

Interleukin-15 (IL-15) specifikus humán ellenanyagok

Kivonat

5

10

A találmány tárgyát olyan izolált humán monoklonális antitestek képezik, melyek specifikusan kötődnek IL-15-höz (pl. humán IL-15-höz), valamint az antitestek alkalmazásával kialakított készítmények és molekulák. A találmány szerinti humán antitestek előállíthatók transzfektómák vagy (nem-humán) transzgenikus állatok (pl. transzgenikus egerek) alkalmazásával, melyek képesek a humán monoklonális antitestek sokféle izotípusának előállítására V-D-J rekombináció és izotípus átkapcsolás révén. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti humán antitesteket tartalmazó gyógyászati készítmények, a találmány szerinti humán antitesteket termelő (nem-humán) transzgenikus állatok és hibridómák, valamint a találmány szerinti antitestek terápiás és diagnosztikai alkalmazásaival kapcsolatos megoldások.

15

„Jelentés a leírásról”
J. ...



Interleukin-15 (IL-15) specifikus humán ellenanyagok

A találmány tárgyát olyan izolált humán monoklonális antitestek képezik, melyek specifikusan kötődnek IL-15-höz (pl. humán IL-15-höz), valamint az ellenanyagok alkalmazásával kialakított készítmények és molekulák. A találmány szerinti humán antitestek előállíthatók transzfektómák vagy (nem-humán) transzgenikus állatok (pl. transzgenikus egerek) alkalmazásával, melyek képesek a humán monoklonális antitestek sokféle izotípusának előállítására V-D-J rekombináció és izotípus átkapcsolás révén. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti humán antitesteket tartalmazó gyógyászati készítmények, a találmány szerinti humán antitesteket termelő (nem-humán) transzgenikus állatok és hibridómák, valamint a találmány szerinti humán antitestek terápiás és diagnosztikai alkalmazásaival kapcsolatos megoldások.

A gyulladások keltő citokinek közé tartozó interleukin-15 (IL-15) 14-15 kDa méretű glikoprotein. Konstitutív expresszióját már számos sejtben és szövetben kimutatták, így pl. monocitákban, makrofágokban, fibroblasztokban, keratinocitákban és dendritikus sejtekben [Waldmann és Tagaya: Annu. Rev. Immunol. 17, 19 (1999); Fehninger és Caligiuri: Blood 97, 14 (2001)]. Expressziója fokozódik gyulladásos körülmények között, így pl. IFN- γ és LPS stimulációban részesült monocitákban, vagy vírusos, bakteriális vagy egysejtű paraziták fertőzésekben [Kirman és mtsai.: Inflamm. Res. 47, 285 (1998); Waldmann és mtsai.: Int. Rev. Immunol. 16, 205 (1998); Waldmann és Tagaya: Annu. Rev. Immunol. 17, 19 (1999); Fehninger és Caligiuri: Blood 97, 14 (2001)]. Emellett idült gyulladásos megbetegedésekben, pl. rheumatoid arthritisben a helyileg termelt IL-15 a synovialis T-sejtek „toborzásán” és aktiválásán keresztül feltehetően fokozza a gyulladást. Ezt az IL-15 előidézte hatást a megbetegedés kórfejlődése szempontjából döntő fontosságúnak tekintik [Kirman és mtsai.: Inflamm. Res. 47, 285 (1998); McInnes és mtsai.: Nat. Med. 175, 82 (1996); McInnes és mtsai.: Nat. Med. 3, 189 (1997); McInnes és Liew: Immunol. Today 19, 75 (1998); Fehninger és Caligiuri: Blood 97, 14 (2001)].

In vitro kísérletekkel igazolták, hogy az IL-15 az IL-2-vel közös receptor összetevőinek köszönhetően számos, utóbbi molekuláéval megegyező biológiai tulajdonsággal rendelkezik. A T-sejteken jelen lévő IL-15 receptor egyedi α -láncot tartalmaz (IL-15Ra), de β -lánc és γ -lánc megegyezik az IL-2R-ével. Ennek következtében mindkét receptor ugyanazokat a Jak/STAT szignáltranszdukciós elemeket használja. Az IL-2 és az IL-15 valamint receptoraik összetett szabályozásnak és differenciált expressziójának köszönhetően ugyanakkor in vivo

funkciójukban lényeges különbségek észlelhetők [Kirman és mtsai.: *Inflamm. Res.* 47, 285 (1998); Waldmann és Tagaya: *Annu. Rev. Immunol.* 17, 19 (1999); Waldmann és mtsai.: *Immunity* 14, 105 (1991)]. Nem szabad figyelmen kívül hagynunk továbbá az IL-15-nek a natural killer (NK) sejtek, az NK-T sejtek és az intraepithelialis lymphocyták kialakulásában,

5 túlélésében, elszaporodásában és működésében betöltött nélkülözhetetlen szerepét sem [Kennedy és mtsai.: *J. Exp. Med.* 191, 771 (2000); Liu és mtsai.: *Immunol. Today* 21, 113 (2000)].

McInnes és mtsai. arról számoltak be, hogy rheumatoid arthritisben szenvedő betegek-
 ből származó T-sejtek IL-15-tel végzett stimulációjuk eredményeként TNF- α termelésbe
 kezdtek [McInnes és mtsai.: *Nat. Med.* 3, 189 (1997); McInnes és Liew: *Immunol. Today* 19,

10 75 (1998)]. Perifériás vérből származó, IL-15 által aktivált T-sejtek hatására sejterintkezés-
 függő mechanizmus eredményeként makrofágokban is lényeges mértékű TNF- α termelés in-
 dukálódott. A TNF- α rheumatoid arthritisben betöltött szerepe miatt e citokin gátlása csök-
 kenti a megbetegedés aktivitását [Bathon és mtsai.: *N. Engl. J. Med.* 343, 1586 (2000); Klip-
 pel: *N. Engl. J. Med.* 343, 1640 (2000); Lovell és mtsai.: *N. Engl. J. Med.* 342, 763 (2000);

15 Maini és Taylor: *Annu. Rev. Med.* 51, 207 (2000)].

A találmány tárgyát humán IL-15-höz specifikusan kötődni, és annak gyulladáskeltő
 hatásait gátolni képes, elsőként közzétett teljes mértékben humán monoklonális ellenanyagok,
 valamint azok előállítása és izolálása képezi. A találmány tárgyát képezi továbbá az említett
 új ellenanyagok jellemzése és különféle IL-15 termeléssel kapcsolatos megbetegedések

20 gyógykezelésében mutatott terápiás hatásuk demonstrálása is. Kimutattuk például, hogy a hu-
 mán ellenanyagok gátolják a gyulladásos megbetegedésekben lényeges szerepet játszó TNF- α
 termelést és a T-sejt proliferációt. Ezért a találmány szerinti humán ellenanyagok az említett
 kórképek (és bármely egyéb, IL-15 közvetített megbetegedés) gyógykezelésének és megelő-
 zésének előnyösebb módját kínálják, részben különleges specifitásuknak (vagyis epitóp- és

25 fajtaspecifitásuknak), affinitásuknak, struktúrájuknak, funkcionális aktivitásuknak, valamint
 annak a ténynek köszönhetően, hogy teljes mértékben humán ellenanyagok, így humán páci-
 enseknek beadva a korábban előállított (pl. egérszárú és humanizált) IL-15 ellenanyagokhoz
 képest lényegesen kevésbé immunogének és nagyobb terápiás hatékonysággal rendelkeznek.
 A találmány tárgyát képezik továbbá az IL-15 gátló ellenanyagok, így a találmány szerinti

30 humán ellenanyagok pl. gyulladásos megbetegedések, pl. rheumatoid arthritis, psoriasis,
 transzplantátum kilökődés valamint rákos megbetegedések kezelésére újonnan kifejlesztett
 terápiás alkalmazásai.

A találmány szerinti izolált humán ellenanyagok számos ellenanyag izotípust foglalnak magukba, ilyenek pl. az IgG1, az IgG2, az IgG3, az IgG4, az IgM, az IgA1, az IgA2, az IgAsec, az IgD és az IgE. Jellemzően a találmány szerinti izolált humán ellenanyagok közé IgG1 (pl. IgG1k), IgG3 és IgM izotípusok tartoznak. Az ellenanyagok lehetnek teljes nagyságúak (pl. IgG1 vagy IgG3 ellenanyag), vagy tartalmazhatnak csupán egy antigénkötő szakaszt [pl. Fab, F(ab)2, Fv, egyláncú Fv fragmenst, izolált komplementaritást meghatározó régiót (CDR), vagy két vagy több izolált CDR-t].

A találmány egy megvalósítási módjában a humán ellenanyagok rekombináns ellenanyagok. A találmány egyik megvalósítási módjában a humán ellenanyagot humán IgG nehézlánc és humán kappa könnyűlánc nukleinsavak kódolják, amelyek variábilis régióikban az 1 azonosítószámú szekvencián és a 3. azonosítószámú szekvencián megadott nukleotidszekvenciát, vagy azok konzervatív szekvencia-módosulásait tartalmazzák. A találmány egy másik megvalósítási módjában a humán ellenanyagot IgG nehézlánc és kappa könnyűlánc nukleinsavak kódolják, amelyek variábilis régióikban a 2 azonosítószámú szekvencián és a 4. azonosítószámú szekvencián megadott nukleotid-szekvenciát, vagy azok konzervatív szekvencia-módosulásait tartalmazzák.

A találmány szerinti ellenanyagok előállíthatók rekombináns úton gazdasejtben, pl. az ellenanyag nehéz és könnyű láncait kódoló nukleinsavakat tartalmazó transzfektómában (pl. halhatatlanná tett CHO sejtekből vagy lymphocytákból álló transzfektómákban), vagy közvetlenül is kinyerhetők az ellenanyagot expresszáló hibridómából (pl. az ellenanyagot kódoló humán nehézlánc transzgént és humán könnyűlánc transzgént tartalmazó genommal rendelkező transzgénikus nem-humán állatból, pl. transzgénikus egérből kinyert, halhatatlanná tett sejttel fuzionált B-sejtet tartalmazó hibridómából). A találmány egyik megvalósítási módjában az ellenanyagok előállítására variábilis régióikban az 1 azonosítószámú szekvencián és a 3. azonosítószámú szekvencián megadott nukleotid-szekvenciát, vagy azok konzervatív szekvencia-módosulásait magukba foglaló humán nehézlánc és humán könnyűlánc nukleinsavakat tartalmazó 146B7 jelű hibridómában, vagy gazdasejt (pl. CHO sejt) transzfektómában kerül sor. A találmány egyes megvalósítási módjaiban az ellenanyagokat 146B7, 146H5, 404E4 vagy 404A8 jelzésű hibridómák termelik. A találmány egy előnyös megvalósítási módjában az ellenanyag specifikusan kötődni képes egy, az IL-15 β - és/vagy γ -láncsal kölcsönhatásban álló doménján található epitóphoz.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellenanyagok specifikusan kötődnek a humán IL-15-höz és meggátolják az IL-15 gyulladást elősegítő hatásainak kialakulását, vagyis meggátolják az IL-15-nek az IL-15 receptorhoz történő

kötődésének hatására bekövetkező TNF- α termelést és/vagy meggátolják a T-sejtek, így a PBMC-k vagy CTLL-2 T-sejtek ennek hatására kialakuló proliferációját. A humán ellenanyagok IL-15-höz történő kötődésének analitiként rekombináns humán IL-15 és ligandumként az ellenanyag alkalmazásával, felületi plazmonrezonanciás („surface plasmon resonance” SPR) technológiával BIACORE 3000 berendezésben megállapított disszociációs egyensúlyi állandója (KD) jellemzően alacsonyabb, mint 10^{-7} M, így alacsonyabb, mint kb. 10^{-8} M, 10^{-9} M vagy 10^{-10} M, vagy még ennél is alacsonyabb. A találmány egy megvalósítási módjában az ellenanyag humán IL-15-höz történő kötődésének disszociációs egyensúlyi állandója (KD) megközelítőleg $6,5 \times 10^{-8}$ M.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát képezi a humán IL-15-höz specifikusan kötődő, az alábbi CDR-szekvenciák bármelyikét tartalmazó izolált humán monoklonális ellenanyag:

(i) az 5., 6., 7., 8., 9. és 10. azonosítószámon megadott szekvenciák;

(ii) az (i) pontban megadott szekvenciákkal legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azokkal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azokkal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ szekvenciák; vagy

(iii) az (i) vagy (ii) pontokban megadott szekvenciák fragmensei, amelyek megőrizték a humán IL-15-höz történő specifikus kötődés képességét.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát képezi a humán IL-15-höz specifikusan kötődő, az alábbi szekvenciák bármelyikét tartalmazó izolált humán monoklonális ellenanyag:

(i) a 7. azonosítószámon megadott szekvencia;

(ii) a 7. azonosítószámú szekvenciával legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azzal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azzal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ szekvencia; vagy

(iii) az (i) vagy (ii) pontokban megadott szekvencia fragmense, amely megőrizte a humán IL-15-höz történő specifikus kötődés képességét.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát képezi a humán IL-15-höz specifikusan kötődő, az alábbi szekvenciák bármelyikét tartalmazó izolált humán monoklonális ellenanyag:

(i) az 5. és 8. azonosítószámon megadott szekvenciák;

(ii) a 6. és 9. azonosítószámon megadott szekvenciák;

(iii) a 7. és 10. azonosítószámon megadott szekvenciák;

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát a humán IL-15-höz specifikusan kötődő izolált humán monoklonális ellenanyag képezi, amely a 4. Azonosítószámú szekvencián megadott könnyűlánc variábilis régiót, vagy a 4. azonosítószámú szekvenciával legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azzal legalább 95%-ban homológ, még

előnyösebben azzal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ könnyűlánc variábilis régiót tartalmaz.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát képező, a humán IL-15-höz specifikusan kötődő izolált humán monoklonális ellenanyag a humán IL-15 γ -lánc-
5 cal kölcsönhatásba lépő doménjén található epitóphoz kötődve meggátolja az IL-15R γ -láncon keresztül megvalósuló cisz-szignáltranszdukciót, és amely az IL-15R vagy más citokin receptor részeként a γ -láncot, vagy a β - és γ -láncokat expresszáló szomszédos sejteken meggátolja a transz-szignáltranszdukciót.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát képező, a humán
10 IL-15-höz specifikusan kötődő izolált humán monoklonális ellenanyag megakadályozza az IL-15 receptor α -, β - és γ -láncainak összeállítását, és/vagy az IL-15R vagy más citokin receptor részeként a γ -láncot, vagy a β - és γ -láncokat expresszáló szomszédos sejteken megakadályozza a láncok összeállítását.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát a találmány szerinti ellenanyagokat vagy antigénkötő részeket kódoló nukleinsav-molekulák képezik. Ennek
15 megfelelően a találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti, ellenanyagot kódoló nukleinsavakat tartalmazó rekombináns expressziósvektorok, valamint az ezekkel transzfektált gazdasejtek, továbbá a találmány szerinti ellenanyagoknak az említett gazdasejtek tenyésztésével történő előállítására szolgáló eljárások.

20 A találmány tárgyát képezi továbbá a 2. és 4. azonosítószámú szekvenciákon megadott aminosav-szekvenciákat vagy azok konzervatív módosulatait tartalmazó nehéz- és könnyűlánc variábilis régiókat kódoló nukleotid-szekvenciát magában foglaló expressziósvektor. Az ilyen expressziósvektorok szakember számára jól ismertek. Ilyenek például a reticulocytalízis alkalmazásával működő in vitro transzkripció/transzlációs vektorok.

25 A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát transzgénikus nem-humán állatból, pl. transzgénikus egérből izolált, IL-15-höz specifikusan kötődő különböző izotípusú (pl. IgG, IgA és/vagy IgM) humán monoklonális ellenanyagok expressziójára képes B-sejtek képezik. Az izolált B-sejtek kinyerésére előnyösen tisztított vagy dúsított IL-15 antigén-készítménnyel és/vagy IL-15-öt expresszáló sejtekkel immunizált transzgénikus
30 nem-humán állatból, pl. transzgénikus egérből kerül sor. A transzgénikus nem-humán állat, pl. transzgénikus egér előnyösen humán nehézlánc transzgént és humán könnyűlánc transzgént tartalmazó genommal rendelkezik. Az izolált B-sejtek halhatatlanná tételével hozható létre az IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagokat termelő sejt (pl. hibridóma).

Mindezeknek megfelelően a találmány tárgyát képezi továbbá az IL-15-höz specifikusan kötődő humán monoklonális ellenanyagok előállítására alkalmas hibridóma. A találmány egy megvalósítási módjában a találmány szerinti hibridóma humán nehézlánc transzgént és humán könnyűlánc transzgént tartalmazó genommal rendelkező transzgénikus nem-humán állatból, pl. transzgénikus egérből kinyert és halhatatlanná tett sejttel fuzionált B-sejtet tartalmaz. Az ellenanyag-termelő hibridómák előállítása érdekében a transzgénikus nem-humán állat tisztított vagy dúsított IL-15 antigén-készítménnyel és/vagy IL-15-öt expresszáló sejtekkel immunizálható. A találmány tárgyát képező hibridómák például a következők: 146B7, 146H5, 404E4, 404A8.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát IL-15-höz specifikusan kötődő humán monoklonális ellenanyagokat expresszáló transzgénikus nem-humán állat, pl. transzgénikus egér képezi. A találmány egy megvalósítási módjában a találmány szerinti transzgénikus nem-humán állat humán nehézlánc transzgént és humán könnyűlánc transzgént tartalmazó genommal rendelkező transzgénikus egér. A transzgénikus nem-humán állat tisztított vagy dúsított IL-15 antigén-készítménnyel és/vagy IL-15-öt expresszáló sejtekkel immunizálható. A találmány szerinti transzgénikus nem-humán állat, pl. transzgénikus egér V-D-J rekombináció és izotípus-váltás („isotype-switching”) eredményeként előnyösen többféle IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyag izotípus (pl. IgG, IgA és/vagy IgM) termelésére képes. Az izotípus-váltás klasszikus és nem-klasszikus úton egyaránt végbemehet.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát IL-15-tel specifikusan reagáló humán monoklonális ellenanyagok előállítására szolgáló eljárások képezik. A találmány egy megvalósítási módjában a találmány szerinti eljárás során humán nehézlánc transzgént és humán könnyűlánc transzgént tartalmazó genommal rendelkező transzgénikus nem-humán állat, pl. transzgénikus egér tisztított vagy dúsított IL-15 antigén-készítménnyel és/vagy IL-15-öt expresszáló sejtekkel történő immunizálására kerül sor. Az állatból ezután eltávolított B-sejteket (pl. léperedetű B-sejteket) myeloma sejtekkel fuzionáltatva IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagokat termelő halhatatlan hibridóma sejtek jönnek létre.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát terápiás hatású gyökhöz, p. citotoxikus droghoz, enzimatikusan aktív toxinhoz vagy annak fragmenséhez, radioizotóphoz vagy kismolekulájú daganatellenes droghoz konjugált humán anti-IL-15 ellenanyag képezi.

A találmány tárgyát képezik továbbá gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagot és legalább egy, IL-15-höz specifikusan kötődő találmány szerinti humán monoklonális

ellenanyagot tartalmazó különféle készítmények, pl. gyógyászati és diagnosztikai készítmények. A találmány szerinti készítmény ezen felül további gyógyászati anyagokat, pl. egyéb immunszuppresszív vagy kemoterápiás hatóanyagokat is tartalmazhat.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát az IL-15 gyulladáskeltő hatásának gátlására szolgáló eljárások képezik, amelyekben egy vagy több, találmány szerinti humán ellenanyag alkalmazásával az IL-15 indukálta TNF- α termelés és/vagy T-sejt proliferáció gátlása valósul meg, előnyösen a szerkezetileg hasonló proteinek/citokinek (pl. az IL-2) aktivitásának (pl. a TNF- α termelés és/vagy a T-sejt proliferáció előidézésének) gátlása nélkül.

A találmány szerinti humán ellenanyagok az adott megbetegedésben szenvedő páciensnek beadva különféle IL-15 közvetített megbetegedések gyógykezelésére és/vagy megelőzésére vehetők igénybe.

A találmány szerinti eljárásokkal és készítményekkel kezelhető (pl. enyhíthető) vagy megelőzhető példaértékű megbetegedések többek között egyes gyulladásos kórképek, pl. az arthritis (pl. a psoriasis-hoz társuló arthritis és a rheumatoid arthritis, ideértve az aktív rheumatoid arthritist és a juvenilis rheumatoid arthritist), valamint a bél gyulladásos elváltozásai. Kimutattuk például, hogy az ellenanyagok psoriasis esetén csökkentik a parakeratosis mértékét, csökkentik az epidermis megvastagodását és mérséklék a keratinocyták proliferációját. A találmány szerinti ellenanyagok csökkentik továbbá a gyulladás mértékét és/vagy meggátolják a rheumatoid arthritisben szerepet játszó aktivált leukocyták chemotaxisát. A találmány szerinti ellenanyagok fertőző megbetegedések, pl. HIV-fertőzés kezelésére is alkalmazhatók. Igénybe vehetők továbbá a transzplantátum-kilökődés kezelésére is. Ennek megfelelően, a találmány szerinti humán monoklonális ellenanyagok igénybe vehetők szerv- vagy szövet-transzplantáción áteső vagy abban részesült páciensek esetében, így pl. szív-, tüdő-, kombinált szív-tüdő-, légcső, vese, máj, hasnyálmirigy, nyelöcső, bél-, bőr-, végtag-, köldökzsínór-, őssejt-, hasnyálmirigysziget-sejt transzplantáció stb. esetén.

A találmány szerinti ellenanyagok ennek megfelelően igénybe vehetők allograft és xenograft kilökődés megelőzésére, vagy heveny allograft vagy xenograft kilökődési reakció visszafordítására, gyógykezelésére vagy enyhítésére.

A találmány szerinti ellenanyagokkal kezelhető megbetegedések közé tartoznak többek között a graft versus host reakció, pl. a vértranszfúziót és a csontvelő-transzplantációt követő graft versus host reakció. A találmány szerinti ellenanyagok igénybe vehetők továbbá számos, IL-15 által közvetített új vérérképződéssel járó megbetegedés, pl. különböző daganatok, rákos megbetegedések, így pl. T-sejtes leukémia kezelésére is. Fokozott

vérérképződéssel járó megbetegedések továbbá egyes gyulladásos kórképek, például a rheumatoid arthritis.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát humán IL-15 túlzott expressziójával járó rendellenesség és/vagy a humán IL-15 hatásának csökkentését vagy gátlását igénylő kórkép gyógykezelésére vagy megelőzésére szolgáló, a találmány szerinti ellenanyagának a kórkép gyógykezelésére vagy megelőzésére alkalmas mennyiségben a páciensnek történő beadását magában foglaló eljárás képezi.

A találmány egy további megvalósítási módjában a kezelendő megbetegedés a következők bármelyike lehet:

10 arthritis, pl. ankylosissal kísért spondylitis, reaktív arthritis, sacroileitis és felnőttkori Still-betegség;

kötőszövetes megbetegedés, pl. szisztémás lupus erythematosus, discoid lupus, központi idegrendszeri lupus, lupus nephritis, sarcoidosis, központi idegrendszeri sarcoidosis és polymyositis / dermatomyositis;

15 szemészeti kórkép, pl. uveitis vagy chorioretinitis;

idegrendszeri kórkép, pl. trópusi spasticus paraparesis, myasthenia gravis, méhnyakrák, rhabdomyosarcoma, Ewing-sarcoma és multiple sclerosis;

gyomor-bélrendszeri és májbetegség, pl. heveny fulmináns hepatitis, coeliakia, műtétet követő vékony- és vastagbélgyulladás, fekélyes vastagbélgyulladás, Crohn-betegség;

20 allergiás megbetegedés, pl. bronchialis asztma;

hematológiai kórkép, pl. heveny T-sejtes lymphoblastos leukémia, felnőttkori T-sejtes leukémia, Sezary-szindróma, krónikus lymphocytás leukémia, mycosis fungoides, prekursor B-sejtes heveny lymphoblastos leukémia/limfóma, krónikus myelogén leukémia, heveny myeloid leukémia, nagysejtes granuláris lymphocytosis, nagysejtes granuláris lymphocytás leukémia, myeloma, plasmacytoma, plazmasejtes myeloma, nehézlánc megbetegedés (γ , μ , és α lánc-megbetegedés), extranodális natural killer sejtes / T-sejtes limfóma és agresszív natural killer sejtes leukémia;

bőrbetegség, pl. allergiás kontakt ekcéma, bullous pemphigoid, égést követő hipertrófiás heg, lichen ruber;

30 tüdőmegbetegedés; pl. idült obstruktív tüdőbetegség, fibrózissal kísért alveolitis, heveny légzőszervi elégtelenség szindróma;

rosszindulatú daganat, pl. colorectalis rák, malignus melanoma;

transzplantáció következtében kialakult megbetegedés, pl. allograft és xenograft kiöködés, graft versus host reakció;

endokrinológiai kórkép, pl. autoimmun thyreoiditis, Grave-féle betegség;
 érmegbetegedés, pl. Wegener-féle granulomatosis, mikroszkópikus polyangiitis, poly-
 arteritis nodosa, óriássejtes arteritis, atherosclerosis;
 5 szülészeti-nőgyógyászati megbetegedés, pl. visszatérő spontán vetélés, endometriosis;
 fertőző megbetegedés, pl. szepszis, AIDS.

A találmány egy további megvalósítási módjában a kezelt megbetegedés a következők
 bármelyike lehet: ankylosissal kísért spondylitis, szisztémás lupus erythematosus, fekélyes
 vastagbélgyulladás, allograft kilökődési reakció és graft versus host reakció.

10 A találmány szerinti humán ellenanyagok egy vagy több további terápiás ágenssel, pl.
 gyulladáscsökkentő hatóanyagokkal, betegségmódosító rheumaellenes drogokkal („disease-
 modifying anti-rheumatic drugs”, DMARD) immunszuppresszív hatóanyagokkal, kemoterá-
 piás szerekkel és psoriasis elleni hatóanyagokkal kombináltan is alkalmazhatók.

15 A találmány egy megvalósítási módjában a páciens az ellenanyagok gyulladáskeltő
 hatásának gátlását tovább fokozó egy vagy több további hatóanyaggal is kezelhető, így pl.
 gyulladáscsökkentő hatóanyaggal, pl. szteroid vagy nem-szteroid gyulladáscsökkentővel
 (NSAID-vel). A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös ilyen hatóanyagok pl. az
 aszpirin és más szalicilátok, a Cox-2 gátlók, pl. a rofekoxib (Vioxx) és a celekoxib (Cele-
 brex), NSAID-ok, mint pl. az ibuprofen (Motrin, Advil), a fenoprofen (Nalfon), a naproxen
 (Naprosyn), a szulindak (Clinoril), a diklofenak (Voltaren), a piroxikam (Feldene), a ketopro-
 20 fen (Orudis), a diflunizal (Dolobid), a nabumeton (Relafen), az etodolak (Lodine), az oxapro-
 zin (Daypro) vagy az indometacin (Indocin).

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellena-
 nyagok együtt adagolhatók egy vagy több DMARD-vel, ilyen pl. a metotrexát (Rheumatrex),
 a hidroxiklorokvin (Plaquenil), a szulfaszalazin (Asulfidin), pirimidin szintézis gátlóval, ilyen
 25 pl. a leflunomid (Arava), IL-1 receptort blokkoló ágenssel, ilyen pl. az anakinra (Kineret), va-
 lamint TNF- α blokkoló ágenssel, ilyen pl. az etanercept (Enbrel), az infliximab (Remicad) és
 az adalimumab.

Ilyen további anyagok az IL-10, az oldható IL-15R, az anti-IL-6R ellenanyagok, a
 CTLA4Ig és az anti-CD20 ellenanyagok.

30 A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán
 ellenanyagok egy vagy több immunszuppresszív hatóanyaggal, pl. ciklosporinnal (Sandimmu-
 ne, Neoral) vagy azatioprinnel (Imural) kombinációban is beadhatók.

Ilyen további anyagok a mikofenolsav, a mikofenolát-mofetil, a kortikoszteroidok, pl.
 a prednizon, a metotrexát, az aranysó, a szulfaszalazin, a maláriaellenes szerek, a brekvinar,

a leflunomid, a mizoribin, a 15-dezoxispergualin, a 6-merkaptopurin, a ciklofoszfamid, a rapamicin, a takrolimusz (FK-506), valamint az anti-thymocita globulin.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellenanyagok beadhatók egy vagy több immunszuppresszív hatóanyaggal, így pl. prednizonnal és ciklosporinnal; prednizonnal, ciklosporinnal és azatioprinnel; vagy prednizonnal, ciklosporinnal és mikofenolát mofetillel együtt.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti ellenanyagok beadhatók egy vagy több kemoterápiás hatóanyaggal együtt is, amilyenek pl. a doxorubicin (Adriamycin), a ciszplatin (Platinol), a bleomicin (Blenoxane), a karmusztin (Gliadel), a ciklofoszfamid (Cytosan, Procytox, Neosar), vagy a klórambucil (Leukeran). A találmány szerinti humán ellenanyagok sugárterápiával együttesen is alkalmazhatók.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti ellenanyagok egy vagy több psoriasis elleni készítménnyel együttesen is adagolhatók, ilyenek a pl. kőszénkátrányt, A-vitamint, kortizont vagy egyéb kortikoszteroidot tartalmazó, helyi kezelésre alkalmazott gyógyszerkészítmények, a szájon át vagy parenterálisan adagolt készítmények, pl. a kortikoszteroidok, a metotrexát, a retinoidok, pl. az acikretin (Neogitason) vagy a ciklosporin (Sandimmune, Neoral). Egyéb, hasonló módon alkalmazható kezelések pl. a napfény- vagy fototerápia.

Ilyen további készítmények az antralin, a kalcipotrien, a tarazotén, az etanercept, az alefacept, az efalizumab, a 6-tioguanin, a mikofenolát mofetil, a takrolimusz (FK 506) és a hidroxikarbamid, valamint a CTLA4Ig és az infliximab. További, hasonló kezelések az UVB (széles- és szűk sávú ultraibolya B), az UVA (ultraibolya A) és a PUVA (pszoralen, metoxalen plussz ultraibolya A) kezelés.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti készítmények a fenti kezelések közül eggyel vagy többel egy időben alkalmazhatók, ilyen kezelések pl. a metotrexát + fényterápia (PUVA vagy UVA); a metotrexát + acitretin; az acitretin + fényterápia (PUVA vagy UVA); a metotrexát + acitretin + fényterápia (PUVA vagy UVA); a hibroxikarbamid + fényterápia (PUVA vagy UVB), a hidroxikarbamid + acitretin; a ciklosporin + metotrexát; vagy a kalcipotrien + fényterápia (UVB).

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellenanyagok más, pl. CD4-specifikus vagy IL-2-specifikus ellenanyagokkal kombináltan is beadhatók. A találmány tárgyát képező humán ellenanyagok és a CD4-specifikus vagy az IL-2-specifikus ellenanyagok kombinált alkalmazása különösen előnyösnek tekinthető autoimmun megbetegedések és transzplantátum-kilökődés kezelése során.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti ellenanyagok más ellenanyagokkal, pl. más immunszuppresszív humán monoklonális ellenanyagokkal kombináltan is alkalmazhatók. Ilyen ellenanyagok pl. az MHC-hez, CD2-höz, CD3-hoz, CD7-hez, CD28-hoz, B7-hez, CD40-hez, CD45-höz, IFN- γ -hoz, TNF- α -hoz, IL-2R-hez, IL-4-hez, IL-5-höz, IL-6R-hez, IL-7-hez, IL-8-hoz, IL-10-hez, CD11a-hoz, CD20-hoz vagy CD58-hoz vagy ligandumaikhoz kötődő ellenanyagok. A találmány szerinti ellenanyagok egyéb immunmoduláló hatású vegyületekkel, pl. oldható IL-15R-rel vagy IL-10-zel kombinációban is beadhatók.

A találmány tárgyát képezi továbbá az IL-15 antigén mintabeli jelenlétének in vitro vagy in vivo kimutatására, vagyis az IL-15 által közvetített megbetegedések diagnosztizálására alkalmas eljárás. A találmány egy megvalósítási módjában az említett eljárás során egy vizsgálandó és egy kontroll mintát az ellenanyag és az IL-15 által alkotott komplex kialakulását lehetővé tevő körülmények között a találmány szerinti monoklonális ellenanyaggal vagy annak antigénkötő részletével reagáltatjuk, majd mindkét mintában kimutatjuk (pl. ELISA vizsgálat segítségével) a komplexképződés eredményét. A két mintában képződött komplex mennyisége közötti statisztikailag lényeges mértékű különbség az IL-15 vizsgált mintában való jelenlétére utal.

A találmány szerinti megoldás egyéb jellemzői és az általa nyújtott további előnyök az alábbi részletes leírásból és a szabadalmi igénypontokból nyilvánvalóvá válnak.

Az alábbiakban az ábrák rövid leírását közöljük.

Az 1. ábrán a humán IL-15 specifikus ellenanyagok, a 146B7, a 147H5, a 404A8 és a 404E4 humán IL-15-höz (hIL-15-höz) és a Q108S és D8SQ108S jelzésű mutáns proteinekhez történő kötődését ábrázoló grafikonok láthatók. A vizsgálatban az ellenanyagok sorozathígításainak hIL-15-höz, vagy a Q108S és D8SQ108S jelzésű mutáns proteinekhez történő kötődését ELISA-val vizsgáltuk.

A 2. és 3. ábrák a 146B7 jelzésű ellenanyag VH- és VL-régióinak aminosav-szekvenciáját (2. és 4. azonosítószámú szekvencia), valamint nukleotid-szekvenciáját (1. és 3. azonosítószámú szekvencia) mutatják be. A váz- („framework”, FR) és komplementaritást meghatározó régiót (CDR-t) bejelöltük.

A 4A-D ábrák az IL-15 által közvetített TNF- α kibocsátás 146B7 jelzésű ellenanyaggal történt gátlását bemutató grafikonokat tartalmaznak. Emberi PBMC-ket (0, 50, 100 ng/mL koncentrációjú) hIL-15 és (0,1, 1, 10 μ g/mL koncentrációjú) 146B7 jelű ellenanyag vagy azonos izotípusú kontroll ellenanyag jelenlétében 72 órán át inkubáltunk. A termelődött TNF- α

mennyiségét ELISA-val állapítottuk meg. Az ábrán két egészséges önkéntes esetében nyert adatokat mutatunk be.

Az 5. ábra a 146B7 jelzésű ellenanyagok az IL-2 vagy IL-15 által közvetített TNF- α kibocsátásra gyakorolt hatását bemutató grafikont tartalmaz. Emberi PBMC-eket (0, 50, 100 ng/mL koncentrációjú) hIL-15 vagy (100 ng/mL koncentrációjú) hIL-2 és (0,1, 1, 10 μ g/mL koncentrációjú) 146B7 jelű ellenanyag jelenlétében 72 órán át inkubáltunk. A termelődött TNF- α mennyiségét ELISA-val állapítottuk meg.

A 6. ábra a 146B7, a 146H5, a 404E4, valamint a 404A8 jelzésű ellenanyagoknak a hIL-15 által kiváltott CTLL-2 proliferációra gyakorolt gátló hatását bemutató grafikont tartalmaz. A hIL-2 hiányában tenyésztett CTLL-2 sejteket (60 pg/mL koncentrációjú) hIL-15 és a 146B7, a 146H5, a 404E4, valamint a 404A8 jelzésű ellenanyagok sorozathígításainak kombinációjával 48 órán keresztül inkubáltuk. A proliferáció (cpm) mérésére [3H]-timidin inkorporációs vizsgálatot alkalmaztunk. A bemutatott eredmények átlagértékeket jelölnek.

A 7-9. ábrák a 146B7 (7. ábra), a 404E4 (8. ábra), valamint a 404A8 (9. ábra) jelzésű ellenanyagoknak a hIL-15 által kiváltott PBMC proliferációra gyakorolt gátló hatását bemutató grafikonokat tartalmaznak. Emberi PBMC-eket 0, 25, 100 ng/mL koncentrációjú hIL-15 (ld. a 7A, a 8A, valamint a 9A ábrát) vagy 0, 10, 100 ng/mL koncentrációjú hIL-2 (ld. a 7B, a 8B, valamint a 9B ábrát) és 0,1, 1, valamint 10 μ g/mL koncentrációjú 146B7 jelű ellenanyag (7. ábra), 404E4 jelű ellenanyag (8. ábra), vagy 404A8 jelű ellenanyag (9. ábra) jelenlétében 72 órán át inkubáltunk. A proliferáció (cpm) mérésére [3H]-timidin inkorporációs vizsgálatot alkalmaztunk.

A 10. ábra a 146B7 jelzésű ellenanyag IFN γ -val stimulált monocitákhoz történő kötődését mutatja be. Emberi PBMC-eket 500 E/mL IFN γ jelenlétében 37°C-on két napig inkubáltunk. Mintánként legalább 5000 sejt esetében áramlás-citometriával, a monociták méretén történt kapuzással megállapítottuk a fluoreszcencia intenzitását. Az ábrán a stimulációs index értékét tüntettük fel [SI = (a pozitív festődés átlagos fluoreszcencia intenzitása)/(a háttér festődés átlagos fluoreszcencia intenzitása)].

A 11. ábra humán monociták 146B7 jelzésű ellenanyaggal (B mező), vagy azonos izotípusú kontroll ellenanyaggal (A mező) történő kötődését mutatja be. Az izolált, majd 500 E/mL koncentrációjú IFN γ jelenlétében tenyésztett emberi PBMC sejtekből citospin centrifugálással készített preparátumokat hematoxilinnel festettük meg.

A 12. ábra psoriasisos emberi bőr 146B7 jelzésű ellenanyaggal (B mező), vagy azonos izotípusú kontroll ellenanyaggal (hIgG1; A mező) történő kötődését mutatja be. A páciensek-

től beleegyezésük után psoriasisos plakkokat nyertünk, majd azokat a vizsgálatig -80°C -on tároltuk. A szöveteket biotinizált ellenanyagokkal jelöltük, majd a kötődést tormaperoxidázzal történt aktiválással tettük láthatóvá.

