumfehérjék molekulatömeg szerinti elválasztása céljából. Az S-300 oszlopról nyert frakciók GIA aktivitását mind a szérummináták megsavanyitása előtt, mind azután megvizsgáltuk. Savanyitás előtt a legtöbb szérumminta az üres térfogatfrakcióiban nem mutatott GIA-aktivitást. Azok a szérummináták azonban, amelyeket megsavanyitottunk, majd ismét közömbösitettünk a GIA-hoz adás előtt, aktivitást mutattak a 200 kilodaltonnál nagyobb molekulatömegü anyagokat tartalmazó frakciókban, s ez arra utal, hogy az onkosztatin-M a szérumban általában olyan kötőfaktorral kapcsolt alakban van, amelynek molekulatömege 200 kilodaltonnál (röviditve: kd) nagyobb és ebben az állapotban hatástalan. A különböző szérumfrakciókat Western-foltanalizissel vizsgáltuk. Az onkosztatin-M elleni specifikus monoklonális antitestek onkosztatin-M molekulatömegének

megfelelő, azonban nagy molekulatömegü frakciókban található fehérjékkel végbemenő reakciója igazolta az onkosztatin-M jelenlétét ezekben a frakciókban. A szérumban talált onkosztatin-M-et tisztitottuk, az N-terminális aminosavszekvencia vizsgálata azt mutatta, hogy ez azonos a nativ, valamint a korábban kapott rekombináns onkosztatin-M-mel.

EREDMÉNYEK

H. Az onkosztatin-M-re specifikus monoklonális antitestek szelekciója

A fuziókat két sorozatban végeztük: minden egyes sorozatban négy fuziót hajtottunk végre, és ennek során minden egyes egérből egy nyirokcsomót alkalmaztunk fuziónként. A fuziók első sorozatából négy hibridet részletesebben vizsgáltunk. A második, sikeresebb fuziósorozatból (a sikerességen itt a mikro-EIA vizsgálattal azonositott pozitiv hibridek számát értjük) legalább 20 további anti-onkosztatin-M monoklonális antitestet azonositottunk. Ezek közül az alábbi hibrideket választottuk ki további tanulmányozásra annak alapján, hogy az EIA kisérletben relativ szignált adtak, és képesek voltak immunprecipitációra mind a nativ, mind a denaturált, metabolikusan jelzett onkosztatin-M-mel: 11R2F8, 12R13B5, 12R13D7 és 12R19E3 jelü hibridek. Az alábbiakban megadott immunprecipitációs adatok alapján a hibrideket három kategória valamelyikébe soroltuk annak a kritériumnak alapján, hogy nativ onkosztatin-M-mel, denaturált onkosztatin-M-mel vagy mindkettővel szemben reakcióképességet mutattak (I. táblázat). E monoklonális antitestek közül ötöt vizsgáltunk annak megállapitása céljából, hogy melyikük

képes az onkosztatin-M gátló hatásait közömbösiteni a növekedés gátlási vizsgálatban. Ezeket az eredményeinket az alábbiakban összegezzük.

**I. táblázat**

Monoklonális onkosztatin-M antitestek

| Az antitest jele | A megfelelő vonal az 1. ábrában | A felismert molekula formája | A foltképzésben mutatott reakció-készség | Közömbösitő hatás |
|---|---|---|---|---|
| 1R10F11 | 2. | nativ | - | nincsen |
| 3R9D9 | 3. | denaturált | + | nincsen |
| 3R13F4 | 4. | denaturált | + | nincsen |
| 4R12C7 | 5. | denaturált | + | nincsen |
| 11R2F8 | 6. | nativ | - | van |
| 12R13B5 | 7. | nativ | | nem határoztuk meg- |
| 12R13D7 | 8. | nativ vagy denaturált | ++ | nem határoztuk meg |
| 12R19E3 | 9. | nativ vagy denaturált | ++ | nem határoztuk meg |

