

ALLOGÉN ÉS XENOGÉN FEHÉRJÉK ELLENI ANTITESTEK, EZEK
ALKALMAZÁSA A DIAGNOSZTIKÁBAN ÉS TERÁPIÁBAN, VALAMINT A
MEGHATÁROZÁSUKRA SZOLGÁLÓ ELJÁRÁSOK

ZETESIS S.P.A., Milánó, Olaszország

A bejelentés napja: 1995. 10. 30.

Elsőbbsége: 1994. 11. 04. (002238 MI94A) Olaszország

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP95/04239

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/14340

KIVONAT

A találmány olyan természetes antitestek kimutatására szolgáló diagnosztikai eljárásokra vonatkozik, amelyek felismerik az emlős szervekből extrahálható körülbelül 14 kD molekulatömegű fehérjéket, melyek tumorelleses aktivitással rendelkeznek, ha xenogén fajoknak adják be őket.

A találmány tárgyát képezik továbbá a nevezett természetes antitestek tisztított formában és ezek alkalmazása a diagnosztikában és terápiában.

Edin

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A

KÉPVISELŐ:

DANUBIA SZABADALMI ÉS

VÉDJEGY IRODA KFT.

BUDAPEST

**ALLOGÉN ÉS XENOGÉN FEHÉRJÉK ELLENI ANTITESTEK, EZEK
ALKALMAZÁSA A DIAGNOSZTIKÁBAN ÉS TERÁPIÁBAN, VALAMINT A
MEGHATÁROZÁSUKRA SZOLGÁLÓ ELJÁRÁSOK**

ZETESIS S.P.A., Milánó, Olaszország

Feltaláló:

BARTORELLI Alberto, Milánó, Olaszország

A bejelentés napja: 1995. 10. 30.

Elsőbbsége: 1994. 11. 04. (002238 MI94A) Olaszország

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP95/04239

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/14340

85591-4023-GI

A találmány olyan természetes antitestek kimutatására szolgáló diagnosztikai eljárásokra vonatkozik, amelyek felismerik az emlős szervekből extrahálható körülbelül 14 kD molekulatömegű fehérjét, melyek tumorelleses aktivitással rendelkeznek, ha xenogén fajoknak adjuk be őket.

A találmány tárgyát képezik továbbá a nevezett természetes antitestek tisztított formában és ezek alkalmazása a diagnosztikában és terápiában.

A WO 92/10197 sz. nemzetközi közzétételi irat olyan fehérje természetű anyagokat ismertet, amelyeket állati szervekből, különösen májból, perklórsavas és hipertóniás sóoldatokkal történő extrakcióval nyertek.

Az említett vegyületek közül egy kb. 14 kD molekulatömegű izoláltak és részlegesen szekvenáltak (MI 94001459 sz. olasz szabadalmi bejelentés), és kimutatták, hogy ez egy főfehérje, amely felelős a megfigyelt biológiai sajátosságokért, nevezetesen a tumorelleses hatásért és képes megnövelni a tumor-antigéneket felismerő antitestek számát, amikor eltérő fajú (fajtajú) állatoknak adják be, mint amelyből extrahálták.

Az említett olasz szabadalmi bejelentésben két monoklonális antitestet is leírtak, melyeket az European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) letéteményes szervnél (Porton Down, Salisbury, UK) 930806103 és 930806104 számon deponált hibridómák termelnek, és amelyek felismerik a tumor-antigének közös epitópjait és a fent említett, kecskemájból izolált 14 kD-os fehérjét (melyre az alábbiakban

UK 114-ként hivatkozunk), melyet antigénként használtak a hibridóma készítményben.

Vizsgálataink során úgy találtuk, hogy olyan természetes antitestek keringenek az emlősök szérumban, amelyek felismerik a szervekből (különösen a májból) extrahálható, a fent leírt tulajdonságokkal rendelkező és a szolid humán tumorok körülbelül 93 %-ában jelenlévő, allogen és xenogén fehérjét egyaránt. Ezek az antitestek, melyek normális esetben az egészséges állatok vagy emberek szérumban alacsony titerben ($<1/100$) fordulnak elő, a megfelelő antigén injektálásával stimulálhatók, és a titer jelentős megnövekedése által a tumorsejtekkel szemben citotoxikus hatásokat képesek előidézni a szérumban.