A 13A ábra rheumatoid arthritises szövetben található magvas sejtek arányát mutatja be SCID egerek 146B7 jelű ellenanyaggal vagy vivőanyaggal történt kezelését követően. A szöveteket hematoxin-eozinnal (HE) festettük, majd a róluk készült képeket a Photo Shop szoftver 6.0-s verziójával elemeztük. A 146B7 jelű ellenanyaggal ($n = 4$) vagy csak vivőanyaggal ($n = 2$) kezelt egerek esetében kapott adatok [(átlag és az átlag hibája (SEM))] a teljes terület százalékában fejezik ki a sejtmagok nagyságát. A 13B és 13C ábrák SCID egerek xenograft RA szöve reprezentatív HE festésének eredményét mutatják be 146B7 jelű ellenanyaggal (13C ábra) vagy PBS-sel (13B ábra) történt kezelést követően.

A 14. ábra psoriasisos SCID egerek 146B7 jelzésű ellenanyaggal történt kezelésének eredményét bemutató grafikonokat tartalmaz. A biopátumokat formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd hematoxin-eozinnal festettük és a Ki-67 magantigén kimutatása érdekében megfelelő módon jelöltük. A 14A ábra a psoriasis súlyosságát mutatja be az epidermis vastagsága alapján, ez utóbbit a stratum corneumtól a hámcsapok („rete pegs”) kezdetéig mértük. A 14B ábrán bemutatott adatok esetében az epidermis vastagságát a stratum corneumtól a hámcsapok legmélyebb pontjáig mértük. A 14C ábra a parakeratosis súlyosságát mutatja be. A 14D ábra a bőr felső rétegében található mononuclearis gyulladásos sejtek számát mutatja be. A 14E ábrán a Ki-67 pozitív keratinociták számát tüntettük fel.

A 15. ábra SCID egerekbe ültetett psoriasisos emberi bőrrészekből 146B7 jelzésű ellenanyaggal (C mező), CsA-val (B mező), vagy vivőanyaggal (A mező) végzett kezelést követően készített metszetek HE festésének eredményét mutatja be. A transzplantációt követően három héttel az egereket PBS-sel (placebóval), 15 napig kétnaponként 10 mg/kg adagban CsA-val (ciklosporin A-val, Sandoz), vagy az első napon 20 mg/kg adagban, majd a 8. és 15. napon 10 mg/kg adagban 146B7 jelzésű ellenanyaggal kezeltük. Egy héttel az utolsó kezelést követően az egereket kiirtottuk és mindegyik xenograftból egy 4 mm átmérőjű hengeres biopátumot („punch biopsy”) vettünk. A biopátumokat formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd az elkészült metszeteket HE-nal festettük.

A 16. ábra SCID egerekbe ültetett psoriasisos emberi bőrrészekből 146B7 jelzésű ellenanyaggal (C mező), CsA-val (B mező), vagy vivőanyaggal (A mező) végzett kezelést követően készített metszetek Ki-67 jelölésének eredményét mutatja be. A transzplantációt követően három héttel az egereket PBS-sel (placebóval), 15 napig kétnaponként 10 mg/kg adagban CsA-val (ciklosporin A-val, Sandoz), vagy az első napon 20 mg/kg adagban, majd a

8. és 15. napon 10 mg/kg adagban 146B7 jelzésű ellenanyaggal kezeltük. Egy héttel az utolsó kezelést követően az egereket kiirtottuk és mindegyik xenograftból egy 4 mm átmérőjű hengeres bioptátumot vettünk. A bioptátumokat formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd az elkészült metszeteket a Ki-67 magantigén kimutatása érdekében jelöltük.

5 A 17. ábra a 146B7 jelzésű ellenanyag receptorhoz kötött IL-15-höz történő kötődését mutatja be. Az IL-15R α -val bevont tálcákat IL-15-tel inkubáltuk. Tíz perc elteltével a tálcák üregeihez biotinizált 146B7-et adtunk. A 146B7 receptorhoz kötött IL-15-höz történő kötődésének mértékét 405 nm-es hullámhosszon ELISA leolvasóval állapítottuk meg.

10 A 18. ábra a 146B7 jelzésű ellenanyagnak a „Raji” sejtekben expresszált receptorához kötődött IL-15-höz történő kötődésének eredményét mutatja be. Az IL-15R-t expresszáló Raji sejtek IL-15-tel történt inkubálását követően 10 perccel a sejteket biotinizált 146B7-tel kezeltük. A 146B7 jelzésű ellenanyag receptorhoz kötött IL-15-höz történő kötődését FACS elemzéssel vizsgáltuk.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

15 A találmány tárgyát IL-15 által közvetített (vagyis az IL-15 gyulladáskeltő tulajdonságai miatt kialakuló) különféle kórképek gyógykezelésére és diagnosztizálására szolgáló új, ellenanyag-alapú gyógyászati készítmények képezik. A találmány szerinti megoldásban az „IL-15 gyulladáskeltő tulajdonságai” kifejezés alatt az IL-15 által kiváltott bármely humorális vagy sejtes immunválaszt értjük, ideértve a TNF- α vagy egyéb gyulladásos mediátorok termelését, valamint a T-sejtek toborzását/proliferációját. A találmány szerinti kezelésekben az
20 IL-15 egy epitópjához specifikusan kötődő izolált humán monoklonális ellenanyagok alkalmazására kerül sor.

A találmány egy megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellenanyagok előállítására V-D-J rekombináció és izotípus-váltás segítségével IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagok különböző izotípusainak (pl. IgG, IgA és/vagy IgE) termelésére képes
25 nem-humán transzgénikus állatban, pl. transzgénikus egérben kerül sor. Ennek megfelelően a találmány tárgyát ellenanyagok, az ellenanyagokat tartalmazó gyógyászati készítmények, valamint az ellenanyagok előállítására alkalmazott nem-humán transzgénikus állatok, B-sejtek, gazdasejt transzfektómák és hibridómák képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá
30 a találmány szerinti ellenanyagokat alkalmazó, IL-15-öt megkötő sejtek kimutatására szolgáló, valamint az IL-15 közvetítette funkciók in vitro vagy in vivo gátlására szolgáló eljárások is. A különböző hatóanyagok IL-15-öt megkötő sejtekhez történő célba juttatására szolgáló eljárások szintén a találmány tárgyát képezik.

A találmány szerinti megoldás könnyebb érthetősége kedvéért a következőkben megadjuk néhány kifejezés magyarázatát. A találmány szerinti megoldás részletes leírásában további definíciók találhatók.

5 Az „IL-15”, „IL-15 antigén” és „interleukin 15” megnevezéseket e helyen azonos értelemben, egymással felcserélhetően alkalmazzuk. Ideértjük az IL-15 sejtek által természetes körülmények között expresszált természetes variánsait vagy izoalakjait is.

10 Az „ellenanyag” kifejezés alatt teljes ellenanyagokat vagy azok bármely antigénkötő fragmensét (vagyis „antigénkötő részét”) vagy szimpla láncát értjük. Az „ellenanyag” megnevezés diszulfidkötésekkel összekapcsolt legalább két nehéz (H) láncot és két könnyű (L) láncot tartalmazó glikoproteint, vagy annak antigénkötő részét jelenti. Minden egyes nehéz-
lánc egy variábilis nehézlánc-régióból (VH) és egy konstans nehézlánc-régióból áll. A konstans nehézlánc-régió három doménből áll, ezek jelzése CH1, CH2 és CH3. Minden egyes könnyűlánc variábilis könnyűlánc-régióból (VL) és egy konstans könnyűlánc-régióból áll. A konstans könnyűlánc régió egyetlen doménből áll, ennek jelölése CL. A VH és VL régiókon
15 belül megkülönböztethetünk komplementaritást meghatározó régióknak (CDR-nek) nevezett hipervariábilis régiókat, amelyek konzerváltabb, váz („framework”, FR) régiók között helyezkednek el. Mindegyik VH és VL régió három CDR-ből és négy FR-ből áll, amelyek aminosav-terminális irányultságban helyeződnek, a következő sorrendben: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. A nehéz- és könnyűláncok variábilis régiói az antigénnel köl-
20 csönhatásba lépő kötődési domént tartalmaznak. Az ellenanyagok konstans régiói elősegítik az immunglobulin gazdaszövetekhez vagy faktorokhoz, pl. az immunrendszer különböző sejtjeihez (pl. effektor sejtekhez), vagy a klasszikus komplementrendszer első komponenséhez (a C1q-hoz) történő kötődését.

25 Az egy ellenanyag „antigénkötő része” (vagy egyszerűen „ellenanyag-részlet”) alatt egy ellenanyag egy vagy több fragmensét értjük, amelyek megtartották egy antigénhez (pl. IL-15-höz) történő specifikus kötődés képességét. Igazolt tény, hogy egy ellenanyag antigénkötő funkcióját a teljes nagyságú ellenanyag fragmensei is elláthatják. Az egy ellenanyag „antigénkötő része” kifejezésnek megfelelő kötőfragmensek például (i) a Fab fragmens, ami a VL, VH, CL és CH1 doménokat tartalmazó monovalens fragmens; (ii) a F(ab')₂ fragmens, amely két Fab fragmenst a kapocsrégióban diszulfid-híddal összekötött tartalmazó bivalens fragmens; (iii) a VH és CH1 doménokat magában foglaló Fd fragmens; (iv) egy ellenanyag egyik karjának VL és VH doménjait magában foglaló Fv fragmens; (v) egy VH doménból álló dAb fragmens [Ward és mtsai.: Nature 341, 544 (1989)]; (vi) izolált komplementaritást meghatározó régió (CDR); vagy (vii) két vagy több izolált CDR kombinációja, amelyeket
30

adott esetben szintetikus kapcsolószekvencia köthet össze. Annak ellenére, hogy az Fv fragmens két doménját, a VL-t és a VH-t különálló gének kódolják, ezek szintetikus kapcsolószekvencia segítségével rekombináns eljárásokkal összekapcsolhatók, ami lehetővé teszi szimpla proteinláncként történő előállításukat, ahol a VL és a VH régiók párba rendeződve monovalens molekulákat, más néven egyláncú FV-t (scFV-t) alkotnak [Bird és mtsai.: Science 242, 423 (1988); Huston és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879 (1988)]. Az egy ellenanyag „antigénköti része” kifejezés ezekre az egyláncú ellenanyagokra is kiterjed. Ezeknek az ellenanyag-fragmenseknek az előállítására szakember számára ismert hagyományos technikák vehetők igénybe, a fragmensek felhasználhatóság szempontjából történő szkrínélése az intakt ellenanyagokéhoz hasonlóan végezhető el.

A „monoklonális ellenanyag” kifejezés egyedi kötődési specifitással és egy meghatározott epitóppal szembeni affinitással rendelkező ellenanyagot jelöl. Ennek megfelelően a „humán monoklonális ellenanyag” kifejezés alatt egyedi kötődési specifitással rendelkező, emberi csíravonal-eredetű immunglobulin-szekvenciákból származó variábilis és konstans régiókat tartalmazó ellenanyagot értünk. A találmány egy megvalósítási módjában a humán monoklonális ellenanyagokat a genomjában humán nehézlánc transzgént és könnyűlánc transzgént hordozó transzgénikus nem-humán állatból, pl. transzgénikus egérből származó, halhatatlanná tett sejttel fuzionált B-sejtet tartalmazó hibridóma termeli.

A „rekombináns humán ellenanyag” megnevezés magában foglal minden, rekombináns úton előállított, expresszált, létrehozott vagy izolált humán ellenanyagot, ilyenek pl. a (a) humán immunglobulin gének tekintetében transzgénikus vagy transzkromoszómális állatból (pl. egérből), vagy a belőle előállított hibridómából izolált ellenanyagok (részletesebben ld. később), (b) az ellenanyag expresszálása céljából transzformált gazdasejtből, pl. transzfektómából izolált ellenanyagok, (c) egy rekombináns, humán kombinatorikus ellenanyag-könyvtárból izolált ellenanyagok, (d) bármely egyéb, humán immunglobulin génszekvenciák más DNS szekvenciákká történő átrendezését („splicing”) magában foglaló módszerrel előállított, expresszált, létrehozott vagy izolált ellenanyagok. Az ilyen rekombináns humán ellenanyagok humán csíravonal-eredetű immunglobulin-szekvenciákból származó variábilis és konstans régiókkal rendelkeznek. A találmány egyes megvalósítási módjaiban azonban ezek a rekombináns humán ellenanyagok in vitro mutagenézisnek (vagy humán Ig szekvenciák tekintetében transzgénikus állat esetében in vivo szomatikus mutagenézisnek) vethetők alá, ennek eredményeként pedig előfordulhat, hogy a rekombináns ellenanyagok VH és VL régióinak aminosav-szekvenciái, annak ellenére, hogy humán csíravonal-eredetű VH és VL szekvenciákból szár-

maznak és azokkal rokonok, természetes körülmények között in vivo nem találhatók meg a humán csíravonal-eredetű ellenanyag repertoárban.

A „heterológ ellenanyag” meghatározást az ilyen ellenanyagot termelő transzgénikus nem-humán szervezetre vonatkozóan alkalmazzuk. Ez a kifejezés olyan ellenanyagra vonat-

5 kozik, amelynek aminosav-szekvenciája, vagy az azt kódoló nukleinsav-szekvencia olyan szervezetből származik, amelynek nem része a transzgénikus nem-humán állat, általában pedig a transzgénikus nem-humán állattól eltérő fajtól származik.

Az „izolált ellenanyag” megnevezés alatt a más antigén-specifitással rendelkező ellen-

10 anyagoktól alapvetően mentes ellenanyagot értünk (pl. az IL-15-höz specifikusan kötődő izolált ellenanyag alapvetően mentes az IL-15-ön kívül más antigénekhez specifikusan kötődő ellenanyagoktól). Az IL-15 egy epitópjához specifikusan kötődő izolált ellenanyag azonban keresztreakciót mutathat más, rokon citokinekkal, vagy más fajokból származó IL-15 protei-

15 nekkal. Az ellenanyag azonban előnyösen mindig kötődik a humán IL-15-höz. Mindemellett egy izolált ellenanyag jellemzően alapvetően mentes egyéb sejtes anyagoktól és/vagy kémiai vegyületektől. A találmány egy megvalósítási módjában eltérő IL-15 specifitású „izolált” monoklonális ellenanyagok kombinációját tartalmazó jól meghatározható összetételű készí-

mény szerepel.

A jelen leírásban „specifikus kötődés” kifejezés alatt egy ellenanyag előre meghatáro-

20 zott antigénhez történő kötődését értjük. Az ellenanyag kötődésének analitiként rekombináns humán IL-15 és ligandumként az ellenanyag alkalmazásával felületi plazmonrezonanciás („surface plasmon resonance” SPR) technológiával BIACORE 3000 berendezésben megáll-

pított disszociációs egyensúlyi állandója (KD) jellemzően alacsonyabb, mint 10^{-7} M, így ala-

csonyabb, mint kb. 10^{-8} M, 10^{-9} M vagy 10^{-10} M, vagy még ennél is alacsonyabb. Az ellen-

25 anyag egy előre meghatározott antigénhez legalább kétszer akkora affinitással kötődik, mint amekkora affinitással az előre meghatározott antigéntől, vagy azzal szoros rokonságban lévő antigéntől eltérő nem-specifikus antigénhez (pl. szarvasmarha-szérumalbuminhoz, vagy kaze-

inhez). Az „egy antigént felismerő ellenanyag” és az „egy antigénre specifikus ellenanyag” kifejezéseket a jelen leírásban az „egy antigénhez specifikusan kötődő ellenanyag” kifejezés-

30 sel azonos értelemben, egymással kicserélhető módon alkalmazzuk.

A „KD” megnevezés egy meghatározott ellenanyag-antigén interakció disszociációs

30 egyensúlyi állandóját jelöli.

Az „izotípus” kifejezés a konstans nehézlánc-régió gének által kódolt ellenanyagosz-

tályt (pl. IgM vagy IgG) jelöli.

Az „izotípus-váltás” kifejezést arra a jelenségre értjük, amikor egy ellenanyag osztálya vagy izotípusa egyik Ig osztályról egy másik Ig osztályra változik.

A „változatlan („nonswitched”) izotípus” megjelölés olyan nehézlánc izotípus osztályra utal, amely előállításakor nem következett be izotípus-váltás. A változatlan izotípust kódoló CH gén jellemző módon a funkcionálisan átrendezett VDJ géntől közvetlenül 3' irányban helyezkedő első CH gén. Az izotípus-váltás klasszikus és nem-klasszikus módon következhet be. A klasszikus izotípus-váltás rekombináns eseményeken keresztül valósul meg, amelyek a transzgén legalább egy váltószekvencia („switch sequence”) régióját érintik. A nem-klasszikus izotípus-váltás létrejöhet pl. humán $\sigma\mu$ és humán $\Sigma\mu$ közötti homológ rekombináció eredményeként (δ -kapcsolt deléció). Az izotípus váltás létrejöhet alternatív, nem-klasszikus átváltó mechanizmusok, többek között pl. intertranszgén és/vagy interkromoszomális rekombináció következtében is.

A „váltószekvencia” kifejezés a váltást eredményező rekombinációért felelős DNS-szekvenciákra utal. A „váltási donor” („switch donor”) szekvencia, jellemzően egy μ váltó régió a váltást eredményező rekombináció során delécióra kerülő szerkezeti régiótól 5' irányban található. A „váltási akceptor” régió a delécióra kerülő szerkezeti régió és a helyettesítő konstans régió (pl. γ , ϵ stb.) között helyeződik. Mivel a rekombináció nem mindig ugyanazon a helyen megy végbe, a végső génszekvencia jellemzően nem vezethető le a szerkezetből.

A „glikozilációs mintázat” alatt proteinhez, közelebbről immunglobulin proteinhez kovalens kötéssel kapcsolódó szénhidrát egységek által kialakított mintázatot értünk. Egy heterológ ellenanyag glikozilációs mintázata alapvetően hasonló lehet a nem-humán transzgénikus állat által termelt ellenanyagokon természetes körülmények között megfigyelhető glikozilációs mintázatokhoz, ahol átlagosan képzett szakember számára a heterológ ellenanyag glikozilációs mintázata jobban hasonlít a nem-humán transzgénikus állatban tapasztalható glikozilációs mintázathoz, mint a transzgén CH-génjeinek forrásául szolgáló faj glikozilációs mintázatához.

Egy adott dologgal kapcsolatban a „természetes körülmények között előforduló” kifejezés arra a tényre utal, hogy az adott dolog előfordul a természetben. Természetes körülmények között előforduló például egy szervezetben (ideértve a vírusokat is) jelen lévő polipeptid vagy polinukleotid-szekvencia, amely természetes forrásból izolálható, és amelyet nem módosítottak szándékosan laboratóriumi körülmények között.

Az „átrendezett” kifejezés nehéz- vagy könnyűlánc immunglobulin lokusz olyan konfigurációjára vonatkozik, ahol alapvetően teljes VH vagy VL domént kódoló konformációban

egy V szegmens közvetlenül egy D-J vagy J-szegmenshez kapcsolódik. Az átrendezett immunoglobulin gén lokusz csíravonal-eredetű DNS-sel történő összehasonlítással azonosítható, az átrendezett lokusz ugyanis legalább egy rekombináns heptamer/nonamer homológ elemet tartalmaz.

- 5 Az egy V szegmenssel kapcsolatban alkalmazott „nem átrendezett” vagy „csíravonal-eredetű konfiguráció” olyan konfigurációt jelöl, amelyben a V szegmens rekombinációja nem eredményezte azt, hogy közvetlenül egy D vagy J szegmens mellett helyeződjön.

A „nukleinsav-molekula” megnevezés DNS- és RNS-molekulákra egyaránt vonatkozik. A nukleinsav-molekula szimpla- vagy dupla szálú lehet, előnyösen dupla szálú DNS.

- 10 Az „izolált nukleinsav-molekula” megnevezésen az IL-15-höz kötődő ellenanyagokat vagy ellenanyag-részleteket (pl. VH-t, VL-t, CDR3-at) kódoló nukleinsavakkal összefüggésben olyan nukleinsav-molekulát értünk, amelyben az ellenanyagot vagy ellenanyag-részletet kódoló nukleotid-szekvenciák mentesek más, a humán genomi DNS-ben a nukleinsavat természetes körülmények között szegélyező, IL-15-től eltérő antigénhez kötődő ellenanyagot
15 vagy ellenanyag-részletet kódoló nukleotid-szekvenciáktól. Az 1-4. azonosítószámú szekvenciák a találmány szerinti 146B7 jelzésű anti-IL-15 ellenanyag nehézlánc variábilis régiójának (VH) és könnyűlánc variábilis régiójának (VL) nukleotid- és aminosav-szekvenciáját tartalmazzák. Közelebről, az 1. és 2. azonosítószámú szekvenciák a 146B7 jelzésű ellenanyag nehézlánc variábilis régiójának (VH), a 3. és 4. azonosítószámú szekvenciák a 146B7 jelzésű
20 ellenanyag könnyűlánc variábilis régiójának (VL) felelnek meg.

- A találmány tárgyát képezik továbbá az 1-4. azonosítószámon megadott szekvenciák „konzervatív szekencia-módosulásai”, vagyis olyan nukleotid- és aminosavszekvencia-módosulások, amelyek nem befolyásolják vagy módosítják lényeges mértékben a nukleotid-szekvencia által kódolt, vagy az aminosav-szekvenciát tartalmazó ellenanyag kötődési tulajdonságait. A konzervatív szekvencia-módosulások közé tartoznak a nukleotid- és aminosav-szubsztitúciók, addíciók, valamint deléciók. Az 1-4. azonosítószámú szekvenciák konzervatív szekvencia-módosulásainak kialakítására szakember számára ismert, standard eljárások, pl. hely-
25 irányított mutagenézis és PCR-alapú mutagenézis vehetők igénybe. Konzervatív aminosav-szubsztitúciónak tekintjük egy aminosav hasonló oldalláncú aminosavval történő helyettesítését. A hasonló oldalláncokkal rendelkező aminosav-családok szakember számára jól ismertek. Ilyenek a bázikus oldalláncokkal rendelkező aminosavak (pl. a lizin, az arginin, a hisztidin), a savas oldalláncokkal rendelkező aminosavak (pl. az aszparaginsav, a glutaminsav), a töltéssel nem rendelkező, poláris oldalláncú aminosavak (pl. a glicin, az aszparagin, a glutamin, a szerin, a treonin, a tirozin, a cisztein, a triptofán), a nem-poláris oldalláncú aminosavak (pl. az
30

alanin, a valin, a leucin, az izoleucin, a prolin, a fenilalanin, a metionin), a béta-elágazódó oldalláncú aminosavak (pl. a treonin, a valin, az izoleucin), valamint az aromás oldalláncú aminosavak (pl. a tirozin, a fenilalanin, a triptofán és a hisztidin). A fentiek értelmében a humán anti-IL-15 ellenanyag egy várhatóan nem-esszenciális aminosava előnyösen a vele azonos oldallánc-családba tartozó másik aminosavra cserélhető.

A találmány egy alternatív megvalósítási módjában az anti-IL-15 ellenanyag kódoló szekvenciájának egészén vagy annak egy részén véletlenszerű mutációk alakíthatók ki pl. szaturációs mutagenezissel, majd az így nyert módosított anti-IL-15 ellenanyagok kötődési aktivitásuk elbírálása érdekében szkrínelhetők.

Mindezek alapján a találmány szerinti (nehéz- és könnyűlánc variábilis régió) nukleotid-szekvenciák által kódolt és/vagy a találmány szerinti (nehéz- és könnyűlánc variábilis régió) aminosav-szekvenciákat (vagyis az 1-4. azonosítószámokon megadott szekvenciákat) tartalmazó ellenanyagok közé tartoznak a konzervatív módosulásokat tartalmazó hasonló szekvenciák által kódolt vagy azokat tartalmazó, alapvetően hasonló ellenanyagok is. Az ilyen, alapvetően hasonló ellenanyagok találmány szerinti, 1-4. azonosítószámokon megadott részleges (nehéz- és könnyűlánc variábilis régió) szekvenciák alapján történő előállításának módját a későbbiekben ismertetjük.

Nukleinsavak esetében az „alapvető homológia” kifejezés arra utal, hogy optimális módon egymás alá rendezett és összehasonlított két nukleinsav vagy azok meghatározott szekvenciái megfelelő nukleinsavak inszerciója vagy delécioja mellett a nukleotidok legalább 80%-ában megegyeznek, jellemzően a nukleotidok legalább kb. 90-95%-ában megegyeznek, még előnyösebben a nukleotidok legalább 98-99,5%-ában megegyeznek. Alapvető homológiáról beszélhetünk alternatív módon akkor is, ha a szegmensek szelektív hibridizációs körülmények között az adott szál komplementerével hibridizálnak.

Aminosav-szekvenciák esetében a „homológia” kifejezés a megfelelő inszerciók vagy delécioik mellett optimális módon egymás alá rendezett és összehasonlított két aminosav-szekvencia közötti azonosság mértékét jelzi.

Két szekvencia százalékos azonossága a szekvenciákban megegyező pozíciók függvénye (százalékos azonosság = azonos pozíciók száma/az összes pozíció száma x 100), figyelembe véve a két szekvencia optimális egymás alá rendezése érdekében kialakított hézagok számát és az egyes hézagok hosszát. A szekvenciák összehasonlítása és százalékos azonosságuk megállapítása matematikai algoritmus segítségével történhet, a számítások menetére az alábbiakban mutatunk be néhány nem korlátozó érvényű példát.

Két nukleotid-szekvencia százalékos azonossága a GCG szoftvercsomag (<http://www.gcg.com>) részét képező GAP programmal állapítható meg, a következő beállítá-
sok alkalmazásával: NWSgapdna.CMP mátrix, hézagsúly: 40, 50, 60, 70, vagy 80; hézag-
hossz-súly: 1, 2, 3, 4, 5, vagy 6. Két nukleotid- vagy aminosav-szekvencia százalékos azonos-
5 sága megállapítható továbbá E. Meyers és W. Miller ALIGN programba (2.0 verziószám)
foglalt algoritmusával [Meyers és Miller: CABIOS 4, 11 (1989)], a következő beállítások al-
kalmazásával: PAM120 súlymaradék tábla, hézaghossz büntetőpont: 12, hézag büntetőpont:
4. Mindezek mellett két aminosav-szekvencia százalékos azonossága megállapítható továbbá
Needleman és Wunsch a GCG szoftvercsomag (<http://www.gcg.com>) részét képező GAP
10 programba foglalt algoritmusával [Needleman és Wunsch: J. Mol. Biol. 48, 444 (1970)], a
következő beállítások alkalmazásával: Blossum 62 mátrix vagy PAM250 mátrix, hézagsúly:
16, 14, 12, 10, 8, 6, vagy 4; hézaghossz-súly: 1, 2, 3, 4, 5, vagy 6.

A találmány szerinti nukleinsav- és protein-szekvenciák felhasználhatók ún. „lekérde-
ző szekvencia”-ként is köz számára hozzáférhető adatbázisok lekérdezésére pl. rokon szek-
15 venciák azonosítása érdekében. Ilyen keresések folytathatók pl. Altschul és mtsai. (2.0 verzió-
számú) NBLAST és XBLAST programjaival [Altschul és mtsai.: J. Mol. Biol. 215, 403
(1990)]. A találmány szerinti nukleotid-molekulákkal homológ nukleotid-szekvenciák azono-
sítására BLAST nukleotid-keresés végezhető a NBLAST programmal (pontszám = 100, szó-
hossz = 12). A találmány szerinti protein-molekulákkal homológ aminosav-szekvenciák azo-
20 nosítására BLAST proteinkeresés végezhető az XBLAST programmal (pontszám = 50, szó-
hossz = 3). Összehasonlítási célból hézagos („gapped”) egymás alá rendelés valósítható meg a
„Gapped BLAST” programmal [Altschul és mtsai.: Nucleic Acids Res. 25, 3389 (1997)]. A
BLAST és Gapped BLAST programok alkalmazásakor az adott program (pl. XBLAST vagy
NBLAST) alapbeállításai használhatók (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

25 A nukleinsavak teljes sejtben, sejtliázumban, részlegesen tisztított vagy alapvetően
tisztá alakban fordulhatnak elő. Egy adott nukleinsav „izolált” vagy „alapvetően tisztított”, ha
standard eljárásokkal, pl. lúg/SDS kezeléssel, CsCl rétegezéssel, oszlop-kromatográfiával,
agarózgél-elektroforézissel vagy további, szakember számára jól ismert technikákkal meg lett
tisztítva más sejtösszetevőktől vagy egyéb szennyező anyagoktól, pl. más sejtbeli nukleinsa-
30 vaktól vagy proteinektől [ld. Current Protocols in Molecular Biology, szerk.: Ausubel és
mtsai., kiad.: Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)].

Bár a találmány szerinti nukleinsav-készítmények (módosított restrikcióshelyek stb.
kivételével) cDNS-ből, genomi DNS-ből vagy mindezek keverékéből származó natív szek-
venciának felelnek meg, génszekvenciák kinyerésére használt standard eljárások segítségével

mutációk is kialakíthatók bennük. A kódoló szekvenciák esetében ezek a mutációk szükség szerint az aminosav-szekvenciát is érinthetik. A természetes V, D, J, konstans, váltó- és egyéb szekvenciákból származó vagy azokkal alapvetően homológ DNS-szekvenciák is a találmány tárgyát képezik (a „származó” kifejezés itt arra utal, hogy egy szekvencia egy másik szekvenciával azonos vagy annak módosításával jött létre).

Egy nukleinsav „működőképesen kapcsolt” állapotban van, ha funkcionális kapcsolatban áll egy másik nukleinsav-szekvenciával. Például egy promoter vagy enhenszer egy kódoló szekvenciához működőképesen kapcsolt állapotban van, ha befolyásolja a szekvencia transzkripcióját. A transzkripciót szabályozó szekvenciák tekintetében a működőképesen kapcsolt kifejezés arra utal, hogy az összekapcsolt DNS-szekvenciák folytonosak, és ha két protein kódoló régió összekapcsolására van szükség, ezen felül azonos leolvasási keretben is vannak. A váltószekvenciák („switch sequences”) esetében a működőképesen kapcsolt állapot arra utal, hogy a szekvenciák alkalmasak váltó rekombináció kialakítására.

Jelen leírásban „vektor” alatt egy hozzákapcsolt másik nukleinsav szállítására alkalmas nukleinsav-molekulát értünk. A vektorok egyik típusa, a „plazmid” kör alakú dupla szálú DNS hurkot jelöl, amelybe további DNS-szegmensek köthetők. További vektortípus a vírusvektor, amely esetében a vírusgenomba köthetők további DNS-szegmensek. Bizonyos vektorok a gazdasejtben önálló replikációra képesek (pl. bakteriális replikációs kezdőhellyel rendelkező bakteriális vektorok, episzomális emlőseredetű vektorok). Más vektorok (pl. a nem episzomális emlőseredetű vektorok) a gazdasejtbe juttatásukat követően annak genomjába integrálódnak, így azzal együtt képesek replikálódni. Mindemellett bizonyos vektorok képesek szabályozni a velük működőképesen kapcsolt gének expresszióját. Ezeket a vektorokat „rekombináns expressziósvektoroknak” (vagy egyszerűen „expressziósvektoroknak”) nevezzük. A rekombináns DNS technológiában alkalmazható expressziósvektorok gyakran plazmid alakban fordulnak elő. Mivel a plazmid a vektor leggyakoribb formája, így jelen leírásban is a „plazmid” és „vektor” megnevezéseket egymással azonos értelemben alkalmazzuk. A találmány tárgyát képezik azonban azonos funkciót betöltő más típusú expressziósvektorok is, ilyenek pl. a vírusvektorok (pl. replikációképtelen retrovírusok, adenovírusok, és adeno-asszociált vírusok).

A „rekombináns gazdasejt” (vagy egyszerűen „gazdasejt”) alatt olyan sejtet értünk, amelybe rekombináns expressziósvektort juttattak. Fontos megjegyeznünk, hogy ez a megnevezés nem csupán a kérdéses sejtre vonatkozik, hanem annak utódaira is. Mivel az egymást követő sejtgenerációkban mutációk vagy környezeti hatások miatt bizonyos módosulások

állhatnak elő, az említett utódsejtek nem feltétlenül azonosak az eredeti sejttel, de ettől függetlenül a leírásban a „gazdasejt” megnevezés vonatkozik rájuk.

A „páciens” kifejezés alatt bármely humán vagy nem-humán állatot érthetünk. Például a találmány szerinti eljárásokat és készítményeket gyulladásos megbetegedésben, pl. arthritisben, így pl. rheumatoid arthritisben szenvedő páciens gyógykezelésére vehetjük igénybe. A „nem-humán állat” kifejezés alatt az összes gerincest, emlősöket és nem emlősöket értjük, így ide tartoznak az emberszabású majmok, a juh, a kutya, a szarvasmarha, a tyúk, a kételtűek, a hüllők stb.

A találmány szerinti megoldás további szempontjait az alábbi alfejezetek tartalmazzák.

I. IL-15 elleni humán ellenanyagok előállítása

A találmány szerinti humán monoklonális ellenanyagok előállítására számos ismert technika igénybe vehető, ilyen pl. a Kohler és Milstein által leírt standard szomatikus sejt hibridizációs eljárás [Kohler és Milstein: Nature 256, 495 (1975)]. A találmány szerinti megoldás szempontjából ugyan előnyös a szomatikus sejt hibridizációs eljárás alkalmazása, de erre a célra elvben a monoklonális ellenanyagok előállítására alkalmazott egyéb eljárások is igénybe vehetők, ilyenek pl. a B-limfociták vírussal vagy onkogénnel történő transzformációja, vagy a humán ellenanyag géneket alkalmazó fág diszpléj technika.

A találmány szerinti humán monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómák előállítására előnyösen egereket alkalmazó rendszerben kerül sor. A hibridómák egerekben történő előállítása, beleértve az immunizációs protokollokat és az immunizált állat lépsejtjeinek izolálására és fuzionáltatására alkalmas eljárásokat, szakember számára jól ismert feladat.

A találmány egy megvalósítási módjában az IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagok előállítására az egérre jellemző immunrendszer helyett a humán immunrendszer bizonyos részleteit hordozó transzgenikus vagy transzkromoszomális egerek alkalmazásával kerül sor. A találmány egy megvalósítási módjában „HuMAb egerek” alkalmazására kerül sor, amelyek „nem átrendezett” humán (μ és γ) nehézlánc, valamint κ könnyűlánc immunglobulin szekvenciákat kódoló humán immunglobulin gén minilokuszokat, valamint az endogén μ és κ lánc lokuszokat inaktiváló célzott mutációkat hordoznak [Lonberg, N. és mtsai.: Nature 368, 856 (1994)]. Ennek köszönhetően ezekben az egerekben az egér IgM vagy κ csökkent expressziója tapasztalható, az immunizációra adott válaszként pedig a bejuttatott humán nehéz- és könnyűlánc transzgenek osztályváltása („class switching”) és szomatikus mutációja eredményeként nagyaffinitású humán IgG monoklonális ellenanyagokat állítanak elő [Lonberg, N. és mtsai.: (1994) ld. fentebb; Lonberg, N.: Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49

(1994); Lonberg, N. és Huszár, D.: Intern. Rev. Immunol. 13, 65 (1995); Harding, F. és Lonberg, N.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 764, 536 (1995)]. A HuMAb egerek létrehozásának módját a II. fejezetben részletesen ismertetjük, továbbá megtalálható a következő szakirodalmi forrásokban: Taylor, L. és mtsai.: Nucleic Acids Research 20, 6287 (1992); Chen, J. és mtsai.: International Immunology 5, 647 (1993); Tuaillon és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3720 (1993); Choi és mtsai.: Nature Genetics 4, 117 (1993); Chen, J. és mtsai.: EMBO J. 12, 821 (1993); Tuaillon és mtsai.: J. Immunol. 152, 2912 (1994); Lonberg és mtsai.: Nature 368, 856 (1994); Lonberg, N.: Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 (1994); Taylor, L. és mtsai.: International Immunology 6, 579 (1994); Lonberg, N. és Huszár, D.: Intern. Rev. Immunol. 13, 65 (1995); Harding, F. és Lonberg, N.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 764, 536 (1995); Fishwild, D. és mtsai.: Nature Biotechnology 14, 845 (1996)]. Lásd továbbá Lonberg és Kay, valamint a GenPharm International 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5789650, 5877397, 5661016, 5814318, 5874299 és 5770429 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratait, Surani és mtsai. 5545807 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratát, valamint a június 11-én publikált WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi iratot, a november 10-én publikált WO 94/25585 számú nemzetközi közzétételi iratot, a június 24-én publikált WO 93/1227 számú nemzetközi közzétételi iratot, a december 23-án publikált WO 92/22645 számú nemzetközi közzétételi iratot, valamint a március 19-én publikált WO 92/03918 számú nemzetközi közzétételi iratot.

20 A HCO12 transzgénikus HuMAb egér létrehozásának módját a 2. példában ismertetjük.

Immunizálások

Az IL-15 elleni, teljes mértékben humán monoklonális ellenanyagok előállítása érdekében humán immunglobulin géneket hordozó transzgénikus vagy transzkromoszomális egerek (pl. HCo12, HCo7 vagy KM egerek) tisztított vagy dúsított IL-15 antigént és/vagy IL-15-öt expresszáló sejteket tartalmazó készítménnyel immunizálhatók [ld. pl. Lonberg és mtsai.: Nature 368, 856 (1994); Fishwild és mtsai.: Nature Biotechnology 14, 845 (1996); WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat]. Alternatív módon az egerek immunizálására humán IL-15-öt kódoló DNS is igénybe vehető. Az első kezeléskor az egerek előnyösen 6-16 hetes életkorúak. A fentieknek megfelelően a HuMAb egerek például (5-50 µg) tisztított vagy dúsított IL-15 antigén-készítménnyel intraperitoneálisan immunizálhatók. Abban az esetben, ha a tisztított vagy dúsított IL-15 antigén-készítménnyel történt immunizálások nem eredményezték ellenanyagok képződését, az egerek az immunválasz fokozása érdekében IL-15-öt expresszáló sejtekkel, pl. sejtvonallal is immunizálhatók.