I. A monoklonális antitestek onkosztatin-M-mel végbemenő immunprecipitációja

Az immunprecipitáció eredményei három olyan hibridómát azonositottak, amelyek $^{35}$S-metioninnel jelzett onkosztatin-M-mel csak annak olyan formájában reagáltak, aminőben a CHO-transzfektánsokból kiválasztódtak (1. csoport) (az 1. ábrában a 2., 6. és 7. vonalak, lásd az I. táblázatot az antitestek azonositása szempontjából). Három további monoklonális antitest csak olyan $^{35}$S-metioninnal jelzett onkosztatin-M-mel reagált, amelyet előbb SDS-val és rekulálószerekkel kezelve redukáltunk és denaturáltunk, majd 100 $C^{o}$ hőmérsékleten forraltunk, nativ onkosztatin-M-mel azonban nem reagáltak (2. csoport, 3., 4. és 5. vonalak). Két további monoklón antitest akár természetes eredetü, akár denaturált, bioszintetikus módszerrel jelzett onkosztatin-M-mel reagált (3. csoport, 8. és 9. vonalak).

J. Az onkosztatin-M-et a növekedés gátlási vizsgálat során közömbösitő monoklonális antitestek

A 11R2F8 hibridből származó tisztitott antitest az onkosztatin-M hatásait koncentrációtól függően közömbösitette (lásd a 2. ábrát). Az 1R10F11 antitest - amely a nativ onkosztatin-M-re irányul - nem oltotta ki az onkosztatin-M növekedés gátló hatásait (lásd a 2B. ábrát). A GIA mérés alapján egyetlen, denaturált determinánst kimutató antitest sem volt képes az onkosztatin-M közömbösitésére. A közömbösitésre képest 11R2F8 antitestet tovább vizsgáltuk az alábbiak szerint, hogy megállapitsuk az onkosztatin-M receptorhoz való kötődésére kifejtett gátlási képességét.

K. Az onkosztatin-M kötődését gátló monoklonális antitestek radioreceptor vizsgálatban

A 11R2F8 antitest koncentrációtól függő módon gátolta az onkosztatin-M kötődését a receptorához - ellentétben egyrészt az 1R10F11 antitesttel, amely reagál ugyan a nativ onkosztatin-M-mel, azonban nem a közömbösitésre jellemző helyen, valamint ellentétben egy harmadik antitesttel (4R12C7), amely egy, a denaturált onkosztatin-M-en lévő epitópra irányul (lásd a 3. ábrát).

L. A monoklonális antitestek rekombináns onkosztatin-M mutánsok ellen irányuló hatása

Az onkosztatin-M mutánsait a vizsgálat alatt lévő, 1989. december 8-án 447,759 számon benyujtott Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésünkben irtuk le, amelyet hivatkozásként e bejelentésünkbe beépitünk. Minden egyes onkosztatin-M mutánst öt különböző antitesttel vizsgáltunk. Egy antitest, amely kimutatta egy denaturált onkosztatin-M determinánsát, azaz a 4R12C7 antitest kötődését összehasonlitottuk a közömbösitésre képes 11R2F8 monoklonális antitest kötődésével (lásd a 4. ábrát). Ha a rekombináns onkosztatin-M molekula C-terminális szakaszából az aminosavakat növekvő számban töröltük, akkor az 1R10F11 és 11R2F8 antitestek - azaz a nativ epitópok ellen irányuló két antitest - reakcióképessége csökkent. Ha a 183. helyü aminosavmaradékot töröltük, akkor mindkét antitest hatékonysága megszűnt, ami arra utal, hogy az ezen antitestek által felismert tercier szerkezet valamilyen molekula C-terminális tartományában

elhelyezkedő aminosavakkal van kapcsolatban. Egyetlen kivétellel valamennyi vizsgált mutánsban a nativ onkosztatin-M elleni antitestek reakcióképessége azonos. Az egyetlen kivétel a Δ44-47 mutáns, amelyet az 1R10F11 antitest megköt, a 11R2F8 - a közömbösitő antitest - azonban nem, s ez valószinűsiti hogy a mutációból eredő konformációs változás a közömbösitő helyet megszünteti, azonban az 1R10F11 által felismert helyet nem érinti. Az EIA adatait megerősitette a COS-transzfektánsokból származó, bioszintetikusan jelzett tápközegek immunprecipitációs elemzése (lásd az 5. ábrát).