A megfigyelt eredmények és a természetes anti-UK 114 antitestek jelenlétének lehetséges bemutatásától függetlenül, amely bemutatás irreveláns a jelen találmány érvényessége szempontjából, a nevezett antitestek és kimutatásuk felhasználható diagnosztikai, prognosztikai és terápiás célokra.

A fentiek alapján tehát a találmány egy, a természetes anti-UK 114 antitestek immunológiai kimutatására szolgáló eljárásra vonatkozik. A találmány tárgyát képezik továbbá a tisztított anti-UK 114 antitestek és ezek felhasználása a diagnosztikában, terápiában és immuncitokémiában. A természetes antitestek detektálására szolgáló eljárások a szokásosak és direkt, kompetitív vagy "szendvics" típusú reakciókon alapulhatnak. Az eljárási protokollokban vagy szilárd hordozókat, vagy immunkicsapásos technikákat

alkalmazhatunk. Az immunvizsgálatokban felhasznált anti-testeket és/vagy UK 114-típusú antigéneket jelezhetjük alkalmasan enzimekkel (például az ELISA technikákhoz) vagy radioaktív vagy fluoreszcens vegyületekkel, festékekkel vagy pigmentekkel és hasonlókkal. Az immunkomplex jelét adott esetben a biotin-avidin rendszer segítségével felerősíthetjük.

Az alkalmazott módszer és az ehhez tartozó anyagok kiválasztása a területen jártas szakember számára jól ismert.

Továbbá azt találtuk, hogy az anti-UK 114 antitestek, melyek a WO 92/10197 számú dokumentumban leírt fehérjékkel vagy a tisztított UK 114 fehérjével kezelt betegek szérumában jelen vannak, *in vitro* és *in vivo* citotoxikus és citolitikus aktivitást mutatnak a humán tumorsejtekkel szemben. A találmány tárgya továbbá tehát egy citolitikus és citotoxikus kompozíció, amely monoklonális vagy poliklonális antitesteket vagy hiperimmun szérumokat tartalmaz, melyeket állatok vagy emberek olyan fehérjékkel való immunizálásával termeltünk, melyek kecskemájából perklórsavval extrahálhatók és amelyeket az ECACC-nél 930806103 vagy 93806104 deponálási számon letétbe helyezett hibridómák által kiválasztott monoklonális antitestek felismernek.

In vivo a citotoxikus aktivitás néhány nappal az antigén (UK 114 vagy UK 101) beadása után egy csúcsot ér el, majd az ezt követő hetekben lassan csökken. Az IgG típusú anti-UK 114 antitest-titer, ezzel ellentétben, ELISA-módszerrel követve lassanként növekszik az idő folyamán. Feltételezhető tehát, hogy a citotoxicitás első csúcsa az IgM-típusú antitesteknek

és/vagy egyéb, eddig még nem azonosított szérum-komponenseknek tulajdonítható.

Nyilvánvaló azoknak a módszereknek a jelentősége, amelyek lehetővé teszik az antitestek és/vagy a citotoxicitás meghatározását oly módon, hogy a terápia megfelelően nyomon követhető legyen.

A találmány szerinti természetes vagy monoklonális antitesteket beadhatjuk parenterálisan olyan dózisban, amely elegendő a citotoxikus hatás eléréséhez. A beadásra alkalmas módszerek lényegében azonosak azokkal, melyek a vakcinák, antitestek vagy hiperimmun szérumok beadására már ismertek. A jelen találmány és az alábbi 2-4. példák további útmutatást nyújtanak a fent ismertetett antitestek terápiás és diagnosztikai alkalmazásaira.

A következő példák a találmány további bemutatására szolgálnak.

1. példa

2,5 % SDS-t és 5 % merkapto-etanol-t adtunk 100 µl kecskemáj perklórsavas extraktumához (WO 92/10197; UK 101). A mintákat 5 percre 100 °C-ra melegítettük, és 4 µl-t SDS-PAGE-ban analizáltunk PHAST SYSTEM készülékben (Pharmacia) poliakrilamid 8/25 gradiens gél (Pharmacia) felhasználásával. Hasonlóképpen alkalmazhatunk nagysűrűségű homogén géleket is. Az elkülönült fehérjéket elektroforetikusan, egy Phast-Transfer készülékkel (Pharmacia) átvittük nitrocellulóz membránra. A membránt előzőleg ekvilibráltuk Tris (25 mM) glicin (192 mM) pufferrel, amelyhez 20 % metanol-t adtunk. A

futtatást 20 percen keresztül 5 V-tal ($I \text{ A/cm}^2$) kiviteleztek. Ezután a membránt - az aspecifikus kötődés megelőzésére egy telítési szakaszt követően - a szérummal inkubáltuk a vizsgálat alatt.