Különféle antigénnek alkalmazásával nyert tapasztalatok alapján a HuMAb egerek akkor mutatják a legerősebb immunválaszt, ha először Freund-féle komplett adjuvánsban lévő antigénnel intraperitoneálisan (ip.) vagy szubkután (sc.) immunizálják őket, majd minden második héten (összesen legfeljebb 10 alkalommal) Freund-féle inkomplett adjuvánsban lévő antigénnel kapnak ip./sc. kezelést. Az immunizálási protokoll során az immunválasz a retroorbitális vénás öbölből nyert szérumminták vizsgálatával ellenőrizhető. A szérumminták ELISA vizsgálata (ld. később) alapján megfelelő anti-IL-15 humán immunglobulin titerrel rendelkező egerek használhatók fel a fúzióra. Kiirtásuk és lépük eltávolítása előtt három nappal az egerek immunválasza intravénásan adott antigénnel fokozható.

IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómák előállítása

Az IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómák előállítása érdekében az immunizált egerekből származó lép- és nyirokcsomó-eredetű sejteket megfelelő halhatatlanná tett sejtvonal, pl. egér myeloma sejtvonal sejtjeihez fuzionáltatjuk. Az így nyert hibridómák ezután antigén-specifikus ellenanyagok termelése szempontjából szkrínelhetők. Így például immunizált egerekből származó léperedetű limfociták különálló sejteket tartalmazó szuszpenziója 50% (tömeg%) PEG alkalmazásával SP2/0-Ag8.653 jelű (ATCC, CRL 1580) nem-szekretáló egér myeloma sejtekkel fuzionálható. A sejteket kb. 1×10^5 mennyiségben lapos aljú mikrotitertálca üregeibe juttatjuk, majd a megszokott összetevők mellett 10% magzati „Clone Serum”-ot, 10% „origen” hibridóma klónozó faktort (IGEN) és 1X HAT-ot (Sigma) tartalmazó szelektív tápközegben két hétig inkubáljuk. Megközelítőleg két hét elteltével a sejtek a HAT helyett HT-t tartalmazó tápközegben tenyésztethetők tovább. Ezután az egyes üregekben lévő sejtek humán anti-IL-15 monoklonális IgM és IgG ellenanyagok termelése szempontjából ELISA-val szkrínelhetők. A kifejezett hibridóma-növekedést követően a tápközeg vizsgálatára általában 10-14 nap után kerülhet sor. Ha az ellenanyagot termelő hibridómák átoltása után ismételt szkrínelésük humán IgG tekintetében továbbra is pozitív eredményű, az anti-IL-15 monoklonális ellenanyagok korlátozó hígítással legalább kétszer szubklónoozhatók. A stabil szubklónok in vitro tenyésztésével a szövettenyésztő tápközegben a jellemzéshez elegendő mennyiségű ellenanyag nyerhető.

IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagokat termelő transzfektómák előállítása

Amint az szakember számára jól ismert, a találmány szerinti humán ellenanyagok például rekombináns DNS-technológia és gén-transzfekciós eljárások kombinációjával gazdasajt-transzfektómában is előállíthatók [Morrison, S.: Science 229, 1202 (1985)].

Például a találmány egy megvalósítási módjában a kérdéses gének, pl. humán ellenanyag gének expressziósvektorba, pl. a GS génextpressziós rendszer által alkalmazott eukarióta

expressziós plazmidba (WO 87/04462 számú nemzetközi közzétételi irat; WO 89/01036 számú nemzetközi közzétételi irat, EP 338 841 számú európai szabadalmi bejelentés) köthető, erre a célra szakember számára jól ismert egyéb expressziósrendszer is igénybe vehető. A klónozott ellenanyaggéneket tartalmazó tisztított plazmid eukarióta gazdasejtekbe, pl. CHO-
5 vagy NSO-sejtekbe, esetleg alternatív módon egyéb eukarióta sejtekbe, például növényi eredetű sejtekbe, gomba- vagy élesztőgomba-sejtekbe juttatható. Erre a célra szakember számára ismert eljárások, pl. elektroporáció, lipofektin, lipofektamin stb. alkalmazhatók. Az ellenanyagének gazdasejtbe juttatását követően kerülhet sor az ellenanyagot expresszáló sejtek azonosítására és kiválasztására. Az itt azonosított sejtek a transzfektómák, amelyek expresszió-
10 ójának fokozásával végső soron megvalósítható a nagy mennyiségű ellenanyag-termelés. E sejtek tenyésztőközegének felülúszójából vagy magukból a sejtekből izolálhatók és tisztíthatók a rekombináns ellenanyagok.

Az előzőekben említett klónozott ellenanyagének más expressziós-rendszerekben, pl. E. coli-ban, vagy teljes szervezetekben, esetleg szintetikus úton expresszálhatók.

15 *Részleges ellenanyag-szekvenciák alkalmazása teljes ellenanyagok expressziójára*

Az ellenanyagok elsősorban a nehéz- és könnyűláncok hat komplementaritást meghatározó régiójában (CDR-jében) elhelyezkedő aminosavakon keresztül lépnek kölcsönhatásba a célantigénnel. Ennélfogva az egyes ellenanyagok CDR-eken belüli aminosav-szekvenciái nagyobb eltéréseket mutatnak, mint a CDR-eken kívüli szekvenciák. Az ellenanyag-antigén
20 kölcsönhatások java részéért CDR-szekvenciák felelősek, így lehetőség nyílik természetes körülmények között előforduló specifikus ellenanyagok jellemzőit utánzó rekombináns ellenanyagok expresszálására olyan expressziósvektorok kialakításával, amelyek a természetes körülmények között előforduló specifikus ellenanyag CDR-szekvenciáit eltérő tulajdonságokkal rendelkező másik ellenanyagból származó vázszekvenciára ültetve tartalmazzák [Riechmann, L. és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); Jones, P. és mtsai.: Nature 321, 522 (1986);
25 Queen, C. és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989)]. A fentieknek megfelelő vázszekvenciák köz számára hozzáférhető, csíravonal-eredetű ellenanyaggén-szekvenciákat tartalmazó DNS-adatbázisokból szerezhetők be. Ezek a csíravonal-eredetű szekvenciák különböznek az érett ellenanyaggén-szekvenciáktól, mivel nem tartalmazzák a B-sejtek érése során
30 V(D)J kapcsolódással létrejövő, teljes mértékben összeállított variábilis géneket. A csíravonal-eredetű génszekvenciák különböznek továbbá a nagyaffinitású másodlagos repertoár ellenanyagok szekvenciájától is, bizonyos egyedi, a variábilis régióban egyenletesen eloszló helyeken. Például szomatikus mutációk meglehetősen ritkán fordulnak elő a 1. váz-régió aminosav-terminálisánál és a 4. váz-régió karboxi-terminálisánál. Mindemellett sok szomatikus mutáció

nem változtatja meg lényeges mértékben az ellenanyag kötődési tulajdonságait. Ennek köszönhetően az egy eredeti ellenanyagéhoz hasonló kötődési tulajdonságokkal rendelkező intakt rekombináns ellenanyag előállításához nincs szükség az ellenanyag teljes DNS-szekvenciájára (PCT/US99/05535 számú amerikai egyesült államokbeli közzétételi irat, 1999. március 12.). Erre a célra jellemzően elég csupán a CDR-régiókat áthidaló részleges nehéz- és könnyűlánc szekvencia ismerete. E részleges szekvencia ismeretében meghatározható, hogy mely csíravonal-eredetű variábilis és kapcsoló génszegmentek járultak hozzá a rekombináns ellenanyag variábilis génjeihez. A variábilis régió hiányzó részei a csíravonal-eredetű szekvencia segítségével tölthetők ki. A protein érése során a nehéz- és könnyűlánc vezetőszekvenciák lehasítódnak, így nem járulnak hozzá a végleges ellenanyag tulajdonságainak kialakításához. A hiányzó szekvenciák hozzáadása érdekében klónozott cDNS-szekvenciák ligációval vagy PCR-amplifikációval szintetikus oligonukleotidokkal kombinálhatók. Alternatív módon a teljes variábilis régió szintetizálható rövid, átfedő oligonukleotidok sorozataként, amelyekből azután PCR-amplifikációval teljes egészében szintetikus variábilis régió-klón hozható létre. Ennek az eljárásnak vannak bizonyos előnyei, így pl. lehetővé teszi meghatározott resztrikciós helyek eltávolítását vagy kialakítását, vagy bizonyos kodonok optimalizálását.

Hibridómából származó nehéz- és könnyűlánc transzkriptumok nukleotid-szekvenciáiból szintetikus oligonukleotidok átfedő sorozata készíthető, amelyek segítségével a természetes szekvenciák aminosav-kódoló kapacitásával megegyező szintetikus V-szekvenciák állíthatók elő. A szintetikus nehéz- és könnyűlánc-szekvenciák háromféle módon is eltérhetnek a természetes szekvenciáktól: az oligonukleotid-szintézis és a PCR-amplifikáció elősegítése érdekében megszakított ismétlődő nukleotid-sorozatokat; a Kozak-féle szabályoknak megfelelően kialakított optimális transzlációs kezdőhelyeket [Kozak: J. Biol. Chem. 266, (1991)]; és a transzlációs kezdőhelyektől 5' irányban kialakított HindIII helyeket tartalmazhatnak.

Mind a nehéz-, mind a könnyűlánc variábilis régiók kialakításához az optimalizált kódoló-, és a nekik megfelelő nem kódoló szál szekvenciákat 30-50 nukleotid nagyságú szakaszokra bontjuk, mely szakaszok a megfelelő nem-kódoló oligonukleotidnak közelítőleg a középpontjával szemben illeszkednek egymáshoz. Így mindegyik lánc esetében az oligonukleotidok egymást átfedő, dupla szálú sorozatokká alakíthatók, amelyek 150-400 nukleotidból álló szegmenseket fognak át. Az oligonukleotid-keveréket azután 150-400 nukleotid nagyságú PCR-amplifikációs termékek előállításához templatként alkalmazzuk. Egy adott variábilis régió oligonukleotid szett jellemzően két keverékre bontható szét, amelyek elkülönített amplifikálásával két, egymást átfedő PCR-terméket kapunk. Ezekből az átfedő termékekből azután PCR-amplifikációval alakítjuk ki a teljes variábilis régiót. Kívánt esetben a könnyen az

expressziósvektor-szerkezetekbe klónozzható fragmensek előállítása érdekében a nehéz- vagy könnyűlánc konstans régió (a kappa könnyűlánc BbsI helyét vagy a gamma nehézlánc AgeI helyét tartalmazó) átfedő fragmense is felhasználható a PCR-amplifikációban. Az expressziósvektor-szerkezetek kialakítása érdekében az újjáalakított nehéz- és könnyűlánc variábilis régiók klónozott promoterral, vezetőszekvenciával, transzlációs kezdőhellyel, vezetőszekvenciával, konstans régióval, 3' nem-transzlált szekvenciával, poliadenilációs szekvenciával, transzkripció terminátor szekvenciával kombinálhatók. A nehéz- és könnyűlánc expressziós szerkezetek egyazon vektorban kombinálhatók, majd velük egyszerre, egymást követően vagy egymástól elkülönülve gazdasejtek transzfektálhatók, amelyek fuzionálásával mindkét láncot expresszáló gazdasejt hozható létre.

A humán IgG κ előállítására szolgáló expressziósvektorok kialakításához alkalmazható plazmidokat a későbbiekben ismertetjük (ld. 1. példa). A plazmidokat úgy alakítottuk ki, hogy a PCR-amplifikált variábilis nehéz- és variábilis kappa könnyűlánc cDNS-szekvenciák alkalmasak legyenek teljes méretű nehéz- és könnyűlánc minigének rekonstrukciójára. Ezen plazmidok segítségével teljes mértékben humán IgG1 κ vagy IgG4 κ ellenanyagok expresszálhatók. A találmány szerinti teljes mértékben humán vagy kiméra ellenanyagok közé tartoznak továbbá az IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM és IgD ellenanyagok. További nehézlánc izotípusok, vagy lambda könnyűláncokat tartalmazó ellenanyagok expressziójához hasonló plazmidok szerkeszthetők.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti, 146B7, 147H5, 404A8 és 404E4 jelzésű humán anti-IL-15 ellenanyagok szerkezeti jellemzőit felhasználva a találmány szerinti ellenanyagok legalább egy funkcionális tulajdonságát, pl. IL-15-höz történő kötődésének képességét megőrző, szerkezetileg rokon humán anti-IL-15 ellenanyagok előállítására kerül sor. Közelebbről, a 146B7, 147H5, 404A8 vagy 404E4 jelzésű ellenanyagok egy vagy több CDR régiójának ismert humán váz-régiókkal és CDR-ekkel végzett rekombinálásával további, rekombináns úton előállított, találmány szerinti humán anti-IL-15 ellenanyagok hozhatók létre.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyát anti-IL-15 ellenanyag előállítására szolgáló eljárás képezi, amely ellenanyag (1) humán nehézlánc váz régiókat és humán nehézlánc CDR-eket tartalmaz, ahol legalább a humán nehézlánc CDR-ek egyike magában foglal a 2. ábrán látható CDR-ek aminosav-szekvenciái (vagy a 2. azonosító számon megadott megfelelő aminosav-szekvenciák közül) egyet, valamint (2) humán könnyűlánc váz régiókat és humán könnyűlánc CDR-eket tartalmaz, ahol legalább a humán nehézlánc CDR-ek egyike magában foglal a 3. ábrán látható CDR-ek aminosav-szekvenciái (vagy a

4. azonosítószámon megadott megfelelő aminosav-szekvenciák közül) egyet; és amely ellenanyag megőrzi az IL-15-höz történő kötődés képességét.

Az ellenanyag IL-15-höz történő kötődésének képessége pl. a példákban bemutatott standard kötődési eljárásokkal (pl. ELISA-val) állapítható meg.

5 Mivel szakember számára jól ismert, hogy az ellenanyagok nehéz- és könnyűlánc CDR3 doménjai különösen fontos szerepet játszanak egy ellenanyag antigénnel szembeni kötődési specifitásban / affinitásban, a fentiekben leírtak szerint előállított találmány szerinti rekombináns ellenanyagok előnyösen a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a 404E4 jelű ellenanyagok nehéz- és könnyűlánc CDR3-jait tartalmazzák. Az ellenanyagok tartalmazhatják
10 továbbá a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a 404E4 jelű ellenanyagok CDR2-jeit. Az ellenanyagok tartalmazhatják továbbá a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a 404E4 jelű ellenanyagok CDR1-jeit. Az ellenanyagok emellett a CDR-ek bármely kombinációját tartalmazhatják.

A fentieknek megfelelően, a találmány egy további megvalósítási módjában a találmány tárgyat anti-IL-15 ellenanyagok képezik, amelyek (1) humán nehézlánc váz régiókat,
15 humán nehézlánc CDR1 régiót, humán nehézlánc CDR2 régiót és humán nehézlánc CDR3 régiót tartalmaznak, ahol a humán nehézlánc CDR3 régió a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a 404E4 jelű ellenanyagok CDR3 régióinak egyike, pl. a 146B7 2. ábrán bemutatott humán nehézlánc CDR régiója (vagy a 2. azonosítószámon megadott megfelelő aminosav-szekvencia); továbbá humán könnyűlánc váz régiókat, humán könnyűlánc CDR1 régiót, humán
20 könnyűlánc CDR2 régiót és humán könnyűlánc CDR3 régiót tartalmaznak, ahol a humán könnyűlánc CDR3 régió a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a 404E4 jelű ellenanyagok CDR3 régióinak egyike, pl. a 146B7 3. ábrán bemutatott humán könnyűlánc CDR régiója (vagy a 4. azonosítószámon megadott megfelelő aminosav-szekvencia); valamint amelyek IL-15-höz kötődnek. Az ellenanyagok tartalmazhatják továbbá a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a
25 404E4 jelű ellenanyagok nehézlánc CDR2-jét és/vagy könnyűlánc CDR2-jét. Az ellenanyagok tartalmazhatják továbbá a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a 404E4 jelű ellenanyagok nehézlánc CDR1-ét és/vagy könnyűlánc CDR1-ét.

A fentiekben bemutatott, géntechnológiai úton előállított ellenanyagok CDR1, 2 és/vagy 3 régiói tartalmazhatják a találmány szerinti 146B7, 147H5, 404A8 vagy 404E4 jelű
30 ellenanyagok pontos aminosav szekvenciáit. Ugyanakkor átlagosan képzett szakember számára is egyértelmű, hogy a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a 404E4 jelű ellenanyagok pontos CDR-szekvenciáitól történő bizonyos eltérés (pl. konzervatív szekvencia-módosulás) nem szükségszerűen jelenti az ellenanyag IL-15 kötődési képességének elvesztését. Ennek megfelelően a találmány egy megvalósítási módjában a géntechnikai úton előállított ellenanyag egy

vagy több olyan CDR-t tartalmazhat, amelyek pl. 90%-ban, 95%-ban, 98%-ban vagy 99,5%-ban megegyeznek a 146B7, a 147H5, a 404A8 vagy a 404E4 jelű ellenanyagok egy vagy több CDR-jével.

Az IL-15-höz történő kötődésen túl a fentiekben bemutatott, géntechnológiai úton előállított ellenanyagok a találmány szerinti ellenanyagokra jellemző egyéb funkcionális tulajdonságok megtartása szempontjából is szelektálhatók, ilyenek pl. a következők:

(1) a humán IL-15-höz történő kötődés és az IL-15 kiváltotta gyulladások gátlása;

(2) az IL-15 előidézte TNF α termelés vagy T-sejt proliferáció gátlása;

(3) a humán IL-15-höz történő kötődés analitiként rekombináns humán IL-15 és ligandumként az ellenanyag alkalmazásával, felületi plazmonrezonanciás (SPR) technológiával BIACORE 3000 berendezésben megállapított disszociációs egyensúlyi állandója (KD) alacsonyabb, mint 10⁻⁷ M;

(4) a humán IL-15 β - és/vagy γ -lánc kölcsönhatásban álló doménján lévő epitóphoz történő kötődés;

(5) a humán IL-15 asp8 aminosava és a humán IL-15 receptor β -egysége közötti kötődés akadályozása és/vagy a humán IL-15 gln108 aminosava és a humán IL-15 receptor γ -egysége közötti kötődés akadályozása;

(6) receptorhoz kötött humán IL-15-höz történő kötődés;

(7) humán IL-15-höz történő kötődés és a humán IL-15 parakeratózist előidéző képességének gátlása;

(8) humán IL-15-höz történő kötődés és a humán IL-15 epidermis megvastagodást előidéző képességének gátlása;

(9) humán IL-15-höz történő kötődés és a humán IL-15 keratinocita-proliferációt előidéző képességének gátlása; és/vagy

(10) humán IL-15-höz történő kötődés és a humán IL-15 aktivált leukocitákra ható kemotaxist kiváltó képességének gátlása;

IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagok jellemzése

A találmány szerinti ellenanyagok IL-15-höz történő kötődésének jellemzésére számos közismert eljárás igénybe vehető. Az ellenanyagok kezdeti jellemzése általában ELISA-val történik. Röviden összefoglalva, mikrotiter tálcák mélyedéseit PBS-ben lévő tisztított IL-15-tel vonjuk be, majd irreleváns proteinekkal, pl. PBS-ben lévő szarvasmarha-szérumalbuminnal blokkoljuk. A tálca üregeibe IL-15-tel immunizált egerből nyert szérumminták hígítási

sorozatát juttatjuk, majd a tálcát 37°C-on 1-2 órán át inkubáljuk. A tálcákat PBS/Tween 20 keverékével mossuk, majd alkalikus foszfáttal konjugált kecske-anti-humán IgG Fc-specifikus poliklonális reagenssel 37°C-on 1 órán keresztül inkubáljuk. Mosást követően az üregekhez ABTS szubsztrátot adunk, majd a tálcát 405 nm-es hullámhosszon leolvasva megállapítjuk a reakció OD-értékét. A fúzióra előnyösen a legmagasabb titerértékeket mutató egereket választjuk ki.

A fentiekben leírtak szerint működő ELISA alkalmas ellenanyagok szkrínelésére, így az IL-15 immunogénnel pozitív reakciót adó ellenanyagokat termelő hibridómák azonosítására is felhasználható. Az IL-15-höz előnyösen nagy affinitással kötődő hibridómák ezután szubklónoozhatók és részletesebben jellemezhetők. Mindegyik hibridómából egy kiválasztott klón, amely az ELISA-vizsgálat eredménye alapján megtartotta a szülősejtek reaktivitását sejtbankban deponálható és ellenanyag-tisztításra használható.

A humán anti-IL-15 ellenanyagok tisztítása érdekében a kiválasztott hibridómák forgópalackokban, kétliteres „spinner flasks” vagy egyéb tenyésztőrendszerben tenyésztethetők. A protein tisztításához a tenyészetek felülúszóját először megszűrjük, majd koncentrálnak, végül affinitás-kromatográfiás vizsgálatban protein-A szefaróz oszlopra (Pharmacia, Piscataway, NJ) visszük. A pufferoldat PBS-re cserélése után a koncentráció 1,43 extinkciós koefficiens mellett az OD280 érték alapján, vagy előnyösen nefelometriás vizsgálattal állapítható meg. Az IgG ellenőrzésére gélelektroforézis és antigén-specifikus eljárás vehető igénybe.

Annak megállapítására, hogy a kiválasztott humán anti-IL-15 monoklonális ellenanyagok egyedi epitópokhoz kötődnek vagy sem, mindegyik ellenanyagot először kereskedelmi forgalomban beszerezhető reagensek (Pierce, Rockford, IL) segítségével biotinizáljuk. A biotinizált monoklonális ellenanyagok kötődése streptavidinnel jelzett próbával mutatható ki. A tisztított ellenanyagok izotípusának meghatározására szakember számára ismert izotípus-specifikus ELISA vizsgálatok vehetők igénybe. Így például mikrotiter tálcák üregeit 10 µg/mL anti-humán Ig-vel 4°C-on egy éjszakán át inkubáljuk. A tálcák 5%-os szarvasmarha-szérum-albuminnal történt blokkolását követően 10 µg/mL tisztított izotípus kontroll monoklonális ellenanyaggal szobahőmérsékleten két órán át reagáltatjuk őket. Az üregekbe ezután vagy humán IgG1-et vagy egyéb humán izotípus-specifikus konjugált próbát juttatunk. A reakció előhívása és értékelése a fentiekben leírtak szerint történik.

A monoklonális ellenanyagok IL-15-öt expresszáló élő sejtekhez történő kötődését áramlás-citometriai vizsgálattal mutathatjuk ki. Röviden összefoglalva, membránhoz kötött IL-15-öt expresszáló, standard körülmények között tenyésztett sejt vonalak sejtjeit és/vagy humán PBMC-ket 0,1% BSA-t és 0,01% NaN₃-et tartalmazó PBS-ben lévő különböző

koncentrációjú monoklonális ellenanyagokkal keverjük össze, majd 4°C-on egy órán át inkubáljuk. Mosást követően a sejteket a primer ellenanyaggal történt jelzés körülményeivel megegyező feltételek mellett fluoreszcenciával jelzett anti-humán IgG ellenanyaggal reagáltatjuk. A mintákat ezután „FACScan” berendezéssel, egyedi sejtek azonosítását lehetővé tevő fény és oldalszórás beállításokkal vizsgáljuk és kimutatjuk a jelzett ellenanyagok kötődését. Alternatív módon az áramlás-citometriai vizsgálati eljárás mellett vagy helyett a fenti vizsgálatra fluoreszcens mikroszkópiát alkalmazó eljárás is igénybe vehető. Ennek során a sejtek jelzése a fentiekkel teljesen megegyező módon történik, majd azokat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáljuk. Ez az eljárás lehetővé teszi különálló sejtek megtekintését, de az antigénsűrűség függvényében érzékenysége alacsony mértékű lehet.

Az anti-IL-15 humán IgG-k az IL-15 antigénnel szemben mutatott reaktivitásuk szempontjából western-blot eljárással is vizsgálhatók. A vizsgálat lényegét röviden összefoglalva, IL-15-öt expresszáló sejtek kivonatával nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézist (SDS-PAGE) végzünk. Az elektroforézist követően a szétválasztott antigéneket nitrocellulóz membránokra visszük, a membránokat 20% egérszérummal blokkoljuk, majd a vizsgálandó monoklonális ellenanyagokkal próbázzuk. A humán IgG kötődése alkalikus foszfatázal jelölt anti-humán IgG, majd BCIP/NBT szubsztrát tabletták (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) hozzáadásával mutatható ki.

II. Humán monoklonális anti-IL-15 ellenanyagokat termelő transzgénikus és transzkromoszomális nem-humán állatok előállítása

Egy további szempontból a találmány tárgyát IL-15-höz specifikusan kötődő humán monoklonális ellenanyagokat expresszáló transzgénikus vagy transzkromoszomális nem-humán állatok, pl. transzgénikus vagy transzkromoszomális egerek képezik. A találmány egy megvalósítási módjában a találmány tárgyát a genomjában egy humán nehézlánc transzgén hordozó transzgénikus vagy transzkromoszomális egér képezi, amely egér IL-15-tel és/vagy IL-15-öt expresszáló sejtekkel történő immunizálás hatására humán anti-IL-15 ellenanyagokat termel. Mint az itt részletesen bemutatásra kerülő transzgénikus, pl. HuMAb egerek esetében, a humán nehézlánc transzgén az egér kromoszomális DNS-ébe integrálva helyeződhet. Alternatív módon, mint pl. a WO 02/43478 számú nemzetközi közzétételi iratban bemutatott transzkromoszomális (pl. KM) egerek esetében, a humán nehézlánc transzgén extrakromoszomálisan is fenntartható. Az ilyen transzgénikus és transzkromoszomális egerek V-D-J rekombináció és izotípus-váltás következtében az IL-15 elleni humán monoklonális ellenanyagok többféle izotípusának (pl. IgG, IgA és/vagy IgE) előállítására képesek. Az izotípus váltás klasszikus és nem-klasszikus úton történhet.

Az idegen antigén-stimulációra heterológ ellenanyag-repertoárral válaszoló transzgénikus vagy transzkromoszomális nem-humán állat megalkotása során alapvető követelmény, hogy a transzgénikus állat heterológ immunglobulin transzgénjei a B-sejt teljes érési folyamata során megfelelően működjenek. Ehhez többek között a heterológ nehézlánc transzgén esetében izotípus-váltásra van szükség. Ennek megfelelően a transzgének kialakításakor szempont, hogy izotípus váltást okozzanak és az ellenanyagok a következők közül egy vagy több tulajdonsággal rendelkezzenek: (1) nagy mennyiségű és sejttípus-specifikus expresszió, (2) funkcionális génátrendeződés, (3) allélkizárás aktiválása és arra történő reagálás, (4) megfelelő primer repertoár expressziója, (5) szignáltranszdukció, (6) szomatikus hipermutáció és (7) az immunválasz során a transzgén ellenanyag lokusz dominálása.

Az előzőekben felsorolt kritériumok közül nem mindegyiknek kell teljesülnie. Például a találmány azon megvalósítási módjaiban, amelyekben a transzgénikus állat endogén immunglobulin lokuszai funkcionálisan károsodtak, a transzgénnek nem kell allélkizárást aktiválnia. Továbbá a találmány azon megvalósítási módjaiban, amelyekben a transzgén funkcionálisan átrendezett nehéz- és/vagy könnyűlánc immunglobulin gént tartalmaz, a funkcionális gén átrendezés kritériumának nem kell megvalósulnia, legalábbis a már átrendezett transzgén esetében. A molekuláris immunológiai fogalmakkal kapcsolatban lásd: Fundamental Immunology, 2. kiadás, szerk.: Paul William E., kiad.: Raven Press, N. Y. (1989).

A találmány bizonyos megvalósítási módjaiban a találmány szerinti humán monoklonális ellenanyagok előállítására alkalmazott transzgénikus vagy transzkromoszomális nem-humán állatok csíravonalukban átrendezett, visszarendezett, vagy kombináltan átrendezett / visszarendezett heterológ immunglobulin nehéz- és könnyűlánc transzgéneket tartalmaznak. A nehézlánc transzgének mindegyike legalább egy CH gént tartalmaz. Emellett a nehézlánc transzgén tartalmazhat funkcionális izotípus váltó szekvenciákat is, amelyek képesek támogatni a transzgénikus állat B-sejtjeiben található, több CH gént kódoló heterológ transzgén izotípus váltását. Ezek a váltószekvenciák természetes körülmények között is előfordulhatnak a transzgén CH génnek forrásául szolgáló faj csíravonalbeli immunglobulin lokuszán, vagy ezek a váltószekvenciák származhatnak a transzgén szerkezet befogadására kijelölt állatfajban (a transzgénikus állatban) előforduló szekvenciákból. Például egy, transzgénikus egér előállítására alkalmazott humán transzgén szerkezet nagyobb számban okoz izotípus váltási eseményt, ha az egér nehézlánc lokuszon természetes körülmények között előfordulóhoz hasonló váltószekvenciát foglal magában, mivel feltételezhetően az egéredetű váltószekvenciák az egér váltó rekombináz enzimrendszerrel történő együttműködésre vannak optimalizálva, míg az emberi váltószekvenciák nem. Váltószekvenciák izolálására és klónozására hagyományos

klónozási eljárások vehetők igénybe, vagy azok immunglobulin váltórégióbeli szekvenciákra vonatkozó publikált szekvencia-információk alapján tervezett, egymást átfedő szintetikus oligonukleotidokból de novo is szintetizálhatók [Mills és mtsai.: Nucl. Acids. Res. 15, 7305 (1991); Sideras és mtsai.: Intl. Immunol. 1, 631 (1989). A korábban említett transzgénikus állatok esetében funkcionálisan átrendezett heterológ nehéz és könnyűlánc immunglobulin transzgének találhatók B-sejtjeik jelentős részében (legalább 10%-ában).

A találmány szerinti transzgénikus állatok előállítására alkalmazott transzgének legalább egy variábilis génszegmenst, egy diverzitás génszegmenst, egy kapcsoló génszegmenst és legalább egy konstans régió génszegmenst kódoló DNS-t tartalmazó nehézlánc transzgént foglalnak magukba. Az immunglobulin könnyűlánc transzgén legalább egy variábilis génszegmenst, egy kapcsoló génszegmenst és legalább egy konstans régió génszegmenst kódoló DNS-t foglal magába. A könnyű- és nehézlánc génszegmenseket kódoló génrészletek heterológak a transzgénikus nem-humán állat szempontjából, mivel a transzgénikus nem-humán állattól eltérő állatból származó immunglobulin nehéz és könnyűlánc génszegmenseket kódoló DNS-nek felelnek meg vagy abból származnak. A találmány egy megvalósítási módjában a transzgén előállítása úgy történik, hogy az egyedi génszegmensek nem átrendezettek, vagyis nem átrendezettek annyira, hogy funkcionális immunglobulin könnyű- vagy nehézláncot kódoljanak. Az ilyen nem átrendezett transzgének támogatják a V, D és J génszegmensek rekombinációját (funkcionális átrendezés), és előnyösen támogatják egy D régiós génszegmens egészének vagy egy részének befoglalását a transzgénikus nem-humán állatban IL-15 antigén expozíció hatására kialakuló átrendezett immunglobulin nehézláncba.

A találmány egy alternatív megvalósítási módjában a transzgének nem átrendezett „minilokuszt” tartalmaznak. Ezek a transzgének jellemzően a C, D és J szegmensek jelentős részét, továbbá a V génszegmensek egy csoportját is tartalmazzák. Az ilyen transzgén szerkezetekben a különféle szabályozóelemek, pl. promoterek, enhanszerek, osztályváltó régiók, RNS feldolgozásra szolgáló szplájsz-donor és szplájsz-akceptor szekvenciák, rekombinációs szignálok stb. a heterológ DNS-ből származó, az előbbieknél megfelelő szekvenciákat tartalmaznak. Ezek a szabályozószekvenciák a találmány szerinti nem-humán állattal megegyező, vagy azzal rokon fajból kerülhetnek a transzgénbe. Így például transzgénikus egerben történő felhasználásra szánt transzgénben humán immunglobulin génszegmensek rágcsló eredetű immunglobulin enhanszer szekvenciával kombinálhatók össze. Alternatív módon az emlősök genomjában természetes körülmények között előforduló funkcionális DNS-szekvenciával nem homológ szintetikus szabályozószekvenciák is a transzgénbe foglalhatók. A szintetikus szabályozószekvenciák kialakításakor konszenzusos alapon elfogadott szabályokat kell

követni, ilyen például egy szplájsz-akceptor hely vagy promoter/enhenszer motívum megengedhető szekvenciáját meghatározó előírás. Például egy minilokusz a genomi immunglobulin lokusz egy részét tartalmazza, amelyből a természetes körülmények között előforduló csíravonal Ig lokuszhoz képest legalább egy belső (vagyis nem a szakasz terminálisán található) nem-esszenciális DNS-szakasz (pl. köztes szekvencia, intron vagy annak egy része) törlésre került.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában az IL-15 elleni humán ellenanyagok előállítására igénybe vett, a WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat 12. példájában bemutatott transzgén (pl. pHCl vagy pHCl2) legalább egy, jellemzően 2-10 és esetenként 25-50 vagy még több példányát hordozó transzgénikus vagy transzkromoszomális állatot a WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat 5., 6., 8. vagy 14. példájában bemutatott könnyűlánc transzgén egy példányát hordozó állattal pároztatják, majd utódaikat a WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat 10. példájában ismertetett JH deletált állattal pároztatják. Az állatok tenyésztése során mindhárom tulajdonság tekintetében homozigóta vonalak kialakítására törekednek. Ezek az állatok a következő genotípussal rendelkeznek: nem átrendeződött humán nehézlánc minilokusz (haploid kromoszóma-készletenként) egy példánya (ld. a WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat 12. példáját), átrendeződött humán K könnyűlánc szerkezet (haploid kromoszóma-készletenként) egy példánya (ld. a WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat 14. példáját), valamint mindegyik endogén egér nehézlánc lokuszon az összes funkcionális JH szegmenst eltávolító deléció (ld. a WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat 10. példáját). Ezeket az állatokat a JH szegmens deléció (ld. a WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat 10. példáját) tekintetében homozigóta egerekkel pároztatva a született utódok a JH deléció tekintetében homozigóták, míg a humán nehéz- és könnyűlánc szerkezetek tekintetében hemizigóták lesznek. Az így kapott állatok antigénekkkel injektálva az adott antigének elleni humán monoklonális ellenanyagokat termelnek.

A fentiek szerint előállított állatokból izolált B-sejtek a humán nehéz- és könnyűláncok tekintetében monospecifikusak, mivel mindegyik génből csupán egy másolatot tartalmaznak. Emellett monospecifikusak a humán vagy egér nehézláncok szempontjából is, mivel a WO 98/24884 számú nemzetközi közzétételi irat 9. és 12. példájában közzétettek szerint kialakított, a JH régiót átívelő deléció miatt bennük az endogén egér nehézlánc gén mindkét példánya működésképtelen. Mindemellett a B-sejtek jelentős hányada a humán vagy egér könnyűláncok tekintetében is monospecifikus lesz, mivel bennük az átrendezett humán könnyűlánc gén egy példányának expressziója allélkizárás és izotípuskizárás útján megakadályozza az endogén egér κ és λ lánc gének átrendeződését.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazott transzgénikus és transzkromoszomális egerek jelentős immunglobulin-repertoárral rendelkeznek, ami ideális esetben alapvetően hasonló a természetes körülmények között előforduló egerekéhez. Így például a találmány azon megvalósítási módjaiban, amelyekben az endogén Ig gének inaktiválására került sor, a szérum
5 összes immunglobulin-mennyisége 0,1-10 mg/mL között, előnyösen 0,5-5 mg/mL között változik, ideális esetben legalább 1,0 mg/mL. Ha a transzgénikus egérbe IgG-ről IgM-re történő váltás kialakítására képes transzgént juttatunk, a felnőtt egér szérum IgG / IgM aránya előnyösen kb. 10:1. Fiatal egérben az IgG / IgM arány ennél sokkal alacsonyabb. Általánosságban a lép- és nyirokcsomó-eredetű B-sejtek több mint 10%-a, előnyösen pedig azok 40-80%-a
10 kizárólag humán IgG proteineket termel.

Az ellenanyag repertoár ideális esetben megközelíti a természetes körülmények között előforduló egerekét, általában azokénak legalább 10%-a, előnyösen pedig 25-50%-ban vagy ennél is nagyobb arányban megegyezik azokéval. Általában legalább ezer, előnyösen 104-106 vagy még több különféle immunglobulin (ideális esetben IgG) termelődik, mennyiségük első-
15 sorban az egér genomba bejuttatott különböző V, J és D régiók számának függvénye. Ezek az ellenanyagok kb. 50%-ban vagy nagyobb arányban felismerik a nagy antigénhatású proteineket, pl. a Staphylococcus A-proteint. Az immunglobulinok előzetesen kiválasztott antigénekhez mutatott affinitása (KD) jellemzően 10^{-7} , így például 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M vagy még alacsonyabb.