A C-terminálisban hiányos Δ187 nevű mutáns információval szolgált a 12R13D7 kötőhelyének feltérképezésében (lásd az 1. ábrában a 8. vonalat), ez utóbbi antitest mind nativ, mind denaturált onkosztatin-M-mel reagált. Ez az antitest az összes, eddig kifejezett mutánssal kölcsönhatásba lépett a Δ187 kivételével. Mivel a 12R13D7 Δ188 és Δ186 mutánsokkal reakcióba lépett - amely mutánsok a Δ187 mutációt megelőző és követő aminosavakat nem tartalmazták - feltételeztük, hogy a Δ187-ben egy más helyen található mutáció felelős ezen antitest reakciókészségének az elvesztéséért. A Δ187 szekvenálása során további mutációt találtunk a 108. helyű aminosavnál, ahol a leucint szerin helyettesitette, s ezzel a 12R13D7 antitest kötőhelye e területre lokalizálódott.

M. Az anti-onkosztatin-M gátolja az onkosztatin-M-nek a Kaposi-szarkómából származó AIDS-KS sejtek növekedésére kifejtett potencirozó hatásait

Az onkosztatin-M-nek a Kaposi-szarkómára kifejtett

növekvést potencirozó hatásait a 6. ábrán mutatjuk be. A tisztitott onkosztatin-M fokozta a Kaposi-szarkóma sejtvonal, valamint az N1072 - rosszindulatú mediesztinális limfómában szenvedő beteg tüdőizzadmányából származó, in vitro tenyésztett simaizomsejtek - celluláris szaporodását. A találmány szerinti 11R2F8 közömbösitő monoklonális antitest a Kaposi-szarkóma tenyészetéhez adva 95%-ban gátolta az exogén onkosztatin-M növekedést potencirozó hatását (7. ábra).

Egy HTLV-II-vel fertőzött sejtvonalból ( #38) származó kondicionált tápközeg szintén potencirozta a Kaposi-szarkómasejtek növekedését [Nakamura és munkatársai: Science 242, 426 (1988)]. A 11R2F8 monoklonális antitest e kondicionált tápközeg Kaposi-szarkómasejtek szaporodására kifejtett potencirozó hatását is gátolta: amint a 7. ábrában látható, onkosztatin-M hatására 60%-os gátlást fejtett ki.

A közömbösitésre nem képes 1R10F11 monoklonális antitest nem fejtett ki hatást egyik vizsgálatban sem az onkosztatin-M szaporodást serkentő hatására (7. ábra).

N. Letétbe helyezett mikroorganizmusok

A jelen találmány kidolgozása során az alábbi sejtvonalakat helyeztük letétbe az "American Type Culture Collection" (Rockville, Maryland) gyűjteményben, és ezek az alábbi letéti számokat kapták:

| Sejtvonal | Letéti szám | A letétbe helyezés ideje |
|---|---|---|
| 11R2F8.9 | ATCC HB 10398 | 1990. március 27. |
| 12R13D7.2 | ATCC HB 10396 | 1990. március 27. |
| 1R10F11.34.16 | ATCC HB 10397 | 1990. március 27. |

A jelen találmány oltalmi köre nem korlátozódik a letétbe helyezett sejtvonalakra, mivel a deponált mikroorganizmusok alkalmazása csupán illusztrálja a találmányt, és bármely - működése szempontjából egyenértékü sejtvonal vagy antitest - a találmány körén belül van. A találmány különböző, a közölteken kivüli módositásai az e területen jártas szakember számára a fenti leirás és a csatolt rajzok alapján nyilvánvalóak, e módositásokat az igénypontok oltalmi köre magában foglalja.