Az adott esetben jelenlévő antitest kötődését egy második anti-humán A₂b-vel detektáltuk, melyet kolorimetriás, radioimmunometriás vagy kemilumineszcens módszerek számára alkalmasan jeleztünk.

2. példa

Enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálatok (ELISA) UK 114 elleni antitestek kimutatására

A vizsgálatokban az alábbi puffereket használtuk:

- (A) 50 mM nátrium-hidrogén-karbonát pH 8,5,
- (B) 50 mM nátrium-foszfát pH 7,2,
- (C) 50 mM nátrium-foszfát pH 7,4, 0,1% (t/tf) NaN₃,
- (D) 40 mM nátrium-foszfát pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,02% (t/tf) NaN₃, 0,05 (tf/tf) Tween 20,
- (E) 50 mM nátrium-foszfát pH 7,4, 0,1% (t/tf) NaN₃, 0,1% (t/tf) BSA,
- (F) 50 mM nátrium-foszfát pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% (t/tf) NaN₃, 0,5% (t/tf) BSA proteáz-mentes, 0,05% (tf/tf), Tween 20, 0,%% (tf/tf) normál kecske szérum.

3,5 mg UK 114 A pufferrel készített 3,5 ml oldatát 9 μ l NHS-LC biotinnal (S.p.A., Milano) 2 mg/ml dimetil-szulfoxid-ban összekevertük. Az elegyet 3 órán keresztül 22 °C-on inkubáltuk, és 24 órán keresztül 4 °C-on Spectrapor 6

dializáló csőben (vágási érték 3500 D) némileg módosított B pufferrel szemben dializáltuk.

A mikrotiter-lemez üregeit bevontuk 100 µl BSA-biotinnal (5 µg/ml C pufferben) 24 órán át 4 °C-on, majd mostuk és 100 µl sztreptavidinnel (5 µg/ml E pufferben) kezeltük. Egy második, egy éjszakán át tartó 4 °C-os inkubálás után az üregeket átmostuk, és 100 µl UK 114-biotinnal különböző koncentrációkban (2, 1 és 0,5 µg/ml E pufferben) 24 órán át 4 °C-on kezeltük. Mosás után az üregeket blokkoltuk.

Bevonat nélküli antigén üregeket készítettünk ezt követően ugyanilyen eljárással, azzal az eltéréssel, hogy a harmadik inkubációs lépésben E puffert alkalmaztunk UK 114-biotin oldat helyett.

A mosási lépést üregenként 300 µl D puffer hozzáadásával kivitelezte három alkalommal. A blokkolást 300 µl 10 % szacharózt és különböző blokkoló szereket tartalmazó C pufferrel valósítottuk meg: 1 % és 5 % marha szérum albumin, 1 % glicin, 1 % BSA 3 % polivinil-pirrolidonnal, 5 % normál kecske szérum. Szobahőmérsékleten 30 perces blokkolás után az oldatot eltávolítottuk, és az üregeket vákuum kamrában kiszárítottuk, majd polietilén és alumínium fóliába csomagolva 4 °C-on tároltuk.

ELISA vizsgálat

Vizsgálat előtt a szérummintákat és a kontrollt 1:21 arányban hígítottuk F pufferral. A minták és a standard oldatok (1, 2, 4 és 8 U/ml F pufferben) 100 µl-ét hozzáadtuk a bevont üregekhez és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten sík

rázógépen (400-500 rpm) inkubáltuk. Ezután az üregeket négyszer 300 µl D pufferral átmostuk, ezt követően 100 µl 1:3000 hígítású, Stabilgen pufferben feloldott kecske anti-humán IgG torma-peroxidázzal jelzett antitestet adtunk hozzá. Egy órás, szobahőmérsékleten, sík rázógépen (400-500 rpm) végzett inkubálás után a lemezeket mostuk, és 100 µl Blue Star oldat (H_2O_2 /TMB) felhasználásával kifejlesztettük. Szobahőmérsékleten (18-24 °C) 15 percig tartó inkubálás után a reakciót 100 µl 1 M kénsav hozzáadásával leállítottuk, és az optikai sűrűséget (OD) egy kettős hullámhosszúságú fotométer segítségével 450 nm-en és referencia hullámhosszként 630 nm-en leolvastuk.