A találmány egyes megvalósítási módjaiban az egy adott antigéntípussal szembeni ellenanyagválaszban szerepet játszó V gének számának korlátozása érdekében előnyös lehet előre meghatározott ellenanyag-repertoárral rendelkező egerek létrehozása. Az előre meghatározott repertoárral rendelkező nehézlánc transzgén tartalmazhat például az emberekben egy adott antigéntípussal szemben adott ellenanyagválaszban előnyben részesített humán VH géneket. Alternatív esetben különböző okokból egyes VH gének ki is zárhatók egy meghatározott repertoárból (pl. kis valószínűséggel kódolnak az adott antigénnel szemben nagyaffinitású V régiókat; szomatikus mutációra és affinitás fokozódásra („affinity sharpening”) mutatott gyengébb hajlamuk, vagy egyes emberekben immunogén hatásuk miatt). A különféle nehéz- vagy könnyűlánc génszegmenseket tartalmazó transzgén átrendeződése előtt az említett génszegmensek könnyen azonosíthatók pl. hibridizáció vagy DNS-szekvenálás segítségével, mivel a transzgénikus állattól eltérő szervezetből származnak.
30

A fentiekben bemutatott transzgénikus vagy transzkromoszomális egerek pl. tisztított vagy dúsított IL-15 antigén-készítménnyel, vagy IL-15-öt expresszáló sejtekkel immunizálhatók. A transzgénikus egerek alternatív módon humán IL-15-öt kódoló DNS-sel is immuni-

zálhatók. Az egerek által termelt B-sejtek azután intratranszgénikus váltó rekombinációval osztályváltáson (cisz-váltáson) mennek át és IL-15-el reagáló immunglobulinokat expresszálnak. Az immunglobulinok lehetnek humán ellenanyagok (más néven „humán szekvenciájú ellenanyagok”), amelyekben a nehéz- és könnyűlánc polipeptideket humán transzgén szekvenciák kódolják, amelyek szomatikus mutáció útján vagy V régió rekombinációs egyesüléssel létrejött szekvenciák vagy csíravonalban kódolt szekvenciák lehetnek; ezek a humán ellenanyagok alapvetően megegyeznek egy humán VL vagy VH génszegmens és egy humán JL vagy DH és JH szegmens által kódolt polipeptid-szekvenciával, bár szomatikus mutáció és differenciált V-J és V-D-J rekombinációs egyesülések eredményeként jelen lehetnek bennük egyéb, nem csíravonal eredetű szekvenciák is. Az ellenanyagok variábilis régiójának jellemzően legalább 80%-át humán csíravonal-eredetű V, J és nehézláncok esetében D génszegmensek kódolják, sokszor a variábilis régiók legalább 85%-át a transzgéneken jelen lévő humán csíravonal szekvenciák kódolják, gyakran pedig a variábilis régiók legalább 90-95%-át, vagy még nagyobb hányadát a transzgéneken jelen lévő humán csíravonal szekvenciák kódolják. Ugyanakkor, mivel szomatikus mutáció és VJ és VDJ egyesülés eredményeként jelen lehetnek nem csíravonal eredetű szekvenciák is, a humán szekvenciájú ellenanyagokban gyakran találhatunk olyan variábilis régió szekvenciákat (és kevésbé gyakran konstans régió szekvenciákat), amelyeket nem az egerek csíravonalában jelen lévő humán transzgén(ek)ben található humán V, D vagy J génszegmensek kódolnak. Jellemzően az ilyen nem csíravonal eredetű szekvenciák (vagy egyedi nukleotid-pozíciók) CDR-ekben vagy azok környékén halmozódnak, vagy olyan helyeken, ahol ismerten gyakori a szomatikus mutációk halmozódása.

Az egy meghatározott antigénhez kötődő humán ellenanyagok létrejöhetnek izotípusváltás következtében, amely során humán szekvenciájú γ -láncot (pl. $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$ vagy $\gamma 3$ láncot), valamint humán szekvenciájú könnyűláncot (pl. kappa láncot) tartalmazó humán ellenanyagok keletkeznek. Az ilyen, izotípus-váltással létrejött humán ellenanyagok affinitás érés és a B-sejtek antigén általi kiválasztása, különösen másodlagos (vagy további) ellenanyag-hatás következtében gyakran tartalmaznak egy vagy több szomatikus mutációt (jellemzően a variábilis régióban, és sok esetben a CDR-ben vagy attól 10 aminosav távolságra). Ezen nagy affinitású humán ellenanyagok kötődési affinitása (KD) jellemzően 10^{-7} alatti, így például 10^{-8} M alatti, 10^{-9} M vagy 10^{-10} M alatti, vagy még alacsonyabb.

A találmány tárgyát képezik továbbá találmány szerinti transzgénikus vagy transzkromoszomális egerekből származó B-sejtek. A B-sejtek felhasználásával humán IL-15-höz nagy affinitással (10^{-7} M alatti értéken) kötődő humán monoklonális ellenanyagokat expresszáló hibridómák hozhatók létre. A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány

tárgyát humán ellenanyagot termelő hibridóma képezi, ahol az ellenanyag humán IL-15-höz történő kötődésének analitiként rekombináns humán IL-15 és ligandumként az ellenanyag alkalmazásával, felületi plazmonrezonanciás technológiával BIACORE 3000 berendezésben megállapított disszociációs egyensúlyi állandója (KD) jellemzően alacsonyabb, mint 10^{-7} M, így alacsonyabb, mint kb. 10^{-8} M, 10^{-9} M vagy 10^{-10} M, vagy még ennél is alacsonyabb., és ahol az ellenanyag a következőket tartalmazza:

humán szekvenciájú könnyűlánc, amely (1) egy humán VL génszegmens és egy humán J szegmens által kódolt polipeptid-szekvenciával alapvetően azonos polipeptid-szekvenciát tartalmazó könnyűlánc variábilis régióból, valamint (2) egy humán CL génszegmens által kódolt polipeptid-szekvenciával alapvetően azonos polipeptid-szekvenciát tartalmazó könnyűlánc konstans régióból áll;

humán szekvenciájú nehézlánc, amely (1) egy humán VH génszegmens, adott esetben egy D régió, és egy humán JH szegmens által kódolt polipeptid-szekvenciával alapvetően azonos polipeptid-szekvenciát tartalmazó nehézlánc variábilis régióból, valamint (2) egy humán CH génszegmens által kódolt polipeptid-szekvenciával alapvetően azonos polipeptid-szekvenciát tartalmazó konstans régióból áll.

Az IL-15 elleni nagyaffinitású humán monoklonális ellenanyagok előállítása elősegíthető a genomjában integrált humán immunglobulin transzgént hordozó transzgénikus egérben lévő humán variábilis régió génszegmensek repertoárjának kiszélesítésére szolgáló eljárással.

Az említett eljárás során az integrált humán immunglobulin transzgénben jelen nem lévő V régió génszegmenseket tartalmazó V gén transzgén genomba juttatására kerül sor. A V régió transzgén akár működésképtelen vagy kihagyott V szegmenseket is tartalmazó humán VH vagy VL (V_{κ}) génszegmens-sorozat egy részét a humán genomban természetes körülmények között előforduló, vagy rekombináns eljárásokkal kivágott és összekapcsolt („spliced together”) alakban /tartalmazó mesterséges élesztőgomba kromoszóma. A mesterséges élesztőgomba kromoszóma gyakran legalább öt vagy még több funkcionális V gén szegmenst tartalmaz. A V repertoár-kiszélesítési eljárással lehetőség van a V régió transzgénben jelen lévő V régió génszegmens által kódolt variábilis régió szekvenciát és a humán IgG transzgén által kódolt C régiót magában foglaló immunglobulin láncot expresszáló transzgénikus egér előállítására. A V repertoár-kiszélesítési eljárással legalább öt, vagy akár legalább 24 vagy több különféle V gént hordozó transzgénikus egér állítható elő. Bizonyos V gén szegmensek működésképtelenek (pl. pszeudogének stb.) lehetnek, ezek megtarthatók, vagy kívánt esetben szakember számára ismert rekombináns eljárások segítségével szelektíven eltávolíthatók.

A J és C szegmenseket magában foglaló humán Ig transzgénből alapvetően hiányzó kiszélesített V szegmens repertoárt tartalmazó funkcionális mesterséges élesztőgomba kromoszómát hordozó egér csíravonal géntechnológiai eljárások segítségével történt kialakítását követően ez a tulajdonság más genetikai háttérű egerekkel történő pároztatás útján elterjeszthető. Ez úton például a kiszélesített V szegmens repertoárt tartalmazó funkcionális mesterséges élesztőgomba kromoszóma eltérő humán Ig transzgént tartalmazó egér csíravonalba juttatható. Humán Ig transzgén (vagy több humán Ig transzgén) alkalmazásakor több kiszélesített V szegmens repertoárt tartalmazó funkcionális mesterséges élesztőgomba kromoszóma is bejuttatható egy csíravonalba. Bár mesterséges élesztőgomba kromoszóma transzgéneknek nevezzük őket, ezek a genomba integrált transzgének az élesztőgomba-szekvenciáktól, pl. az élesztőgomba-sejtben történő önálló replikációhoz szükséges szekvenciáktól alapvetően mentesek is lehetnek. Ezek a szekvenciák adott esetben géntechnológiai úton (pl. restriktáz emésztéssel, impulzusmezős gélelektroforézissel, vagy más, erre alkalmas eljárással) távolíthatók el, miután az élesztőgomba-sejtbeli replikációra tovább már nincs szükség (pl. az egér ES sejtbe vagy egér prozigótába történő bejuttatás előtt). A humán szekvenciájú immunglobulin expresszió képességének továbbvitelére szolgáló eljárásokban pl. a humán Ig transzgén(ek)e)t és adott esetben kiszélesített V szegmens repertoárt tartalmazó funkcionális mesterséges élesztőgomba kromoszómát is hordozó transzgénikus egerek tenyésztésére kerül sor. A mesterséges élesztőgomba kromoszóma VH és VL génszegmenseket egyaránt tartalmazhat. A transzgénikus egér bármely egyéb, kívánt genetikai háttérrel rendelkező egérrel pároztatható, ideértve az egyéb humán transzgéneket, pl. humán Ig transzgéneket és/vagy egyéb humán limfocita proteineket kódoló transzgéneket hordozó egereket is. A találmány tárgyát képezi továbbá egy kiszélesített V régió repertoárt tartalmazó funkcionális mesterséges élesztőgomba transzgént hordozó transzgénikus egér által termelt nagy affinitású humán szekvenciájú immunglobulin is. Bár az előzőekben a találmány szerinti transzgénikus állat létrehozásának találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös módját mutattuk be, az alábbi négy kategóriába sorolt egyéb megvalósítási módok is a találmány tárgyát képezik:

- I. Nem átrendezett nehéz- és átrendezett könnyűlánc immunglobulin transzgént hordozó transzgénikus állatok.
- II. Nem átrendezett nehéz- és nem átrendezett könnyűlánc immunglobulin transzgént hordozó transzgénikus állatok.
- III. Átrendezett nehéz- és nem átrendezett könnyűlánc immunglobulin transzgént hordozó transzgénikus állatok.

IV. Átrendezett nehéz- és átrendezett könnyűlánc immunglobulin transzgént hordozó transzgénikus állatok.

Az előbbi kategóriákba sorolt transzgénikus állatok előnyösség tekintetében felállítható sorrendje abban az esetben, ha az endogén könnyűlánc gének (vagy legalább a K gén) homológ rekombinációval (vagy egyéb eljárással) kiütésre kerültek a következő: II > I > III > IV; ahol pedig az endogén könnyűlánc gének nem lettek kiütve, hanem allélkizárással kell elnyomni őket, a következő: I > II > III > IV.

III. Ellenanyag-konjugátumok, immunotoxinok

Egy további szempontból a találmány tárgyát terápiás gyökkel, pl. citotoxinnal, drog-
gal (pl. immunszuppresszív anyaggal), vagy radioizotóppal konjugált humán anti-IL-15 mo-
noklonális ellenanyag képezi. A citotoxinnal konjugált ellenanyagot „immunotoxin”-nak ne-
vezzük. Citotoxinnak vagy citotoxikus anyagnak nevezünk bármely ágenszt, amely káros ha-
tást fejt ki a sejtekre (pl. elpusztítja őket). Ilyenek pl. a taxol, a citokalazin-B, a gramicidin-
D, az etidium-bromid, az emetin, a mitomicin, az etopozid, a tenopozid, a vinkrisztin, a vin-
blasztin, a kolhicin, a dixirubicin, a daunorubicin, a difidroxiantracindion, a mitoxantron, a
mitramicin, az aktinomicin-D, az 1-dehidrotesztoszteron, a glükokortikoidok, a prokain, a
tetrakain, a lidokain, a propanolol, a puomicin, valamint mindezek analóg és homológ vegyü-
letei. Terápiás ágensek pl. többek között az antimetabolitok (pl. a metotrexát, a 6-merkaptopu-
rin, a 6-tioguanin, a citarabin, az 5-fluorouracil-dekarbazin), az alkilező ágensek [pl. a mekló-
retamin, a tioepa klórambucil, a melfalán, a karmusztin (BSNU) és a lomusztin (CCNU), a
ciklofoszfamid, a buszulfán, a dibrom-mannitol, a sztreptozotocin, a mitomicin-C, a cisz-dik-
lórdiamin platina (II) (DDP) ciszplatin], az antraciklinek [pl. a daunorubicin (korábban dau-
nomicin) és a doxorubicin], az antibiotikumok [pl. a daktinomicin (korábban aktinomicin), a
bleomicin, a mitramicin, az antramicin (AMC)], valamint a mitózisgátló ágensek (pl. a vin-
krisztin és a vinblasztin). A találmány szerinti ellenanyag IL-15-tel összefüggő kórkép, pl. rá-
kos megbetegedés gyógykezelésére szolgáló citotoxikus radioaktív gyógyászati készítmény
létrehozása érdekében radioizotóppal, pl. radioaktív jódatommal is konjugálható.

A találmány szerinti ellenanyag-konjugátumok egy adott biológiai válaszreakció mó-
dosítására is felhasználhatók. A terápiás gyök azonban nem csupán a klasszikus terápiás ágen-
sek közül kerülhet ki. Így pl. a gyökként használt drog egy kívánt biológiai tulajdonsággal
rendelkező protein vagy polipeptid is lehet. Ilyen protein lehet pl. egy enzimatikusan aktív
toxin vagy annak aktív fragmense, pl. abrin, ricin-A, Pseudomonas exotoxin, diftériatoxin;
protein, pl. tumornekrózis-faktor vagy interferon- γ ; vagy biológiai válaszreakciót módosító
anyag, pl. limfokin, interleukin-1 („IL-1”), interleukin-2 („IL-2”), interleukin-6 („IL-6”),

- granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor („GM-CSF”), granulocita kolónia stimuláló faktor („G-CSF”), vagy egyéb citokin vagy növekedési faktor. A terápiás gyökök ellenanyagokkal történő konjugálására szolgáló eljárások szakember számára jól ismertek, lásd pl. Arnon és mtsai.: „Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy”,
 5 In Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 243-56, szerk.: Reisfeld és mtsai., kiad.: Alan R. Liss Inc. (1985); Hellstrom és mtsai.: „Antibodies For Drug Delivery”, In Controlled Drug Delivery, 2. kiadás, szerk.: Robinson és mtsai., pp. 623-653, kiad.: Marcel Dekker Inc. (1987); Thorpe: „Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review” In Monoclonal antibodies '84: Biological and Clinical Applications, szerk.: Pinchera és mtsai.,
 10 pp. 475-506 (1985); „Analysis, Results And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy” In Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, szerk.: Baldwin és mtsai, pp. 303-316, kiad.: Academic Press (1985); Thorpe és mtsai.: Immunol. Rev. 62, 119 (1982)].

IV. Gyógyászati készítmények

- 15 A találmány tárgyát képezi továbbá egy találmány szerinti humán monoklonális ellenanyagot vagy találmány szerinti humán monoklonális ellenanyagok kombinációját, vagy azok antigénköti részét gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyaggal együtt kisserelten tartalmazó készítmény, pl. gyógyászati készítmény. A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a készítmények több (pl. kettő vagy több) találmány szerinti izolált humán ellen-
 20 nyag kombinációját tartalmazzák. Előnyösen, a készítményben található minden egyes ellenanyag az IL-15 egy előre meghatározott, elkülönülő epitópjához kötődik.

- A találmány szerinti gyógyászati készítmények kombinációs terápiában, vagyis más hatóanyagokkal kombináltan is alkalmazhatók. Így pl. a kombinációs terápiában egy találmány szerinti készítmény és legalább egy további terápiás ágens, pl. gyulladáscsökkentő ható-
 25 anyag, betegségmódosító reumaellenes drog (DMARD), immunszuppresszív hatóanyag, kemoterápiás hatóanyag vagy psoriasis elleni hatóanyag együttes alkalmazására kerülhet sor. A találmány szerinti gyógyászati készítmények sugárterápiával együttesen is alkalmazhatók. A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti készítmények egyéb ellenanyagokkal, pl. CD4-specifikus ellenanyagokkal vagy IL-2 specifikus ellenanyagokkal történő együttes al-
 30 kalmazása is. A CD4-specifikus vagy IL-2 specifikus ellenanyagokkal végzett kombinációs terápia különösen alkalmas autoimmun megbetegedések és transzplantátum-kilökődési reakciók kezelésére.

A „gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyag” meghatározás alatt értünk bármely élettanilag kompatibilis oldószert, diszpergáló médiumot, bevonószert, baktérium- és

gombaellenes hatóanyagot, izotóniás és abszorpciót késleltető ágenst stb. A vivőanyag előnyösen alkalmas (pl. injekcióban vagy infúzióban történő) intravénás, intramuszkuláris, szubkután, parenterális, spinális vagy epidermális beadásra. A beadás módjától függően az aktív vegyület (vagyis az ellenanyag, bispecifikus és multispecifikus molekula) inaktivációjának elkerülése érdekében a savak és egyéb külső tényezők káros hatásától megvédő bevonattal lát-
ható el.

A „gyógyászati szempontból elfogadható só” meghatározás olyan sóra vonatkozik, amely megőrzi a hatóanyag kívánt biológiai hatását és nem rendelkezik semmilyen nemkívánatos toxikus hatással [ld. pl. Berge, S. M. és mtsai.: J. Pharm. Sci. 66, 1 (1977)]. Az említett kritériumnak savaddíciós és bázisaddíciós sók egyaránt megfelelhetnek. A savaddíciós sók származhatnak például nem-toxikus szeretlen savakból, pl. sósavból, salétromsavból, foszfor-savból, kénsavból, bróm-hidrogénsavból, jódhidrogénsavból, foszforossavból stb., valamint nem-toxikus szerves savakból, pl. alifás mono- és dikarboxilsavakból, fenil-szubsztituált al-
kánsavakból, hidroxil-alkánsavakból, aromás savakból, alifás és aromás szulfonilsavakból stb.
A bázisaddíciós sók közé soroljuk az alkáliföldfémekből, pl. nátriumból, káliumból, magnézi-
umból, kalciumból stb. származó sókat, valamint a nem-toxikus szerves aminokból, pl. N, N'-
dibenzil-etiléndiaminból, N-metilglükaminból, klórprokainból, kolinból, dietanolaminból, eti-
léndiaminból, prokainból stb. származó sókat.

A találmány szerinti készítmények beadására szakember számára ismert számos eljárás igénybe vehető. Amint az szakember számára nyilvánvaló, a beadás útja és/vagy módja a kívánt eredmény függvénye. Az aktív hatóanyagok olyan vivőanyagokkal is kisserelhetők, amelyek meggátolják a hatóanyag gyors kibocsátását, ilyenek pl. a szabályozott kibocsátású készítmények, pl. az implantátumok, a transzdermális tapaszok, valamint a mikrokapszulázott célbajuttató rendszerek. Erre a célra biológiailag lebontható és biokompatibilis polimerek al-
kalmazhatók, ilyenek pl. az etilén-vinil-acetát, a polianhidridek, a poliglikolsavak, a kollagén, a polioctoészterek és a poli-tejsav. Ilyen kisserelések előállítására már számos eljárást szab-
dalmaztattak, vagy más módon ismertek a szakember számára [ld. pl. Sustained and Control-
led Release Drug Delivery Systems, szerk.: Robinson, J. R., kiad.: Marcel Dekker Inc., New
York (1978)].

A találmány szerinti vegyület bizonyos utakon történő beadása esetén a vegyület inak-
tíválódást megakadályozó anyaggal történő bevonására, vagy azzal együttes adagolására lehet
szükség. Például a vegyület megfelelő vivőanyagban, pl. liposzómában vagy oldószerben is
beadható egy páciensnek. Gyógyászati szempontból elfogadható oldószerek pl. a fiziológiás
sóoldat és a vizes pufferoldatok. A liposzómák pl. víz-az-olajban-a-vízben CGF emulziók,

valamint hagyományos liposzómák lehetnek [Strejan és mtsai.: J. Neuroimmunol. 7, 27 (1984)].

Gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagok például a steril vizes oldatok vagy diszperziók, vagy a steril injektálható oldatok vagy diszperziók alkalmi előállítására szolgáló steril porok. Az említett médiumok és ágensek gyógyászati szempontból aktív anyagok előállításában történő felhasználásának módjai szakember számára jól ismertek. Hacsak nem inkompatibilisek az aktív hatóanyaggal, bármely hagyományos médium vagy ágens találmány szerinti gyógyászati készítmények előállításában történő felhasználása a találmány tárgyát képezi. A készítmények további aktív hatóanyagokkal is kiegészíthetők.

A gyógyászati készítményeknek az előállításukra és tárolásukra alkalmazott körülmények között jellemzően stabilnak és sterilnek kell lenniük. A készítmények kiszerezése lehet pl. oldat, mikroemulzió, liposzóma vagy egyéb, magas drogkoncentráció hordozására alkalmas rendezett szerkezet. A vivőanyag pl. vizet, etanolt, poliolt (például glicerint, propilénglikolt, folyékony polietilén-glikolt stb.), valamint ezek megfelelő keverékeit tartalmazó oldószer vagy diszperziós közeg lehet. A készítmény megfelelő fluiditása pl. bevonószerek, köztük lecitin alkalmazásával, diszperzió esetében a kívánt részecskeméret megtartásával és szor-faktánsok használatával biztosítható. Sok esetben előnyös, ha a készítményt izotóniás ágensekkel, pl. cukrokkal, polialkoholokkal, pl. mannitollal, szorbitollal vagy nátrium-kloriddal egészítjük ki. Az injekciós készítmények elhúzódó abszorpciója pl. abszorpciót késleltető anyag, pl. monosztearát só vagy zselatin hozzáadásával érhető el.

Steril injekciós oldatok állíthatók elő megfelelő oldószerben lévő, kívánt mennyiségű aktív vegyület és szükség szerint egy vagy több, fentiekben felsorolt összetevő elegyítésével, majd mikroszűrővel történő sterilizálásával. A diszperziók előállítása során az aktív hatóanyagot általában alap diszperziós közeget és a szükséges egyéb, fentiekben felsorolt összetevőket tartalmazó steril vivőanyagba juttatjuk. A steril injekciós oldatok előállítására szolgáló steril porok készítése előnyösen vákuum-szárítással és fagyasztva szárítással (liofilizálással) történik, amelynek eredményeként az aktív hatóanyagból és a korábban szűrővel sterilizált oldat bármely egyéb kívánt összetevőjéből steril por jön létre.

Az adagolás módját a kívánt válaszreakció (pl. gyógyhatás) optimumának elérése érdekében kell meghatározni. Így például a hatóanyag beadható egy adagban, hosszabb időn keresztül több kisebb adagban, vagy a dózis a terápiás helyzet követelményeinek megfelelően arányosan növelhető vagy csökkenthető. A találmány szerinti humán ellenanyagok beadhatók szubkután injekcióban például hetente egyszer vagy kétszer, vagy havonta egyszer vagy kétszer. Különösen előnyös, ha a parenterális beadásra szánt készítmények egységnyi dózisát a

beadás megkönnyítését és az adagok egyöntetűségét szem előtt tartva határozzák meg. Az adagolási egység a jelen leírásban a páciens kezelésére alkalmas, fizikailag elkülönülő egységnyi gyógyszeradagot jelöl; mindegyik egység az aktív hatóanyagnak a kívánt terápiás hatás figyelembe vételével előre meghatározott mennyiségét gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyaggal együtt tartalmazza. A találmány szerinti adagolási egység meghatározása közvetlenül összefügg (a) a hatóanyag egyedi jellemzőivel és az elérni kívánt terápiás hatással, valamint (b) páciensek érzékenységeinek kezelésére szolgáló aktív hatóanyag kiszerezésének velejáró korlátaival.

Gyógyászati szempontból elfogadható antioxidánsok például (1) a vízzoldékony antioxidánsok, pl. az aszkorbinsav, a cisztein-hidroklorid, a nátrium-biszulfát, a nátrium-metabiszulfid, a nátrium-szulfid stb.; (2) az olajban oldódó antioxidánsok, pl. az aszkorbil-palmitát, a butilált hidroxianizol (BHA), a butilált hidroxitoluén (BHT), a lecitin, a propilgallát, az alfa-tokoferol stb.; valamint (3) a fémkelát-képző ágensek, pl. a citromsav, az etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA), a szorbitol, a borkősav, a foszforsav stb.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények kiszerezése orális, nazális, helyi (bukális és szublingvális), rektális, vaginális és/vagy parenterális beadásra szánt formában történhet. A kiszerezések az adagolás megkönnyítése érdekében egységnyi adagokban állhatnak rendelkezésre, ezek a gyógyszereszek számára ismert eljárások bármelyikével előállíthatók. Az egységnyi adag előállításához felhasznált, vivőanyaggal kevert aktív hatóanyag mennyisége a kezelni kívánt páciensről és a választott beadási módtól függ. Az egységnyi adag előállításához felhasznált, vivőanyaggal kevert aktív hatóanyag mennyisége a készítmény terápiás hatást kifejtő mennyiségével egyezik meg. Általában a teljes adag mennyiségét 100%-nak tekintve az aktív hatóanyag mennyisége kb. 0,001 százalék és kb. 90% közötti, előnyösen kb. 0,005% és kb. 70% közötti, legelőnyösebben pedig kb. 0,01% és 30% közötti.

A találmány szerinti, vaginális beadásra alkalmas kiszerezés például szakember által megfelelőnek tartott vivőanyagokat tartalmazó pesszárium, tampon, krém, gél, paszta, hab vagy permet lehet. A találmány szerinti készítmények helyi vagy transzdermális beadásra szánt kiszerezése pl. por, permet, kenőcs, paszta, krém, öblítőoldat, gél, oldat, tapasz és inhalációszer lehet. Az aktív hatóanyag steril körülmények között gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyaggal, valamint szükség szerint tetszőleges tartósítószerrel, pufferrel vagy hajtóanyaggal keverhető össze.

A „parenterális beadás” vagy „parenterálisan beadva” kifejezések általában injekciós úton történő, nem enterális vagy helyi beadási módot jelölnek, ide tartoznak többek között az intravénás, az intramuszkuláris, az intraarteriális, az intratekális, intrakapszuláris, az intraorbi-

tális, az intrakardiális, az intradermális, az intraperitoneális, a transztracheális, a szubkután, a szubkutikuláris, az intraartikuláris, a szubkapszuláris, a szubarachnoideális, az intraspinalis, az epidurális vagy az intrasternalis injekció vagy infúzió.

A találmány szerinti gyógyászati készítményekben alkalmazható vizes és nem-vizes
5 vivőanyagok többek között a víz, az etanol, a poliolok (például a glicerín, a propilénglikol, a polietilén-glikol stb.), valamint ezek megfelelő keverékei, a növényi olajok, pl. az olívaolaj, valamint az injektálható szerve észterek, mint pl. az etil-oleát. A készítmény megfelelő fluiditása pl. bevonószeres, köztük lecitin alkalmazásával, diszperzió esetében a kívánt részecske-
méret megtartásával és szörfaktánsok használatával biztosítható.

10 A találmány szerinti gyógyszerkészítmények tartalmazhatnak továbbá különféle adjuvansokat, pl. tartósítószereseket, nedvesítő-anyagokat, emulzióképző anyagokat és diszpergálószereket. A mikrobiális szennyeződés a korábban ismertetett sterilizálással, valamint különféle baktérium- és gombaellenes hatóanyagok, pl. paraben, klórbutanol, fenol szorbinsav stb. hozzáadásával kerülhető el. Kívánt esetben a készítmény izotóniás anyagok, pl. cukrok, nátrium-klorid stb. hozzáadásával is kiegészíthető. Az injekciós készítmény elhúzódozó abszorpciója
15 pl. abszorpciót késleltető anyag, pl. alumínium-monosztearát vagy zselatin hozzáadásával érhető el.

A gyógyászati célból ember vagy állatok kezelésére alkalmazott találmány szerinti vegyületek beadhatók önmagukban, vagy például 0,001% és 90% közötti (előnyösebben
20 0,005% és 70% közötti, például 0,01% és 30% közötti) mennyiségű aktív hatóanyagot és gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagot tartalmazó gyógyszerkészítményként.

A kiválasztott beadási úttól függetlenül a találmány szerinti, megfelelő hidratált formában alkalmazott vegyületek, és/vagy a találmány szerinti gyógyászati készítmények szakember számára ismert hagyományos eljárásokkal gyógyászati szempontból elfogadható adagolási formában szerelhetők ki.
25

A találmány szerinti gyógyászati készítményekben az aktív hatóanyag aktuális mennyisége úgy határozandó meg, hogy egy adott páciens, készítmény és beadási mód esetében a kívánt terápiás válasz eléréséhez elegendő legyen anélkül, hogy toxikus lenne a páciensre nézve. Az adag nagysága számos farmakokinetikai tényező függvénye, ilyenek pl. az alkalmazott találmány szerinti készítmény vagy észterének, sójának vagy amidjának aktivitása, a beadás módja, a beadás ideje, az alkalmazott vegyület kiválasztódásának gyorsasága, a kezelés időtartama, az alkalmazott készítménnyel egyidejűleg beadott egyéb drogok, vegyületek és/vagy egyéb anyagok, a kezelt páciens életkora, neme, testtömege, kondíciója, általános egészségi állapota és korábbi gyógykezelései, valamint a szakember számára ismert egyéb
30

tényezők. Átlagosan képzett orvos vagy állatorvos számára nem okozhat nehézséget a gyógyászati készítmény hatékony adagjának meghatározása és előírása. Például a kezelőorvos vagy –állatorvos a gyógyászati készítményben található találmány szerinti vegyület adagját először a kívánt terápiás hatás eléréséhez szükségesnél alacsonyabb szinten állapíthatja meg, majd a kívánt hatás eléréséig fokozatosan növelheti azt. Általánosságban, a találmány szerinti készítmény megfelelő napi adagja a terápiás hatás eléréséhez szükséges legalacsonyabb adagnak felel meg. Az így meghatározott hatékony adag nagysága a fentiekben felsorolt faktorok függvénye. A beadás előnyösen a célhely közelében, előnyösen intravénás, intramuszkuláris, intraperitoneális vagy szubkután úton történhet. Kívánt esetben a gyógyászati készítmény hatékony napi adagja beadható két, három, négy, öt, hat vagy több kisebb, különálló adagban megfelelő időközökkel elosztva a nap folyamán, adott esetben egységnyi adagokban. Bár a találmány szerinti vegyület önmagában is beadható, előnyösebbnek tekintjük a vegyület gyógyászati kisserelésben (készítményben) történő beadását.

A gyógyászati készítmények beadására szakember számára ismert gyógyászati eszközök is igénybe vehetők. Például a találmány egy előnyös megvalósítási módjában a találmány szerinti gyógyászati készítmény tűnélküli injektorral is beadható (az eszköz leírását lásd az 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 és 4596556 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban). A következő szabadalmi iratok a találmány szerinti megoldásban alkalmazható, közismert implantátumokat és modulokat ismertetnek. A 4487603 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban szabályozott ütemű gyógyszerbeadást lehetővé tevő, beültethető mikroméretű infúziós pumpa leírása található; a 4486194 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat gyógyászati anyagok bőrön keresztül történő beadását lehetővé tevő gyógyászati eszközt ismertet; a 4447233 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat olyan gyógyszerinfúziós pumpa leírását teszi közzé, amelynél pontosan beállítható az infúzió-beadás üteme; a 4447224 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat folyamatos drogbeadást lehetővé tevő, változtatható áramlású, beültethető infúziós apparátust ismertet; a 4439196 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat többkamrás rekeszekből álló, ozmotikus alapú drogbeadó rendszer leírását teszi közzé; a 4475196 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat pedig ozmotikus alapú drogbeadó rendszert ismertet. Szakember számára ezeken kívül számos egyéb implantátum, célba juttató rendszer és modul ismert.

A találmány bizonyos megvalósítási módjaiban a találmány szerinti humán monoklonális ellenanyagok a megfelelő in vivo megoszlás biztosítása érdekében speciális módokon is kisserelhetők. A vér-agy gát például sok nagymértékben hidrofil vegyületet kiszűr. Kívánt

esetben, a találmány szerinti gyógyászati készítmények a vér-agy gáton történő átvittetésük érdekében pl. liposzómákban is kiserelhetők. A liposzómák előállítására szolgáló eljárások leírása megtalálható például a 4522811 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban, az 5374548 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban, az 5399331 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban. A liposzómák tartalmazhatnak továbbá egy vagy több, szelektíven meghatározott sejtekbe vagy szervekbe transzportált gyököt, ami elősegíti a célzott drog-célbajuttatást [ld. pl. Ranade, V. V.: J. Clin. Pharmacol. 29, 685 (1989)]. Példaértékű célbajuttató gyökök pl. a folsav vagy a biotin (ld. pl. Low és mtsai. 5416016 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratát), a mannozidok [Umezawa és mtsai.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 1038 (1988)], az ellenanyagok [Bloeman, P. G. és mtsai.: FEBS Lett. 357, 140 (1995); Owais, M. és mtsai.: Antimicrob. Agents Chemother. 39, 180 (1995)]; a szörfaktáns A-protein receptor [Briscoe és mtsai.: Am. J. Physiol. 1233, 134 (1995)], amelynek különböző fajtái a találmány szerinti kiserelés, vagy a találmány szerinti molekula összetevői lehetnek; a p120 [Schreier és mtsai.: J. Biol. Chem. 269, 9090 (1994)]; ld. továbbá Keinanen, K. és Laukkanen, M. L.: FEBS Lett. 346, 123 (1994); Killion, J. J. és Fidler, I. J.: Immunomethods 4, 273 (1994)]. A találmány egy megvalósítási módjában a találmány tárgyat képező gyógyászati vegyületek liposzómákban kerülnek kiserelésre, a találmány egy előnyösebb megvalósítási módjában a liposzómák célba juttatást elősegítő gyököt is tartalmaznak. A találmány legelőnyösebb megvalósítási módjában a liposzómákba foglalt gyógyászati vegyületek a daganat vagy fertőzés helyének szomszédságában, bolus injekció formájában kerülnek beadásra. A készítmény fluiditásának lehetővé kell tennie a fecskendőbe történő könnyű felszívását. A készítménynek az előállítására és tárolására alkalmazott körülmények között stabilnak kell maradnia, továbbá védettnek kell lennie a különféle mikroorganizmusok, pl. baktériumok vagy gombák okozta szennyeződés káros hatásaitól.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán monoklonális ellenanyagok olyan kiserelése alkalmazható, amely megakadályozza vagy csökkenti a placentán történő átvittetésüket. Ez szakember számára ismert eljárásokkal, pl. az ellenanyag „PEGizálásával” vagy F(ab)₂' fragmensek alkalmazásával érhető el [ld. pl. Cunningham-Rundles és mtsai.: J. Immunol. Methods 152, 177 (1992); Landor, M.: Ann. Allergy Asthma Immunol. 74, 279 (1995)]. Ennek különösen akkor van jelentősége, ha az ellenanyagokat visszatérő spontán vetelés gyógykezelésére vagy megelőzésére vesszük igénybe.

Rheumatoid arthritis esetében a „terápiás szempontból hatékony dózis” a páciensek esetében az előzetes javulásértékelés („Preliminary Definition of Improvement”) során előnyösen ACR20, előnyösebben ACR50, még előnyösebben ACR70 értéket ér el.

Az előzetes javulásértékelésben az ACR20 érték a következőképpen definiálható: $\geq 20\%$ -kal javult „érzékeny ízület” (TCJ) pontszám és „duzzadt ízület” (SWJ) pontszám, valamint a következő öt bírálati szempont közül három esetében $\geq 20\%$ javulás: „páciens által elbíralt fájdalomérzet” (VAS); „páciens által adott általános értékelés” (VAS), „orvos által adott általános értékelés” (VAS), „a páciens korlátozottságának önértékelése” (HAQ), akut-fázis anyagok (CRP vagy ESR) mennyisége.

Az ACR50 és ACR70 értékek az előbbivel azonos módon, ≥ 50 vagy $\geq 70\%$ -os javulást feltételeznek [ld. továbbá Felson és mtsai.: Arthritis Rheumatism 38, 727 (1995)].

Egy vegyület rákellenes hatása állati modellrendszerekben bírálható el, amelyek segítségével következtetni lehet az adott vegyület emberi daganatok esetében mutatott hatékonyságára. A vegyület ezen tulajdonsága alternatív módon a vegyület in vitro gátló hatásának szakember számára ismert módon történő megállapításával is felmérhető. Egy terápiás hatású vegyület gyógyászati szempontból hatékony mennyisége csökkentheti a daganat méretét vagy más módon enyhítheti a páciens tüneteit. Többek között a páciens nagyságának, a páciens tünetei súlyosságának, valamint a kiválasztott készítmény és beadási út figyelembe vételével átlagosan képzett szakember számára nem okozhat nehézséget a vegyület gyógyászati szempontból hatékony mennyiségének meghatározása.

Az ellenanyagok psoriasis gyógykezelésére vagy megelőzésére való alkalmazhatósága is szakember számára jól ismert eljárások segítségével állapítható meg.

A készítménynek sterilnek és annyira folyékonnak kell lennie, hogy fecskendőben beadható legyen. A vízen túl a vivőanyag lehet pl. izotóniás pufferolt sóoldat, etanol, poliol (például glicerín, propilénglikol, folyékony polietilén-glikol stb.), valamint ezek megfelelő keverékei. A készítmény megfelelő fluiditása pl. bevonószerek, köztük lecitin alkalmazásával, diszperzió esetében a kívánt részecskeméret megtartásával és szörfaktánsok használatával biztosítható. Sok esetben előnyös, ha a készítményt izotóniás ágensekkel, pl. cukrokkal, polialkoholokkal, pl. mannitollal, szorbitollal, vagy nátrium-kloriddal egészítjük ki. Az injekciós készítmények elhúzódozó abszorpciója pl. abszorpciót késleltető anyag, pl. alumínium monosztearát vagy zselatin hozzáadásával érhető el.

Amennyiben az aktív hatóanyag a fentiek szerint megfelelően védett formában áll rendelkezésre, úgy inert töltőanyaggal vagy emészthető, ehető vivőanyaggal együtt szájon át is beadható.

V. A találmány szerinti eljárások és alkalmazások

A találmány szerinti humán anti-IL-15 ellenanyagok (ideértve azok származékait és konjugátumait), valamint az ellenanyagokat tartalmazó készítmények számos in vitro és in vivo diagnosztikai és terápiás alkalmazásban felhasználhatók.

5 A találmány egy megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellenanyagokat T-sejtek és/vagy monociták/makrofágok IL-15 indukálta TNF α termelésének gátlására vesz-
szük igénybe, előnyösen az egyéb citokinek, pl. az IL-2 által indukált TNF α -termelés gátlása
10 nélkül. Az ellenanyag IL-15-tel történő reagáltatásakor (pl. az ellenanyag páciensnek történt
beadását követően) az IL-15 IL-15 receptoron keresztül történő jelátadása, így a T-sejtek
és/vagy monociták/makrofágok IL-15 indukálta TNF α termelése is gátolt lesz. A találmány
szerinti megoldás szempontjából előnyös ellenanyagok IL-15-specifikus epitópokhoz (pl.
meghatározott alegységekhez, pl. a gamma alegységhez) kötődnek, így meggátolják ugyan az
IL-15 előidézte TNF α termelést, de nem zavarják meg a szerkezetileg rokon citokinek, pl. az
IL-2 TNF α termelését.

15 Alternatív módon a találmány szerinti humán ellenanyagokat az IL-15 receptor α -, β -
és γ -lánc összeállításának megakadályozására, vagy az IL-15 receptor vagy más citokin-re-
ceptor részeként β - és γ -láncokat expresszáló szomszédos sejteken a láncok összeállításának
gátlására alkalmazzuk.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellen-
20 anyagokat az IL-15 által indukált T-sejt toborzás és/vagy proliferáció gátlására alkalmazzuk,
előnyösen anélkül, hogy más, szerkezetileg rokon citokinek, pl. az IL-2 által kiváltott T-sejt
proliferációt gátolnánk. Mint a TNF α termelés esetében fentebb bemutattuk, az ellenanyag
IL-15-tel történő reagáltatásakor (pl. az ellenanyag páciensnek történt beadását követően) az
IL-15 IL-15 receptoron keresztül történő jelátadása, így az IL-15 indukálta T-sejt stimuláció
25 is gátolt lesz.

Mindezeknek megfelelően a találmány egy további megvalósítási módjában a
találmány tárgyát IL-15 által közvetített megbetegedés (pl. egy autoimmun megbetegedés, pl.
psoriasis, rheumatoid arthritis, bélgyulladás, vagy fertőző megbetegedés, pl. HIV) gyógykeze-
lésére vagy megelőzésére szolgáló eljárás képezi, melynek során egy páciensnek a találmány
30 szerinti humán ellenanyagnak a megbetegedés gyógykezelése vagy megelőzése szempontjá-
ból hatékony mennyiségét adjuk be. Az ellenanyag önmagában, vagy más terápiás ágenssel,
pl. gyulladáscsökkentővel, pl. szteroid vagy nem-szteroid gyulladáscsökkentővel, vagy citoto-
xinnal együttesen alkalmazható, amelyek az ellenanyaggal együtt vagy azzal szinergizmusban

fejtik ki hatásukat az IL-15 közvetített megbetegedés gyógykezelése vagy megelőzése érdekében.

A találmány egy megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellenanyagokat rheumatoid arthritis (RA) gyógykezelésére vagy megelőzésére alkalmazzuk. Az ellenanyagok csökkentik az IL-15-nek bizonyos kórképekben, pl. rheumatoid arthritisben a gyulladás súlyosbodásában játszott szerepét. A rheumatoid arthritis esetében a gyulladásos folyamat kialakulásában és fenntartásában T-sejtek, közelebbről CD4+ T-helper sejtek játszanak szerepet. Egy további citokin, a TNF α szintén részt vesz a végső soron az ízületek roncsolódásához és a páciens munkaképtelenségéhez vezető gyulladásos folyamatok kialakításában. Az IL-15 helyi szintézise kulcsszerepet játszik mind a T-sejtek aktiválásában és toborzásában, mind a TNF α és más gyulladásokeltő citokinek indukálásában. Az IL-15 rheumatoid arthritis súlyosbodásában való közreműködése során a makrofágok által szintetizált IL-15 T-sejt toborzást indukál. Az aktivált T-sejtek ezután (1) fenntartják a makrofágok aktivált állapotát, és (2) TNF α termelést idéznek elő. A stimulált makrofágok további IL-15 szintézist és T-sejt aktiválást idéznek elő, fenntartva ezzel a gyulladásos körfolyamatot. A TNF α -ra és makrofágokra kifejtett hatásán túl az IL-15 aktiválja a neutrofil granulocitákat és befolyásolja a B-sejtek helyi immunglobulin-termelését, különösen a rheumatoid faktor szintézisét.

Mindezek alapján a találmány szerinti anti-IL-15 ellenanyagok felhasználhatók az IL-15 fentiekben említett, rheumatoid arthritishez vezető hatásainak megelőzésére vagy gátlására, így az említett kórkép megelőzésére vagy gyógykezelésére is alkalmazhatók. Például a találmány szerinti anti-IL-15 ellenanyagok felhasználhatók a gyulladásos folyamatok gátlására, vagy a rheumatoid arthritisben szerepet játszó aktivált leukociták kemotaxisának megakadályozására.

A találmány szerinti humán ellenanyagok felhasználhatók a metotrexátra nem kellőképpen reagáló rheumatoid arthritises páciensekben a szerkezeti károsodás súlyosbodásának meggátolására, vagy közepes-súlyos fokú aktív rheumatoid arthritisben szenvedő páciensek esetében a tünetek és elváltozások súlyosságának enyhítésére és a szerkezeti károsodás elodázására, ideértve azokat a pácienseket is, amelyek esetében még korábban nem szenvedett kudarcot a DMARD terápia.

A találmány szerinti humán ellenanyagok az IL-15 egyéb hatásainak blokkolására vagy gátlására is felhasználhatók. IL-15-öt számos sejt és szövet expresszál, ilyenek pl. a monociták, a makrofágok, a fibroblasztok, a dendritikus sejtek és a keratinociták. A keratinociták az epidermisnek és a nyálkahártyák hámfjának fő sejtösszetevői. Növekedésük szabálya-

zásáért citokinek és növekedési faktorok összetett hálózata felelős, ezek némelyikét maguk a keratinociták termelik. A keratinociták által termelt IL-15 hozzájárul a T-sejtek psoriasisos plakkokban megfigyelhető gyülekezéséhez, proliferációjához és túléléséhez. Számos olyan betegséget ismerünk, amelyeknél a keratinociták számának növekedése által előidézett epidermalis hiperplázia felelős a tünetek legalább egy részéért. Ilyen megbetegedések pl. egyes idült kórképek, mint pl. a psoriasis és az atópiás dermatitis, valamint az idült kézekcéma, a kontakt dermatitis, a vírus (pl. HPV) okozta szemölcsök, a bőr T-limfóma, a késleltetett sebgyógyulás, pl. a cukorbetegség következtében kialakuló sebgyógyulási zavar. A találmány tárgyát képezik ennek megfelelően az előbbieken felsorolt kórképek gyógykezelésére vagy megelőzésére szolgáló, páciensek találmány szerinti humán anti-IL-15 ellenanyagok a kórképek kezelésére vagy megelőzésére alkalmas mennyiségével történő kezelését magukban foglaló eljárások. A találmány szerinti anti-IL-15 ellenanyagok psoriasis esetén alkalmasak például a parakeratosis blokkolására vagy gátlására, az epidermis vastagságának csökkentésére és a keratinociták proliferációjának mérséklésére.

Az IL-15 a bélhámsejtek működését is befolyásolja [Reinecker és mtsai.: Gastroenterology 111, 1706 (1996)]. Közelebbről, az IL-15 módosulásokat okozhat a nyálkahártya-hámsejteken és a bélhámsejteken, ennek megfelelően szerepet játszik a bél gyulladásos megbetegedéseinek, pl. a coeliakiának a kialakulásában. Az IL-15 ilyen megbetegedésekben betöltött szerepére utal az IL-15+ sejteknek a coeliakiában szenvedő, kezeletlen páciensek vékonybélben való szelektív túlreprezentáltsága (WO 00/02582 számú nemzetközi közzétételi irat). Ezáltal nyert igazolást, hogy az IL-15 közvetlenül szerepet játszik a megbetegedés megindításában és fenntartásában. Ennek megfelelően, a találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti (az IL-15 gyulladáskeltő hatását gátló) humán anti-IL-15 ellenanyagok a kórkép gyógykezelésére vagy megelőzésére elegendő mennyiségben egy páciensnek beadva felhasználhatók a coeliakia gyógykezelésére és/vagy megelőzésére.

Kimutattuk továbbá, hogy az IL-15 elősegíti az új vérerek kialakulását is, ezt a folyamatot neovascularisációnak vagy angiogenesisnek nevezzük. Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti ellenanyagok neovascularisációval járó megbetegedések megelőzésére vagy gyógykezelésére történő alkalmazása. Ilyen betegségek a gyulladásos kórképeken túl a neovascularisáción alapuló vagy azzal jellemezhető különféle rákos megbetegedések.

A találmány szerinti humán ellenanyagok felhasználhatók továbbá az IL-15 fertőző megbetegedések (pl. HIV-fertőzés) esetében kifejtett hatásának blokkolására vagy gátlására is. Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti ellenanyagok

fertőző megbetegedések, pl. HIV-1 fertőzés megelőzésében vagy gyógykezelésében történő alkalmazása.

A találmány szerinti ellenanyagok különféle IL-15 közvetített megbetegedések in vitro vagy in vivo diagnosztizálására is igénybe vehetők. Közelebbről, az ellenanyagok felhasználhatók az IL-15 mennyiségének meghatározására, a felszínükön vagy receptoraikhoz kötve IL-15-öt (receptorhoz kötött humán IL-15-öt) hordozó sejtek számának kimutatására. Az IL-15 kimutatott mennyisége ezután összefüggésbe hozható bizonyos betegségtünetekkel. Alternatív módon, az ellenanyagok felhasználhatók az IL-15 funkció gátlására vagy blokkolására, ami megelőzheti vagy enyhítheti az IL-15 által okozott betegségtüneteket.

Amint azt a korábbiakban bemutattuk, a találmány szerinti humán anti-IL-15 ellenanyagok a gyulladáscsökkentő hatás fokozása érdekében egy vagy több egyéb terápiás ágenssel, pl. immunszuppresszív vagy gyulladáscsökkentő hatóanyaggal együtt is beadhatók. Az ellenanyag az egyéb ágenshez kapcsolva (immunkomplex formájában), vagy elkülönülten is adagolható. Utóbbi esetben az ellenanyag a további hatóanyag beadása előtt, az után, vagy azzal egy időben is adagolható. Erre a célra alkalmas terápiás ágensek többek között a gyulladáscsökkentő anyagok, a betegségmódosító reumaellenes drogok, az immunszuppresszív hatóanyagok, a kemoterápiás szerek és a psoriasis elleni hatóanyagok. A találmány szerinti humán ellenanyagok sugárterápiával együttesen is alkalmazhatók.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellenanyagok más, pl. CD4-specifikus vagy IL-2-specifikus ellenanyagokkal kombináltan is beadhatók. A találmány tárgyát képező humán ellenanyagok és a CD4-specifikus vagy az IL-2-specifikus ellenanyagok kombinált alkalmazása különösen előnyösnek tekinthető autoimmun megbetegedések és transzplantátum-kilökődés kezelése során.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti humán anti-IL-15 ellenanyagokat és adott esetben használati utasítást tartalmazó reagenskészletek is. A reagenskészlet tartalmazhat egy vagy több további reagenst, pl. egy immunszuppresszív reagenst, vagy egy vagy több további találmány szerinti humán ellenanyagot (az IL-15 antigén első humán ellenanyag által megkötött epitópjától eltérő epitóphoz kötődő, komplementer aktivitással rendelkező humán ellenanyagot).

A fentieknek megfelelően a találmány szerinti ellenanyagokkal kezelt pácienseknek (a találmány szerinti humán ellenanyag beadását megelőzően, azt követően vagy azzal egy időben) a humán ellenanyagok terápiás hatását fokozó vagy megerősítő más terápiás hatóanyag, pl. gyulladáscsökkentő anyag is beadható.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti humán ellenanyagok felhasználhatók hozzájuk kötött különféle vegyületek (pl. terápiás ágensek, jelzőanyagok, citotoxinok, immunszuppresszív hatóanyagok stb.) olyan sejtekhez történő célba juttatására, amelyek felszínükön membránhoz vagy receptorhoz kötve IL-15-öt tartalmaznak. A találmány tárgyát képezik továbbá IL-15-öt és IL-15 receptort expresszáló sejtek (pl. kimutatást elősegítő jelzőanyagokat, pl. radioaktív izotópot, fluoreszcien vegyületet, enzimet vagy enzimkofaktort alkalmazó) ex vivo, in vivo vagy in vitro lokalizálására szolgáló eljárások.

A találmány további megvalósítási módjait az alábbi, illusztráció célját szolgáló, nem korlátozó érvényű példákban mutatjuk be. A szekvencialista, az ábrák és az itt idézett szakirodalmi hivatkozások, szabadalmak és közzétett szabadalmi bejelentések teljes egészükben a kitanítás részét képezik.

1. példa

Cmu módosítást hordozó egerek létrehozása

CMD célbajuttató vektor szerkesztése

A pICEmu plazmid az egér Ig nehézlánc lokusznak az mu génre kiterjedő EcoRI/XhoI fragmensét tartalmazza, amelyet Balb/C genomi lambda fág könyvtárból [Marcu és mtsai.: Cell 22, 187 (1980)] nyertünk ki. Ezt a genomi fragmenst a pICEMI9H plazmid [Marsh és mtsai.: Gene 32, 481 (1984)] XhoI/EcoRI helyeibe szubklónoztuk. A pICEmu-ban található nehézlánc szekvenciák a mu intronos enhenszertől közvetlenül 3' irányban helyeződő EcoRI helytől a mu gén utolsó transzmembrán exonjától kb. 1 kb távolságra 3' irányban található XhoI helyig terjednek; bár a mu váltás ismétlődő régió („switch repeat region”) nagy része az E. coli-ban történt passzálás során delécióra került.

A célbajuttató vektort a következőképpen alakítottuk ki. Egy, a pICEmu-ból kimetszett 1,3 kb nagyságú HindIII/SmaI fragmenst a HindIII/SmaI alkalmazásával emésztett pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) vektorba szubklónoztuk. Ez a pICEmu fragmens a Cmu1-től kb. 1 kb távolságra 5' irányban helyeződő HindIII helytől a Cmu1-ben található SmaI helyig terjed. Az így nyert plazmidot SmaI/SpeI alkalmazásával emésztettük, majd beillesztettük a pICEmu-ból származó, megközelítőleg 4 kb nagyságú, a Cmu1 SmaI helyétől az utolsó Cmu exontól közvetlenül 3' irányban helyeződő XbaI helyig terjedő SmaI/XbaI fragmenst. Az így nyert pTAR1 plazmidot a SmaI helynél linearizáltuk, majd egy neo expressziós kazettát illesztettünk bele. Ez a kazetta az egér foszfoglicerát-kináz (pgk) promoter [XbaI/TaqI fragmens; Adra és mtsai.: Gene 60, 65 (1987)] transzkripció ellenőrzése alatt álló, a pgk poliadenilációs helyet magában foglaló [PvuII/HindIII fragmens; Boer és mtsai.:

Biochemical genetics 28, 299 (1990)] neo gént tartalmazza. A kazettát a pKJ1 plazmidból [Tybulewicz és mtsai.: Cell 65, 1153 (1991)] nyertük, amelyből EcoRI/HindIII fragmensként kimetszettük a neo kazettát, majd EcoRI/HindIII emésztett pGEM-7Zf(+)-be szubklónozva a pGEM-7 (KJ1) plazmidot kaptuk. A pGEM-7 (KJ1)-ből EcoRI/SalI emésztéssel kimetszettük a neo kazettát, végeit tompítottuk, majd a genomi Cmu szekvenciákéval ellenkező irányultságban a pTAr1 plazmid SmaI helyébe szubklónoztuk. Az így nyert plazmidot NotI-gyel linearizáltuk, majd a homológ rekombinánsokat hordozó ES klónok dúsításának lehetővé tétele [Mansour és mtsai.: Nature 336, 348 (1988)] érdekében herpes simplex vírus timidin-kináz (tk) kazettát inszertáltunk bele. Ez a kazetta az egér pgk promoter és poliadenilációs hely által közrefogva a tk gén kódoló szekvenciáit tartalmazza [Tybulewicz és mtsai.: Cell 65, 1153 (1991)]. A fentiek szerint előállított CMD célbajuttató vektor összesen kb. 5,3 kb esetében homológ a nehézlánc lokusszal és az első Cmu exon egyedi SmaI helyébe inszertált neo expressziós kazettát tartalmazó mutáns mu gént alakít ki. A célbajuttató vektort az ES sejtekbe elektroporációval történt bejuttatása előtt a plazmidszekvenciák között hasító PvuI-gyel linearizáltuk.

Módosított ES sejtek előállítása és elemzése

Ab-1 ES sejteket [McMahon, A. P. és Bradley, A.: Cell 62, 1073 (1990)] mitotikusan inaktív SNL76/7 sejtátláló rétegeken (ld. ugyanott) tenyésztettünk alapvetően a Robertson által leírtaknak megfelelően [Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. p. 71-112, szerk.: Robertson, E. J., kiad.: IRL Press, Oxford (1987)]. A linearizált CMD célbajuttató vektort Hasty és mtsai. eljárásának felhasználásával elektroporációval AB-1 sejtekbe juttattuk [Hasty, P. R. és mtsai.: Nature 350, 243 (1991)]. Az elektroporáción átesett sejteket $1-2 \times 10^6$ sejt/csésze mennyiségben 100 mm-es csészékbe juttattuk. Huszonnégy óra elteltével a tápközeget (200 $\mu\text{g/mL}$ aktív hatóanyag-tartalmú) G418 és (5×10^{-7} M) FIAU hozzáadásával kiegészítettük, majd 8-9 napos inkubálással lehetővé tettük a drogrezisztens klónok kialakulását. A klónokat kinyertük, tripszinizáltuk, két adagra osztottuk és tovább szaporítottuk. Mindegyik klón esetében a sejtek felét lefagyasztottuk, a másik felét pedig a vektor és a célszekvenciák közötti homológ rekombináció jelenlétére vizsgáltuk.

A DNS elemzését Southern-blot hibridizációval végeztük. A DNS klónokból történő kivonását Laird és mtsai. eljárása szerint végeztük [Laird és mtsai.: Nucleic Acids Res. 19, 4293 (1991)]. Az izolált genomi DNS-t SpeI-gyel emésztettük, majd egy A-próbának (ld. az 1. ábrát) nevezett 915 bp-os SacI fragmensen próbáztuk, ami egy, a mu intronos enhenszer és a mu váltó régió közötti szekvenciával hibridizál. Az A-próba a vad típusú lokusz esetében egy 9.9 kb-os SpeI fragmenst, a CMD célbajuttató vektorral homológ rekombináldott mu

lokusz esetében pedig egy diagnosztikai értékű 7.6 kb-os fragmenst mutat ki (a neo expressziós kazetta SpeI helyet tartalmaz). A Southern-blot elemzéssel szkrínelt 1132 G418- és FIAU-rezisztens klón közül három esetében lehetett a mu lokusznál történt homológ rekombinációra utaló 7,6 kb-os SpeI csík jelenlétét kimutatni. A vektor mu génbe történt homológ integrálódásának igazolása érdekében ezeket a klónokat BglI, BstXI és EcoRI enzimekkel tovább emésztettük. A BglI, BstXI és EcoRI enzimekkel emésztett vad típusú DNS A-próbával végzett Southern-blot elemzése során 15,7, 7,3 és 12,5 kb-os fragmensek keletkeznek, míg a 7,7, 6,6 és 14,3 kb-os fragmensek jelenléte a módosított mu allél jelenlétére utal. A SpeI emésztéssel kimutatott mindhárom pozitív klón esetében a neo kazetta CmuI exonba történt inszerciójára utaló várt BglI, BstXI és EcoRI restrikciós fragmensek keletkeztek.

A mutáns mu gént hordozó egerek létrehozása

A 264, 272 és 408 jelzésű három módosított ES klónt felolvasztottuk majd Bradley eljárást követve C57BL/6J blasztocisztákba injektáltuk [Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach, p. 113-151, szerk.: Robertson, E. J., kiad.: IRL Press, Oxford (1987)]. A bejuttatott ES sejtekből és a gazda blasztocisztából származó sejtek keverékét hordozó kiméra egerek létrehozása céljából a beinjektált blasztocisztákat álvemhes nőtény egerek méhébe juttattuk. Az ES sejtek kimérán belüli részaránya szabad szemmel is elbírálható a szörzet ES sejtvonalból származó „aguti” színe alapján, a C57BL/6J alapszíne ugyanis fekete. A 272 és 408 jelzésű klónok (az aguti szín kis kiterjedése alapján) csak kis részarányú kimérákat hoztak létre, a 264-es klón azonban jelentős hányadú hímváru kimérák születését eredményezte. Ezen kimérák C57BL/6J nőtényekkel történt párosztatásának eredményeként aguti színű utódok születtek, ami az ES sejt genom csíravonalbeli átvitelére utalt. A módosított mu gén jelenlétére történő szkrínelést farokbioptátumokból származó, BglI-gyel emésztett DNS Southern-blot elemzésével végeztük (az ES sejt fentiekben ismertetett DNS elemzésével megegyező módon). Az aguti színű utódok kb. 50%-a esetében a vad típusú 15,7 kb-os BglI csík mellett egy 7,7 kb-os csíkot is ki lehetett mutatni, ami a módosított mu gén csíravonalbeli átvitelére utalt.

Transzgénikus egerek vizsgálata az mu gén funkcionális inaktiválódása szempontjából

Annak megállapítása érdekében, hogy a neo kazetta CmuI-be történt inszerciója inaktiválta-e az Ig nehézlánc gént vagy sem, egy 264-es klónból származó kimérát a JH génszegmensek deléciojának eredményeként a nehézlánc-expressziót inaktiváló JHD mutáció [Chen és mtsai.: Immunol. 5, 647 (1993)] tekintetében homozigóta egérrel párosztattunk. Ennek eredményeként négy aguti színű utódot kaptunk. Az utódokból egy hónapos korukban szérumin-tát nyertünk, majd azokat egér IgM jelenlétének kimutatása érdekében ELISA-val vizsgáltuk.

A négy utód közül kettőből teljesen hiányoztak az IgM ellenanyagok (ld. az 1. táblázatot). A négy állat farokbioptátumból származó, BglI-gyel emésztett és A-próbával hibridizált (ld. az 1. ábrát), valamint StuI-gyel emésztett és 475 kb-os EcoRI/StuI fragmenssel (ld. ugyanott) hibridizált DNS-ének Southern-blot elemzéssel végzett genotipizálásával kimutattuk, hogy azok az állatok nem expresszáltak IgM-et, amelyeknél a nehézlánc lokusz egy allélja JHD mutációt, másik allélja Cm1 mutációt hordozott. A JHD mutáció szempontjából heterozigóta egerek a vad típusra jellemző szérumban Ig mennyiségekkel rendelkeznek. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a Cm1 mutáció inaktiválja az μ gén expresszióját.

1. táblázat

Egér	Szérumban IgM ($\mu\text{g/mL}$)	Ig H lánc genotípus
42	< 0,002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	< 0,002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6 F1	153	+/+
JHD	< 0,002	JHD/JHD

Az 1. táblázat ELISA-val megállapított szérumban IgM mennyiséget tartalmazza a CMD és JHD mutációkat hordozó egerek (CMD/JHD), a JHD mutáció szempontjából heterozigóta egerek (+/JHD), vad típusú (129Sv x C57BL/6J)F1 egerek (+/+) és B-sejt hiányos, a JHD mutáció szempontjából homozigóta egerek esetében (JHD/JHD).

2. példa

HCO12 transzgénikus egerek előállítása

A HCO12 humán nehézlánc transzgén

A HCO12 transzgént a 80 kb-os pH2C2 inszert [Taylor és mtsai.: Int. Immunol. 6, 579 (1994)] és a 25 kb-os pVx6 inszert együttes injektálásával hoztuk létre. A pVx6 jelű plazmidot a következők szerint állítottuk elő.

A csíravonal-eredetű humán VH 1-18(DP-14) gént kb. 2,5 kb 5', valamint 5 kb 3' szegélyező genomi szekvenciával együtt tartalmazó 8,5 kb nagyságú HindIII/SalI DNS-fragenst a pSP72 plazmidvektorba (Promega, Madison, WI) szubklónozva létrehoztuk a p343.7.16 jelű plazmidot. A csíravonal-eredetű humán VH 5-51(DP-73) gént kb. 5 kb 5', valamint 1 kb 3' szegélyező genomi szekvenciával együtt tartalmazó 7 kb nagyságú BamHI/HindIII DNS-fragenst a pBR322 alapú, pGP1f jelű plazmid kónozó vektorba (Taylor és mtsai.: Nucleic Acids

Res. 20, 6287 (1992) klónozza létrehoztuk a p251f jelű plazmidot. A pGP1f,pGP1k-ból származó új klónozóvektort (13. azonosítószámú szekvencia) EcoRV/BamHI-gyel emésztettük, majd a csíravonal-eredetű humán VH 3-23(DP-47) gént kb. 4 kb 5', valamint 5 kb 3' szegélyező genomi szekvenciával együtt tartalmazó 10 kb nagyságú EcoRI/BamHI DNS-fragmenssel kötöttük össze. Az így nyert p112.2RR.7 jelű plazmidot BamHI/SalI-gyel emésztettük, majd a p251f 7 kb nagyságú tisztított BamHI/SalI inszertjével kötöttük össze. Az ennek eredményeként előállított pVx4 jelű plazmidot XhoI-gyel emésztettük, majd a p343.7.16 8,5 kb nagyságú XhoI/SalI inszertjével kötöttük össze.

A VH1-18 gént a másik két V génnel azonos irányultságban tartalmazó klónhoz jutottunk. Ezt a pVx6 jelzésű klónt NotI-gyel emésztettük, majd a tisztított 26 kb-os inszertet a pCH2-ből származó tisztított 80 kb-os NotI inszerttel együtt 1:1 molarányban másfél napos (C57BL/6J x DBA/2J)F2 embriók pronukleuszába injektáltuk [Hogan, B. és mtsai.: „Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual” 2. kiadás, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY (1994)]. A beinjektált embriókból kifejlődött, a Vx6- és HC2-eredetű szekvenciákat egyaránt hordozó transzgénikus egerekből három független vonalat alakítottunk ki. Ezeket a vonalakat a következőképpen neveztük el: (HCO12)14881, (HCO12)15083 és (HCO12)15087. Mindhárom vonalból származó egereket ezután az 1. példában ismertetett CMD mutációt, a JKD mutációt [Chen és mtsai.: EMBO J. 12, 811 (1993)], valamint a (Kco5)9272 transzgént [Fishwild és mtsai.: Nature Biotechnology 14, 845 (1996)] hordozó egerekkel pároztattuk. Az ennek eredményeként született egerek az endogén egér nehézlánc és kappa könnyűlánc lokuszok diszrupciója tekintetében homozigóták voltak és humán nehézlánc és kappa könnyűlánc transzgéneket expresszáltak.

3. példa

IL-5 elleni humán monoklonális ellenanyagok előállítása

A fentieknek megfelelően előállított HCo12 és HCo7 transzgénikus egereket [szállító: Medarex, San José, CA, USA] Freund-féle komplett adjuvánssal (CFA, 121024LA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), vagy Freund-féle inkomplett adjuvánssal (ICFA, 121195LA, Difco) kiegészített humán rekombináns IL-15-tel (hIL-15, Immunex corp., Seattle, USA) szubkután (sc.), intraperitoneálisan (ip.) vagy intravénásan (iv.) immunizáltuk. Az immunizálásra több esetben KLH-val kapcsolt hIL-15-öt vettünk igénybe. Freund-féle komplett vagy inkomplett adjuvánssal kiegészített hIL-15-tel végzett többszöri megerősítő immunizálást követően az egerekből nyert szérummintákat IL-15 elleni humán ellenanyagok kimutatása céljából vizsgáltuk.

A transzgénikus egerek 146B7, 146H5, 404E4 és 404A8 jelű klónokat eredményező immunizálási sémája

Egér száma: 146 (HCo12), azonosító:995-146, nőtény

- | | | |
|--------|-----|--|
| 170699 | sc. | 12 µg hIL-15 + CFA (Difco, tételszám: 121024LA) |
| 010799 | sc. | 12 µg hIL-15 + ICFA (Difco, tételszám: 121195LA) |
| 150799 | sc. | 12 µg hIL-15 + ICFA |
| 020899 | sc. | 12 µg hIL-15-KLH + ICFA |
| 070999 | sc. | 12 µg hIL-15-KLH + ICFA |
| 280999 | sc. | 12 µg hIL-15-KLH + CFA |
| 111099 | iv. | 30 µg hIL-15 + PBS |
| 121099 | iv. | 30 µg hIL-15 + PBS |
| 151099 | | az egér nyirokcsomó- és lépsejtjeinek SP2/0-val történő fuzionáltatása |

Egér száma: 404 (HCo7), azonosító:997-404, nőtény

- | | | |
|--------|-----|---|
| 201099 | ip. | 25 µg hIL-15-KLH + CFA (Difco, tételszám: 121024LA) |
| 031199 | ip. | 12,5 µg hIL-15 + 12,5 µg hIL-15-KLH + ICFA (Difco, tételszám: 121195LA) |
| 101199 | iv. | 12,5 µg hIL-15 + 12,5 µg hIL-15-KLH |
| 121199 | iv. | 12,5 µg hIL-15 + 12,5 µg hIL-15-KLH |
| 191199 | | az egér nyirokcsomó- és lépsejtjeinek SP2/0-val történő fuzionáltatása |

5 Tenyésztőközeg

Fúziós Partner Tenyésztőközeg („Fusion Partner Medium”, FPM):

100 IE/mL penicillinnel, 100 µg/mL szterptomicinnel, 1 mM Na-piruváttal, 0,5 mM β-merkaptóetanollal (Life Technologies, Paisley, Skócia) és 10% hővel inaktivált magzati borjúsavóval (HyClone, Utah, USA) kiegészített „Iscoves Modified Dulbecco’s Medium”.

10 Fúziós szelekciós tenyésztőközeg (Fusion Selection Medium”, FSM):

30 mL „Origen” hibridóma klónozó faktorról (IGEN, Gaithersburg, MD, USA), HAT-tal (1 tégely, a gyártó által ajánlott koncentráció, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) és 0,5 mg/mL kanamicinnel (Life Technologies, Paisley, Skócia) kiegészített FPM.

Fúziós klónozó tenyésztőközeg („Fusion Cloning Medium”, FCM):

15 20 mL „Origen” hibridóma klónozó faktorról (IGEN, Gaithersburg, MD, USA), HT-vel (1 tégely, a gyártó által ajánlott koncentráció, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) és 0,5 mg/mL kanamicinnel (Life Technologies, Paisley, Skócia) kiegészített FPM.

Hibridómakészítés: lép- és nyirokcsomó-sejtek SP2/0 myeloma sejtekkel történő fuzionáltatása

A hibridómák előállításának első lépéseként az egerekből eltávolítottuk a lépet, a lágyéki és az aorta körüli nyirokcsomókat. A lép- és nyirokcsomó-sejtek elkülönült sejtekből álló szuszpenzióját 1:2 arányban SP2/0 myeloma sejtekkel kevertük össze. A sejteket centrifugáltuk, majd az üledéket 37°C-on 1 mL polietilén-glikolban [50% (w/v) PBS-ben, Sigma-Aldrich, Irvine, UK] óvatosan reszuszpendáltuk. A sejtuszuszpenziót 60 másodpercig kavartuk, majd 25 mL FPM-2 hozzáadását követően 37°C-on 30-60 percig inkubáltuk. Az inkubálás után a sejteket üregenként $0,75 \times 10^5$ sejt koncentrációban 96 üregű tálcákra 100 μ L FSM hozzáadásával tenyésztettük. Három nap elteltével mindegyik üreghez 100 μ L FSM-t adtunk.

A hIL-15-tel immunizált HCo7 és HCo12 egerek lép- és nyirokcsomó sejtjeinek fuzionáltatásával számos, IL-15 elleni ellenanyagokat termelő hibridómát sikerült előállítanunk. A következő négy, teljes mértékben humán anti-IL-15 ellenanyagokat termelő stabil klónt izoláltuk: (1) 146LyD7F7B7, átnevezés után: 146B7; (2) 146DE2E12A3H5, átnevezés után: 146H5; (3) 404CG11B7E4, átnevezés után: 404E4; (4) 404FB12E7A8, átnevezés után: 404A8. A felsorolt klónok mindegyike a humán IgG1/k alosztályba tartozott.

Hibridómák szkrínelése

A fúziót követő 7. és 11. nap között az üregek tartalmát humán ellenanyagok jelenlétének kimutatása érdekében a következő ELISA-kal szkríneltük.

A humán IgG tenyészetek felülszójában való jelenlétének szkrínelésére alkalmazott ELISA

A humán IgG ellenanyagok jelenlétének kimutatására szolgáló ELISA-hoz "Nunc Maxisorp" ELISA-tálca mindegyik üregéhez 100 μ L foszfát-pufferolt sóoldatban (PBS-ben) 0,9 μ g/mL koncentrációjú nyúl- α -k- κ -könnyűlánc ellenanyagot (DAKO, Glostrup, Dánia) adtunk, majd a tálcákat szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk. A tálcák 2% csirkeszérummal (Life Technologies, Paisley, Skócia) és 0,05% Tween-20-al (PBSTC) kiegészített PBS-sel történt blokkolását követően az üregekhez a tenyészetek felülszójából származó mintákat adtunk. Másfél órás inkubálást követően a tálcákat mostuk, majd 0,5 μ g/mL koncentrációjú, PBSTC-ben hígított tormaperoxidázzal (DAKO, Glostrup, Dánia) konjugált nyúl- α -humán IgG (Fab2-fragments) ellenanyagot adtunk az üregekhez. Egy órás inkubálást követően a tálcákat mostuk, az üregekhez a gyártó által biztosított protokoll előírásainak megfelelően ABTS szubsztrátot (2,2'-azinobisz-3-etilbenzotiazolin-szulfonsavat, Roche Diagnostics, Mann-

heim, Németország) adtunk, majd az ellenanyag-kötődést EL808 típusú ELISA leolvasó készülékkel (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA) 405 nm-en vizsgálva értékeltük.

Az IL-15-specifikus ellenanyagok jelenlétének szkrínelésére alkalmazott ELISA

A humán IgG/k ellenanyagokat tartalmazó üregeket humán anti-IL-15 ellenanyagok
5 jelenlétének kimutatására szolgáló IL-15-specifikus ELISA-val vizsgáltuk. A vizsgálatához "Nunc Maxisorp" ELISA-tálca mindegyik üregéhez 100 µL foszfát-pufferolt sóoldatban (PBS-ben) 1 µg/mL koncentrációjú IL-15-öt adtunk, majd a tálcákat szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk. A tálcák 2% csirkeszérummal (Life Technologies, Paisley, Skócia) és 0,05% Tween-20-al (PBSTC) kiegészített PBS-sel történt blokkolását követően az üregekhez
10 a tenyészetek felülúszóiból származó mintákat adtunk. Másfél órás inkubálást követően a tálcákat mostuk, majd PBSTC-ben 1:5000 arányban hígított, tormaperoxidázzal konjugált α-humán IgG Fc ellenanyagot (Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania, USA) adtunk az üregekhez. Egy órás inkubálást követően a tálcákat mostuk, az üregekhez a gyártó által biztosított protokoll előírásainak megfelelően ABTS szubsztrátot (2,2'-azinobisz-3-etil-
15 benztiazolin-szulfonsavat, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) adtunk, majd az ellenanyag-kötődést EL808 típusú ELISA leolvasó készülékkel (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA) 405 nm-en vizsgálva értékeltük.

A hibridómák szubklónozása

Stabil anti-IL-15 sejtvonalak nyerése érdekében a hibridómákat korlátozó hígítás módszerével 96 üregű tálcákon (0,5 sejt/üreg mértékig) szubklónoztuk.
20

A szubklónokat kb. 10 nap elteltével a fentiekben ismertetett IL-15 ELISA-val vizsgáltuk. A szubklónozási folyamat egyes fázisaiban az FSM tenyésztőközeget FCM-re, illetve FPM-re cseréltük. A szubklónok izotípusát az alábbiakban ismertetett ELISA-val határoztuk meg.

Az anti-IL-15 ellenanyagok izotípusának megállapítása ELISA-val

Az izotípus meghatározó ELISA-hoz "Nunc Maxisorp" ELISA-tálca mindegyik üregéhez 100 µL foszfát-pufferolt sóoldatban (PBS-ben) 1 µg/mL koncentrációjú anti-humán-Fc ellenanyagot (Jackson Immuno Research) adtunk, majd a tálcákat szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk. A tálcák 2% csirkeszérummal (Life Technologies, Paisley, Skócia) és
30 0,05% Tween-20-al (PBSTC) kiegészített PBS-sel történt blokkolását követően az üregekhez a tenyészetek felülúszóiból származó mintákat adtunk. Másfél órás inkubálást követően a tálcákat mostuk, majd alkalikus foszfatázzal konjugált egér-α-HuIgG1 ellenanyagot (Zymed, plaats, land), vagy tormaperoxidázzal konjugált nyúl-α-HuIgG3 (Zymed) ellenanyagot adtunk

az üregekhez. Egy órás inkubálást követően a tálcákat mostuk, az üregekhez a gyártó által biztosított protokoll előírásainak megfelelően ABTS szubsztrátot (2,2'-azinobisz-3-etilbenzti-
azolin-szulfonsavat, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) adtunk, majd az ellenany-
anyag-kötődést EL808 típusú ELISA leolvasó készülékkel (Bio-tek Instruments, Winooski,
5 VT, USA) 405 nm-en vizsgálva értékeltük.

4. példa

A teljes mértékben humán anti-IL-15 ellenanyagok epitóp-specifitása

Gyógyászati alkalmazhatóságuk és az IL-15 gyulladások gátlása érdeké-
10 ben az IL-15 specifikus ellenanyagoknak fel kell ismerniük az IL-15 receptor IL-2R β -láncával
és/vagy γ -láncával kialakított kölcsönhatásban részt vevő IL-15 epitópokat.

A 146B7, a 146H5, a 404A8 és a 404E4 jelzésű, teljes mértékben humán anti-IL-15
ellenanyagok epitóp-specifitásának értékelésére a Petit és mtsai. által leírt mutáns proteineket
alkalmaztunk. Az IL-15 mutánsok közé tartozott a Q108S (ebben a 108. pozícióban lévő glu-
15 tamint szerin helyettesíti, ez a mutáció az IL-15 γ -láncal kölcsönhatásba lépő helyét érinti),
valamint a D8SQ108S (ebben a 108. pozícióban lévő glutamint és a 8. pozícióban lévő aszpa-
ragint egyaránt szerin helyettesíti, ezek a mutációk az IL-15 mind a β -, mind a γ -láncal köl-
csönhatásba lépő helyeit érintik).

A 146B7, a 146H5, a 404A8 és a 404E4 jelzésű hIL-15 specifikus ellenanyagok hIL-
20 15-höz és mutáns IL-15 proteinekhez történő kötődésének vizsgálata ELISA-val

Az ELISA-hoz "Nunc Maxisorp" ELISA-tálca mindegyik üregét 100 μ L foszfát-
pufferolt sóoldatban (PBS-ben) 1 μ g/mL koncentrációjú IL-15-tel vagy mutáns IL-15 protein-
nel vontuk be. A tálcák 2% csirkeszérummal (Life Technologies, Paisley, Skócia) és 0,05%
Tween-20-al (PBSTC) kiegészített PBS-sel történt blokkolását követően az üregeket a hIL-15
25 specifikus ellenanyagok sorozathígításaival inkubáltuk. A tálcákat mostuk, majd PBSTC-ben
1:5000 arányban hígított, tormaperoxidázzal konjugált α -humán IgG Fc ellenanyagot (Jack-
son Immuno Research, West Grove, Pennsylvania, USA) adtunk az üregekhez. Egy órás inku-
bálást követően a tálcákat mostuk, az üregekhez a gyártó által biztosított protokoll előírásai-
nak megfelelően ABTS szubsztrátot (2,2'-azinobisz-3-etilbenztiazolin-szulfonsavat, Roche
30 Diagnostics, Mannheim, Németország) adtunk, majd az ellenanyag-kötődést EL808 típusú
ELISA leolvasó készülékkel (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA) 405 nm-en vizsgálva
értékeltük.

A 146B7, a 146H5, a 404A8 és a 404E4 jelzésű, teljes mértékben humán IL-15-specifikus ellenanyagok hIL-15-höz és a Q108S és a D8SQ108S jelű mutáns IL-15 proteinekhez történő kötődésének eredményét az 1. ábrán mutatjuk be. Sem a 146B7, sem a 146H5 nem volt képes ezekhez a mutáns IL-15 proteinekhez kötődni. Mivel mindkét mutáns a Q108S mutációt hordozza, a 146B7 és a 146H5 által felismert epitóp az IL-15 ellenanyagnak az IL-15 receptor γ -láncával kölcsönhatásba lépő kritikus doménjainál található. A 404A8 és a 404E4 jelzésű ellenanyagok képesek voltak megkötni a mutáns proteineket, így ezek epitópja az IL-15 β - és γ -láncsal kölcsönhatásba lépő doménjain kívül található. A 146B7 és a 146H5 egyaránt az IL-15 ellenanyagnak az IL-15 receptor γ -láncával kölcsönhatásba lépő régiójához kötődik. Ez az eredmény megegyezik a találmány szerinti teljes mértékben humán anti-IL-15 ellenanyagok alkalmazásával végzett proliferációs vizsgálati eljárások eredményeivel. Amint azt a későbbiekben részletesen bemutatjuk, sem a 404A8, sem a 404E4 jelzésű ellenanyagok nem voltak képesek meggátolni a CTLL-2 sejtek és humán PBMC-k IL-15 előidézte proliferációját. A 146B7 és a 146H5 egyaránt képesek voltak az IL-15 előidézte proliferáció gátlására. A proliferáció gátlása az IL-15 és az IL-15 receptor γ -alegysége közötti kölcsönhatás gátlásán keresztül valósul meg.

5. példa

A 146B7 VH és VL régiójának szekvenciái

A 146B7 átrendezett VH és VL doménjainak nukleotid-szekvenciáját és származtatott aminosav-szekvenciáját a következő módon határoztuk meg. Ezek a szekvenciák tájékoztatnak az alkalmazott csíravonal-eredetű VH és VL családokról; az ezekben a csíravonal-eredetű szekvenciákban megfigyelhető pontmutációk a B-sejtek az állat immunizálása során bekövetkező affinitásérésének eredményei.

RNS kinyerés

A vizsgálat során 5×10^6 mennyiségű 146B7 hibridóma sejtől RNAzol (Biogenesis, Poole, Anglia) reagensnek a gyártó utasításainak megfelelően történt alkalmazásával nyertük ki az összes RNS-t.

cDNS előállítás

A cDNS-nek a 146B7 RNS-éből történő kinyeréséhez az alábbi összetevőket alkalmaztuk (a gyártók utasításainak megfelelően): $3 \mu\text{g}$ összes RNS; AMV pufferes reverz transzkriptáz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország); oligo d(T)15 (Promega, Madison, WI, USA); dNTP (Boehringer Mannheim corp., USA) és RNSsin (Promega).

A VH és VL régiók klónozása érdekében történt amplifikációhoz alkalmazott PCR láncindítók

A következő láncindító-párokat alkalmaztuk:

VH:

FR1 5' láncindítók

- (1) AB62 CAg gTK CAg CTg gTg CAg TC
- (2) AB63 SAg gTg CAg CTg KTg gAg TC
- (3) AB65 gAg gTg CAg CTg gTg CAg TC

VH vezető 5' láncindítók

- (4) AB85 ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC
- (5) AB86 ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg
- (6) AB87 ATg gAg TTT ggR CTg AgC Tg
- (7) AB88 ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC
- (8) AB89 ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT

VH 3' láncindító

- (9) Ab90 TgC CAg ggg gAA gAC CgA Tgg

5

VK:

FR1 5' láncindítók

- (1) AB8 RAC ATC CAg ATg AYC CAg TC
- (2) AB9 gYC ATC YRg ATg ACC CAg TC
- (3) AB10 gAT ATT gTg ATg ACC CAg AC
- (4) AB11 gAA ATT gTg TTg ACR CAg TC
- (5) AB12 gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC
- (6) AB13 gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC
- (7) AB14 gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC

VK vezető 5' láncindítók

- (8) AB123 CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg
- (9) AB124 CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC
- (10) AB125 CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC
- (11) AB126 ATg gAA CCA Tgg AAg CCC CAg CAC AgC

VK 3' láncindító

- (12) Ab16 Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg

A VH és VL régiók klónozása érdekében történt amplifikációhoz alkalmazott PCR kondíciók

A PCR-t AmpliTaq polimeráz (Perkin Elmer) alkalmazásával, „GeneAmp PCR System 9700” berendezésben végeztük (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

PCR protokoll

	94°C 2'
11 ciklus	94°C 30"
	65°C 30", ciklusonként –1°C
	72°C 30"
30 ciklus	94°C 30"
	55°C 30"
	72°C 30"
	72°C 10"
	lehűtés 4°C-ra

5 A VH és VL „pGEMT-Vector System I”-be történő klónozása

A PCR-termékeket agarózgélen történt elemzésüket követően S-400 vagy S-300 mikroszpin oszlopokon (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA), vagy a QIAEX II gélextrakciós reagenskészlet (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) alkalmazásával tisztítottuk ki. Mindegyik kísérletben a VH és VL régiókból FR1 vagy vezető láncindítók

10 tókkal különállóan amplifikált két PCR-terméket „pGEMT-Vector System I”-be (Promega) klónoztunk a gyártó által rendelkezésre bocsátott protokollnak megfelelően.

DH5α E. coli transzformálását követően az egyedi klónokat telep PCR-rel, T7 és SP6 láncindítók

15 vábbi vizsgálatok érdekében NcoI/NotI (NE Biolabs, Egyesült Királyság és Roche Diagnostics) emésztést végeztünk, majd annak eredményét agarózgélen elemeztük.

Szekvenálás

A V régiókat a „pGEMT-Vector System I”-be klónozásukat követően szekvenáltuk. A szekvenáláshoz T7 és Sp6 láncindítókat (Eurogentec, Luik, Belgium) és az „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” elnevezésű szekvenáló reagens-

20 készletet alkalmaztuk a gyártó (Applied Biosystems, Warrington, Egyesült Királyság) által rendelkezésre bocsátott protokollnak megfelelően. A reakciókat „ABI PRISM 377 Sequencer” berendezésben (PE Applied Biosystems) végeztük, a szekvenciákat a DNASTar, SeqmanII programmal elemeztük. A szekvenciákat ezután a VBASE-ban (www.mrc-

cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.htm) található V-gén szekvenciákkal egymás alá rendeztük.

A 146B7 VH és VL régióinak klónozása és szekvenálása

A 146B7 jelzésű hibridómából származó VH és VL régiókat PCR-rel amplifikáltuk, majd cDNS-szekvenciájuk meghatározása érdekében „pGEMT-Vector System I”-be klónoztuk. A nukleotid- és a megfelelő aminosav-szekvenciákat a 2. (1. és 2. azonosítószámú szekvenciák) és a 3. ábrán tüntettük fel (3. és 4. azonosítószámú szekvenciák). Az ábrákon bejelöltük a váz- és komplementaritást meghatározó régiókat (CDR-eket) is. A 146B7 VH régiójának csíravonal-családja a Vbase alapú egymás alá rendezés szerint: VH5-51 (VH5 alcsoport), D2-15/D2 (DH-szegmens), JH4b (JH-szegmens). A 146B7 VL régiójának csíravonal-családja a Vbase alapú egymás alá rendezés szerint: A27 (VKIII alcsoport) és JK2 (JK-szegmens). A VH és VL doménekről további információ a Kabat adatbázisban található (<http://immuno.bme.nwu.edu/> vagy <http://www.Vbase.com>).

6. példa

A 146B7 kötődési affinitásának jellemzői

A 146B7 affinitását biomolekuláris protein-kölcsönhatások megállapításán alapuló felületi plazmon rezonanciás technológiával, BIACORE 3000 berendezésben határoztuk meg, a következők szerint. A biomolekuláris kötődések által a felületi rétegben előidézett és kimutatott SPR szignál változások a felületi rétegben bekövetkezett anyagkoncentráció-változásokra utalnak. Az affinitás kifejezésére a következő meghatározásokat vettük igénybe: k_a = asszociációs ráta állandó ($M^{-1} \text{ sec}^{-1}$); k_d = disszociációs ráta állandó (sec^{-1}); K_A = asszociációs egyensúlyi állandó = k_a/k_d (M^{-1}); és K_D = disszociációs egyensúlyi állandó = k_d/k_a (M).

A 146B7 humán IL-15-tel (hIL-15-tel) szemben mutatott affinitásának megállapítására különböző eljárásokat vettünk igénybe. Két különböző szállítótól (Immunex Corp., Seattle, USA és Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) beszerzett rekombináns humán IL-15-öt CM5 érzékelőcsiphez kötöttünk. Az érzékelőcsiphez kötött vegyület volt a ligandum. Más kísérletekben 146B7-et használtunk ligandumként.

Mindegyik kinetikai vizsgálatban a 146B7 vagy hIL-15 analit érzékelőcsiphez kapcsolt ligandumhoz történő kötődését hasonlítottuk össze egy referencia kontroll CM5 érzékelőcsiphez történt kötődésével. Az analit sorozathígításait (0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$) vizsgáltuk. A k_a és k_d értékek megállapítása és a K_A és K_D kiszámítása érdekében az asszociációs és disszociációs görbéket Langmuir 1:1 modellben monometrikus kölcsönhatásra illesztettük. Az adatokat BIA-Evaluation Version 3.1 program segítségével elemeztük. Biva-

lens kölcsönhatás esetén a „bivalens analit” modellt alkalmaztuk. Az elemzések eredményét csúszó alapvonalra korrigáltuk.

5 A 146B7 ellenanyag affinitásának megállapításához BIACORE 3000 készülék alkalmazásával megmértük a 146B7 ellenanyag két különböző forrásból (az Immunex-től és a Peprotech-től) beszerzett rekombináns humán IL-15-re vonatkozó affinitását. Ligandumként 146B7-et és analitként hIL-15-öt alkalmazva megállapítottuk a monovalens kölcsönhatás mértékét (görbeillesztés Langmuir 1:1 szerint).

A 146B7 ellenanyag IL-15-tel (Immunex Corp.) szembeni affinitásának meghatározásakor a következő eredményeket kaptuk:

10 asszociációs ráta állandó k_a : $1,07 (\pm 0,17) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ disszociációs ráta állandó k_d : $6,56 (\pm 0,09) \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$

asszociációs egyensúlyi állandó K_A : $1,55 (\pm 0,21) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$

disszociációs egyensúlyi állandó K_D : $6,59 (\pm 0,88) \times 10^{-8} \text{ M}$

15 A 146B7 aviditásának meghatározásához ligandumként IL-15-öt (Immunex Corp.), analitként 146B7-et alkalmaztunk. A kapott adatok Langmuir (1:1) görbére illesztéssel végzett elemzések az ellenanyag bivalens kölcsönhatását kifejezve kaptuk meg az ellenanyag aviditását.

A 146B7 ellenanyag IL-15-tel (Immunex Corp.) szembeni aviditásának meghatározásakor a következő eredményeket kaptuk:

20 asszociációs ráta állandó k_a : $7,30 (\pm 0,81) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ disszociációs ráta állandó k_d : $1,45 (\pm 2,05) \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$

asszociációs egyensúlyi állandó K_A : $5,03 (\pm 3,40) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$

disszociációs egyensúlyi állandó K_D : $1,55 (\pm 1,24) \times 10^{-9} \text{ M}$

25 Meghatároztuk a 146B7 Peprotech-től beszerzett IL-15-re vonatkozó affinitását és aviditását is. A két különböző forrásból származó IL-15-re vonatkozó affinitás vagy aviditás tekintetében azonban nem találtunk lényeges különbséget.

30 Amint azt az alábbiakban a CTLL-2 sejtek és PBMC-k humán interleukin 15 (hIL-15) előidézte proliferációjának a teljes mértékben humán anti-IL-15 ellenanyagok által történő gátlásával kapcsolatos példában bemutatjuk, a 146B7 dózisfüggő módon gátolta az IL-15 előidézte, [3H]-timidin inkorporáció alapján mért proliferációt. Az affinitás mérésének egy gyakorlatiasabb módja, az 50%-os gátlásnál mérhető IC_{50} koncentráció meghatározás ezeknél a proliferáció-gátlási kísérleteknél $3,1 \pm 0,91 \text{ nM}$ eredményt hozott. Ez az IC_{50} érték megfelel a BIACORE 3000 berendezésben 146B7 ligandum és rekombináns humán IL-15 analit eseté-

ben kapott aviditás értéknek (KD 1,5 nM), megerősítve az ebben a vizsgálatban kapott affinitás- és aviditás-mérési eredményeinket.

7. példa

5 **A hIL-15 által előidézett TNF- α termelés gátlása teljes mértékben humán anti-IL-15 ellenanyagokkal**

A 146B7, 146H5, 404E4 és 404A8 jelzésű teljes mértékben humán anti-IL-15 ellenanyagok IL-15 indukálta TNF- α termelésre gyakorolt hatását egészséges önkéntesekből nyert perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC-k) alkalmazásával, a következő eljárásokkal vizsgáltuk. Az IL-15-specifitás értékelése érdekében az említett ellenanyagok IL-2 indukálta TNF- α termelésre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk.

Sejtenyésztés

A tenyészeteket 2 mM L-glutamint, 100 NE/mL penicillint, 100 μ g/mL sztreptomicint (Life Technologies, Paisley, Skócia) és 10% hővel inaktivált magzati borjúsavót (HyClone, Utah, USA) tartalmazó RPMI-1640 felhasználásával tartottuk fenn.

Perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC-k) tisztítása

Egészséges önkéntestől beleegyezése után vérmintát vettünk, a minta alvadását heparinnal gátoltuk. A PBMC-ket Ficoll-t (Pharmacia, Uppsala, Svédország) alkalmazó sűrűséggrádiens centrifugálással tisztítottuk ki.

20 Vizsgált vegyületek

hIL-15, tételszám: 6870-011, Immunex Corp., Seattle, Wasinghton, USA

hIL-2, Chiron Benelux BV, Amszterdam, Hollandia

Alkalmazott teljes mértékben humán ellenanyagok: 146B7 (gyártási tétel: 070101) és 146B7RDJW07, 404A8 (gyártási tétel: 030101) és 404E4 (gyártási tétel: 080101), izotípus kontroll ellenanyag T1 (97-2B11-2B12, gyártási tétel: 190900).

PBMC-k humán IL-15 (hIL-15) vagy hIL-2 indukálta TNF- α termelésének gátlása anti-IL-15 ellenanyagokkal

A vizsgálatban 96 üregű lapos aljú tálcákon üregenként 1,5 x 10⁵ sejt mennyiségben három vagy négy replikációban hIL-2 vagy hIL-15 jelenlétében, vagy anélkül és anti-IL-15 ellenanyagok jelenlétében, vagy azok hiányában PBMC-ket tenyésztettünk. Negatív kontrollként izotípus kontroll (T1) ellenanyagot alkalmaztunk. A proliferáció pozitív kontrolljaként konkanavalin A-t (2,5 μ g/mL, Calbiochem) használtunk. A sejteket 5% CO₂ jelenlétében

37°C-on 72 órán át inkubáltuk. A humán TNF- α mennyiségét a begyűjtött felülúszók ELISA vizsgálatával határoztuk meg (U-CyTech, Utrecht, Hollandia).

A 146B7 és egy izotípus kontroll ellenanyag hatását PBMC-k IL-15 előidézte TNF- α termelésének befolyásolása alapján állapítottuk meg. A 146B7 dózisfüggő módon gátolta az IL-15 előidézte TNF- α termelést, míg az izotípus kontroll ellenanyag nem mutatott ilyen hatást (4. ábra; két egészséges önkéntes esetében kapott adatok). A 404E4 és a 404A8 jelzésű ellenanyagok nem gátolták az IL-15 által előidézett TNF- α termelést.

Az anti-IL-15 ellenanyagok specifikitásának igazolása érdekében megvizsgáltuk az IL-2 által előidézett TNF- α termelésre gyakorolt hatásukat is. A 146B7 nem gátolta az IL-2 által előidézett TNF- α termelést (5. ábra). A 404E4 vagy 404A8 esetében sem lehetett az IL-2 által előidézett TNF- α termelés dózisfüggő gátlását megfigyelni.

Az IL-15 által előidézett TNF- α termelés dózisfüggő gátlását csupán a 146B7 esetében lehetett megfigyelni, a 404E4 vagy a 404A8 nem voltak ilyen hatással. A gátlóhatás hIL-15-specifikusnak bizonyult, az IL-2 által előidézett TNF- α termelést az ellenanyag nem gátolta.

8. példa

A humán interleukin-15 (hIL-15) által előidézett CTLL-2 és PBMC proliferáció gátlása teljes mértékben humán anti-IL-15 ellenanyagokkal

A 146B7, 146H5, 404E4 és 404A8 jelzésű ellenanyagok T-sejt proliferációra gyakorolt gátló hatását CTLL-2 sejtek [Gillis és mtsai.: (1978)] és perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC-k) alkalmazásával, a következő eljárásokkal vizsgáltuk.

Sejtenyésztés

A tenyészeteket 2 mM L-glutamint, 100 NE/mL penicillint, 100 μ g/mL sztreptomicint (Life Technologies, Paisley, Skócia) és 10% hővel inaktivált magzati borjúsavót (HyClone, Utah, USA) tartalmazó RPMI-1640 felhasználásával tartottuk fenn. A CTLL-2 sejteket [Gillis és mtsai.: (1978)] milliliterenként 36 egység hIL-2-vel (Chiron Benelux BV, Amszterdam, Hollandia) kiegészített fenti tápközegben tenyésztettük, a kísérlet kezdete előtt 3-4 nappal megvontuk a hIL-2 kiegészítést. A CTLL-2 sejteket felhasználásuk előtt három alkalommal mostuk.

Perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC-k) tisztítása

Egészséges önkéntestől beleegyezése után vérmintát vettünk, a minta alvadását heparinnal gátoltuk. A PBMC-ket Ficoll-t (Pharmacia, Uppsala, Svédország) alkalmazó sűrűséggrádiens centrifugálással tisztítottuk ki.

Vizsgált vegyületek

- 5 hIL-15, tételszám: 6870-011, Immunex Corp., Seattle, Wasinghton, USA
hIL-2, Chiron Benelux BV, Amszterdam, Hollandia
a CTLL-2 vizsgálatra alkalmazott anti-UL-15 ellenanyagokat a 6. ábrán tüntettük fel: 146B7, 146H5, 404A8, 404E4
a PBMC-vizsgálatban alkalmazott anti-IL-15 ellenanyagok: 146B7 (gyártási tétel: 070101), 404A8 (gyártási tétel: 030101) és 404E4 (gyártási tétel: 080101)
10 CTLL-2 sejtek humán IL-15 (hIL-15) vagy hIL-2 indukálta proliferációjának gátlása anti-IL-15 ellenanyagokkal

A vizsgálatokban a sejteket 96 üregű tálcákön üregenként 5 x 10³ sejt mennyiségben három replikációban hIL-2 vagy hIL-15 jelenlétében vagy anélkül tenyésztettük. A proliferációra gyakorolt hatás elbírálása érdekében mind a négy anti-IL-15 ellenanyagot megvizsgáltuk. A sejteket 5% CO₂ jelenlétében 37°C-on 16 órán át inkubáltuk. A sejtek begyűjtése (Harvester 96 Mach II M, Tomtec, Orange CT, USA) előtt 4 órával az üregekhez 1 µCi/üreg mennyiségben [3H]timidint (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) adtunk.

- 20 Amint az a 6. ábrán látható, a CTLL-2 sejtek IL-15 által előidézett proliferációját a 146B7 és a 146H5 dózisfüggő módon csökkentette, erre utal a [3H]timidin inkorporáció csökkent mértéke. A CTLL-2 sejtek IL-15 által előidézett proliferációját sem a 404E4, sem a 404A8 nem volt képes blokkolni.

- 25 PBMC-k humán IL-15 (hIL-15) vagy hIL-2 indukálta proliferációjának gátlása anti-IL-15 ellenanyagokkal

- PBMC-ket 96 üregű U-aljú tálcákön (Nunc, Nalge Nunc International, Dánia) üregenként 5 x 10⁴ sejt mennyiségben három replikációban hIL-2 vagy hIL-15 és az anti-IL-15 ellenanyagok jelenlétében vagy azok hiányában tenyésztettünk. A proliferáció pozitív kontrolljaként konkanavalin A-t (2,5 µg/mL, Calbiochem) használtunk. A sejteket 5% CO₂ jelenlétében 37°C-on 72 órán át inkubáltuk. A sejtek begyűjtése (Harvester 96 Mach II M, Tomtec, Orange CT, USA) előtt 16 órával az üregekhez 1 µCi/üreg mennyiségben [3H]timidint (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) adtunk.

A 146B7 dózisfüggő módon gátolta az IL-15 által előidézett [3H]timidin inkorporációt, ennek köszönhetően gátolta a sejtek proliferációját is ($IC_{50} = 3,1 \pm 0,91 \text{ nM}$) (7. ábra). Sem a 404E4, sem a 404A8 nem volt képes a hIL-15 indukálta PBMC proliferáció gátlására (8-9. ábra). A korábban elvégzett kísérletek tapasztalatai alapján a 146H5 jelzésű ellenanyagot nem vizsgáltuk.

A 146B7, 404E4 és 404A8 IL-15-specifitásának igazolása érdekében megvizsgáltuk az említett ellenanyagok IL-2 által kiváltott proliferációra gyakorolt hatását is. A vizsgált anti-IL-15 ellenanyagok egyike sem befolyásolta az IL-2 hatására kialakuló proliferációt (7-9. ábra).

9. példa

A 146B7 jelű humán anti-IL-15 ellenanyag kötődése humán PBMC-ken jelen lévő humán IL-15-höz

Vizsgált minták

Egészséges önkéntesektől hozzájárulásuk után nyert PBMC-k

146B7 jelű ellenanyag (gyártási tétel: MDX015), Medarex Inc., Annandale, NJ, USA

A 146B7 és humán IgG biotinizálása

N-hidroxiszukcinimido-biotint (Sigma) először 100 mg/mL végső hígításban DMSO-ban, majd 1 mg/mL végső hígításban $NaHCO_3$ -ban (Sigma) hígítottunk. Egy mL-ben hígított 1 mg ellenanyaghoz 600 μ L biotinoldatot adtunk, majd a keveréket szobahőmérsékleten, sötétben, két órán keresztül inkubáltuk. A nem kötődött biotin eltávolítása érdekében az ellenanyag-biotin oldatot 4°C-on egy éjszakán át „slide-a-lyzer™” dialízis kazettában dializáltuk (10,000 MWCO, Pierce, Perbio Science, Hollandia). A következő napon a biotinizált ellenanyagok koncentrációját spektrofotometriás eljárással (Ultrospec 2100pro) 280 nm-en mérve határoztuk meg.

Perifériás vér mononukleáris sejtek stimulálása

Az IL-15 termelés indukálásához egészséges önkéntesekből vénás vért vettünk. A PBMC-eket 5 E/mL penicillint, 50 μ g/mL sztreptomocint, 2 mM L-glutamint (Biowhittaker Europe) és 10% magzati borjúsavót (Optimum C241, Multicell, Wisent Inc.) tartalmazó RPMI 1640 tápközegben (Biowhittaker Europe) 37°C-on legfeljebb két napig tenyésztettük, majd 500 E/mL $IFN\gamma$ -val (Boehringer Ingelheim) stimuláltuk.

Áramlás-citometria

A sejteket 5 E/mL penicillint, 50 µg/mL sztreptomicint, 2 mM L-glutamint (Biowhit-taker Europe) és 10% magzati borjúsavót (Optimum C241, Multicell, Wisent Inc.) tartalmazó RPMI 1640 tápközegben (Biowhit-taker Europe) 10% humán AB szérummal (CLB, Amszter-dam, Hollandia) előzetesen inkubáltuk. A 20 percig 4°C-on „Cytofix/Cytoperm™” reagens-készletben (Becton Dickinson, San Diego, CA) történt permeabilizálást és „Perm/Wash™” pufferben (Cytofix/Cytoperm™ reagenskészlet) történt mosását követően a PBMC-ket áramlás-citometriás módszerrel IL-15-tel jelöltük. A jelölési procedúra alatt a sejtek folyama-tos permeabilitását „Perm/Wash™” puffer alkalmazásával (Cytofix/Cytoperm™ reagens-készlet) biztosítottuk. Négy °C-on 30 percig 20 µg/mL biotinizált 146B7-tel vagy biotinizált hIgG1-gyel történt inkubálásukat és „Perm/Wash™” pufferben történt mosásukat követően a sejteket 4°C-on 30 percig sztreptavidin-fikoeritrinnel (DAKO) inkubáltuk. Mintánként lega-lább 5000 sejt esetében áramlás-citometriával (FACS Calibur, Becton Dickinson), a monoci-ták méretén történt kapuzással megállapítottuk a fluoreszcencia intenzitását (CellQuest Pro szoftver). Megállapítottuk a stimulációs index értékét: $SI = (a \text{ pozitív festődés átlagos fluo-reszcencia intenzitása}) / (a \text{ háttér festődés átlagos fluoreszcencia intenzitása})$.

Immuncitokémia

Az IL-15 humán monocitákon való jelenlétének kimutatásához teljesvér-mintákból citospin-preparátumokat készítettünk. Miután 5×10^4 sejtet (200 µL-t) Superfrost(R)-Plus tárgylemezre (Menzel) centrifugáltunk, a lemezeket levegőn megszárítottuk (< 60 percig), 4°C-on 8 percig 2%-os paraformaldehid/PBS keverékben fixáltuk, majd PBS-sel mostuk és ismét levegőn szárítottuk. A festést megelőzően a citospin-preparátumokat (0,1% szaponint tartalmazó, PBSS) PBS-ben permeabilizáltuk, ezt az anyagot a festési folyamat egészében igénybe vettük. Az endogén peroxidáz-aktivitás gátlása érdekében a citospin-preparátumokat citromsav/foszfátpuffer keverékében (pH = 5,8) oldott 0,05% (v/v) hidrogénperoxiddal (H₂O₂) szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltuk. PBSS alkalmazásával végzett mosást követően az endogén biotin aktivitást a gyártó utasításainak megfelelően, „Biotin Blocking Kit”-tel (Vector Lab, DAKO) blokkoltuk. PBSS alkalmazásával végzett mosást követően a nem-specifikus kötőhelyeket a citospin-preparátumok PBSS-ben lévő 10% (v/v) humán összevont AB-szérummal (CLB, Amszterdam, Hollandia) 30 percig történt inkubálásával blokkoltuk. A citospin-preparátumokat ezután a biotinizált primer ellenanyaggal szobahőmér-sékleten 60 percig inkubáltuk, majd PBSS mosást követően szobahőmérsékleten 30 percig 2% humán AB szérumot tartalmazó PBSS-ben 1:100 arányban hígított biotinizált tormape-

oxidázzal komplexet képző sztreptavidinnel (streptABComplex/HRP, DAKO) inkubáltuk. PBSS mosást követően a tormaperoxidáz-aktivitás kimutatása érdekében a citospin-preparátumokat nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH = 4,9) lévő 0,5 mg/mL 3-amino-9-etilkarbazol és 0,01% H₂O₂ jelenlétében szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. A preparátumokat ezután folyó csapvíz alatt 5 percig mostuk, hematoxilinnel (DAKO) egy percig kontrasztfestettük, folyó csapvíz alatt ismét 5 percig mostuk, majd „Faramount”-ba vagy glicergélbe (DAKO) ágyasztuk.

Áramlás-citometria

A 146B7 IFN γ -stimulált humán monocitákhoz történő kötődését a 10. ábra mutatja be.

- 10 A biotinizált 146B7 nem stimulált monocitákhoz történt kötődése az IL-15 stimulálatlan sejtekben való előfordulására utal. A monociták IFN γ -val történő stimulálása a 146B7 sejthez kötődésének fokozódásához vezetett, a kötődés a maximumát a tenyésztés első napján érte el. A kontroll hIgG1 ellenanyag csak csekély mértékben kötődött a nem stimulált monocitákhoz. Az IFN γ -val végzett stimulálás az Fc γ receptorok monocitákon megfigyelhető fokozott expresszióján keresztül növeli a hIgG1 kötődés mértékét.

Immuncitokémia

- 20 A 11. ábra a humán monociták 146B7-tel vagy a hIgG1 jelű kontroll ellenanyaggal végzett jelölésének eredményét szemlélteti. A sejtek 146B7-tel történt inkubálását követően a citoplazma jól láthatóan vörösen elszíneződött, a kontroll ellenanyaggal történt inkubálás után ezt nem lehetett megfigyelni. Ennek megfelelően a 146B7 megköti a monocitákon található hIL-15-öt, a kötődés mértéke IFN γ -val történt stimulálás eredményeként fokozódik. A 11. ábrán az is megfigyelhető, hogy az IL-15 jelölés eredménye elsősorban intracellulárisan látható.

- 25 10. példa

A 146B7 jelű humán anti-IL-15 ellenanyag szövetekbeli IL-15-kötődésének immunhisztokémiai kimutatása

Vizsgált minták

- 30 Psoriasisban szenvedő páciensektől hozzájárulásuk után nyert psoriasisos szövetminták (Louise Villadsen, Department of Dermatology, Gentofte University Hospital, Koppenhága, Dánia)

146B7 jelű ellenanyag (gyártási tétel: MDX015), Medarex Inc., Annandale, NJ, USA

A 146B7 és humán IgG biotinizálása

N-hidroxiszukcinimido-biotint (Sigma) először 100 mg/mL végső hígításban DMSO-ban, majd 1 mg/mL végső hígításban NaHCO₃-ban (Sigma) hígítottunk. Egy mL-ben hígított 1 mg ellenanyaghoz 600 µL biotinoldatot adtunk, majd a keveréket szobahőmérsékleten, sötétben, két órán keresztül inkubáltuk. A nem kötődött biotin eltávolítása érdekében az ellenanyag-biotin oldatot 4°C-on egy éjszakán át „slide-a-lyzer™” dialízis kazettában dializáltuk (10,000 MWCO, Pierce, Perbio Science, Hollandia). A következő napon a biotinizált ellenanyagok koncentrációját spektrofotometriás eljárással (Ultrospec 2100pro) 280 nm-en mérve határoztuk meg.

Immunhisztokémia

A szövetmintákat a vizsgálatig –80°C-on tároltuk. Kiolvasztásuk után a szövetekből készített metszeteket szobahőmérsékleten 10 percig acetonnal fixáltuk, majd levegőn megszáritottuk. Az endogén peroxidáz-aktivitás gátlása érdekében a metszeteket citromsav/foszfát-puffer keverékében (pH = 5,8) oldott 0,05% (v/v) hidrogénperoxiddal (H₂O₂) szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltuk. PBS-Tween20 (PBST, 0,05% v/v) alkalmazásával végzett mosást követően az endogén biotin aktivitást a gyártó utasításainak megfelelően, „Biotin Blocking Kit”-tel (Vector Lab, DAKO) blokkoltuk. PBST alkalmazásával végzett mosást követően a nem-specifikus kötőhelyeket a metszetek PBST-ben lévő 10% (v/v) humán összevont AB-szérummal (CLB, Amszterdam, Hollandia) 30 percig történt inkubálásával blokkoltuk. A szérum leitatása után a metszeteket 2% humán AB szérumot tartalmazó PBS-sel hígított biotinizált primer ellenanyaggal (146B7 vagy hIgG1) szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltuk, majd PBST-vel mostuk. Ezt követően a metszeteket szobahőmérsékleten 30 percig 2% humán AB szérumot tartalmazó PBSS-ben 1:100 arányban hígított biotinizált tormaperoxidázzal komplexet képző streptavidinnel (streptABComplex/HRP, DAKO) inkubáltuk. PBST mosást követően a tormaperoxidáz-aktivitás kimutatása érdekében a metszeteket nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH = 4,9) lévő 0,5 mg/mL 3-amino-9-etilkarbazol és 0,01% H₂O₂ jelenlétében szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. A metszeteket ezután folyó csapvíz alatt 5 percig mostuk, hematoxilinnel (DAKO) egy percig kontrasztfestettük, folyó csapvíz alatt ismét 5 percig mostuk, majd végül „faramount”-ba vagy glicergélbe (DAKO) ágyaztuk.

Eredmények

A psoriasisos bőrminták esetében a metszetek 146B7-tel történt jelölését követően a keratinociták citoplazmájának egyértelmű festődése volt kimutatható, míg a kontroll ellenanyaggal jelölt mintáknál nem tapasztaltunk hasonló jelenséget (12. ábra, a 146B7 megjelöli a psoriasisos plakkokból származó IL-15 pozitív keratinocitákat).

A 146B7 jelű humán anti-IL-15 ellenanyag SCID egér – humán szövet kimérákban megfigyelt IL-15 blokkoló hatása arthritises és psoriasisos szövetekben egyaránt jelentős gyulladáscsökkenést eredményez

5 Vizsgált minták

Juvenilis rheumatoid arthritisben szenvedő páciensektől hozzájárulásuk után nyert synovialis szövetminták (Alexei Grom, division of pediatric rheumatology, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA)

10 Páciensektől hozzájárulásuk után nyert keratoma biopátumok (Louise Villadsen, Department of Dermatology, Gentofte University Hospital, Koppenhága, Dánia)

146B7 jelű ellenanyag psoriasis kísérletek céljára (gyártási tétel: MDX015), Medarex Inc., Annandale, NJ, USA

146B7 jelű ellenanyag rheumatoid arthritis kísérletek céljára (gyártási tétel: 15-00RDJW07), Medarex Inc., Annandale, NJ, USA

15 Az IL-15 blokkolása SCID egér - emberi synovialis szövet kimérákban

Juvenilis rheumatoid arthritisben szenvedő betegektől ízületi helyreállító műtétet követően friss synovialis szövetmintákat nyertünk. A minták begyűjtése steril körülmények között történt. A preparátumok homogenitásának biztosítása érdekében a synovialis szövetmintákat feldaraboltuk és a kapott fragmenseket gondosan elkevertük. A szövetdarabokat 20 SCID/NOD egerek (Jackson Laboratories) hátának bőr alatti kötőszövetébe ültettük (állatonként 2-4 graft, 100 mg szövetminta/hely). A graft beültetés napján, majd az implantációt követő 7., 14. és 21. napon mindegyik állat ip. 500 µg 146B7-et vagy PBS-t kapott. Az állatokat az implantációt követő 28. napon írtottuk ki. A synovialis graftokat kimetszettük, majd formalinban rögzítettük.

25 SCID egér - emberi synovialis szövet kimérákból származó szövetek HE-festődésének mennyiségi meghatározása [Lehr és mtsai.: J. Histochem. Cytochem. 45, 1559 (1997) után, módosítva]

A SCID egér -- humán synovialis szövet kimérákból kapott metszetekről 10X objektív használatával (Zeiss mikroszkóp, Axiovision szoftver) digitális felvételeket készítettünk 30 (2060x2060, jpg), majd az adatokat számítógéppel, Photoshop 6.0 szoftver (Adobe Systems, Mountain View, CA) alkalmazásával elemeztük, méretüket 1300x1300 pixelre csökkentettük. Mindegyik metszeten hat 10X nagyítású látómezőt választottunk ki a szövet egész metszeten tapasztalható festődésének lehető legjobb reprezentálása érdekében. A megfestett magok kiválasztása után („varázspálca” egy sötét magon, tolerancia: 10) elkészítettük a kiválasztott te-

rület optikai sűrűség grafikonját és feljegyeztük az átlagos festődési intenzitás értékét (a „hasonló/kép hisztogram” parancs kiválasztása után). Ezután kijelöltük a háttérteret és megállapítottuk a festődés erősségét („varázspálca” a háttéren, tolerancia: 10). A festődés intenzitását a magfestődés és a háttérfestődés különbségeként határoztuk meg. Ezt az általunk kijelölt egységekkel rendelkező mérőszámot citokémiai indexnek neveztük el. Az ábrákon bemutatott értékek az átlag és az átlag hibája (SEM). Az adatokat Student-féle t-tesztel elemeztük.

Az IL-15 blokkolása SCID egér - emberi psoriasios szövet kimérákban

Két páciens psoriasiso plakkjaiból keratoma biopátumokat nyertünk, ezeket felosztottuk és C.B-17 SCID (Jackson Laboratories) egerekbe transzplantáltuk. Három héttel a transzplantációt követően az egerek PBS (placebo), minden második napon 15 napig 10 mg/kg CsA (ciklosporin-A) (Sandoz) kezelésben, vagy az 1. és a 10. napon 20 mg/kg, a 8. és 15. napon pedig 10 mg/kg 146B7 kezelésben részesültek. Egy héttel az utolsó injekciót követően az egereket kiirtottuk és mindegyik xenograftból egy 4 mm-es átmérőjű hengeres („punch”) biopátumot vettünk. A biopátumokat formalinban rögzítettük, paraffinba ágyasztuk és HE-nal festettük (15. ábra), valamint Ki-67 antigén jelenlétének kimutatására immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk (16. ábra).

SCID egér - emberi psoriasisos szövet kimérákból származó szövetek immunhisztokémiai festődésének mennyiségi meghatározása

A HE-nal festett metszetekben meghatároztuk az epidermis vastagságát (μm), a parakeratosis mértékét (0-3), valamint a dermis felső rétegében található gyulladásos sejtek számát. A Ki-67-tel festett metszeteken meghatároztuk a ciklusosan működő keratinociták négyzetmilliméterenkénti számát. Mindegyik kezelési csoportban meghatároztuk a 4 egérre vonatkozó értékeket, az egyes esetekre vonatkozó adatoknál kiszámoltuk az átlagot és az átlag hibáját.

SCID/RA modell

A metszetek mikroszkópos vizsgálatával megállapítottuk, hogy a legsötétebben a gyulladásos sejtek magjai festődtek. Ennélfogva a sejtmagok (relatív területként meghatározott) számát a gyulladásos folyamatra vonatkozó mérőszámként használtuk. A 146B7 injektálása a vivőanyaggal végzett kezeléshez képest csökkenti a synovialis szövetbe infiltráló sejtek számát (13a ábra, $p < 0,05$). A 13C ábra a 146B7-nek a gyulladásos sejtek xenograft synovialis szövetbe történő infiltrációjára gyakorolt hatását, a sötét magokkal rendelkező sejtek számának csökkenését mutatja, a 13B ábrán a csak vivőanyaggal végzett kezelés eredménye látható.

SCID/psoriasis modell

A 14. ábrán 146B7 vagy kontroll kezelésben részesült SCID/psoriasis egerek kezelésének eredményét mutatjuk be. A PBS vivőanyaghoz képest a 146B7 injektálása csökkentette az a psoriasisnak az epidermis stratum corneumtól a hámcsapok kezdetéig mért vastagságára gyakorolt hatását (14A ábra): PBS ($177,8 \pm 42,2 \mu\text{m}$), CsA ($91,0 \pm 15,2 \mu\text{m}$), 146B7 ($62,5 \pm 9,1 \mu\text{m}$). Az epidermis vastagságának csökkenése akkor is érzékelhető volt, ha a stratum corneumtól a hámcsapok aljáig mért távolságot vettük figyelembe (14B ábra): PBS ($433,8 \pm 32,1 \mu\text{m}$), CsA ($303,8 \pm 62,9 \mu\text{m}$), 146B7 ($208,0 \pm 33,8 \mu\text{m}$). A 146B7 kezelés a parakeratosis mértékét is csökkentette (14C): ($1,6 \pm 0,4$), CsA ($1,3 \pm 0,3$), 146B7 ($0,5 \pm 0,3$). A 146B7 csökkentette mindezekon kívül a dermis felső rétegében található gyulladásos mononukleáris sejtek számát is (14D ábra): ($33,3 \pm 1,9$ mononukleáris sejt), CsA ($19,4 \pm 8,5$), 146B7 ($16,4 \pm 0,1$). A humán Ki-67 protein expressziója szigorúan összefügg a sejtproliferációval. Az interfázisban az antigén kizárólag a sejtmagban mutatható ki, míg a mitózis során a protein nagy része a kromoszómák felszínére helyeződik át. Az, hogy a Ki-67 protein a sejtciklus mindegyik aktív [G(1), S, G(2) és mitózis] fázisában kimutatható, de nyugalomban lévő [G(0)] sejtekből hiányzik, kiváló lehetőséget nyújt arra, hogy egy adott sejtpopuláció ún. növekedő frakciójának („growth fraction”) meghatározására alkalmazzuk. A 146B7 a Ki-67+ ciklizáló keratinociták számát is csökkenti (14E ábra): ($247,9 \pm 77,0$), CsA ($116,0 \pm 24,1$), 146B7 ($73,8 \pm 9,9$).

Rheumatoid arthritis humán SCID modelljeiben a 146B7-tel végzett kezelés meggátolta a gyulladásos sejteknek a gyulladt szövetbe történő beáramlását. Emellett a humán psoriasisos plakk graftokat hordozó SCID egerek 146B7-tel végzett kezelése a CsA-terápiához képest csökkentette a psoriasis súlyosságát. A humán/SCID egerek 146B7 kezelése nagymértékben mérsékelte a gyulladásos tünetek súlyosságát, az epidermis vastagságát, az osztódó keratinociták számát és a parakeratosis súlyosságát.

12. példa

A 146B7 jelű humán anti-IL-15 ellenanyag felismeri a receptorhoz kötött IL-15-öt

Vizsgált minták

hIgG1 – humán kontroll ellenanyag (Sigma)

146B7 jelű ellenanyag - Medarex Inc., Annandale, NJ, USA (gyártási tétel: MDX015),

IL-15R α -t konstitutív módon expresszáló Raji sejtek (Martin Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, Egyesült Királyság)

A 146B7 és humán IgG biotinizálása

N-hidroxiszukcinimido-biotint (Sigma) először 100 mg/mL végső hígításban DMSO-ban, majd 1 mg/mL végső hígításban NaHCO₃-ban (Sigma) hígítottunk. Egy mL-ben hígított 1 mg ellenanyaghoz 600 µL biotinoldatot adtunk, majd a keveréket szobahőmérsékleten, sötétben, két órán keresztül inkubáltuk. A nem kötődött biotin eltávolítása érdekében az ellenanyag-biotin oldatot 4°C-on egy éjszakán át „slide-a-lyzer™” dialízis kazettában dializáltuk (10,000 MWCO, Pierce, Perbio Science, Hollandia). A következő napon a biotinizált ellenanyagok koncentrációját spektrofotometriás eljárással (Ultrospec 2100pro) 280 nm-en mérve határoztuk meg.

10 A 146B7 IL-15 – IL-15R komplexhez történő kötődésének ELISA-val történő megállapítása

IL-15Rα-val (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) szobahőmérsékleten egy éjszakán át történt inkubálással bevont lapos aljú mikrotiter tálcákat (Greiner) 2% csirkeszérummal kiegészített PBS szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltuk. PBST-vel (0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS-sel) történt mosást követően a tálcákat 50 µL jelöletlen IL-15 (Immunex, Seattle, USA) különböző hígításaival szobahőmérsékleten inkubáltuk. Tíz perc elteltével különböző koncentrációkban biotinizált ellenanyagok 50 µL-ét adtuk az üregekhez, majd a tálcákat szobahőmérsékleten 90 percig inkubáltuk. PBST-vel végzett mosást követően a tálcákat szobahőmérsékleten 60 percig 2% csirkeszérumot tartalmazó PBS-sel (PBST-C-vel) 1:10000 arányban hígított sztreptavidin-poli-tormaperoxidázzal (CLB, Amszterdam, Hollandia) inkubáltuk. Végezetül a tálcákat mostuk, majd a gyártó által biztosított protokoll előírásainak megfelelően ABTS pufferben lévő ABTS szubsztráttal (2,2'-azinobisz-3-etilbenzotiazolin-szulfonsav, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) inkubáltuk. A színreakciót 50 µL 2%-os oxálsavval állítottuk le. Az ellenanyag-kötődést EL808 típusú ELISA leolvasó készülékkel (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA) 405 nm-en vizsgálva értékeltük.

25 A 146B7 Raji sejteken lévő IL-15 – IL-15R komplexhez kötődése

FACS pufferben (PBS, 0,05% BSA, 0,02% NaNO₃) lévő 10% összevont humán AB szérummal (CLB, Amszterdam, Hollandia) 4°C-on 20 percig előzetesen Raji sejteket inkubáltunk. A tálcák üregeihez 1-2 x 10⁵ sejt/mL mennyiségben Raji sejteket, valamint 10%-os humán AB szérumot tartalmazó FACS pufferben hígított jelöletlen IL-15 különböző koncentrációinak 50 µL-ét adtuk. A sejtek 4°C-on 30 percig végzett inkubálását, majd FACS pufferben történt kétszeri mosását követően biotinizált 146B7 vagy biotinizált hIgG1 jelű ellenanyagok 50 µL-ével 4°C-on 30 percig inkubáltuk őket. FACS pufferrel végzett kétszeri mosást követő-

en a sejteket 4°C-on 30 percig 50 µL sztreptavidin-fikoeritrinnel inkubáltuk. FACS pufferrel végzett kétszeri mosást követően a sejteket 200 µL FACS pufferbe gyűjtöttük. A fluoreszcencia intenzitását mintánként legalább 5000 sejt esetében áramlás-citometriával (FACS Calibur, Becton Dickinson) CellQuest Pro szoftver alkalmazásával állapítottuk meg. A feltüntetett adatok a stimulációs indexet (S. I.) jelölik, amelyet a következőképpen kaphatunk meg: $SI = \frac{(a \text{ pozitív festődés átlagos fluoreszcencia intenzitása})}{(a \text{ háttér festődés átlagos fluoreszcencia intenzitása})}$.

ELISA

A 146B7 IL-15/IL-15R komplexhez történő kötődése ELISA vizsgálatának eredményét a 17. ábra tartalmazza. A receptorához kötődő IL-15 mennyiségének növekedésével a 146B7 kötődésének fokozódását lehetett megfigyelni. A kontroll ellenanyag kötődése esetében nem észleltünk hasonló hatást.

IL-15-öt expresszáló Raji sejtekhez történő kötődés.

A 146B7 Raji sejteken lévő IL-15/IL-15R komplexhez való kötődését a 18. ábrán mutatjuk be. A 146B7 dózisfüggő módon kötődik az IL-15/IL-15R komplexhez. A hIgG1 nem kötődött a Raji sejteken lévő IL-15/IL-15R komplexhez (18. ábra).

A 146B7 a citokin receptorához történő kötődése után is képes az IL-15 megkötésére. A 146B7 olyan epitópon kötődik az IL-15-höz, amely nem játszik szerepet annak receptorhoz történő kötődésében.

Felhasznált szakirodalom

Bathon J. M., Martin R. W., Fleischmann R. M., Tesser J. R., Schiff M. H., Keystone E. C., Genovese M. C., Wasko M. C., Moreland L. W., Weaver A. L., Markenson J. and Finck B. K. (2000) A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343, 1586-93.

Fehniger T.A. and Caligiuri M.A. (2001) Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97: 14-28.

Fishwild D.M., O'Donnell S.L., Bengoechea T., Hudson D.V., Harding F., Bernhard S.L., Jones D., Kay R.M., Higgins K.M., Schramm S.R. and Lonberg N. (1996) High-avidity human IgGκ monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nature biotechnol.* 14: 845-51.

Gillis S., Ferm M. M., Ou W. and Smith K. A. (1978) T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* 120, 2027-32.

Kennedy M.K., *et al.* (2000) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in IL-15 deficient mice. *J. Exp. Med.* 191: 771-80

Kirman I., Vainer B. and Nielsen O. H. (1998) Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Res* 47, 285-9.

Klippel J. H. (2000) Biologic therapy for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343, 1640-1.

Köhler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-7.

Liu C. C., Perussia B. and Young J. D. (2000) The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol Today* 21, 113-6.

Lovell D. J., Giannini E. H., Reiff A., Cawkwell G. D., Silverman E. D., Nocton J. J., Stein L. D., Gedalia A., Ilowite N. T., Wallace C. A., Whitmore J. and Finck B. K. (2000) Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 342, 763-9.

Maini R. N. and Taylor P. C. (2000) Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med* 51, 207-29.

McInnes I. B., al-Mughales J., Field M., Leung B. P., Huang F. P., Dixon R., Sturrock R. D., Wilkinson P. C. and Liew F. Y. (1996) The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2, 175-82.

McInnes I. B., Leung B. P., Sturrock R. D., Field M. and Liew F. Y. (1997) Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 3, 189-95.

McInnes I. B. and Liew F. Y. (1998) Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 19, 75-9.

Oppenheimer-Marks, *et al.* (1997) *J. Clin. Investig.* 101:1261-72.

Pettit D. K., Bonnert T. P., Eisenman J., Srinivasan S., Paxton R., Beers C., Lynch D.,

Miller B., Yost J., Grabstein K. H. and Gombotz W. R. (1997) Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *J Biol Chem* 272, 2312-8.

Ruchatz, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:5654-60.

Waldmann T., Tagaya Y. and Bamford R. (1998) Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors. *Int Rev Immunol* 16, 205-26.

Waldmann T. A., Dubois S. and Tagaya Y. (2001) Contrasting Roles of IL-2 and IL-15 in the Life and Death of Lymphocytes. Implications for Immunotherapy. *Immunity* 14, 105-110.

Waldmann T. A. and Tagaya Y. (1999) The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 17, 19-49..

10 Szakember számára nyilvánvaló, vagy rutin kísérletezéssel eldönthető, hogy a találmány szerinti megoldásnak számos, az itt közöltekkel egyenértékű megvalósítási módja létezik. Ezek mindegyike a következőkben ismertetendő szabadalmi igénypontok hatókörébe tartozik. Az igénypontokban közzétett megvalósítási módok bármely kombinációja a találmány hatókörébe tartozik.

15 Az itt ismertetett közlemények, szabadalmak és folyamatban lévő szabadalmi beadványok teljes egészükben a kitanítás részét képezik.

Szabadalmi igénypontok

1. Izolált humán monoklonális ellenanyag, amely humán IL-15-höz specifikusan kötődik, és amely legalább egy, az alábbiak bármelyikének megfelelő CDR-szekvenciát tartalmaz:

- 5 (i) az 5., 6., 7., 8., 9. vagy 10. azonosítószámon megadott szekvenciák;
- (ii) az (i) pontban megadott szekvenciákkal legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azokkal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azokkal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ szekvenciák; vagy
- 10 (iii) az (i) vagy (ii) pontokban megadott szekvenciák fragmensei, amelyek megőrizték a humán IL-15-höz történő specifikus kötődés képességét.

2. Az 1. igénypont szerinti ellenanyag, amely ellenanyag az alábbiak bármelyikét tartalmazza:

- (i) a 7. azonosítószámon megadott szekvencia;
- 15 (ii) a 7. azonosítószámú szekvenciával legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azzal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azzal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ szekvencia; vagy
- (iii) az (i) vagy (ii) pontokban megadott szekvencia fragmense, amely megőrizte a humán IL-15-höz történő specifikus kötődés képességét.

3. Az 1. igénypont szerinti szekvencia, amely szekvencia az alábbiak bármelyikét tartalmazza:

- (i) az 5. és 8. azonosítószámon megadott szekvenciák;
- (ii) a 6. és 9. azonosítószámon megadott szekvenciák;
- (iii) a 7. és 10. azonosítószámon megadott szekvenciák;
- 25 (iv) az (i), (ii) vagy (iii) pontokban megadott szekvenciákkal legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azokkal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azokkal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ szekvenciák; vagy
- (v) az (i), (ii), (iii) vagy (iv) pontokban megadott szekvenciák fragmensei, amelyek megőrizték a humán IL-15-höz történő specifikus kötődés képességét.

4. Az 1. igénypont szerinti ellenanyag, amely ellenanyag az alábbiak közül legalább 30 négy, tetszőlegesen kiválasztott CDR-t tartalmaz:

- (i) az 5., a 6., a 7., a 8., a 9. és a 10. azonosítószámon megadott szekvenciák;
- (ii) az (i) pontban megadott szekvenciákkal legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azokkal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azokkal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ szekvenciák; vagy

(iii) az (i) vagy (ii) pontokban megadott szekvenciák fragmensei, amelyek megőrizték a humán IL-15-höz történő specifikus kötődés képességét.

5. Az 1. igénypont szerinti ellenanyag, amely az alábbi szekvenciák bármelyikét tartalmazó izolált humán monoklonális ellenanyag:

- 5 (i) az 5., 6., 7., 8., 9. és 10. azonosítószámon megadott szekvenciák;
- (ii) az (i) pontban megadott szekvenciákkal legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azokkal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azokkal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ szekvenciák; vagy
- 10 (iii) az (i) vagy (ii) pontokban megadott szekvenciák fragmensei, amelyek megőrizték a humán IL-15-höz történő specifikus kötődés képességét.

6. Izolált humán monoklonális ellenanyag, amely a humán IL-15-höz specifikusan kötődik és amely a 2. azonosítószámú szekvencián megadott aminosav-szekvenciájú nehézlánc variábilis régiót, vagy a 2. azonosítószámú szekvenciával legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azzal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azzal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ aminosav-szekvenciájú nehézlánc variábilis régiót tartalmaz.

7. Izolált humán monoklonális ellenanyag, amely humán IL-15-höz specifikusan kötődik és amely a 4. azonosítószámú szekvencián megadott aminosav-szekvenciájú könnyűlánc variábilis régiót, vagy a 4. azonosítószámú szekvenciával legalább 90%-ban homológ, előnyösebben azzal legalább 95%-ban homológ, még előnyösebben azzal legalább 98%-ban, vagy legalább 99%-ban homológ aminosav-szekvenciájú könnyűlánc variábilis régiót tartalmaz.

8. Izolált humán monoklonális ellenanyag, amely ellenanyag a humán IL-15 γ -láncsal kölcsönhatásba lépő doménjén található epitóphoz specifikusan kötődve meggátolja az IL-15R γ -láncra keresztül megvalósuló cisz-szignáltranszdukciót, és amely az IL-15R vagy más citokin receptor részeként a γ -láncot, vagy a β - és γ -láncokat expresszáló szomszédos sejteken meggátolja a transz-szignáltranszdukciót.

9. Izolált humán monoklonális ellenanyag, amely ellenanyag specifikusan kötődik a humán IL-15-höz és amely gátolja az IL-15 receptor α -, β - és γ -láncának összeállítását.

30 10. Izolált humán monoklonális ellenanyag, amely ellenanyag specifikusan kötődik a humán IL-15-höz és amely az IL-15 vagy más citokin receptor részeként β - és γ -láncokat expresszáló szomszédos sejteken gátolja a láncok összeállítását.

11. A 9. igénypont szerinti ellenanyag, amely ellenanyag az IL-15 vagy más citokin receptor részeként β - és γ -láncokat expresszáló szomszédos sejteken gátolja a láncok összeállítását.

5 12. Eljárás humán IL-15 fokozott expressziójával kapcsolatos rendellenesség és/vagy humán IL-15 hatásainak csökkentésével vagy gátlásával előnyösen befolyásolható bántalom gyógykezelésére vagy megelőzésére, *azzal jellemezve*, hogy páciensnek az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti izolált humán monoklonális ellenanyagnak a bántalom gyógykezelésére vagy megelőzésére alkalmas mennyiségét beadjuk.

10 13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az izolált humán monoklonális ellenanyagot az alábbi bántalmak bármelyikének gyógykezelése vagy megelőzése érdekében adjuk be: ízületi gyulladások, kötőszöveti megbetegedések, szemészeti megbetegedések, idegrendszeri kórképek, gyomor-bélrendszeri- és májbetegségek, allergiás megbetegedések, hematológiai megbetegedések, bőrbetegségek, tüdőbetegségek, rosszindulatú daganatos megbetegedések, transzplantációhoz kapcsolódó kórképek, endokrinológiai kórképek, érbetegségek, nőgyógyászati megbetegedések vagy fertőző betegségek.

14. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az izolált humán monoklonális ellenanyagot az alábbi bántalmak bármelyikének gyógykezelése vagy megelőzése érdekében adjuk be: ankylosissal kísért spondylitis, szisztémás lupus erythematosus, fekélyes vastagbélgyulladás, allograft-kilökődés vagy graft-versus-host reakció.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

84 oldal

19 oldal old.

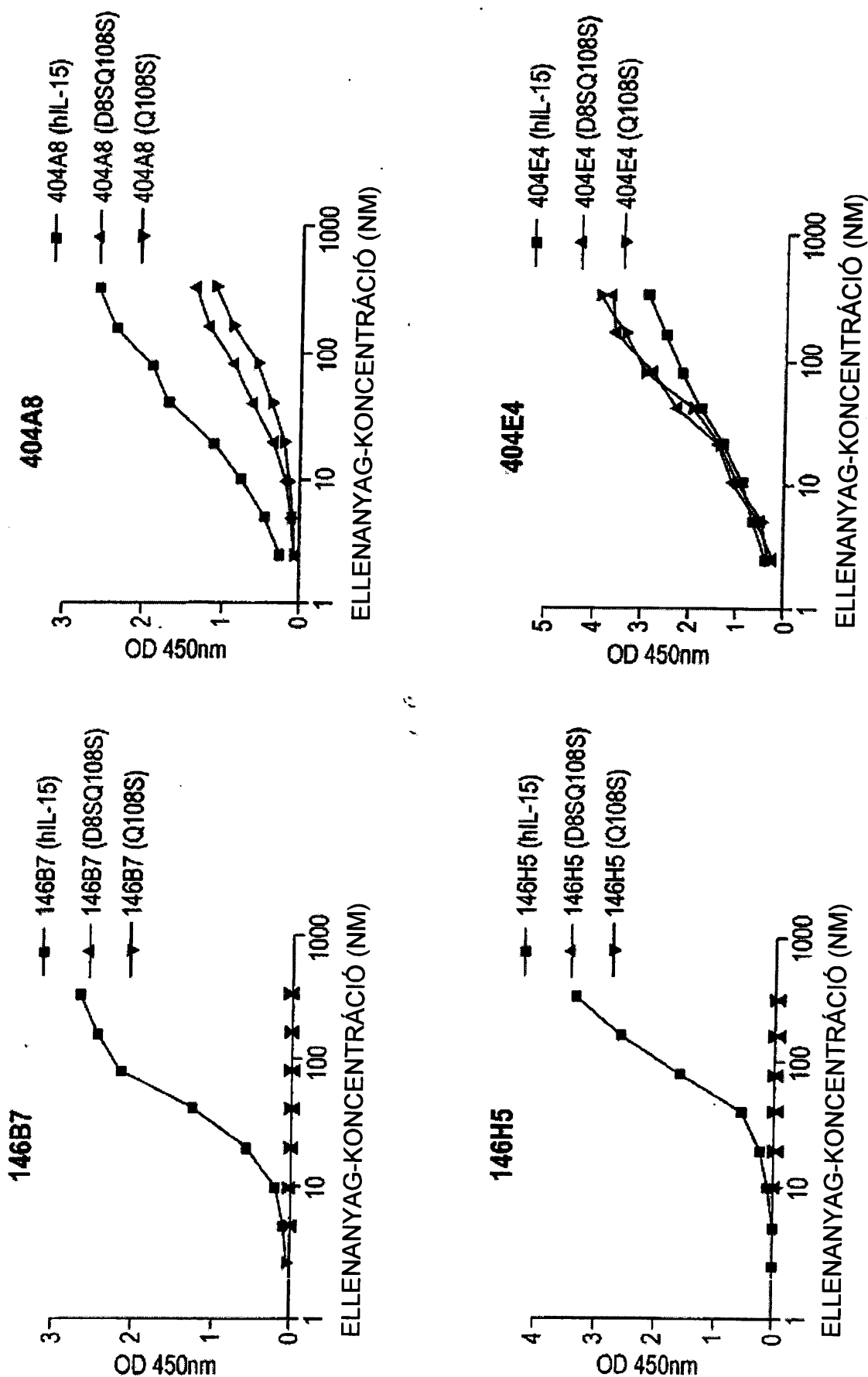
9 oldal. nevelésig

112 oldal

szabadalmi ügyvivő

PCT/IB2004/000484

1/19



1. ábra

146B7 VK

60 *
 AB63 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AAG ATC
 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I>
 FRI

120 *
 TCC TGT AAG GTT TCT GGA TAC TTC TTT ACC ACC TAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC CAG ATG
 S C K V S G Y F F T T Y W I G W V R Q M>
 CDR1

180 *
 CCC GGG AAA GGC CTG GAG TAT ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT GAC TCT GAT ACC AGA TAC
 P G K G L E Y M G I I Y P G D S CDR2

240 *
 AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC
 S P S F Q G Q V T I S A D K S I S T A Y>
 FR3

300 *
 CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGT
 L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R G G>
 FR4

360 *
 AAC TGG AAC TGC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC
 N W C F D Y W G Q G T L V T V S S A S> Cyt
 CDR3 JH4b

ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA AB90
 T K G P S V F P L A>

2. ábra

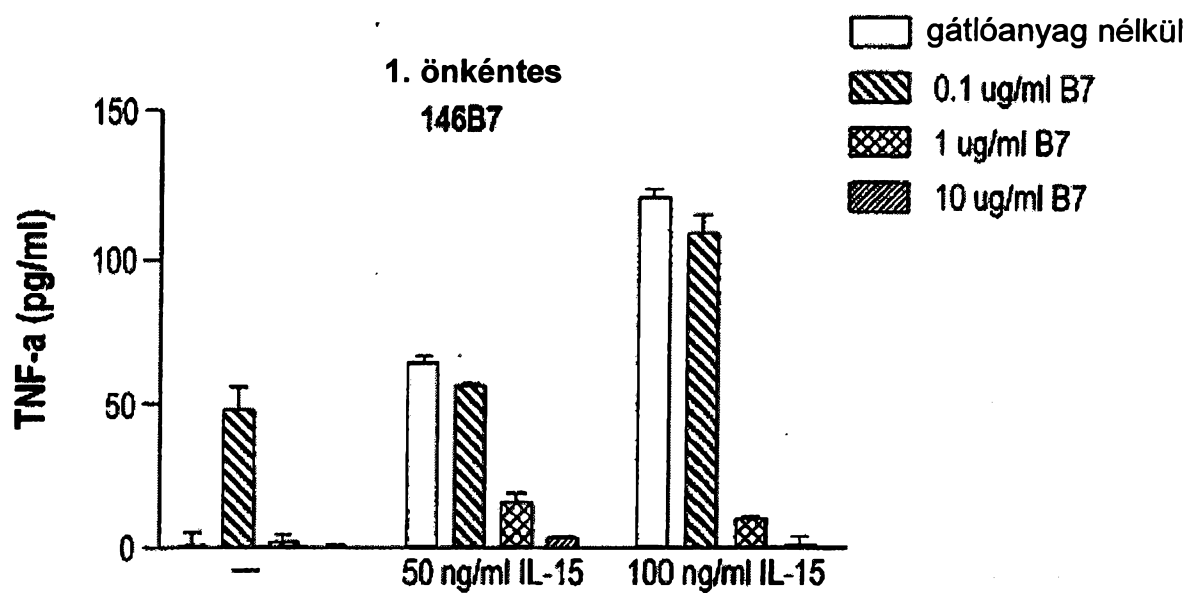
146B7 VK

```

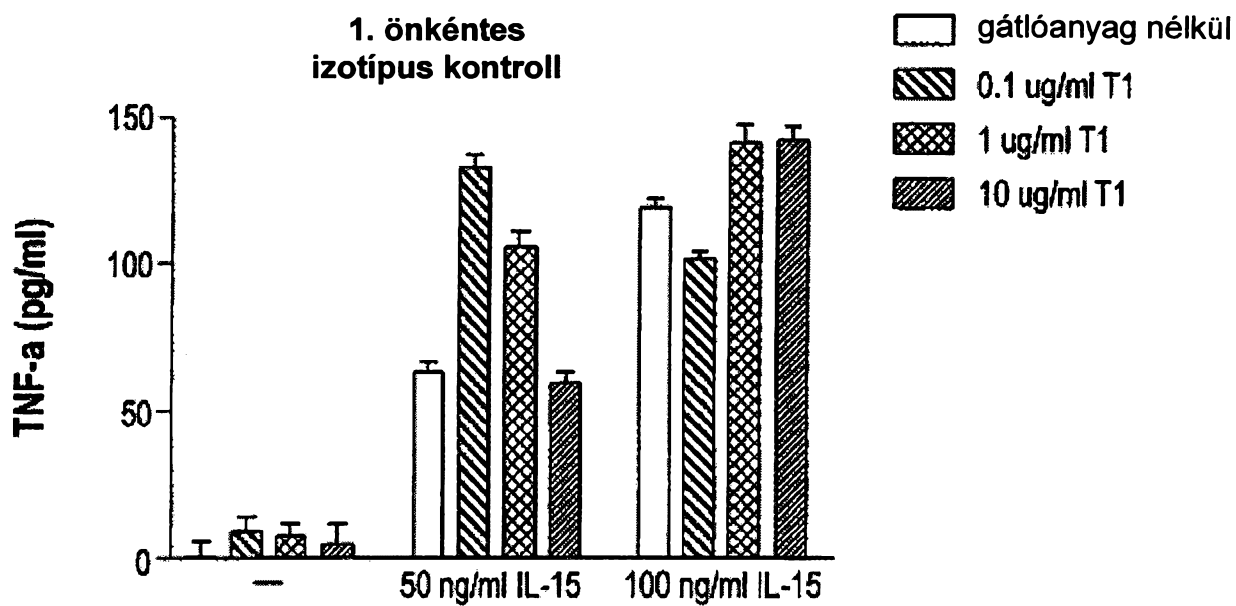
60 *
AB11 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
   E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T>
FR1
120 *
CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA
   L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K>
CDR1
180 *
CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC CGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
   P G Q A P R L L L I Y G A S R R A T G I P>
FR2
240 *
GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGC TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG
   D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E>
FR3
300 *
CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CGG TAT GGT AGC TCA CAC ACT TTT GGC CAG
   P E D F A V Y Y C Q R Y G S S H T F G Q>
CDR3
* AA
GGG ACC AAG CTG GAG ATC AGC CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG AB16
   G T K L E I S R T V A A P S S V F I F P>
FR4

```

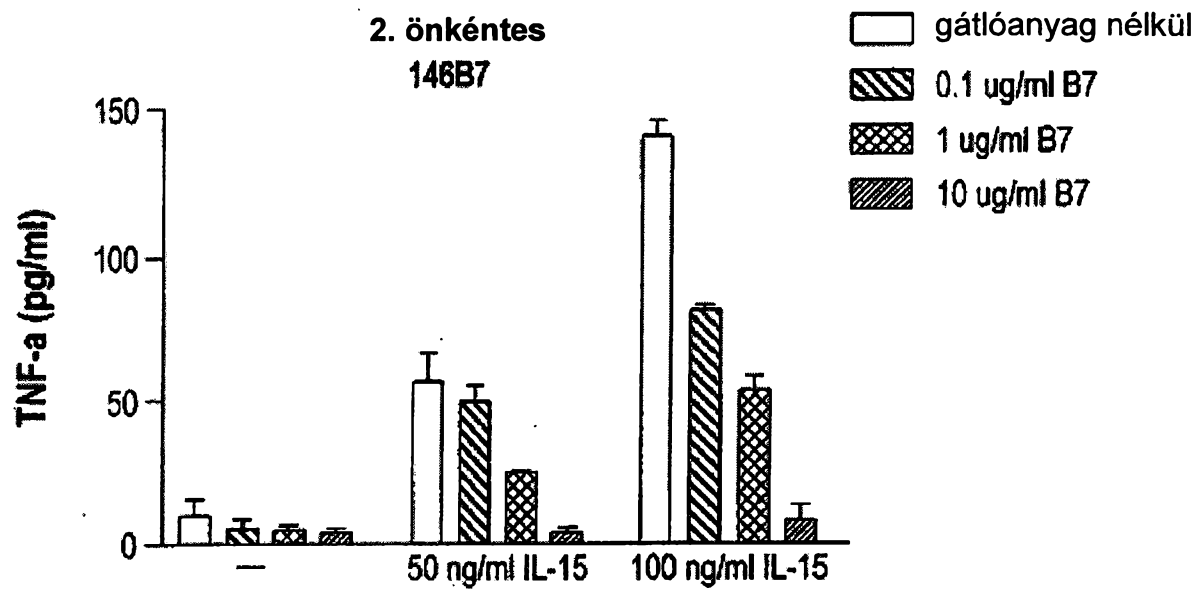
3. ábra



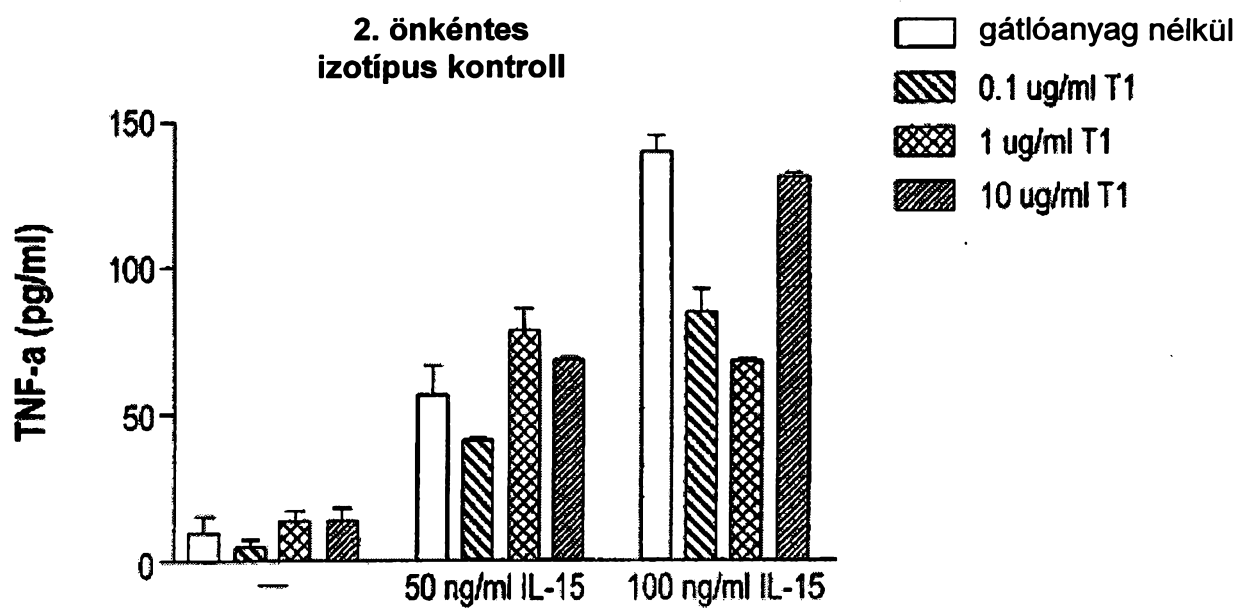
4a. ábra



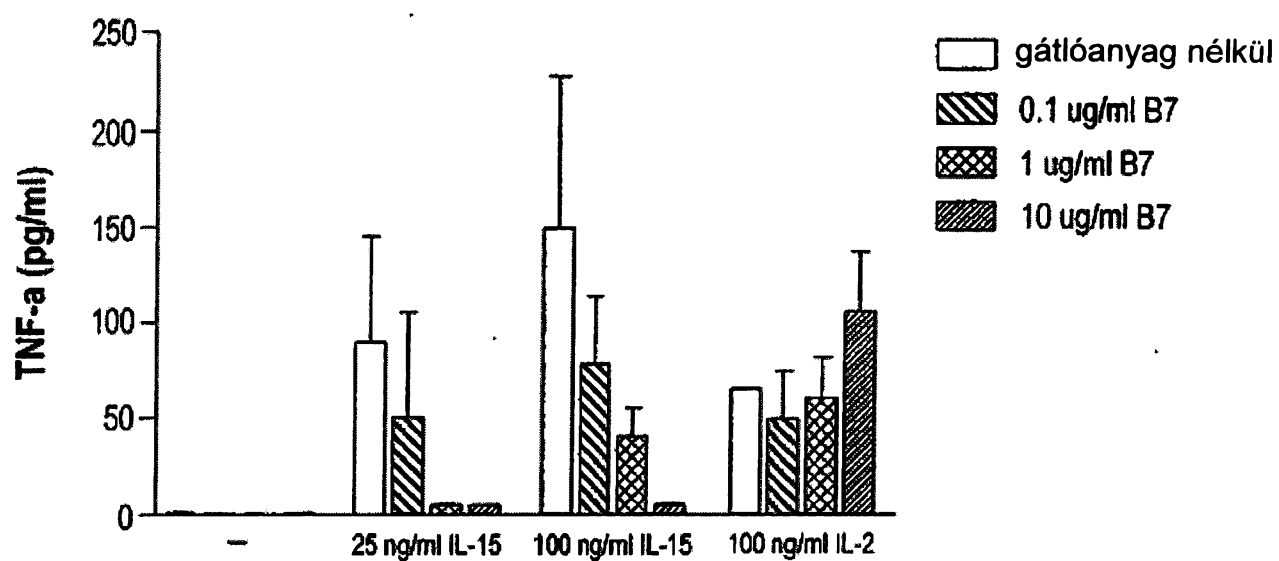
4b. ábra



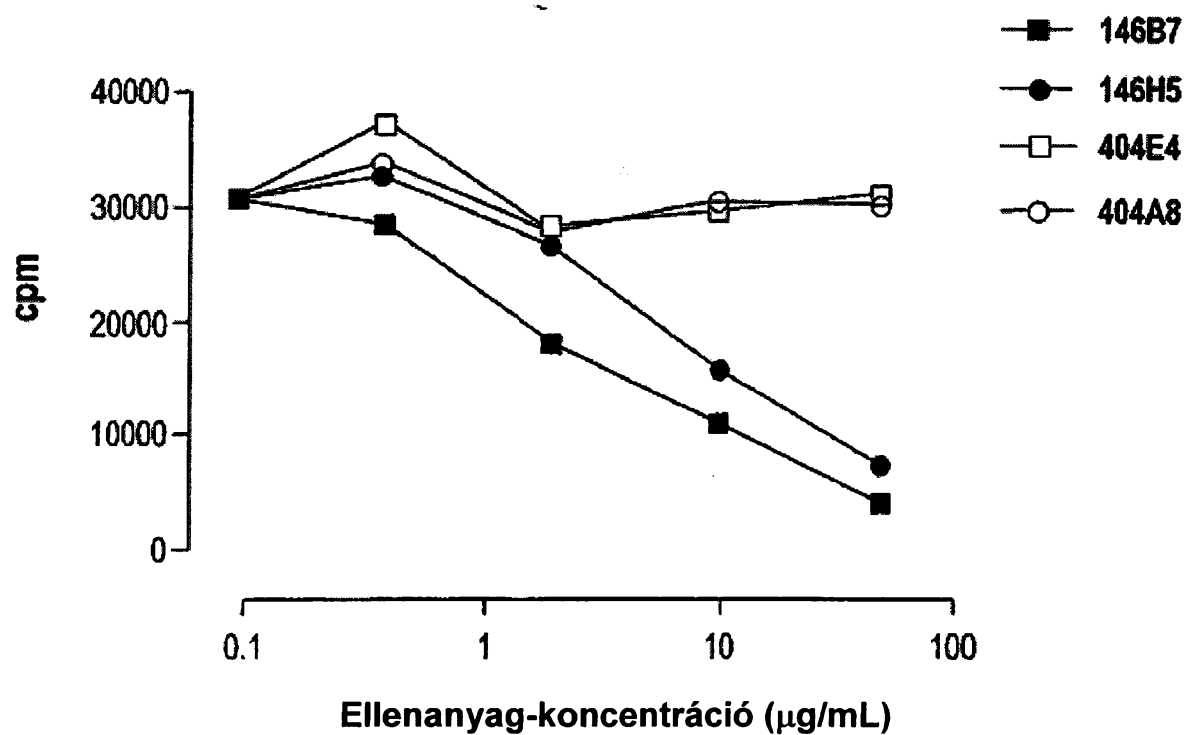
4c. ábra



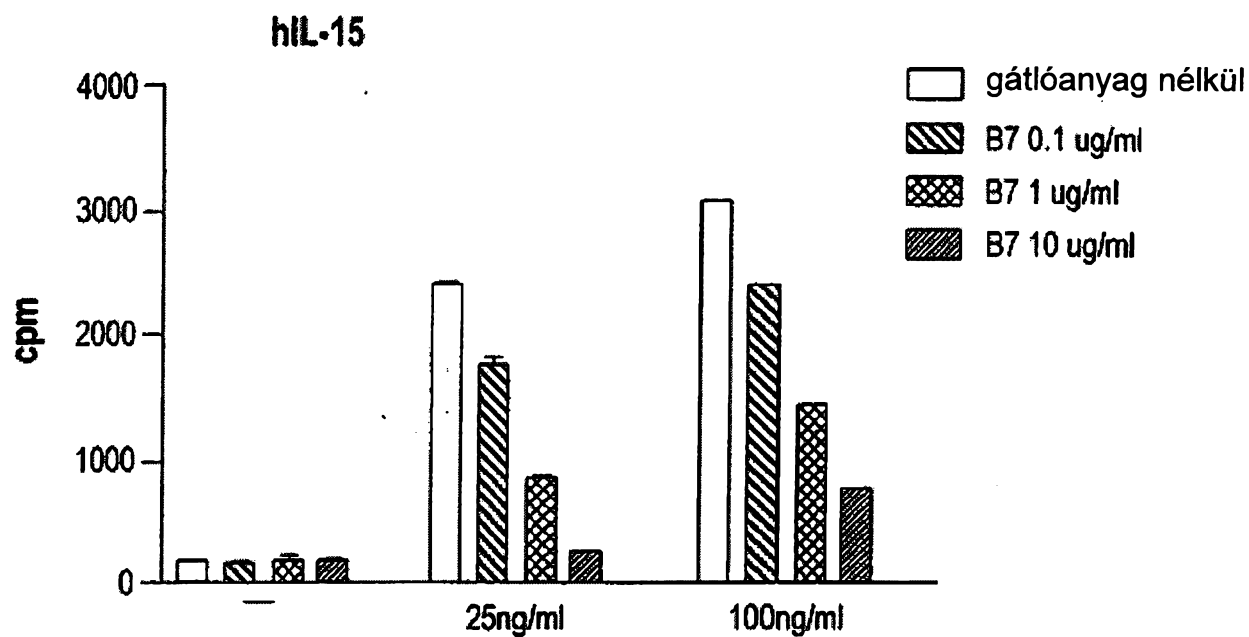
4d. ábra



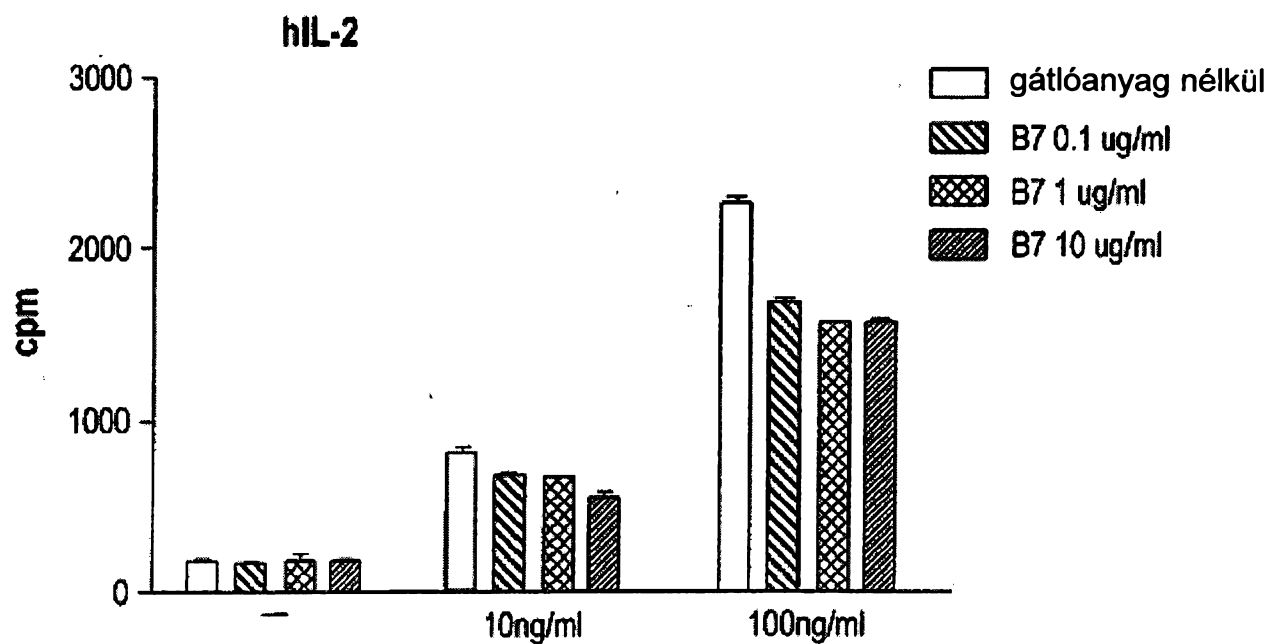
5. ábra



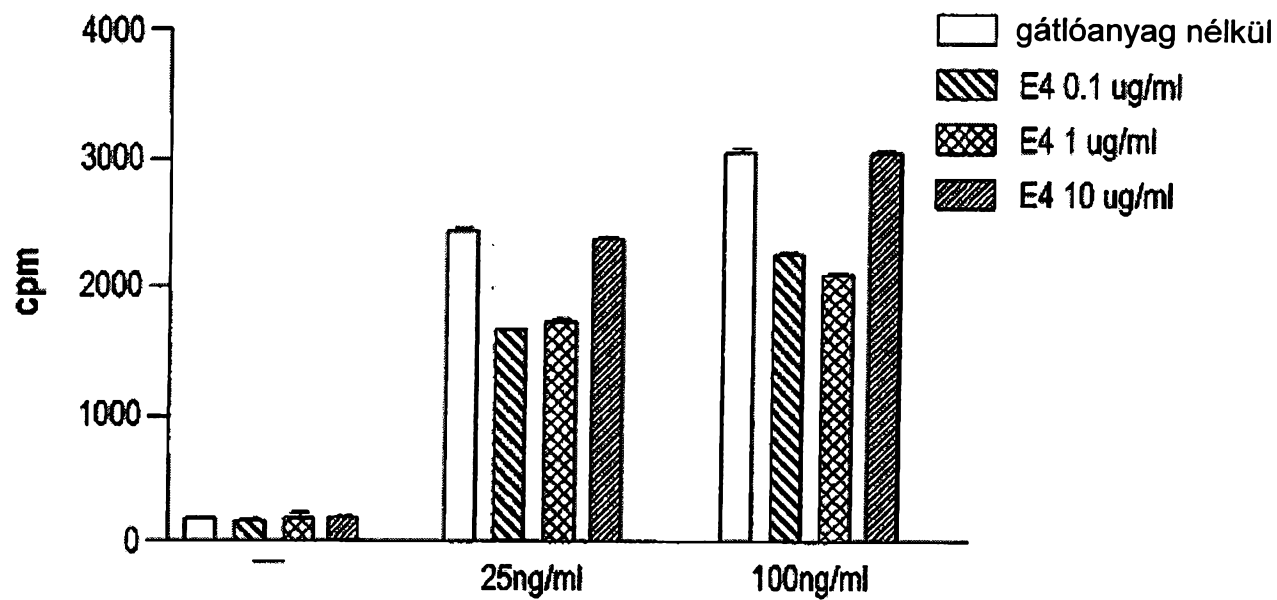
6. ábra



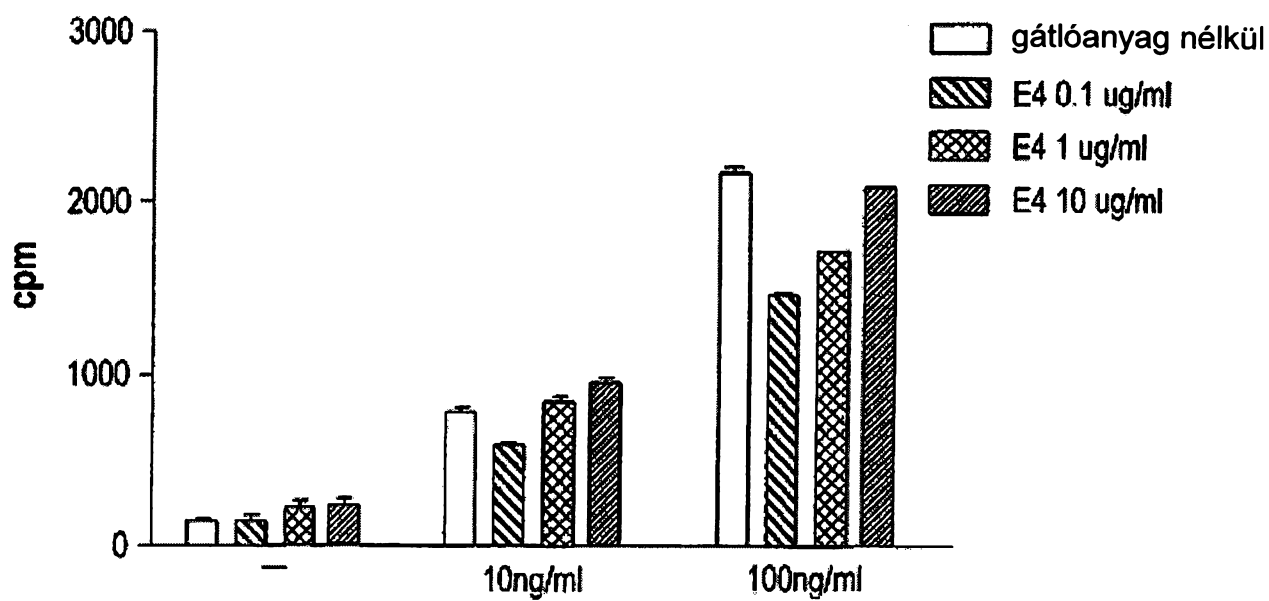
7a. ábra



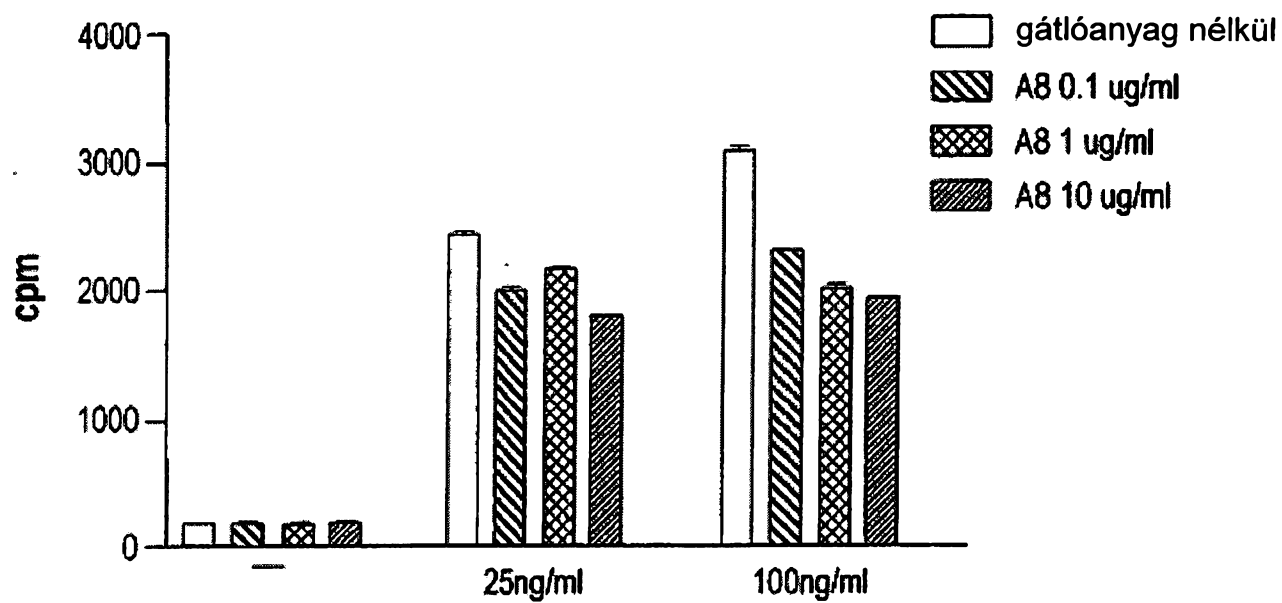
7b. ábra



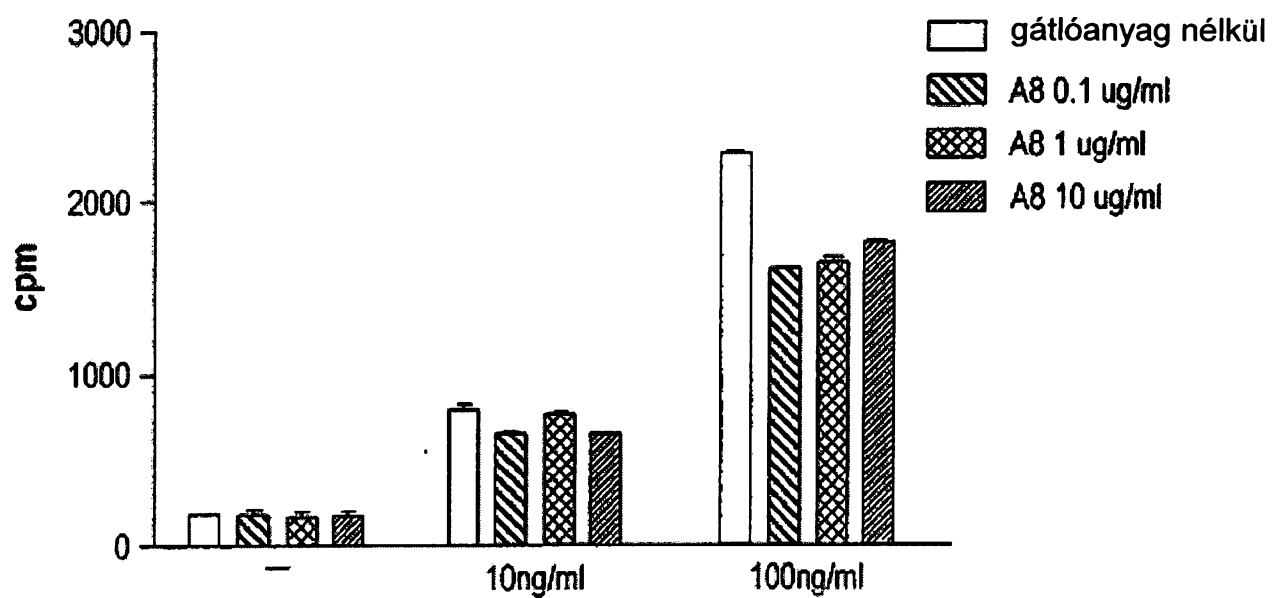
8a. ábra



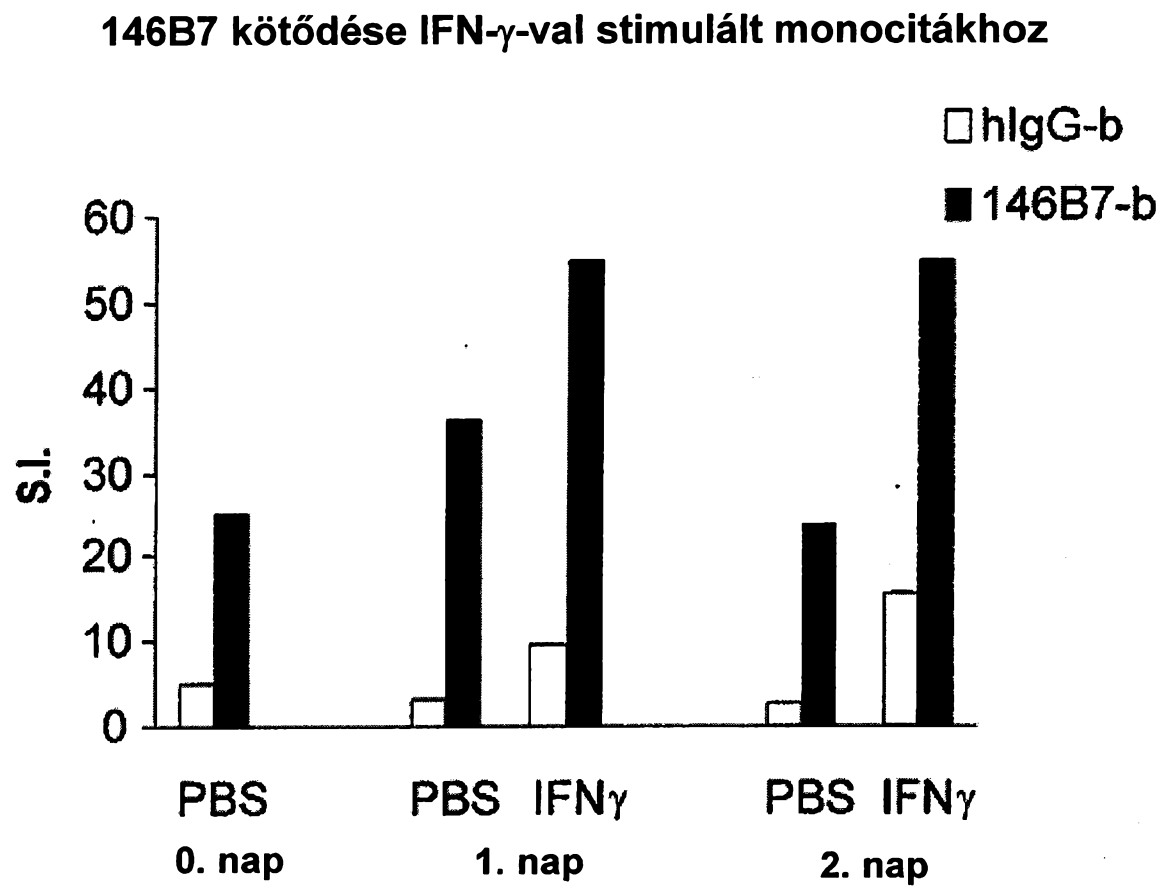
8b. ábra



9a. ábra

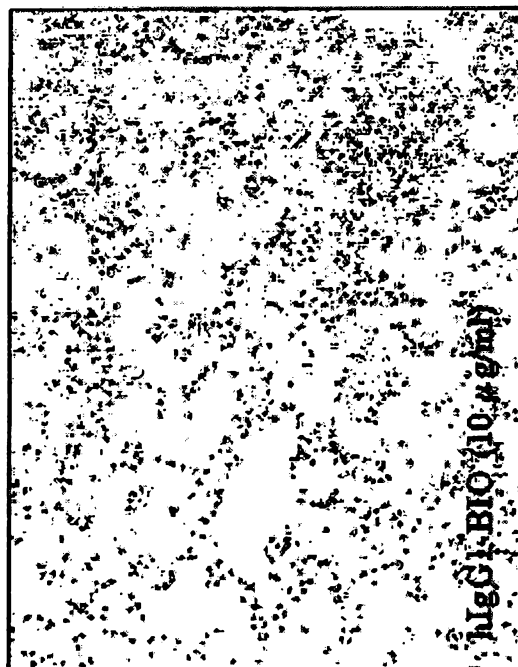


9b. ábra

**10. ábra**



11b. ábra



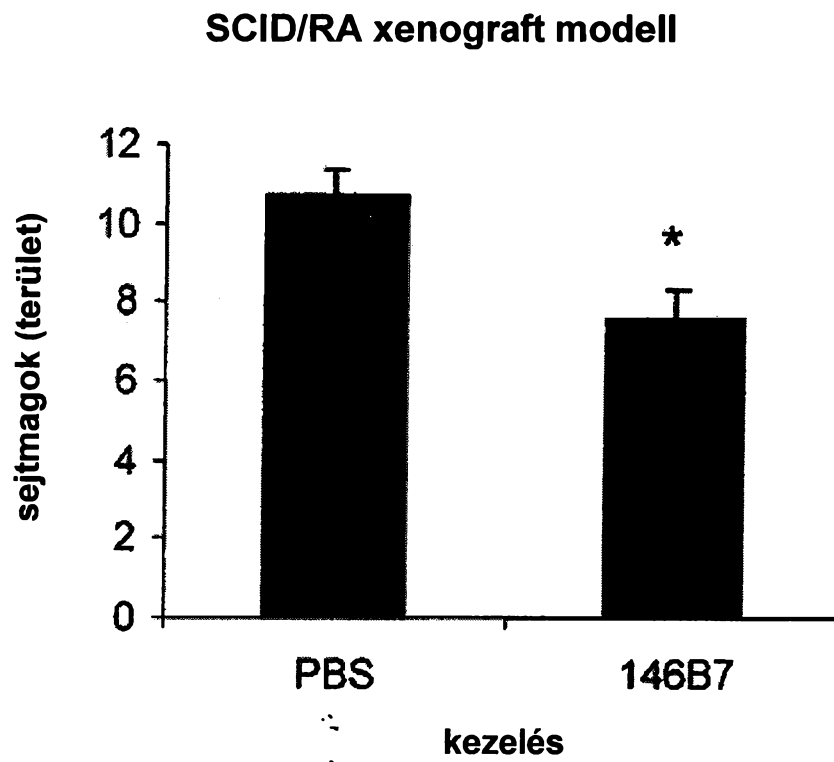
11a. ábra



12b. ábra

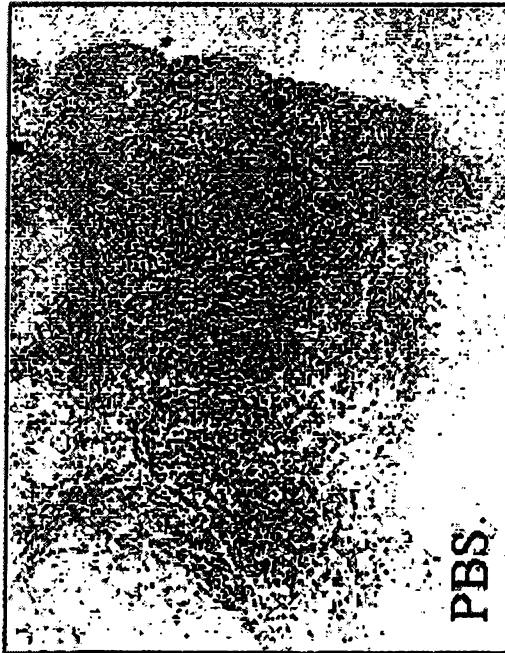


12a. ábra

**13a. ábra**

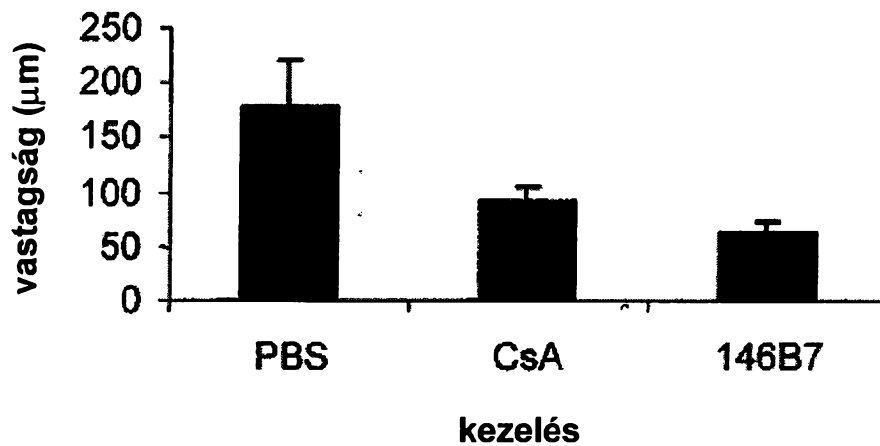


13c. ábra



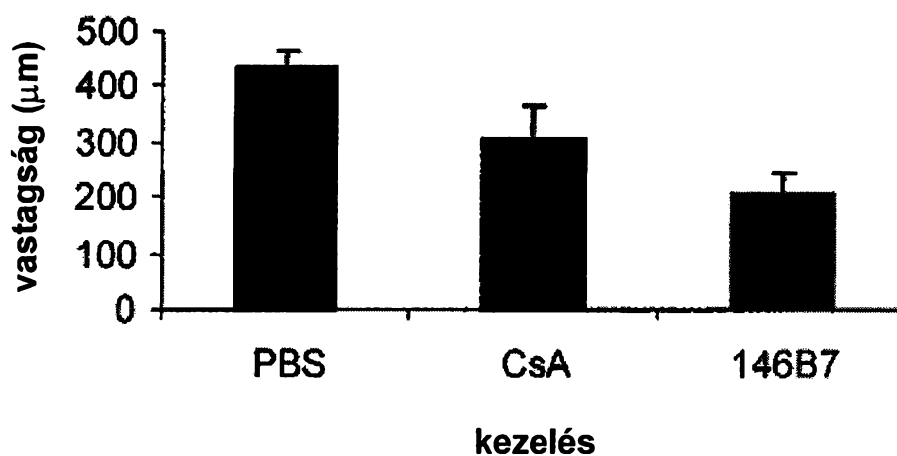
13b. ábra

A 146B7 hatása az epidermis a stratum corneum és a hámcsapok kezdete között mért vastagságára



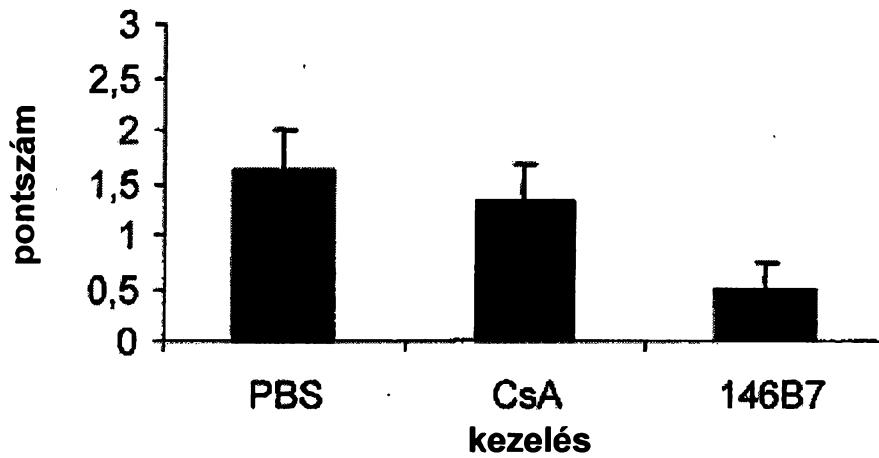
14a. ábra

A 146B7 hatása az epidermis a stratum corneum és a hámcsapok legalsó pontja között mért vastagságára



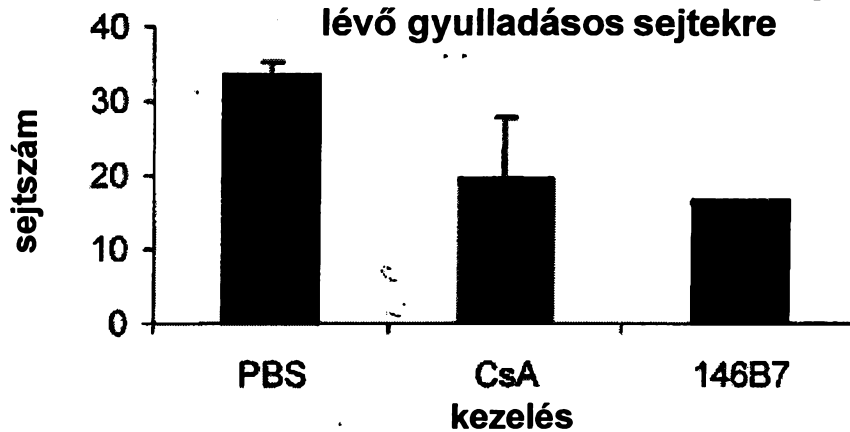
14b. ábra

A 146B7 hatása a parakeratosisra



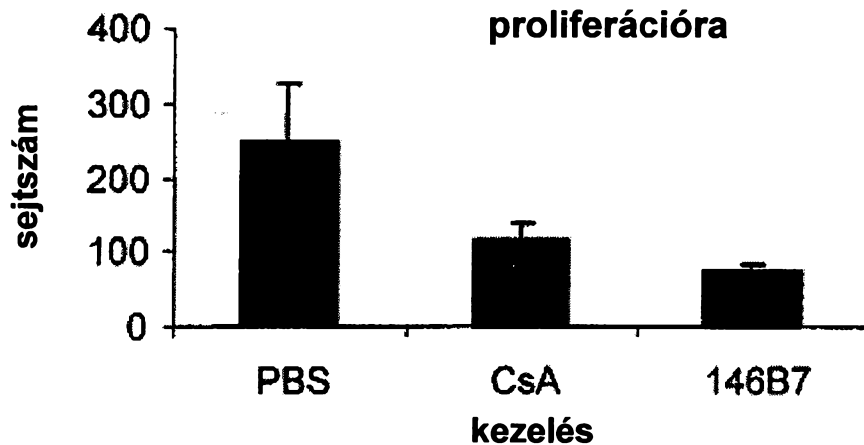
14c. ábra

**A 146B7 hatása a dermis felső rétegében
lévő gyulladásos sejtekre**



14d. ábra

**A 146B7 hatása a Ki-67+ keratinocita
proliferációra**



14e. ábra



PBS

15a. ábra



CsA

15b. ábra



146B7

15c. ábra



PBS

16a. ábra



CsA

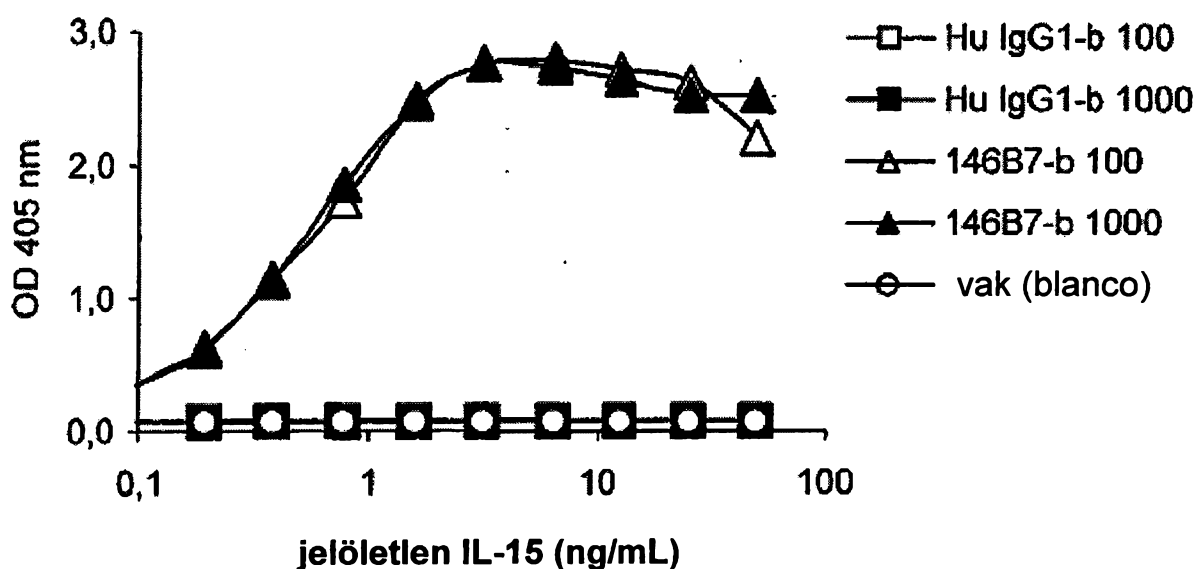
16b. ábra



146B7

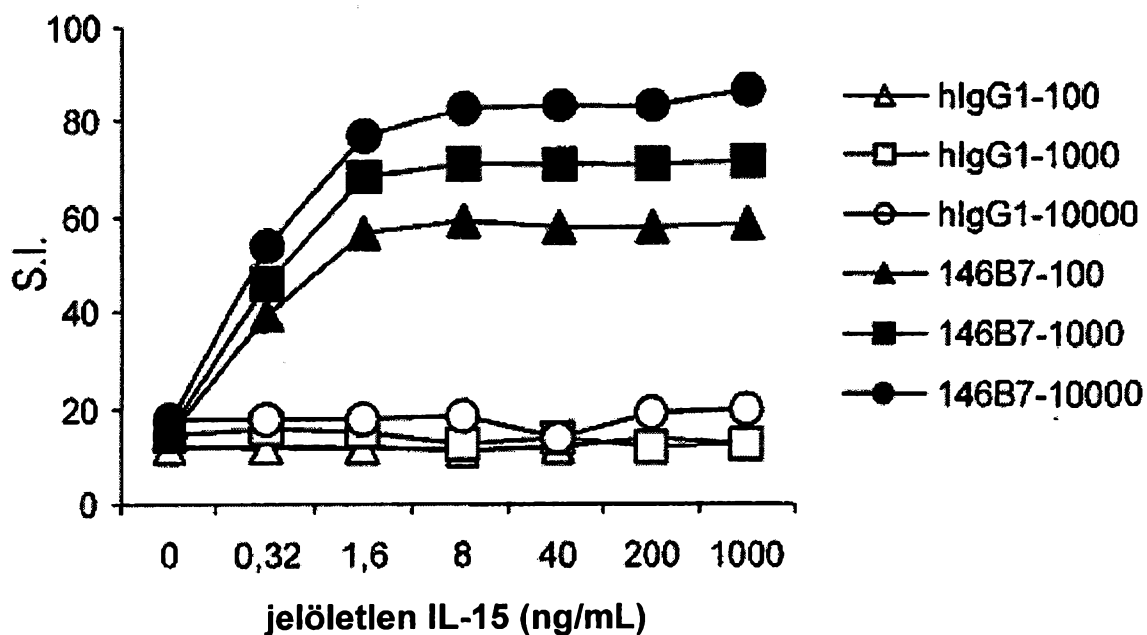
16c. ábra

**A 146B7 kötődése az IL-15/IL-15R α komplexhez
ELISA vizsgálat alapján**



17. ábra

**A 146B7 kötődése Raji sejteken lévő IL-15/IL-15R α
komplexhez**



18. ábra