Szabadalmi igénypontok

1. A Kaposi-szarkómasejtek növekedésének gátlására alkalmazható antitest vagy annak fragmentuma, azzal jellemezve, hogy antigénnel kapcsolódó helye onkosztatin-M-mel szemben reakcióképes.

2. Az 1. igénypont szerinti, Kaposi-szarkómasejtek növekedésének gátlására alkalmazható antitest vagy annak fragmentuma, azzal jellemezve, hogy ez monoklonális antitest vagy annak fragmentuma.

3. A 2. igénypont szerinti, Kaposi-szarkómasejtek növekedésének gátlására alkalmazható monoklonális antitest fragmentum, azzal jellemezve, hogy ez Fab, $F(ab')_2$ vagy $F_v$ fragmentum.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti, Kaposi-szarkómasejtek növekedésének gátlására alkalmazható antitest vagy annak fragmentuma, azzal jellemezve, hogy valamilyen jelzéssel, toxinnal vagy növekedési faktorral konjugált alakban van.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti, Kaposi-szarkómasejtek növekedésének gátlására alkalmazható antitest vagy annak fragmentuma, azzal jellemezve, hogy antigénnel kapcsolódó helye a 11R2F8 monoklonális antitest immunspecifikus kötődését kompetitiven gátolni képes.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti, Kaposi-szarkómasejtek növekedésének gátlására alkalmazható antitest vagy annak fragmentuma, azzal jellemezve, hogy

ez kiméra antitest vagy annak fragmentuma.

7. Monoklonális antitest, azzal jellemezve, hogy ez Kaposi-szarkómasejtek növekedésének gátlására alkalmazható 11R2F8 monoklonális antitest.

8. Monoklonális antitest fragmentumok azzal jellemezve, hogy ezek a 11R2F8 monoklonális antitestnek a Kaposi-szarkómasejtek növekedésének gátlására alkalmazható Fab, $F(ab')_2$ vagy $F_v$ fragmentumai.

9. A 8. igénypont szerinti fragmentumok, azzal jellemezve, hogy valamely jelzéssel, toxinnal vagy növényi faktorral konjugált alakban vannak.

10. A Kaposi-szarkómasejtek szaporodásának gátlására alkalmazható kiméra antitest vagy annak fragmentuma, azzal jellemezve, hogy legalább egy, az antigénnel kapcsolódó helye a 11R2F8 monoklonális antitestből vagy az ezen antitestet kódoló DNS-ből származtatható.

A meghatalmazott:

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 1.
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő

32 oldal + 7 ábrával

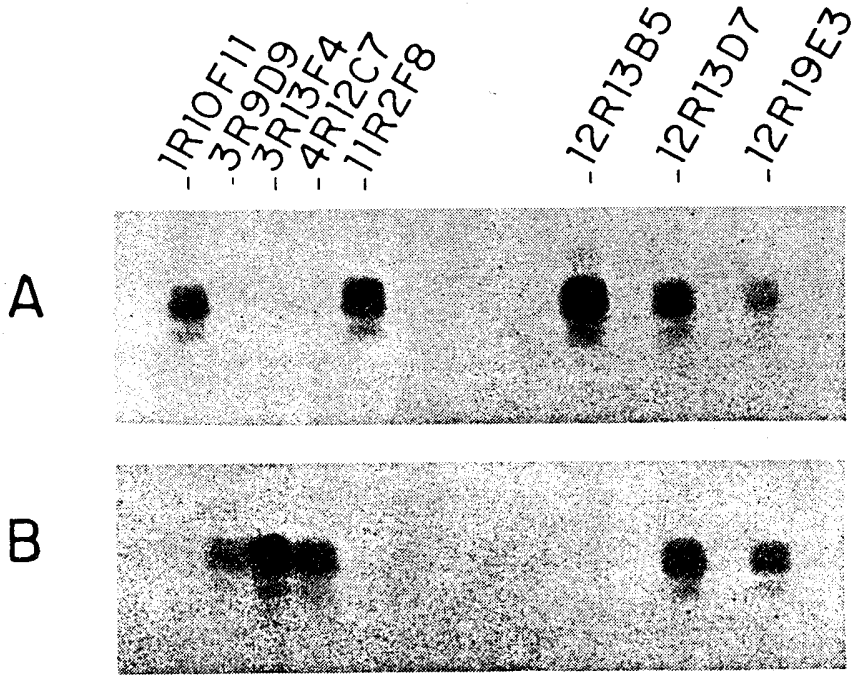
Földvári

1005/91

1527/91

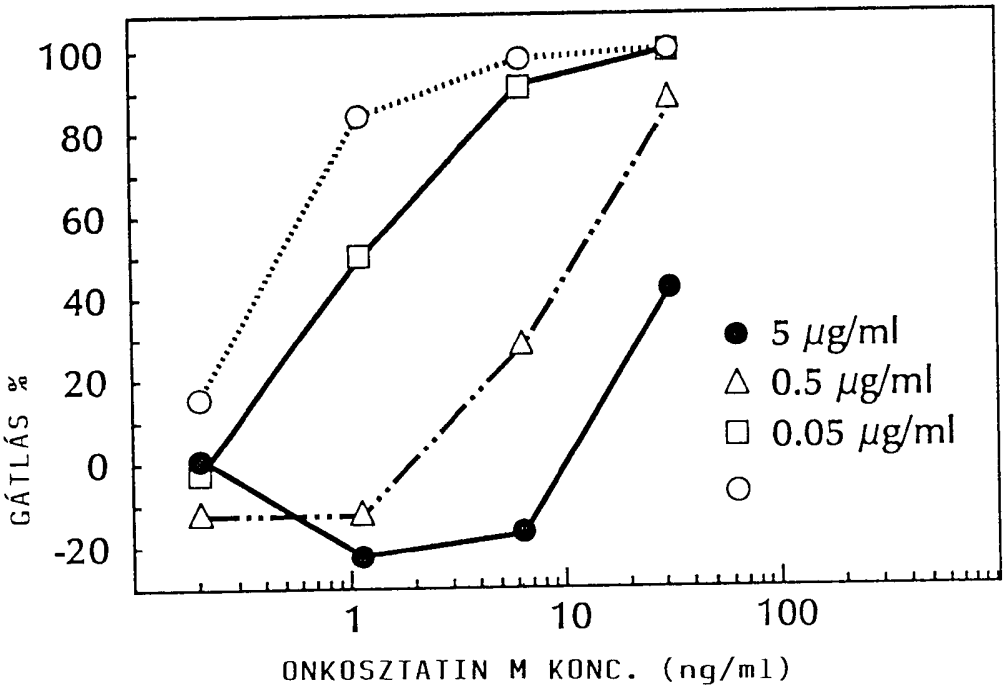
57274-1

8/1