Azokat a mintákat, melyek OD-értéke nagyobb volt mint a 8 U/ml standard, tovább hígítottuk mielőtt vizsgáltuk.

A minta koncentrációját a standard görbéből kalkuláltuk.

A titer meghatározása immunterápiás kezelésen átesett betegekben

Az UK 101 terápiában részesült betegekben mért anti-UK 114 antitest titerek kiértékelése azt mutatta, hogy a mellrákban szenvedő betegek 28 %-ánál és a vastagbél tumorban szenvedő betegek 46 %-ánál az antitestválasz magasabb, mint a háttér érték 15 nappal az UK 101 kezelés után (4 szubkután injekció). Az UK 101 terápia kezdetétől számított 40 nap múlva az anti-UK 114 antitest titer növekedését a vastagbél- és a mellrákban szenvedő betegek 63, illetve 97 %-ánál lehetett detektálni (lásd 1. és 2. ábra).

3. példa

Az anti-UK 114 antitestek citotoxikus hatása tumor sejtvonalakon

KATO-III (gyomor karcinóma) és NICH (kissejtes tüdő karcinóma) tumor sejtvonalakot, illetve monoklonális antitesttel, melyet a P3D1DII jelű hibridóma (ECACC-nél 930806103 számon deponálva) szekretált és anti-UK 114 (rAb) nyúl poliklonális antitesttel végzett, közvetett immunfluoreszcencia által felületi festésre pozitív és negatív vonalakat használtunk a citotoxikus vizsgálatokhoz. A citotoxicitást a sejtvonalakból felszabaduló ^{51}Cr százalékaiban adtuk meg, melyeket eltérő ideig inkubáltunk különböző koncentrációjú mAb P3D1DII, Rb anti-UK 114 Ab vagy a kontrollként használt, nem-rokon monoklonális vagy poliklonális antitesttel, heterológ (tengeri malac) vagy homológ komplement forrás jelenlétében vagy tisztított humán monociták jelenlétében. Úgy találtuk, hogy mind az mAb P3D1DII, mind az anti-UK 114 rAb indukálnak, a nem-rokon kontroll antitestek azonban nem indukálnak a KATO-III-ban egy komplement-függő citotoxicitást, amely hiányzik, ha hővel inaktiválunk, vagy C9 deficiens szérumot alkalmazunk komplement-forrásként. A citotoxicitás helyreállt, amikor a C9 deficiens szérumot tisztított C9-cel kiegészítettük. Továbbmenően az Rb anti-UK 114 Ab indukált, a nem-rokon Rb Ab azonban nem indukált antitest függő celluláris citotoxicitást (ADCC), amikor KATO-III-t használtunk célmolekulaként. Az anti-UK 114 Ab preabszorpciója tisztított antigénnel megszüntette az antitest-indukált citotoxicitást. Ezzel

ellentétben, sem komplement citotoxicitást sem ADCC-t nem figyeltünk meg NICH-en. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az anti-UK 114 antitestek rendelkeznek egy potenciális komplementaritással és antitest-sejt függő citotoxicitással a tumor sejtvonalakkal szemben, melyek az UK 114 antigént a felületükön expresszálják.

4. példa

Az anti-UK 114 antitestek in vivo citotoxicitása csupasz egereken humán tumor sejtvonalak xenográf implantációval történő bevitele után

Csupasz egerekbe s.c. 1×10^6 HT29 humán colon adenokarcinóma sejteket implantáltunk. Nyolc órával később az egerek a daganatos oldalon kaptak egy 0,2 ml anti-UK 114 nyúl hiperimmun (1/12 titer) szérum injekciót, melyet nyulak UK 114 immunizálásával nyertünk. A kezelést a beadás utáni 7., 11., 14., 18., 21. és 25. napon megismételtük. Az egerek egy másik csoportját hasonló módon kezeltük olyan tumoros betegekből nyert szérumokkal, akik klinikailag válaszoltak az UK 114 kezelésre és anti-UK 114 Ab-t termeltek.

A kontroll csoport csak hordozót kapott. A kezelt csoportok az élettartam megnövekedésében statisztikus szignifikanciát mutattak és csökkent a tumor megjelenése. A tumor lappangási ideje szintén figyelemreméltóan meghosszabodott a kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz viszonyítva. A példa eredményeit, melyeket nyúl szérummal és humán szérummal kaptunk, az alábbi 1. táblázatban közöljük.

1. táblázat

Kezelés	Tumor megje- lenése	Látencia (nap)	Túlélés (nap)
Kontroll	12/12	9	30

Nyúl anti-UK			
114 szérum	2/12	28	84

Humán anti-UK			
114 szérum	5/20	23	67

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás természetes antitestek immunológiai kimutatására, melyek felismernek egy emlős szervekből extrahálható, az ECACC-nél 930806103 vagy 93806104 deponálási számon letétbe helyezett hibridómák által szekretált monoklonális antitestek által felismert fehérjét és a humán szolid tumorok kb. 93 %-ában jelen vannak, *azzal jellemezve*, hogy kimutatunk egy, az említett antitestek és az említett - adott esetben jelzett - fehérjék közötti immunkomplexet.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az immunkomplexet egy második jelzett anti-species antitesttel mutatjuk ki.
3. Természetes antitestek, melyek felismerik az emlős szervekből extrahálható, az ECACC-nél 930806103 vagy 93806104 deponálási számon letétbe helyezett hibridómák által szekretált monoklonális antitestek által felismert fehérjéket és a humán szolid tumorok kb. 93 %-ában jelen vannak.
4. Citotoxikus kompozíciók, *azzal jellemezve*, hogy állatok vagy emberek immunizálásával termelt antitesteket vagy hiperimmun szérumokat tartalmaznak, ahol kecskemájból perklórsavval extrahálható és az ECACC-nél 930806103 vagy 93806104 deponálási számon letétbe helyezett hibridómák által

szekretált monoklonális antitestek által felismert
fehérjékkel immunizálunk.

13 oldal
+ 1 tábla.

14 oldal

A meghatalmazott:

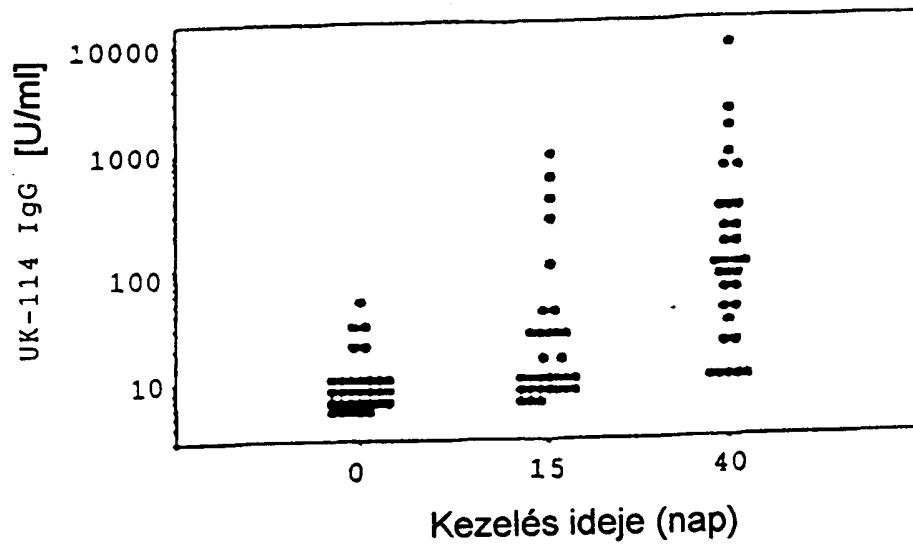
DANUSIA
Szabadalmi és Patológiai Iroda Kft.
S.



Fedru.

**KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY****1. ábra**

Anti-UK 114 antitest-növekedés colon karcinómában
szenvedő betegeknél UK 101 terápia során

**2. ábra**

Anti-UK 114 antitest-növekedés mellrákban szenvedő
betegeknél UK 101 terápia során