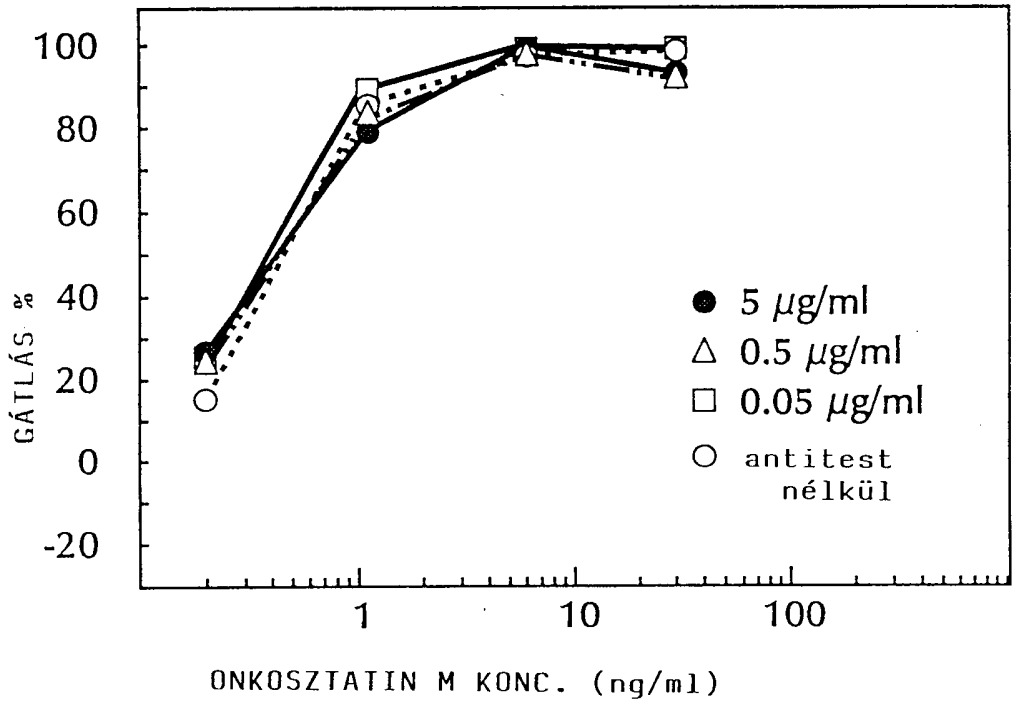

1. ábra

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 11
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő



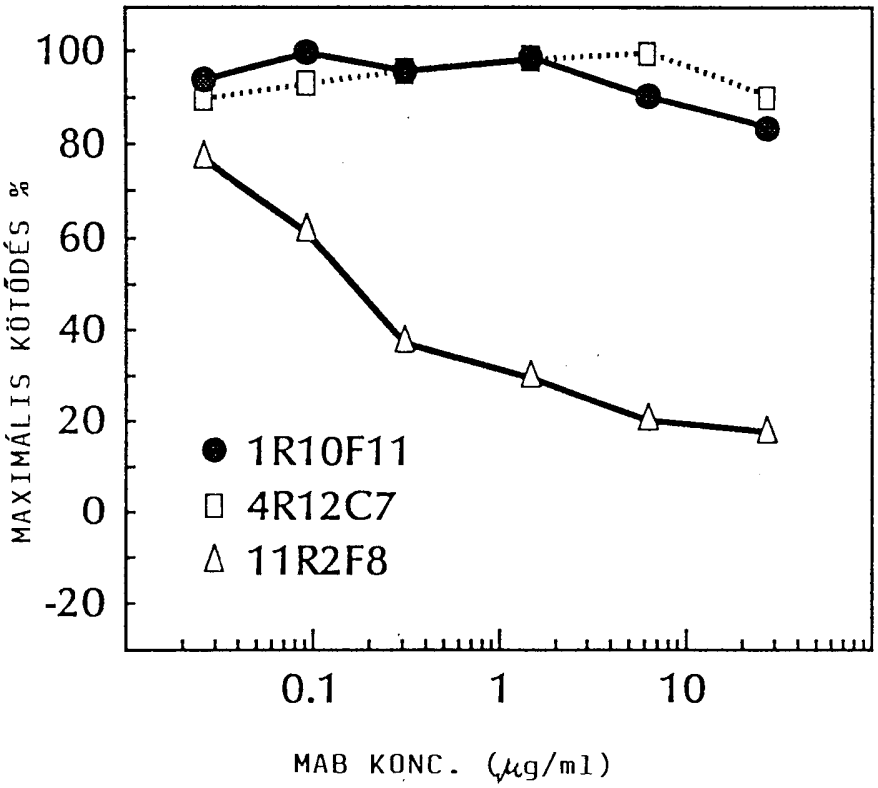

2A ábra

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 11
KARÁCSONYI BÉLA



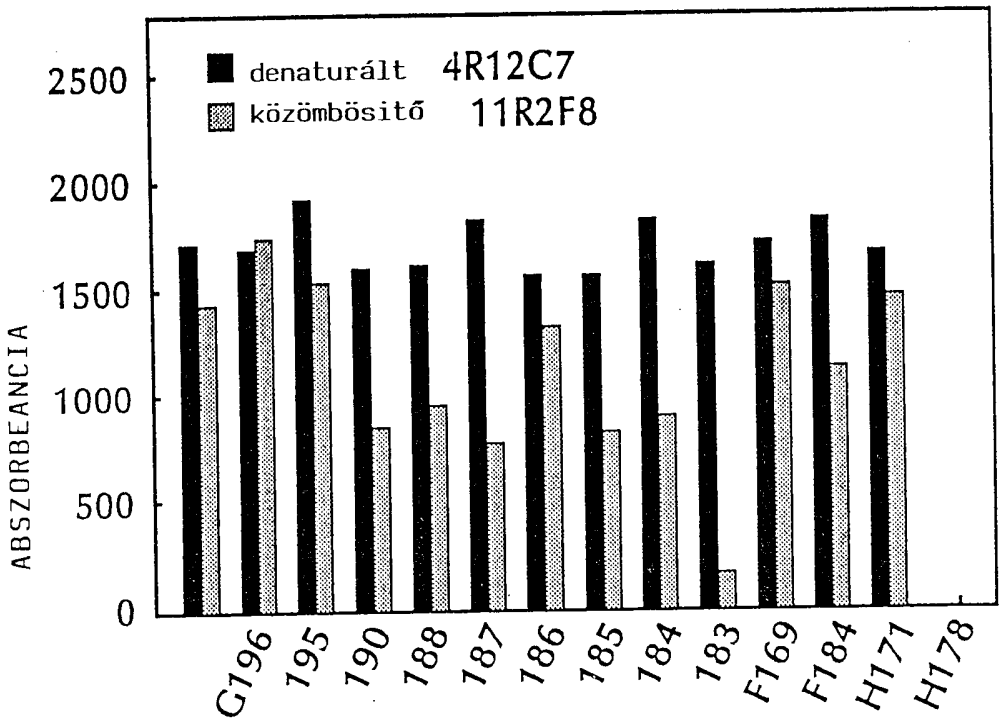

2B ábra

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 11
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő



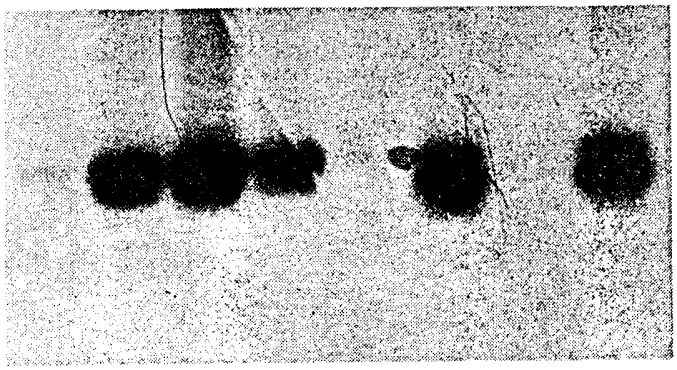

3. ábra

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 11
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő




4. ábra

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 11
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő

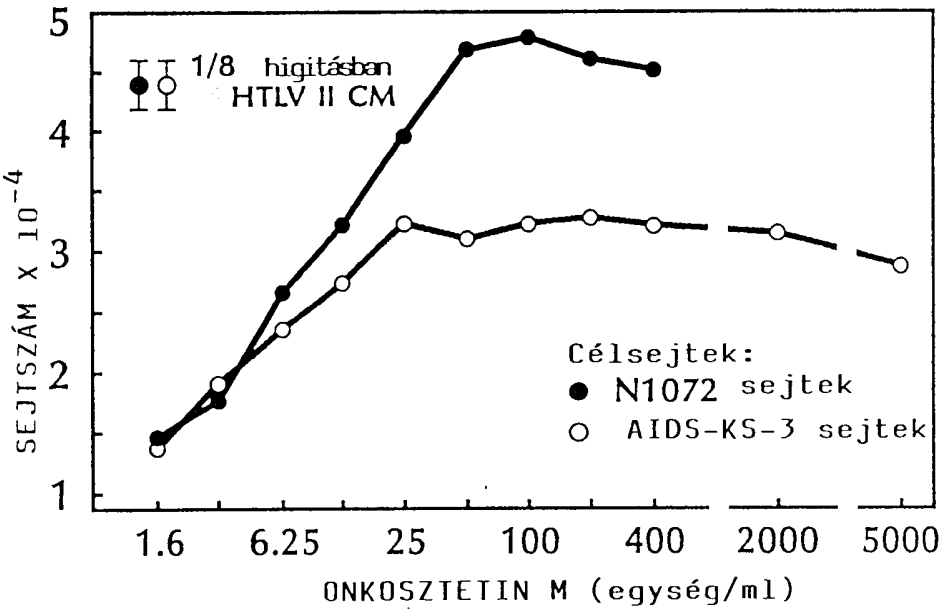


Vonal 1. 2. 3. 4. 1. 2. 3. 4.

kontroll deléciós mutáns

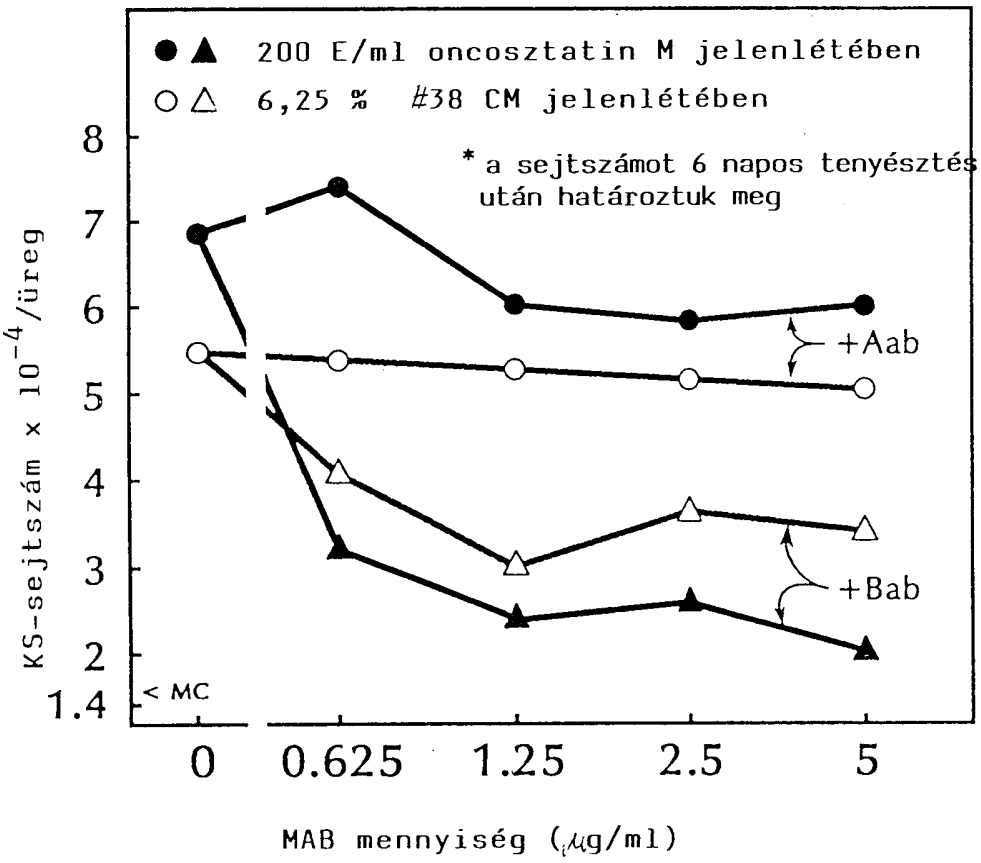
5. ábra

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 11.
KARACSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő




6. ábra

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 11.
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő




7. ábra

29. sz. Ügyvédi Munkaközösség
SZABADALMI IRODA
1011 Budapest, Fő utca 11.
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő