

ELJÁRÁS BISPECIFIKUS MONOKLONÁLIS ANTITEST ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japán

A bejelentés napja: 1989.12.22.

Elsőbbségei: 1988.12.27. (332194-1988)

1989.01.26. (018560-1989)

-53153-

J a p á n

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A

KIVONAT

A találmány tárgya ^{eljárás} egy ansamitocin származék és egy megcélzott antigén, főleg tumorhoz ^{kapcsolódó} antigén elleni bispecifikus monoklonális antitest, ^{előállítására} amely képes egy ansamitocin származékot a céltól eltérő helyen stabil és inaktív formában szállítani és a célnál az aktív ansamitocin származékot felszabadítani, úgy hogy a bispecifikus monoklonális antitest és az ansamitocin származék felhasználásával nagyon hosszan ható és szelektív, kevés káros hatással rendelkező rákellenes szer állítható elő.

Földvár

6763/Pg

19034 / 90

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGYIRODA

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A

Nº 5 C 12 P 21 / 08.
A 61 K 39 / 395

-53153-

ELJÁRÁS BISPECIFIKUS MONOKLONÁLIS ANTITEST ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japán

Feltalálók:

IWASA Susumu, Kyoto

HARADA Kaori, Osaka

TOYODA Yukio, Hyogo

J A P Á N

A bejelentés napja: 1989.12.22.

Elsőbbségei: 1988.12.27. (332194-1988)
1989.01.26. (018560-1989)

J a p á n

68606-5372-GI

A jelen találmány tárgya eljárás bispecifikus hibrid monoklonális antitest előállítására. Pontosabban, a jelen találmány tárgya egy olyan hibrid monoklonális antitest (a továbbiakban mint hibrid MoAb-ra hivatkozunk rá), amely bispecifikus egy ansamitocin származékra és egy cél-antigénre, azaz egy rákos sejt felületi membránján levő, tumorhoz kapcsolódó antigénre nézve, valamint az ezt előállító polidóma.

A jelen találmány továbbá egy olyan rák-kezelésre vonatkozik, amely során az említett MoAb-ot használjuk arra a célra, hogy specifikusan kapcsoljon egy ansamitocin származékot egy rákos sejthez, hogy a rákos sejtet ezáltal elpusztítsuk.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábrán az antitest hígítási görbét látjuk, amelyet úgy kapunk, hogy az 1. példa szerint előállított AS6-44.9 anti-ANS antitestet az 1. referencia példában leírt ELISA módszernek vetjük alá. A 2. ábrán ugyanennek az AS6-44.9 antitestnek ANS-sel (1 ng/ml) szembeni neutralizáló aktivitását látjuk. A 3. ábrán a 2. példában előállított ATF1-170 hibrid antitest bispecifikus antitest aktivitását látjuk. A 4. ábrán a 3. példában előállított ATF1-170 tetraóma által termelt immunoglobulin hidroxilapatit oszlop elúciós görbéjét látjuk a 280 nm-en mért elnyelés alapján. Az 5. ábrán a 3. példában előállított anti-ANS-anti-hTfR bispecifikus antitest citotoxicitási vizsgálatának eredményeit látjuk. A 6. ábrán az RCAS1-488 tenyészet felülúszójának antitest hígítási görbéjét látjuk.

Az ansamitocint, amely egy jelentős antitumor aktivitással rendelkező hatóanyag, egy aktinomyces (*Nocardia* nemzetség) fermentációs termékei között fedezték fel [E.Higashide et al.: *Nature*, 270 721 (1977)]. Jóllehet egy ansamitocin analógot, a maytansint (a továbbiakban a rövidítése MAY) már korábban felfedezték mint egy növényi eredetű antitumor anyagot [S.M.Kupchan et al.: *Journal of the American Chemical Society*, 94, 1354 (1972)], mégis több figyelmet fordítottak az ANS-ra, amely bakteriális eredetű, mivel a MAY-ból előállítható mennyiség kevés. Mindkét anyagnak a hatásmechanizmusa hasonlít a vinka alkaloidokéra [például a vinkrisztinére (a továbbiakban VCR-nek rövidítjük)], azaz gátolja a mikrotubulusok képződését a tumorsejtekben, ezáltal fejtve ki citocid hatást. Az ansamitocin citotoxicitása 10-100-szor nagyobb mint az ismert rákellenes kemoterápiás hatóanyagoké (például a metotrexáté, daunomiciné); mint egy új típusú antitumor anyagot, az ansamitocint és származékait kémiai módosításokkal és mikrobiális átalakításokkal szintetizálták [A.Kawai et al.: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 2194 (1984); H.Akimoto et al.: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 2565 (1984); A.Kawai et al.: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 3441 (1984)]. Ezeknek az ansamitocin származékoknak in vitro és in vivo antitumor hatását tanulmányozva, MAY-t és VCR-t használva kontroll hatóanyagként, valamint a szubakut toxicitási vizsgálatok során, beleértve az emésztőrendszeri rendellenességeket és a neurotoxicitási vizsgálatokat is, számos ansamitocin származékról találták azt, hogy a hatékonyság és biztonság szempontjából jobbak mint a MAY és a VCR. Pontosabban, a I képletű 9-tio-maytansin jobb kemoterápiás koeficiens értéket mutatott

(toxikus mennyiség/ hatékony mennyiség) mint a MAY és a VCR.

Azonban az ANS erős citotoxicitása erős mellékhatásokat okoz; az ANS most ugyanabban a helyzetben van mint amilyenben a MAY volt, amelynek a fejlesztését leállították, mivel emésztőrendszeri rendellenességeket okozott és neurotoxikus hatása volt.

Másrészről azonban kifejlesztették a "célzott terápiás gyógyszereket", azaz olyan tumorellenes immunokomplexeket, amelyekben egy antitumor antitestet egy kemoterápiás hatóanyaghoz vagy egy biotoxinhoz kapcsolnak, azzal a céllal, hogy szelektíven pusztítsák a tumor-sejteket. Jellemzőjük az, hogy felismerik és kötődnek a tumor-sejteken levő tumor-specifikus antigénekhez illetve a tumorról kapcsolatos antigénekhez, gátolják a DNS szintézist, fehérje szintézist vagy mikrotubulus képződést ezekben a tumor-sejtekben és megölik őket. Ennélfogva a tumoros szervekre, szövetekre és sejtekre specifikusak és csekély káros hatással rendelkeznek a normál sejtekre. Néhány antitest-hatóanyag vagy antitest-toxin komplexet már bevezettek a klinikai gyakorlatba, néhány biztató eredménnyel. Azonban az antitest aktivitása vagy a hatóanyag illetve a toxin farmakológiai aktivitása gyakran lecsökken, mivel kémiai kötési reakció van az antitest és a hatóanyag illetve a toxin-fehérje között; várható hogy hatékonyabb szelektív antitumor anyagokat fognak kifejleszteni.

Részletesebben, az alacsony molekulatömegű antitumor anyagoknál számos probléma van, például:

- (1) egy megfelelő funkcionális csoportot kell használni egy antitesthez való kötésre
- (2) egy antitesthez való kémiai kötődés nagyobb

hatással van az aktivitásra mint egy toxikus fehérjénél, és a farmakológiai aktivitás rendszerint egy tizedére-egy századára vagy még kisebbre csökken, és így

- (3) különleges körülményeket kell biztosítani, amelyek között az antitest-hatóanyag komplex kapcsoló része lehasítható a tumorsejtekben.

Ezzel a technikai háttérrel vizsgálatokat folytattunk új típusú antitest-hatóanyag komplex kifejlesztésére, oly módon, hogy az ANS-t, amely jelentős citotoxikus aktivitással rendelkezik, egy antitumor antitesthez kötik, hogy tumor-specifikussá tegyék. Az ilyen antitest-hatóanyag komplex előállítása során várható volt a fenti problémák előfordulása. A szokványos módszerekből, azaz a kémiai kapcsolási reakciók használatából származó problémák közé tartozik:

- (1) a hatóanyag antitumor aktivitásának lényeges csökkenése, valamint az antitest-antigén kapcsolódás aktivitásának csökkenése,
- (2) homopolimer melléktermékek keletkezése az antitestek között, amelyek szelektív antitumor anyagként semlegesek, vagy nagy molekulájú polimerek képződése, amelyek in vivo nem hasznosak, mivel könnyen metabolizálódnak,
- (3) nehézségek az antitesthez kapcsolódó hatóanyag molekulák számának szabályozásában, lehetetlenné téve ezáltal hogy állandó minőségű antitest-hatóanyag komplexet állítsunk elő, és
- (4) nehézségek a legjobb terápiás koefficienssel

rendelkező hatóanyag használatában, mivel az antitesthez kapcsolásra felhasználható hatóanyagok szelekcióját azokra korlátozza, amelyek megfelelő funkciós csoporttal rendelkeznek.

Az újabban kifejlesztett hibridóma előállítási technikák lehetővé tették újtípusú triómák, tetraómák és más poliómák előállítását [C. Milstein et al.: Nature, 305, 357 (1983); M.R.Suresh et al.: Proceedings of the National Academy of Science, USA., 83, 67989 (1986)], ezzel lehetővé téve új funkciókkal rendelkező bispecifikus antitestek előállítását [Japanese Unexamined Patent Publication No. 12276/1988 (Hybritech); US Patent No. 4,714,681 (University of Texas System Cancer Center)].

A problémák megoldásának módjai

Vizsgálatokat folytattunk a fentiekben leírt új technológia alkalmazásáról és kiterjesztéséről ezeknek a problémáknak a megoldására. Ennek eredményeképpen sikerült olyan hibrid MoAb-ot kifejleszteni, amely nem teszi szükségessé a kémiai kapcsolási eljárásokat az antitest és a hatóanyag molekula között, amely lényeges volt a szokásos antitest-hatóanyag komplexek előállításához, és amely lehetővé teszi olyan antitest-hatóanyag immunokomplex előállítását, amely megtartja mind az antitest, mind a hatóanyag teljes bioaktivitását; ezután a hibrid MoAb felhasználásával előállítottunk egy anti-humán-tumor fehérje komplexet. Ennek megfelelően a jelen találmány olyan polidóma előállítási eljárására vonatkozik, amely olyan bispecifikus hibrid MoAb-ot termel, amely specifikus mind az ansamitocin

származékokra mind a cél antigénekre, azaz a tumorsejt-membránon levő antigénekre.

A jelen találmány tárgya továbbá egy olyan tetraóma által előállított bispecifikus hibrid MoAb előállítási eljárása amelyet úgy kapunk, hogy fúzionáltatunk egy ansamitocin származékok elleni antitestet (a továbbiakban anti-ANS antitestnek rövidítjük) termelő hibridómát, és egy másik hibridómát, amely a cél antigének elleni antitestet termeli, valamint az ezt a hibrid MoAb-ot felhasználva előállított szelektív anti-humán-tumor fehérje komplex előállítási eljárása. A cél antigén lehet például humán transzferrin receptor (a továbbiakban csak hTfR-nek rövidítjük), amely gyakran expresszálódik a tumorsejtek membránján.

A jelen találmány szerinti bispecifikus hibrid MoAb-ot termelő polidóma előállítására egy anti-ANS-antitestet termelő hibridómát használunk, amelyet például az alább ismertetett módszerrel állíthatunk elő.

Egy ansamitocin származékkal először beoltunk egy állatot, hogy beindítsuk az anti-ANS antitest termelését. Ebben az esetben az ANS önmagában immunogénként való felhasználása rendszerint nem indukálja az antitest nagymennyiségben való termelését; ennél fogva egy megfelelő funkcionális csoporttal rendelkező ansamitocin származékot hordozó fehérjével, például szarvasmarha szérum albuminnal (a továbbiakban BSA-nak rövidítjük), vagy tiroglobulinnal konjugálva használjuk immunogénként, egy megfelelő funkciós csoporton keresztül, úgymint a PDM-3-C₂₀-karboximetil éter karboxil csoportján keresztül, vagy a II általános képlettel leírható maytansinol 3- α -aminofenil-acetát vagy PDM-3-C₂₀-p-aminobenzil éter

aminocsoportján keresztül.

Vegyület	R	Y	Q
PDM-3-C ₂₀ - -karboximetil éter	-COCH(CH ₃) ₂	-CH ₂ COOH	-OH
Maytansinol 3-α- aminofenil-acetát	-COCH(NH ₂)C ₆ H ₅	-CH ₃	-OH
PDM-3-C ₂₀ -p- aminobenzil éter	-COCH(CH ₃) ₂	-CH ₂ (C ₆ H ₄)NH ₂	-OH
9-tio-maytansin	-COCHCH ₃ N(CH ₃)COCH ₃	-CH ₃	-SH
MAY	-COCHCH ₃ N(CH ₃)COCH ₃	-CH ₃	-OH
ANS	-COCH(CH ₃) ₂	-CH ₃	-OH

Megjegyzés: PDM-3 jelentése 20-demetoxi-20-hidroxi-maytansinol
3-izobutirát

A használt állat lehet például nyúl, patkány, egér és tengeri malac; a MoAb előállításához különösen előnyös az egér használata.

A beoltást szokásos módszerrel végezhetjük. Például az immunogén anyagot 1-100 µg mennyiségben, előnyösen 10-25 µg-ot oltásonként, 0.1 ml fiziológiás sóoldattal és 0.1 ml komplett Freund adjuvánssal emulgeáljuk, majd ezután az állat hátába adjuk szubkután módon, vagy intraperitonálisan a hasüregébe, 3-6-szor 2-3 hetes intervallumokban.

Az immunizált állatok csoportjából, például egerekből, azokat választjuk ki amelyek magas antitest titerrel rendelkeznek. Az utolsó immunizálás után 3-5 nappal összegyűjtjük a lépeket vagy nyirokmirigyeket; a bennük levő antitest-termelő sejteket mielóma sejtekkel fúzionáltatjuk. A sejtfúziót ismert módszerekkel végezzük. A fuzogén anyagok közé tartozik például a polietilén-glikol (a továbbiakban PEG-nek rövidítjük) és a Sendai vírus; a PEG használata előnyös. A mielóma sejtvonalak közé tartozik például az NS-1, P3U1 és SP2/O; előnyös a P3U1 használata. Előnyös, ha az arány a splenociták és a mielóma sejtek között 1:1 és 1:10 között van. Ajánlott, hogy 1000-9000 molekulatömegű PEG-et adjunk hozzá 10-80% koncentrációban, az inkubálást 20-37°C-on végezzük, előnyösen 30-37°C-on, 3-10 percig.

Különböző módszerek használhatók az anti-ANS-antitestet termelő hibridómák szelektálására, beleértve az ELISA módszert, amely során a hibridóma tenyészetek felülúszóját olyan mikrotiter lemezekhez adjuk, amelyekre (maytansinol-3-α-aminofenil-acetát)-humán szérum albumin (a továbbiakban HSA-nak rövidítjük) komplexet adszorbeáltattunk; ezután torna-peroxidázzal (HRP) jelzett anti-egér immunoglobulin antitestet adunk a mikrotiter

lemezekhez, és a lemez szilárd fázisához kötődött anti-ANS monoklonális antitestet detektáljuk. Azokat a pozitív antitest aktivitást mutató hibridómákat amelyeket HAT-tal (hipoxantin-aminopterin-timidin) kiegészített táptalajon szelektáltunk és növesztettünk, azonnal tovább klónozzuk; a klónozást általában könnyen végrehajthatjuk határhígítási módszerrel vagy más módszerekkel. A klónozott hibridómák tenyésztése felülűszójának antitest titerét a fenti módszerekkel meghatározzuk hogy kiválasszuk azokat a hibridómákat, amelyek stabilan, magas titerrel termelnek egy antitestet, így állíthatjuk elő a keresett anti-ANS antitestet termelő hibridómát.

A fenti módszer szerint előállított és anti-ANS antitestet (IgG₁, lambda lánc) termelő hibridómák közé tartozik az AS6-44.9 egér hibridóma.

A tumorról kapcsolatos antigének mint cél antigének közé tartozik a hTfR, amely viszonylag gazdagon expresszálódik a különböző tumor sejtvonalakban. A hTfR-t humán placenta szövetből tisztíthatjuk ismert módszerekkel [P.A.Seligman et al.: Journal of Biological Chemistry, 254, 9943 (1979)]; a nagy tisztaságú mintát az alábbi módszerekkel állíthatjuk elő.

- (1) Humán placenta szövetet foszfáttal pufferelt sóoldatban (20 mmól dinátrium-foszfát, 0.15 mól NaCl; a továbbiakban PBS-nek rövidítjük), pH=7.5, 4% Triton-X-100-at tartalmaz, homogenizáljuk, majd szonikáljuk és centrifugáljuk.
- (2) A kapott felülűszót, miután ammónium-szulfáttal kisóztuk, olyan oszlopra visszük, amelyre humán transzferrin elleni antitestet kapcsoltunk és

alaposan mossuk foszfát pufferrel (20 mmól dinátrium-foszfát, a továbbiakban PB-nek rövidítjük), pH=7.5, 0.5 mól NaCl-t tartalmaz, majd a hTfR frakciót 0.5 mól NaCl-t és 0.5% Triton-X-100-at tartalmazó 0.02 mólos glicin pufferrel (pH=10.0) eluáljuk.

- (3) A kapott hTfR frakciót hTf-fel kapcsolt oszlopra visszük. Miután az oszlopot 1 mólos NaCl-t tartalmazó PB-vel (pH=7.5) mostuk, az eluálást 1 mól NaCl-t és 1% Triton-X-100-at tartalmazó 0.5 mólos glicin pufferrel (pH=10.0) eluáljuk, így kapjuk a tisztított hTfR mintát.

Más módszer szerint egylépéses eluálás és izolálás is lehetséges anti-hTfR antitesttel kapcsolt oszlopot használva.

Az állatok immunizálását hTfR-rel és az anti-hTfR-antitestet termelő sejtek mielóma sejtekkel való fúzióját ugyanolyan módszerrel végezhetjük, mint amit az ansamitocin származékokra leírtunk. Különböző módszerek használhatók anti-hTfR-antitestet termelő hibridómák screenelésére. Az ilyen módszerek közé tartozik például az ELISA módszer, amely során a hibridómák tenyészetének felülszóját olyan mikrotiter lemezre visszük, amelyre anti-egér IgG antitest van adszorbeálva, majd a HRP-vel jelölt tisztított hTfR mintát hozzáadjuk és a lemez szilárd fázishoz kötött anti-hTfR monoklonális antitestet detektáljuk, valamint a sejt-ELISA módszer, amely során a K562 sejt vonalat, amely a sejt felszíni membránján nagymennyiségű TfR-t expresszál, egy mikrotiter lemezre immobilizáljuk, és a hibridómák tenyészetének felülszóját adjuk a mikrotiter lemezhez, majd HRP-vel jelölt anti-egér IgG antitestet adunk hozzá.

A fenti módszer szerint előállított anti-hTfR antitestet termelő (IgG₁, kappa lánc) hibridómák közé tartozik például a 22C6 egér hibridóma.

Számos módszer létezik a jelen találmány szerinti, bispecifikus hibrid MoAb-ot termelő polidóma előállítására [H.Aramoto et al.: Proteins, Nucleic Acids and Enzymes, 33, 217 (1988)]; ezek közül bármelyik használható. Az ilyen módszerek közé tartozik például

- (1) az a módszer, amely során az említett HAT rezisztens anti-ANS-antitestet termelő hibridómát lépésenként 5-bróm-dezoxiuridinnel (a továbbiakban BrdU-nak rövidítjük) kiegészített táptalajhoz szoktatjuk, ezt követően egy timidin-kináz deficiens törzset szelektálunk és HAT érzékennyé tesszük; hasonlóképpen, egy HAT-rezisztens anti-hTfR-antitestet termelő hibridómát teszünk rezisztenssé 8-aza-guaninra (a továbbiakban AZG-nek rövidítjük), ezt követően egy hipoxantin-guanin-foszforibozil transzferáz deficiens törzset klónozzunk és HAT érzékennyé tesszük; ezt a két törzset azután egy ismert módszerrel fúzionáltatjuk, így kapjuk a tetraómaikat, amelyeket HAT-tal kiegészített táptalajon szelektálunk, majd azt a tetraómat klónozzuk, amely mind az ansamitocin származékhoz mind a hTfR-hez kapcsolódni képes hibrid antitestet szekretál; és
- (2) az a módszer, amely szerint egy anti-ANS-

-antitestet termelő hibridómát fluoreszcein-izotiocianáttal (a továbbiakban FITC-nek rövidítjük) jelölünk; egy anti-hTfR-antitestet termelő hibridómát tetrametil-rodamin-izotiocianáttal (a továbbiakban TRITC-nek rövidítjük) jelölünk; ezt a két jelzett hibridómát ismert módszerrel fúzionáltatjuk; a kapott sejt-szuszenziót fluoreszcein-aktivált sejt-szelektálóra visszük (a továbbiakban FACS-nak rövidítjük), hogy szelektáljuk és klónozzuk azokat a tetraóákat, amelyek mind a FITC zöld fluoreszcenciáját, mind a TRITC vörös fluoreszcenciáját mutatják. A szülő törzsek genetikai markereit fordítva használhatjuk a kívánt tetraóma szelektálására és klónozására.

Ezekben az eljárásokban a sejtek fúziójára fuzogén anyagot, például Sendai vírust vagy PEG-et használunk, illetőleg elektromos stimulálást vagy más módszert. A sok közül a PEG az előnyös. Az alábbiakban a PEG felhasználására ismertetünk egy módszert, de a jelen találmány nem korlátozható erre a módszerre. A körülbelül 1000-9000 molekulatömegű PEG-et használjuk körülbelül 10-80% koncentrációban; a kezelés ideje 0.5-30 perc. Hatékony fúziót érhetünk el ha a sejteket 37°C-on 4-10 percig tartjuk kontaktusban 35-55%-os PEG 6000-rel; ezek az előnyös körülmények.

A polidómák szelekcióját az előzőekben említett HAT-tal kiegészített táptalajban illetve más táptalajokban végezhetjük; erre a célra 8-AZG, 6-tioguanin, 5-BrdU vagy más hatóanyagok felhasználásával a hatóanyag akklimatizációs módszert

alkalmazhatjuk, hogy a hatóanyagra rezisztens törzseket állítsunk elő. Egy új marker bevezetése a fúzionált sejtekbe lehetővé teszi különböző szelekciós táptalajok alkalmazását. Az ilyen szeleciós táptalajra példa lehet a neomicinnel kiegészített táptalaj valamint a higromicin B-vel kiegészített táptalaj [B.Sugden et al.: Molecular and Cellular Biology, 5, 419 (1985)]. Hozzáférhető az a módszer is, amely során különböző fluoreszcens festékekkel jelölt hibridómákat fúzionáltatunk, majd a kettősen jelölt hibrid hibridómákat FACS-szal szétválasztjuk az előzőekben közölt leírás szerint [L.Karawajew et al.: Journal of Immunological Methods, 96, 265 (1987)].

A hibrid antitestet termelő polidóma szelektálására különböző módszerek alkalmasak. Az ilyen módszerek közé tartozik például:

- (1) az előbb említett ELISA módszer az anti-ANS antitestet termelő hibridóma szelektálására;
- (2) az az ELISA módszer, amelyben a polidóma tenyészet felülszóját olyan mikrotiter lemezhez adjuk, amelynek a felszínére anti-egér immunoglobulin antitestet adszorbeáltunk és HRP-vel jelzett hTfR-t adunk hozzá, hogy kimutassuk a szilárd fázishoz kötött anti-hTfR antitestet;
- (3) az az ELISA módszer, amelyben a polidóma tenyészet felülszóját olyan mikrotiter lemezhez adjuk, amelyre (maytansinol 3- α -amino-fenil-acetát)-HSA komplexet adszorbeáltunk, majd HRP-vel jelzett hTfR-t adunk hozzá a bispecifikus hibrid antitest detektálására;

ha olyan anti-hTfR antitestet használunk (kappa lánc), amelynek könnyű lánc a eltér az anti-ANS antitestétől (lambda lánc), akkor

- (4) az az ELISA módszer, amelyben a tenyészet felülúszóját olyan mikrotiter lemezekhez adjuk, amelyre (maytansinol 3- α -aminofenil-acetát)-HSA komplexet adszorbeáltunk, majd HRP-vel vagy biotinnal jelzett anti-egér IgG-kappa lánc specifikus antitestet adunk hozzá a bispecifikus antitest kimutatására, valamint ezeknek a módszereknek a módosításai;

ezeket a módszereket adott esetben kombinálva is alkalmazhatjuk.

A hibrid antitest aktivitás szempontjából pozitív polidómákat klónozzuk, ami általában egyszerűen kivitelezhető a határhígítási vagy egyéb módszerekkel. A klónozott polidómák tenyészetének felülúszóját a fentemlített módszerrel antitest-titer meghatározásnak vetjük alá, hogy szelektáljuk azt a polidómát, amely egy antitestet stabilan, magas titerrel termel, így kapjuk a keresett hibrid monoklonális antitestet termelő polidómát.

Az említett, jelen találmány szerinti polidóma tenyésztését folyékony táptalajon, vagy állatok hasüregében (azaz emlősök, például egerek hasüregében) végezhetjük ismert módszerekkel. A tenyészfolyadékból vagy aszcitesz folyadékból az antitestet ismert biokémiai technikák kombinálásával izoláljuk. Például a sejttenyészetet vagy aszcitesz folyadékot lecentrifugáljuk; a kapott felülúszót összegyűjtjük és kisózzuk (általában ammónium-szulfátot vagy nátrium-szulfátot alkalmazva). A kapott fehérje csapadékot megfelelő oldatban oldjuk majd dializáljuk és oszlop-kromatografáljuk (például ioncserélő oszloppal, géliszűrő oszloppal, Protein A oszloppal, hidroxilapatit oszloppal) a

keresett antitest kinyerésére és tisztítására. Egylépéses kinyerést és tisztítást is végezhetünk olyan oszloppal, amelyre két különböző antigént kötöttünk.

A fentiekben ismertetett elválasztási és tisztítási eljárások körülbelül 1-5 mg hibrid MoAb-ot eredményeznek 1 liter tenyészet-felülúszóból, fehérjetömegre számítva 80%-osnál nagyobb tisztaságban. 20 ml aszcitesz folyadékból 3-10 mg ugyanilyen antitest állítható elő.

Az így előállított hibrid MoAb egy egységes fehérje, és például proteínáz kezeléssel olyan $F(ab')_2$ fragmentek állíthatók elő, amelyek mind az ansamitocin származékokhoz mind a tumorról kapcsolatos antigénekhez, úgymint hTfR antigénekhez való kapcsolódási aktivitásukat megtartják; ezek a fragmentek ugyanazt a célt szolgálhatják mint a jelen találmány szerinti hibrid MoAb.

Az előzőekben említett eljárás szerint előállított, hibrid antitestet termelő polidómák közé tartozik például az ATF1-170 tetraóma, amelyet az alábbiakban következő 2. példában ismertetünk.

Mint olyan polidómát, amely a jelen találmány szerinti hibrid MoAb-ot termeli, az előzőekben az anti-ANS MoAb-ot termelő hibridóma és az anti-hTfR MoAb-ot termelő hibridóma fúziójával létrejött polidómát említettük. Megjegyezzük azonban, hogy az a trióma, amelyet úgy kapunk, hogy fúzionáltatjuk az egyik MoAb-ot termelő hibridómát, egy másik MoAb-ot termelő olyan sejttel vagy hibridómával, amelyet úgy kapunk, hogy Epstein-Barr vírussal vagy más eszközökkel végzett immortalizáció után két, megfelelő MoAb fajtát termelő sejt fúzionáltatjuk, ugyanazt a célt szolgálhatja mint az előbb említett tetraóma, amíg a jelen találmány szerinti hibrid MoAb-ot termeli.

Továbbá, azokban az esetekben, amikor ezek a polidómak egér IgG MoAb-ot termelnek, lehetséges egér-humán kiméra antitestet készíteni oly módon, hogy olyan DNS-t állítunk elő, amely a bispecifikus hibrid MoAb antigén felismerő helyének variábilis régióját kódolja, és ezt gén-manipulációs technika alkalmazásával humán IgG konstans régióját kódoló génhez ligáljuk [Z. Steplewski et al.: Proceedings of the National Academy of Science, USA, 85, 4852 (1988)]. Ezt a kiméra antitestet előnyösen használhatjuk emberek kezelésére, mivel kicsi az antigenicitása.

Számos módszer használható a rák terápiában a jelen találmány szerinti bispecifikus antitest vagy egy ansamitocin származékból és a bispecifikus antitestből előállított anti-humán-tumor fehérje komplex alkalmazásával. Az ilyen módszerek közé tartozik például:

- (1) az a módszer, amelyben a jelen találmány szerinti hibrid MoAb-ot rákos betegeknek adjuk be, és megfelelő idő elteltével ansamitocin származékot adunk be a betegnek, ezzel biztosítjuk, hogy a rákos szövetekhez vagy sejtekhez kapcsolódjon a rákellenes szer; és
- (2) az a módszer, amelyben a hibrid MoAb-ot és egy ansamitocin származékot egyszerre adunk be a rákos betegnek, előnyös
- (3) az a módszer, amelyben a hibrid MoAb-ot és egy ansamitocin származékot reagáltatunk, a nem reagált ansamitocin származékot eltávolítjuk, majd a kapott anti-humán-tumor fehérje komplexet adjuk be a rákos betegnek.

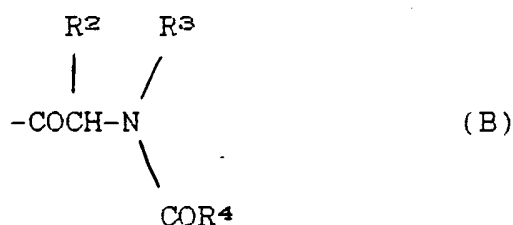
Az utóbbi esetben bármely ansamitocin származék használható, ha

antitumor aktivitással rendelkeznek és képesek az anti-ANS antitesttel reagálni. Az ilyen ansamitocin származékok közé tartoznak például a III általános képletű vegyületek ahol R jelentése hidrogénatom vagy karbonsavból származó acilcsoport; Q jelentése hidroxilcsoport (OH) vagy merkaptocsoport (SH); X jelentése klóratom vagy hidrogénatom; Y jelentése hidrogénatom, rövid szénláncú alkilszulfonilcsoport, alkilcsoport vagy aralkil csoport, ezek közül bármelyik lehet helyettesített és ezeknek 4,5-dezoxi származékai.

A fenti III általános képletben R-rel jelzett, karbonsavból származó acilcsoport lehet például 300-nál nem nagyobb molekulatömegű karbonsavakból származó acilcsoport, vagy 1-20 szénatomot tartalmazó acilcsoport. Az ilyen acilcsoportok közé tartoznak például a telített vagy telítetlen alifás acilcsoportok, telített vagy telítetlen aliciklusos acilcsoportok és az N-acil- α -aminosav típusú acilcsoportok; ezeket például a következő képlettel lehet leírni:



ahol R^1 jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, alkenilcsoport, cikloalkilcsoport vagy arilcsoport; ezeknek a csoportoknak lehetnek szubsztituenseik; a fenti ciklikus csoport alkilén láncon keresztül kapcsolódhat a karbonil csoporthoz. Olyan példaként, amikor szubsztituenst tartalmaz, a következő képlettel jellemzett N-acil- α -aminoacil csoportot említjük:



ahol R^2 jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, cikloalkilcsoport vagy arilcsoport; ezeknek a csoportoknak lehetnek szubsztituensei; a ciklikus csoport alkilén láncon keresztül kapcsolódhat a szénatomhoz az α -helyzetben.; R^3 jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, cikloalkilcsoport vagy arilcsoport; ezeknek a csoportoknak lehetnek szubsztituensei, és a ciklikus csoport alkilén láncon keresztül kapcsolódhat az N atomhoz; R^4 jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, alkenilcsoport, cikloalkil csoport vagy egy arilcsoport; ezeknek a csoportoknak lehet szubsztituense és a ciklikus csoport alkilén láncon keresztül kapcsolódhat a nitrogénatomon levő karbonilcsoportához; R^4 jelentése lehet alkoxics csoport vagy benzil-oxi-csoport.

A fenti (A) képlettel jellemzett acilcsoportban R^1 jelentését az alábbiakban adjuk meg.

Az R^1 -gyel jelzett alkilcsoportba tartoznak az 1-18 szénatomot tartalmazó alkilcsoportok (például a metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, izobutil-, szek-butil-, terc-butil-, pentil-, izopentil-, 1-metil-propil-, hexil-, heptil-, 3-heptil-, oktil-, nonil-, decil-, undecil-, dodecil-, tridecil-, pentadecil és heptadecilcsoport). Mások mellett a körülbelül 1-16 szénatomot tartalmazó, alacsony szénatomszámú alkilcsoport előnyös.

Az R^1 -gyel jelölt alkenil-csoportok közé tartoznak például a 2-10 szénatomot tartalmazó alkenilcsoportok (például a vinil-, allil-, 1-metil-vinil-, 1-oktenil- és 1-decenil-csoport). Mások

mellett a 2-4 szénatomot tartalmazó alacsony szénatomszámú alkenilcsoportok előnyösek.

Az R^1 -gyel jelölt cikloalkilcsoportok közé tartoznak a 3-10 szénatomot tartalmazó cikloalkilcsoportok (például a ciklopropil-, ciklobutil-, ciklopentil-, ciklohexil-, cikloheptil-, ciklooktil-, nonybornil- és adamantilcsoport).

Az R^1 -gyel jelölt arilcsoportba tartozik a fenil- és a naftilcsoport. A fenilcsoport az előnyös.

Az R^1 -ként szereplő alkilcsoport, alkenilcsoport, cikloalkilcsoport és acilcsoport helyettesítőt is tartalmazhat. A szubsztituensek közé tartoznak például az 1-4 szénatomot tartalmazó alacsony szénatomszámú alkoxics csoportok (például a metoxi-, etoxi-, propoxi-, izopropoxi-, butoxi-, izobutoxi-, szek-butoxi- és terc-butoxi- csoport), a 2-4 szénatomot tartalmazó alacsony szénatomszámú alkanoil csoportok (például az acetil-, propionil-, butiril- és izobutirilcsoport), a 2-4 szénatomot tartalmazó alacsony szénatomszámú alkanoil-oxi-csoportok (például az acetil-oxi-, propionil-oxi-, butiril-oxi és izobutiril-oxi-csoport), a 2-4 szénatomot tartalmazó alacsony szénatomszámú alkoxikarbonil csoportok (például a metoxi-karbonil, etoxi-karbonil, propoxi-karbonil és izopropoxi-karbonil-csoport), a halogénatomok (például a klór-, fluor-, bróm- és jódatom), hidroxilcsoport nitrocsoport, cianocsoport, trifluormetil-csoportok, amino- csoportok mono-(alacsony szénatomszámú (C_{1-4}) alkil)-amino csoportok (például a metil-amino csoport), a di-(alacsony szénatomszámú (C_{1-4}) alkil)-amino csoportok (például a dimetil-amino-, dietil-amino-, dipropil-amino-, diizopropil-amino és dibutil-amino csoport), 1-4 szénatomot tartalmazó alacsony

szénatomszámú alkil-tio csoportok (például a metil-tio-, etil-tio-, propil-tio-, izopropil-tio-, butil-tio-, izobutil-tio-, szek-butyl-tio- és terc-butyl-tio-csoport), alacsony szénatomszámú (C_{1-4}) alkilszulfonilcsoportok, alacsony szénatomszámú alkánszulfonilcsoportok, oxocsoportok, tioxo-csoportok és 1-4 szénatomot tartalmazó alacsony szénatomszámú alkanoil-amino csoportok (például a formil-amino-, acetyl-amino-, propionil-amino-, butiril-amino- és izobutiril-amino-csoport). Ha a fenti R^1 csoport jelentése ciklikus csoport (cikloalkil vagy aril csoport), akkor a szubsztituensek közé tartoznak még az 1-4 szénatomot tartalmazó alacsony szénatomszámú alkilcsoportok (például a metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, izobutil-, szek-butyl- és terc-butyl-csoport). A csoportok a szubsztituensek azonos vagy különböző csoportjába tartozó 1-3 taggal szubsztituálhatók.

Az R^1 -gyel jelölt ciklikus csoport (cikloalkil- vagy aril-csoport, amely szubsztituenssel is rendelkezhet) a $-COR^1$ képletben szereplő karbonil csoporthoz alkilén láncon keresztül kapcsolódhat. Az alkilén láncok közé tartoznak például az 1-4 szénatomszámú alkilén láncok (például a metilén, etilén, metil-metilén (etilidén), propilén, butilén, 1-, 2- vagy 3-metil-propilén, 1- vagy 2-etiletilén, propil-metilén, 1,1- vagy 1,2-dimetil-etilén, izopropil-metilén). Az alkilén láncok rendelkezhetnek a fentemlítt szubsztituensek valamelyikével. Ennek megfelelően, ha a ciklikus csoport és az alkilén lánc összekapcsolódik, akkor R^1 jelentése olyan cikloalkilcsoport vagy aralkilcsoport, amely szubsztituenssel rendelkezhet.

Az R^1 -gyel jelölt, 1-18 szénatomot tartalmazó és egy szubsztituenssel rendelkező alkilcsoportok közé tartozik például

a metoxi-metil-, butoxi-metil-, metil-tio-metil-, metil-tio-etil-, etil-tio-etil-, izopropil-tio-etil-, butil-tio-etil-, izobutil-tio-etil-, acetyl-oxi-metil-, acetyl-oxi-etil-, etoxi-karbonil-metil-, butoxi-karbonil-etil-, fluor-metil-, klór-metil-, klór-etil-, 3-klór- -propil-, 4-klór-butyl-, trifluor-metil-, bróm-metil-, 4-bróm-butyl-, 5-bróm-pentil-, jód-metil-, 2-jód-etil-, ciano-metil-, metil-szulfinil-etil- és metil-szulfonyl-metil-csoport.

Az R¹-gyel jelölt, 2-10 szénatomot tartalmazó és egy szubsztituenssel rendelkező alkenil csoportok közé tartozik a 2-etoxi-karbonil-vinil-csoport.

Az R¹-gyel jelölt, 3-10 szénatomot tartalmazó és egy szubsztituenssel rendelkező cikloalkil csoportok közé tartozik például a 2,2-dimetil-ciklopropil-, 4-izobutil-ciklohexil-, 2-bróm-ciklopropil-, 2-klór-ciklobutil-, 4-klór-ciklohexil-, 2,2-difluor-ciklobutil-, 3-metoxi-ciklohexil-, 4-acetyl-ciklohexil-, 2-ciano-ciklobutil-, 4-ciano-ciklohexil- és 4-dimetil-amino-ciklohexil- csoport.

Az R¹-gyel jelölt, egy szubsztituenssel rendelkező aril-csoportok közé tartozik például a 2-, 3- vagy 4-metil-fenil-, 4-terc-butyl-fenil-, 2-,3- vagy 4-klór-fenil-, 2-,3- vagy 4-bróm-fenil-, 2-, 3- vagy 4-jód-fenil-, 2-, 3- vagy 4-fluor-fenil-, 2- vagy 4-metoxi-fenil-, 4-butoxi-fenil-, 4-metoxi-karbonil-fenil-, 3-acetyl-fenil-, 2-, 3- vagy 4-nitro-fenil-, 3- vagy 4-ciano-fenil-, 4-dimetil-amino-fenil-, 4-dietyl-amino-fenil-, 4-acetoxi-fenil-, 4-butiril-oxi-fenil-, 3,4-dimetoxi-fenil-, 3,4,5-trimetoxi-fenil-, 3,4-metilén-dioxi-fenil-, 3-trifluor-metil-fenil-, 4-metil-tio-fenil-, 4-metil-szulfonyl-fenil- és

4-acetamido-fenil-csoport.

Ha az R^1 -gyel jelölt, a fentiekben ismertetett ciklikus csoport [például cikloalkil és aril (főleg fenil) csoport] az (A) képletben levő acilcsoport karbonil szénatomjához alkilén láncon keresztül kapcsolódik, akkor R^1 lényegében olyan csoportot jelent, amely ezeket a ciklikus csoportokat és a hozzá kapcsolódó alkilén láncokat tartalmazza, például egy cikloalkilcsoportot vagy egy aralkilcsoportot. Az ilyen cikloalkilcsoportok közé tartozik például az adamantil-metil-, ciklohexil-metil-, 3-ciklohexil-propil-, 2-ciklopentenil-metil- és 2-ciklopentil-etil- csoport. Az aralkil csoportok közé tartozik például a 4-bróm- -benzil-, 2-, 3- vagy 4-ciklobenzil-, 2,5- vagy 3,4-dimetoxi-benzil-, 4-etoxi-benzil-, 4-fluor-benzil-, 3- vagy 4-metoxi-benzil-, 4-metoxi-fenil-etil-, 1- vagy 2-naftil-metil-, 2-, 3- vagy 4-nitro-benzil-, 3-nitro-fenetil-, benzil, 2-,3- vagy 4-fenil-propil-, 2-, 3- vagy 4-metil-benzil-, 3,4,5-trimetoxi-benzil- és α -metil-fenetil-csoport.

A fenti (B) képlettel jellemzett N-acil- α -aminoacil csoportot az alábbiakban írjuk le.

Az R^2 , R^3 vagy R^4 csoportok részére meghatározott alkil, alkenil-, cikloalkil- és arilcsoportok ugyanazok mint amiket az előzőkben az R^1 számára említettünk. Ezek a csoportok szubsztituenset tartalmazhatnak. Szubsztituensként ugyanazok a csoportok említhetők, mint amiket az előzőkben az R^1 csoportnál példaként említettünk. Az R^2 , R^3 vagy R^4 ciklikus csoport (azaz cikloalkilvagy arilcsoport a (B) képletben alkilén láncon keresztül kapcsolódhat az α -helyzetben levő szénatomhoz, a nitrogénatomhoz vagy a nitrogénatomhoz kapcsolódó karbonil csoporthoz. Az alkilén lánc ugyanaz lehet mint amit az előzőkben

az R¹-nél leírtunk.

Az R⁴-gyel jelzett alkoxi-csoport lehet 1-4 szénatomos alkoxics csoport (például metoxi-, etoxi-, propoxi-, izopropoxi-, butoxi-, izobutoxi-, szek-butoxi- és terc-butoxi-csoport).

A (B) képlettel leírt N-acil- α -amino-acil csoport lehet például N-acetil-N-metil-glicil-, N-benzoil-N-metil-glicil-, N-(4-klór-benzoil)-N-metil-glicil-, N-acetil-N-metil-alanil-, N-acetil-N-benzil-alanil-, N-acetil-N-metil-leucil-, N-izobutiril-N-metil-alanil-, N-izovaleril-N-metil-alanil-, N-propionil-N-metil-alanil-, N-acetil-N-metil-fenilalanil-, 2-(N-acetil-N-metil)-amino-3-metoxi-karbonil-propionil-, 2-(N-acetil-N-metil)-amino-3-metil-merkaptó-propionil-, 2-(N-acetil-N-metil)-amino-3-etil-merkaptó-propionil-, N-acetil-N-metil-izoleucil-, N-acetil-N-metil-leucil-, N-acetil-N-metil-metionil-, N-acetil-N-metil-fenilalanil-, N-acetil-N-metil-4'-acetoxi-tirozinil-, N-benzil-N-metil-valil-, N-acetil-N-metil-fenilglicil, N-acetil-N-metil-3-ciano-alanil- és N-acetil-N-metil- -(4'-dimetil-amino)-fenilalanil-csoport.

A fenti (I) általános képletben Y-nal jelzett alacsony szénatomszámú alkilszulfonilcsoport lehet 1-4 szénatomszámú alkilszulfonilcsoport (például metánszulfonil-, etánszulfonil-, 2-propánszulfonil-, 2-butánszulfonil-csoport).

Az Y-nal jelzett alacsony szénatomszámú, 1-8 szénatomos alkilcsoport lehet metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, szek-butil-, pentil-, izopentil-, hexil-, heptil-, oktilcsoport. Az aralkilcsoport lehet fenil-[alacsony szénatomszámú (C₁₋₄) alkilcsoport], például benzil-, 2-fenetil-, 3-fenil-propil-csoport. Az Y-ban szereplő alkil- és aralkilcsoport tartalmazhat szubsztituenst. A szubsztituens lehet

például hidroxilcsoport, aminocsoport, oxocsoport, halogénatom (klór-, bróm-, jódatom), trifluor-metil-csoport, alacsony szénatomszámú (C₂₋₅) alkoxi-karbonil- csoport, karboxilcsoport, metilén-dioxi-csoport és alacsony szénatomszámú (C₁₋₄) alkil-tio csoport.

A megfelelő 4,5-didezoxi származékokat a III általános képlettel írhatjuk le, ahol a szimbólumok megfelelnek a fentieknek.

Az előzőekben említett ansamitocin származékokat szintetizálhatjuk például a Kupchan és munkatársai által leírt módszerrel [Journal of the American Chemical Society, 97, 5294 (1975)], a Higashide és munkatársai által leírt módszerrel [Nature, 270, 271 (1977)], valamint a 4137230, 4151042, 4162940, 4228239, 4229533, 4248870, 4256746, 4260608, 4263294, 4264596, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4317821, 4322348, 4331598, 4356265, 4362663, 4371533 és 4424219 sorszámú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás alapján és hasonló módszerekkel.

A jelen találmány szerinti cél-antigén számos antigén lehet; a jellemző példák közé tartoznak a rákos sejtek membránjának felületi antigénjei, úgymint a tumorhoz kapcsolódó antigének, immunkompetens sejtfelszíni receptorok és a vírussal fertőzött sejtek felszíni antigénjei. Ezek közül az antigének közül gyakran használják a hTfR-t mint tumorral kapcsolt antigént, de karcinoembrionikus antigént (amelynek a rövidítése CEA), az α -fetoproteint és számos tumorhoz kapcsolódó cukorlánc antigént, beleértve a CA19-9-et [S.Hakomori: Cancer Research, 45, 2405 (1985)], a B-sejt limfóma membrán immunoglobulin idiotipusokat [R.A.Miller et al.: New England Journal of Medicine, 306, 517

(1982)], T-sejt limfóma receptor idiotipusokat [L.L.Lanier et al.: Journal of Immunology, 137, 2286 (1986)], valamint a specifikusan a vesesejt karcinómán expresszáldó glikoproteint is használják.

Amint az előzőekben említettük, a jelen találmány szerinti hibrid MoAb képes nagyon specifikusan kötödni a cél antigénhez és hatékonyan elpusztítani a rákos sejteket a hozzákötődő ansamitocin származék citotoxikus hatása révén, ezzel lehetővé teszi a szelektív és hatékony rák kezelést.

A jelen találmány szerinti hibrid MoAb olymódon semlegesíti egy ansamitocin származék citotoxikus hatását, hogy hozzákötődik, majd az ansamitocin származékot a megcélzott helyen elengedi, hogy kifejtse citotoxikus hatását. Így a jelen találmány szerinti hibrid MoAb az ansamitocin származékot képes stabil és inaktív formában a célhelytől eltérő helyen szállítani, majd az ansamitocin aktív formáját a megcélzott helyen felszabadítja, ezzel kiváló stabilitású és szelektivitású, valamint nagyon csekély káros mellékhatással rendelkező rákellenes szer állítható elő.

A továbbiakban a jelen találmányt referencia és munkapéldákon keresztül részletesebben ismertetjük; ezek a példák nem jelenthetik a jelen találmány oltalmi körének korlátozását.

Az állati sejtek letétbe helyezése törzsgyűjteményekben

Allati sejtvonal	IFO (IFO szám)	FRI (FERM szám)
Egér hibridóma AS6-44.9	50181	BP-2233
Egér-egér hibridóma 22C6	50172	BP-2054
Egér hibridóma ATF1-170	50182	BP-2234
Egér hibridóma RCS-1	50184	BP-2333
Egér hibridóma RCAS1-488	50218	BP-2687

IFO: Institute of Fermentation, Osaka

FRI: Fermentation Research Institute, Agency of Industrial
Science and Technology, Ministry of International Trade and
Industry

1. Referencia példa

(ELISA az anti-ANS antitest vizsgálathoz)

(1) Szilárd fázisú antigén előállítása

N-(gamma-maleimido-butiriloxi)-szukcinimiddel maleimidezett
maytansinol 3- α -amino-fenil-acetátot adunk olyan HSA-hoz, amelyet
N-szukcinimidil-piridil-ditio-propionátos redukcióval módosítunk,
így kapjuk tiolcserés reakcióval a (maytansinol-3- α -amino-fenil-
-acetát)-HSA komplexet.

(2) Vizsgáló módszer

A fenti, antigén-érzékenyített lemezhez 100 μ l-t adunk a
szóbanforgó hibridóma felülúszójából, majd 2 órán át

szobahőmérsékleten hagyjuk a reakciót lejátszódni. Miután a lemezt alaposan mostuk 20 millimólos foszfáttal pufferelt sóoldattal, amely 0.05 % Tween 20-at tartalmaz (pH=7.3, a továbbiakban csak PBS-Tw-nek rövidítjük), egy HRP-vel jelzett anti-egér IgG nyúl antitestet adunk hozzá, majd a reakciót szobahőmérsékleten hagyjuk lejátszódni 2 órán át.

Miután a lemezt ismét mostuk, orto-fenilén-diamint és H_2O_2 -t mint enzim-szubsztrátot tartalmazó 0.1 mólos citrát puffer oldatot adunk mindegyik lemezhez, és az enzimreakciót szobahőmérsékleten hagyjuk lejátszódni. Miután a reakciót 1 normál kénsav hozzáadásával leállítottuk, a színanyag mennyiségét 492 nm-en fotometrálni határozzuk meg, egy Multiscan alkalmazásával (készíti a Flow Co.).

2. Referencia példa

(Az anti-hTfR-antitestet termelő hibridóma készítése)

(1) A hTfR tisztítása

1 kg humán placenta-szövetet kis darabokra vágunk, majd PBS-ben (pH=7.5) homogenizáljuk, majd lecentrifugáljuk. A kapott üledéket 4 % Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben homogenizáljuk. Ezt a homogenizátumot ultrahangozzuk, majd lecentrifugáljuk. A kapott felülúszóhoz 100 ml-ként 32 g ammónium-szulfátot adunk. Kisózás után ezt az oldatot olyan oszlopra visszük, amelyre anti hTf antitestet kapcsoltunk, majd alaposan mossuk 0.5 mól NaCl-t tartalmazó PB-vel (pH=7.5). A 0.5 mól NaCl-t és 0.5% Triton-X 100-at tartalmazó 0.02 mólos glicin pufferrel (pH=10.0) eluálódó hTfR frakciót hTf-fel kapcsolt oszlopra visszük. Miután az oszlopot 1 mól NaCl-t tartalmazó PB-vel mostuk, az elúciót 1 mól NaCl-t és 1% Triton X-100-at tartalmazó 0.05 mólos glicin

pufferrel (pH=10.0) végezve körülbelül 1.5 mg tisztított hTfR mintát kapunk.

(2) Immunizálás

A fenti tisztított hTfR minta fiziológiás sóoldatban készült 200 µg/ml-es oldatához azonos térfogatú Freund komplett adjuvánst adunk, majd alaposan emulgeáljuk. A kapott emulziót ezután intraperitonálisan és szubkután adagoljuk BALB/c egereknek (nőstény, n=10, 20 µg/ml/egér). A további immunizálást 3 hetes intervallumokban végezzük. 4 egymást követő immunizálás után két héttel maximális szérum antitest titerrel rendelkező állatnak intravénásan ugyanazt a hTfR antigén oldatot adjuk mint amit az előzőekben meghatároztunk (30 µg/0.1 ml fiziológiás sóoldat/egér).

(3) Sejtfúzió

A végső immunizálás után 3 nappal a lépet kivágjuk és splenocita szuszpenziót készítünk a szokványos módszerekkel (körülbelül 10^8 sejt). Ehhez a szuszpenzióhoz 2×10^7 egér mielóma sejtet adunk, majd PEG 6000-rel fúzionáltatjuk a sejteket Köhler és Milstein módszere szerint [Nature, 256, 495 (1975)].

A sejtfúzió teljes lejátszódása után a sejtkeveréket HAT táptalajban szuszpendáljuk, amely hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmaz, és 10 napig növesztjük őket. A szülősejtek szelektálása után a tenyésztést tovább folytatjuk HT táptalajon, amelynek ugyanilyen az összetétele mint a HAT táptalajnak, csak nem tartalmaz aminopterint.

(4) Hibridómák szelekciója és klónozása

Kereskedelmi forgalomban levő anti-egér IgG nyúl antitest oldatot (20 µg/ml) mérünk szét 100 µl/luk mennyiségben egy 96 lukas mikrotiter lemezen. A mikrotiter lemezt ezután éjszakán át 4°C-on hagyjuk állni, majd 2 % BSA-t tartalmazó PBS-t (pH=7.3)

adunk az érzékenyített lemezhez. Az (1) pontban kapott tisztított hTfR mintát, miután az ismert módszerrel HRP-vel jelöltük, használjuk ELISA-hoz [T.Kitagawa: Yuki Gosei Kagaku, 42, 283 (1984)]. Eszerint a hibridómák tenyészetének felülúszóját adjuk a fenti második antitest-érzékenyített lemezhez, majd a reakciót szobahőmérsékleten 2 órán át hagyjuk lejátszódni. Ennek megfelelően, a hibridóma tenyészetek felülúszóját az előzőekben említett második antitest-érzékenyített lemezhez adjuk, majd a reakciót szobahőmérsékleten hagyjuk lejátszódni 2 óra alatt. Miután a lemezt PBS-sel mostuk, HRP-vel jelzett hTfR-t adunk hozzá, majd ezt kétórás, szobahőmérsékleten lejátszódó reakció követi. Az enzim-reakciót ezután az antitest-titer meghatározása céljából az 1-(2) referencia példa szerint hajtjuk végre.

A különösen magas kapcsolási aktivitást mutató hibridómákat határhígítási módszerrel klónozzuk, így kapjuk a 22C6 anti-hTfR antitestet termelő hibridómát. A jelen antitestet az IgG₁ (kappa lánc) alosztályba tartozónak azonosítottuk, amely nagy affinitást mutat a K562 humán rákos sejtvonalhoz.

3. Referencia példa

(Kevert hemagglutinációs vizsgálat, MHA)

A vizsgált sejtek közül a tapadó sejteket (500 sejt/luk) egy 60 lukas mikrotiter lemezen hígítjuk (Nunc), majd 24-48 óra hosszat tenyésztjük, míg a nem-tapadó sejteket szérumot nem tartalmazó táptalajban szuszpendáljuk, lukakba osztjuk szét (500 sejt/luk), majd 5 percig 400 x g-vel centrifugáljuk, hogy a sejtek a lemezhez tapadjanak.

Az indikátor vért a következők szerint állítjuk elő: Birka vörös vérsejteket háromszor mossuk PBS-sel, majd PBS-ben szuszpendálva 2 %-os szuszpenziót állítunk elő. A szuszpenziót azonos térfogatú egér anti-birka-vörös vérsejt antitesttel (Ortho) reagáltatjuk, amelyet előzőleg 2.5-szűrőszóra hígítottunk maximum agglutinációs titeren PBS-sel, 37°C-on 30 percig. A vérsejteket háromszor mossuk PBS-sel majd ismét PBS-ben szuszpendáljuk 2 %-os koncentrációban. A szuszpenziót azonos térfogatú nyúl anti-egér IgG antitesttel (Cappel) reagáltatjuk, amelyet előzőleg 25-szűrőszóra hígítottunk PBS-sel, 37°C-on 30 percig. A vérsejteket ezután háromszor mossuk PBS-sel, majd 2 %-os szuszpenzió formájában tároljuk.

A sejt-tapadási lemezt 0.1 mólos $MgCl_2$ -0.03 mólos $CaCl_2$ -0.1% glükóz tartalmú Veronál pufferelt sóoldattal mossuk (pH=7.4, rövidítése a továbbiakban VBS), amely még 5% FCS-t tartalmaz. Egy tenyészet felülúszót vagy aszcitesz folyadékot a mikrotiter lemez lukaiba mérünk szét, majd egy órán át szobahőmérsékleten hagyjuk állni. A lemezt VBS-sel mossuk, majd az előzőleg 5%-os FCS-VBS-sel 0.2 %-osra hígított indikátor vérsejt szuszpenziót mérjük szét a lukákba és szobahőmérsékleten hagyjuk állni 40 percig. A lemezt VBS-sel mossuk hogy eltávolítsuk a nem reagált vérsejteket, majd mikroszkóppal vizsgáljuk. Azt az esetet minősítjük pozitívnak, amikor a kontroll tesztben (antitestet nem adtunk hozzá) nem keletkezik 1 %-nál több rozetta és ezzel egyidőben a vizsgált sejteknek több mint 25 %-nál keletkezik rozetta a fenti tesztben.

4. Referencia példa

(Anti humán vesesejt karcinóma monoklonális antitestet termelő hibridóma készítése)

(1) Humán vese ráksejtek transzplantációja és immunizálás szérummal

Egy nu/nu-BALB/c egérnek szubkután beadunk egy tumorszövet darabot (graft, 2 mm-es négyzet), amely veserákban szenvedő betegtől származik, így kapjuk az AM-RC-3, stabil ráksejtet, amelyet ezután szubkután átültetünk szingenikus nu/nu-BALB/c egérnek. Három-négy hét elteltével a szérumot összegyűjtjük. Egy szingenikus BALB/c egérnek intraperitonálisan beadunk 0.5 ml-t a szérumból azonos térfogatú komplett Freund adjuvánssal, ezt hatszor megismételjük 7-10 napos intervallumokban, majd az egérnek intraperitonálisan 1.0 ml-t adunk a szérumból (végső immunizálás). A végső immunizálás után az antitest titert a 3. referencia példában leírt MHA módszerrel határozzuk meg.

(2) Hibridóma készítés

Az immunizált egérnek azokat a lépsejtjeit, amelyek magas antitest titert mutatnak, egér mielóma sejtekkel (NS-1) fúzionáltatjuk az ismert módszerrel (kezelés PEG6000-rel 37°C-on 1-10 percig), majd a hibridómákat HAT táptalajon szelektáljuk (1×10^{-4} mól hipoxantin, 4×10^{-7} mól aminopterin és 1.6×10^{-5} mól timidin). A növekedő hibridóma csoportokat a 3. referencia példában leírt MHA módszerrel vizsgáljuk át, majd a magas antitest titerű csoportokat tovább klónozzuk, így kapjuk az anti-humán vese karcinóma MoAb-ot termelő RCS-1 egér hibridómát. Az RCS-1 egér hibridóma által termelt RCS-1 antitestet az IgG₁

alcsoportha tartozónak azonosítottuk.

(3) Egér MoAb előállítása

Egy MCH (AF)-nu egérnek 5×10^6 egér hibridóma RCS-1 sejtet adunk be intraperitonálisan. Körülbelül 4 hét elteltével 5-10 ml aszcitesz folyadékot gyűjtünk össze. Az összegyűjtött aszcitesz folyadékot kisózzuk ammónium-szulfáttal, majd DEAE-cellulóz oszlopon tisztítjuk. Körülbelül 200 mg tisztított egér anti-humán vesesejt karcinóma MoAb RCS-1-et kapunk 50 ml aszcitesz folyadékból.

(4) Az egér anti-humán vese karcinóma MoAb jellemzői

Az egér MoAb RCS-1 reakcióképességét a különböző humán tumorsejtekkel és normál vesesejtekkel a 3. referencia példában leírt MHA módszerrel határozzuk meg. Az eredmények a következő táblázatban láthatók.

A táblázatból tisztán látható, hogy az antitest erősen reagál mindenféle veseráksejttel, míg nem reagál a normál veseszövetekkel. Az antitest ezenkívül reagál a tüdőrák sejtek, hólyagrák sejtek és T-sejt leukémia sejtek egy részével.

Táblázat

(Az egér RCS-1 monoklonális antitest reaktivitása)¹

Pozitív sejtcsoportok

Veserák: (AM-RC-3, AM-RC-6, AM-RC-7, SK-RC-1, SK-RC-9, SK-RC-18)

Hólyagrák: (T-24)

Tüdörák: (Luci-10, Calu-6, PC-10)

T-sejt leukémia (HUT-78)

Negatív sejtcsoportok:

Hólyagrák: (KK-47, MGH-U-1)

Prosztatarák: (DU-145)

Gyomorrák: (NUGC-2, NUGC-3, NUGC-4, MKN-28, KATO-III, MRK-1)

Bélrák (SW-403, SW-620, SW-1116, SW-1222, CaOV-4, HT-29)

Méhnyakrák: (ME-180)

Melanóma (SK-MEL-33, SK-MEL-37)

Mellrák (MCF-7)

Glioma (MG-178)

Tüdörák (ADLC-DA, SBC-3, SCLC-SA, Luci-6, CADO-LC3, OKADA, QG-56)

T-sejt leukémia: (CCRF-CEM, HPB-ALL, HSB-2, HUT-102, RPMI-8402,
P12/Ichikawa, MT-1, MT-2)

B-sejt leukémia: (Raji, Daudi, Ball-1, RPMI-1788, Ly-16)

Null sejt leukémia: (Nall-1, Nalm-6, Nalm-18, KOPN-K, P30/Ohkubo)

Myelocita leukémia: (HL-60)

Negatív szövetcsoport:

Normál vese (5 különböző)

1): A 3. referencia példa szerinti MHA módszerrel meghatározva.

1. példa

(Az anti-ANS-antitestet termelő hibridóma előállítás és immunizálás)

PDM-3-C₂₀-karboximetil étert aktív észterré alakítunk N-hidroxi-szukcinimiddel és diciklohexil-karbodiimiddel, majd a BSA hordozó-fehérjéhez kapcsoljuk, így kapunk egy immunogént.

Az így kapott (PDM-3-C-₂₀-karboximetil éter)-BSA komplex 200 µg/ml fiziológiás sóoldatban készült oldatához azonos térfogatú Freund komplett adjuvánst adunk, majd alaposan emulgeáljuk. A kapott emulziót intraperitonálisan és szubkután adjuk be BALB/c egereknek (nőstény, 20 µg/ml/egér). A további immunizálást 2-3 hetes intervallumokban végezzük. Annak az állatnak, amely három további immunizálás után 10 nappal maximális szérum antitest titert mutat, a (PDM-3-C₂₀-karboximetil-éter)-BSA komplex oldatát adjuk be intravénásan (50 µg/0.1 ml fiziológiás sóoldat / egér).

(2) Sejtfúzió

A sejtfúziót a 2-(3) referencia példában leírt módon végezzük.

(3) Hibridómák szelekciója és klónozása

A hibridómákat az 1. referencia példában szereplő ELISA módszerrel szelektáljuk, (maytansinol 3- α -aminofenil-acetát)-HSA-val kapcsolt mikrotiter lemezen, majd a 2-(4) referencia példában leírt eljárást követve kapjuk az anti-ANS MoAb-ot termelő hibridómákat. Ezek közül a hibridómák közül szelektáltuk az AS6-44.9 egér hibridómát, amely erősen kötődik a 9-tiomaytansin-hoz, a MAY-hoz és az ANS-hez, valamint a PDM-3-

-C20-karboximetil-éter immunogénhez. A jelen antitest immunoglobulin osztályát, alosztályát és könnyűlánc típusát meghatározva az IgG₁-lambda láncúnak bizonyult az Ouchterlony és ELISA módszerekkel. Az antitestről úgy találtuk, hogy képes semlegesíteni az ANS citotoxicitását.

Az 1. ábrán láthatjuk az AS6-44.9 hibridóma tenyészet felülúszójának ELISA-val mért antitest hígítási görbéjét. A 2. ábrán láthatjuk az ANS citotoxicitásának semlegesítési görbéit (megcélzott sejtvonalak: P388D1 egér leukémia sejtvonal és a K562 humán leukémia sejtvonal).

2. Példa

(Az anti-ANS-anti-hTfR bispecifikus hibrid monoklonális antitest előállítás)

(1) Sejtfúzió

Az 1. példában előállított anti-ANS antitestet termelő AS6-44.9 hibridómát, valamint a 2. példában előállított, az anti-hTfR antitestet termelő 22C6 hibridómát fluoreszcens festés céljára 37°C-on 30 percig Iskove-Ham kevert táptalajban inkubáljuk, amely az AS6-44.9 esetében 0.5 µg/ml FITC-t, illetve a 22C6 esetében 1.5 µg/ml TRITC-t tartalmaz. LSM oldat hozzáadása (megvásárolható a Wako Pure Chemical Industries Ltd-től) és az elpusztult sejtek eltávolítása után ezeket a hibridómákat 1:1 arányban összekeverjük, majd PEG6000-rel fuzionáltatjuk a sejteket.

Miután két órán át 37°C-on inkubáltuk, a sejteket FACS-ra visszük, majd 25 000 fluoreszceinnel-rodaminnal duplán festett sejtet szelektálunk. Ezeket a duplán festett sejteket (10

sejt/luk) 96 lukas mikrotiter lemezen szaporítjuk, amely 5×10^5 sejt/luk mennyiségben egér timocitákat tartalmaz tápláló sejtekként.

(3) Hibrid hibridómák klónozása és szelekciója

Azokban a lukakban levő sejtek felülúszóját, amelyekben a sejtfúzió után 1-2 héttel sejtszaporodás történt, a következő bispecifikus antitest ELISA eljárással vizsgáljuk, hogy meghatározzuk antitest titerüket. Az 1-(1) referencia példában előállított (maytansinol 3- α -aminofenil-acetát)-HSA érzékenyített lemezekhez adjuk a hibrid hibridómák tenyészetének felülúszóját, majd a reakciót 2 óráig hagyjuk lejátszódni szobahőmérsékleten. Miután a lemezt PBS-Tw-vel mostuk, biotinnal jelzett anti-egér IgG-kappa lánc specifikus antitestet adunk hozzá, majd a reakciót 2 óra hosszat hagyjuk szobahőmérsékleten lejátszódni. Ezután HRP-vel jelzett avidint adunk hozzá és a lemezt mossuk. A szilárd fázishoz kötődött enzim aktivitását az 1-(2) referencia példában leírt módszerrel határozzuk meg.

A magas hibrid antitest aktivitást mutató lukakat határhígítási módszerrel klónozzuk, így kapjuk a keresett bispecifikus antitestet termelő ATF1-170 tetraómat.

A 3. ábrán látható az ATF1-170 felülúszója antitest hígítási görbéje.

(3) A hibrid antitest tisztítása

Egerenként 5×10^6 tetraóma sejtet adunk be intraperitonálisan hat BALB/c egernek, amelyeknek előzőleg intraperitonálisan 0.5 ml ásványolajat adtunk. Az aszcitesz folyadék visszatartása 14-18 nappal később jelentkezik. Az aszcitesz folyadékot összegyűjtjük és 45-50 % telített ammónium-szulfáttal kisézzük, így kapjuk az IgG frakciót. 20 mmólos

PBS-sel (pH 7.5) szembeni dialízis után ezt a frakciót olyan Cellulofine oszlopra visszük, amelyet PDM-3-C₂₀-p-aminobenzil éterrel kapcsolunk, majd 0.2 mólos glicin-HCl pufferrel (pH=2.9) eluáljuk. A savasan eluált frakciót PBS-sel szemben dializáljuk, majd nagynyomású folyadékkromatográfra visszük, hidroxilapatit oszlopot használva kapjuk a jelen találmány szerinti anti-ANS-anti-hTfR bispecifikus hibrid antitestet.

20 ml aszcitesz folyadékból körülbelül 7.3 mg bispecifikus antitestet kapunk.

3. Példa

(Anti-ANS-anti-hTfR bispecifikus monoklonális antitest izolálása)

Az ATF1-170 tetraómat BALB/c egerekbe oltjuk a 2-(3) példában leírt módszerrel aszcitesz folyadék előállítása céljából. A kapott aszcitesz folyadékot 40-50 % telített ammónium-szulfáttal kisózzuk, majd Protein A oszlopon tisztítva kapjuk az IgG frakciót. Ezt a savasan eluált frakciót 10 mmólos kálium-foszfát pufferrel (pH=6.2) szemben dializáljuk, majd olyan hidroxilapatit oszlopra visszük, amelyet azonos pufferrel hoztunk egyensúlyba. Az eluálást 10-300 mmólos kálium-foszfát (pH=6.2) oldat gradienssel végezzük a különböző immunoglobulin fajták elválasztása céljából. Az eredmények a 4. ábrán láthatók.

A 4. ábrán az 1. csúcs az AS6-44.9 anti-ANS antitest elúciós pozíciójának felel meg, a 3. csúcs a 22C6 anti-hTfR antitest elúciós pozíciójának. A megfelelő csúcsok antitest elúciós frakcióit a 2-(2) példában bispecifikus antitestekre leírt ELISA módszerrel vizsgáljuk. Ennek eredményeképpen, csak a 2-es csúcs mutatott erős antitest aktivitást; ez azt igazolja, hogy a keresett ATF1-170 bispecifikus antitest a 2-es csúcsban

eluálódik.

A jelen találmány szerinti aszcitesz folyadék 5 ml-éből körülbelül 2.2 mg bispecifikus antitest nyerhető ki.

4. Példa

(Az anti-ANS-anti-hTfR bispecifikus monoklonális antitest szelektív citotoxicitása)

A 3. példában előállított tisztított anti-ANS-anti-hTfR bispecifikus antitestet 5 mól-ekvivalensnyi ansamitocinnel reagáltatjuk 1 óra hosszat 5°C-on, majd a reakcióelegyet olyan Sephadex G-25 oszlopra visszük amely PBS-sel van egyensúlyba hozva, így nyerjük ki az ANS-bispecifikus antitest komplexet.

Az ANS-antitest komplex oldatot (0.5 ml/luk) olyan lemezre visszük, amelyre humán leukémia sejteket (K562; 1.0×10^4 sejt/0.5 ml/luk) vagy egér leukémia sejteket (P388D₁; 1.0×10^4 sejt/0.5 ml/luk) oltottunk, majd a tenyésztést 4 napig 37°C-on végezzük. A tenyésztés után a sejtszámot Coulter Counterrel meghatározzuk, és az ANS-antitest komplex citotoxicitását értékeljük. Az eredmények az 5. ábrán láthatók.

Az ANS-antitest komplex erős citotoxikus hatást mutat a K562 humán leukémia sejtvonallal szemben, amely rendelkezik hTfR-rel, és erősen kötődik a jelen találmány szerinti bispecifikus antitesthez, de csekély citotoxikus hatása van a P388D₁ egér leukémia sejtvonalra, amelyen nincs hTfR.

5. Példa

(Anti-ANS-anti-humán vesesejt karcinóma bispecifikus hibrid monoklonális antitest előállítás)

(1) Sejtfúzió

A 2. példában leírt módszer szerint az 1. példában előállított AS6-44.9 anti-ANS antitestet termelő hibridómát és a 4. referencia példában előállított RCS-1 anti-humán vesesejt karcinóma antitestet termelő hibridómát fluoreszcens festéshez 30 percig 37°C-on külön-külön Iskove-Ham F12 kevert táptalajban inkubáljuk, amely az AS6-44.9 esetében 0.3 µg/ml FITC-t és az RCS-1 esetében 1.5 µg/ml TRITC-t tartalmaz. LSM oldat hozzáadása (beszerezhető a Wako Pure Chemical Industries, Ltd.-től) és az elpusztult sejtek eltávolítása után a két hibridómát 1:1 arányban összekeverjük és PEG6000-rel fuzionáltatjuk.

Miután két órán át inkubáltuk, a sejteket FACS-ra visszük és 25 000 fluoreszceinnel-rodaminnal duplán festett sejtet izolálunk. Ezeket a duplán festett sejteket (10 sejt/luk) olyan 96 lukas mikrotiter lemezen tenyésztjük, amelyet tápláló sejtekként 5×10^5 sejt/luk koncentrációban egér timocitákkal borítunk.

(2) Hibrid hibridómák szelekciója és klónozása

Azokban a lukakban levő sejteknek a felülúszóját, amelyekben a fúzió után 1-2 héttel sejtszaporodás volt, a következő bispecifikus antitest ELISA eljárásnak vetjük alá, hogy meghatározzuk antitest titerüket. Olyan mikrotiter lemezre, amelyre AM-RC-7 vese ráksejteket (10^4 sejt/luk) adszorbeáltunk, felvisszük a kiválasztott hibrid hibridómák felülúszóját, majd a reakciót szobahőmérsékleten 2 óra hosszat hagyjuk lejátszódni.

Miután a tenyészetet tápfolyadékkal mostuk, HRP-vel jelzett (maytansinol 3- α -aminofenil-acetát)-HSA-t adunk hozzá, majd a reakciót szobahőmérsékleten 2 óra hosszat hagyjuk lejátszódni. A lemezt ezután mossuk. A szilárd fázishoz kötődő enzim aktivitását az 1-(2) referencia példában leírt módszerrel határozzuk meg.

Azokat a lukakat, amelyek magas hibrid antitest aktivitást mutatnak, határhigításos módszerrel klónozzuk, így kapjuk a keresett bispecifikus antitestet termelő RCAS1-488 tetraómat. A 6. ábrán láthatjuk az RCAS1-488 tenyészet felülúszójának antitest higítási görbéjét.

(3) A hibrid antitest tisztítása

Egerenként 5×10^6 tetraóma sejtet oltunk be intraperitonálisan hat olyan BALB/c egérnek, amelyek előzőleg intraperitonálisan 0.5 ml ásványolajat kaptak. Az aszcitesz folyadék felgyülemzése 14-18 nappal később kezdődik. Az aszcitesz folyadékot összegyűjtjük, és 40-50 %-ig telített ammónium-szulfáttal kisózzuk, így kapunk egy IgG frakciót. 20 mmólos PBS-sel (pH=7.5) szembeni dialízis után ezt a frakciót olyan Cellulofine oszlopra visszük, amelyre PDM-3-C₂₀-p-aminobenzil-étert kötöttünk, majd 0.2 mólos glicin-HCl pufferrel (pH=2.9) eluáljuk. A savasan eluált frakciót PBS-sel szemben dializáljuk, majd nagynyomású folyadékkromatográfiának vetjük alá hidroxilapatit oszlopot használva, így kapjuk a jelen találmány szerinti anti-ANS-anti-humán vesesejt karcinóma bispecifikus hibrid antitestet.

20 ml aszcitesz folyadékból körülbelül 5.8 mg bispecifikus antitestet kapunk.

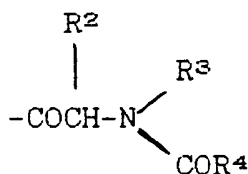
SZABADALMI IGENYPONTOK

1. Eljárás olyan hibrid monoklonális antitest előállítására, amely mind egy ansamitocin származékhoz, mind egy megcélzott antigénhez képes kötődni, azzal jellemezve, hogy az említett hibrid monoklonális antitest előállítására képes polidómát tenyésztünk, és az említett monoklonális antitestet kinyerjük a tenyészetből.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás a megcélzott antigénként egy tumorhoz kapcsolódó antigénhez kötődni képes antitest előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő antitestet nyerjük ki.
3. A 2. igénypont szerinti eljárás a tumorhoz kapcsolódó antigénként humán transzferrin receptorhoz kötődni képes antitest előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő antitestet nyerjük ki.
4. A 2. igénypont szerinti eljárás a tumorhoz kapcsolódó antigénként humán vesesejt karcinómához kapcsolódó glikoproteinekhez kötődni képes antitest előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő antitestet nyerjük ki.
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás z ansamitocin származékként a III általános képletű vegyülethez, ahol R jelentése hidrogénatom vagy karbonsavból származó acil-csoport; Q jelentése hidroxilcsoport vagy merkaptocsoport X jelentése klóratom vagy hidrogénatom; Y jelentése hidrogénatom, rövidszénláncú alkilszulfonilcsoport, alkilcsoport vagy aralkilcsoport, ezek közül bármelyik lehet helyettesített vagy ezeknek 4,5-dezoxi származékaihoz kötődni képes antitest előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő antitestet nyerjük ki.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás R helyén



képletű csoportot tartalmazó, III általános képletű vegyülethez kötödni képes antitest előállítására, amelyben R^1 jelentése 1-18 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, vagy a következő képletű csoport:



ahol R^2 , R^3 és R^4 jelentése 1-18 szénatomos alkilcsoport, Q jelentése hidroxil- vagy merkaptocsoport; X jelentése klóratom; Y jelentése 1-8 szénatomos alkilcsoport, azzal jellemezve, hogy a megfelelő antitestet nyerjük ki.

7. Eljárás egy ansamitocin származék és egy olyan hibrid monoklonális antitest közötti immunkomplex előállítására, amely mind az ansamitocin származékhoz, mind egy megcélzott antigénhez képes kapcsolódni, azzal jellemezve, hogy az említett ansamitocin származékot az említett hibrid monoklonális antissal reagáltatjuk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy megcélzott antigénként egy tumorhoz kapcsolódó antigénhez kötödni képes antitestet alkalmazunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy tumorhoz kapcsolódó antigénként humán transzferrin receptorhoz kötödni képes antitestet alkalmazunk.

10. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy tumorhoz kapcsolódó antigénként humán vesesejt karcinómához kapcsolódó glikoproteinhez kötődni képes antitestet alkalmazunk.

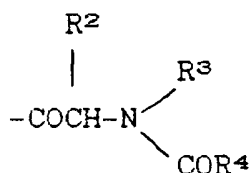
11. Az 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy ansamitocin származékként

III általános képletű vegyületet alkalmazunk, ahol R jelentése hidrogénatom vagy karbonsavból származó acil-csoport; Q jelentése hidroxilcsoport vagy merkaptocsoport; X jelentése klóratom vagy hidrogénatom; Y jelentése hidrogénatom, rövidszénláncú alkilszulfonilcsoport, alkilcsoport vagy aralkilcsoport, ezek közül bármelyik lehet helyettesített vagy ezeknek 4,5-dezoxi származékai.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R helyén



képletű csoportot tartalmazó vegyületet alkalmazunk, amelyben R¹ jelentése 1-18 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, vagy a következő képletű csoport:



ahol R², R³ és R⁴ jelentése 1-18 szénatomos alkilcsoport, Q jelentése hidroxil- vagy merkaptocsoport; X jelentése klóratom; Y jelentése 1-8 szénatomos alkilcsoport.

13. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ansamitocin származékként ansamitocint használunk.

14. Eljárás olyan polidóma előállítására, amely képes egy ansamitocin származék és egy olyan hibrid monoklonális antitest közötti immunkomplex előállítására, amely mind az ansamitocin származékhoz, mind egy megcélzott antigénhez képes kapcsolódni, azzal jellemezve, hogy egy ansamitocin származék előállítására képes állati sejtet olyan állati sejttel fuzionáltatunk, amely a megcélzott antigén elleni antitestet termel.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás egy tetraóma előállítására, azzal jellemezve, hogy mindkét állati sejtként hibridómát használunk

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy megcélzott antigénként egy tumorhoz kapcsolódó antigént használunk.

17. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy tumorhoz kapcsolódó antigénként humán transzferrin receptort használunk.

18. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tumorhoz kapcsolódó antigénként humán vesesejt karcinómához kapcsolódó glikoproteint használunk.

19. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ansamitocin származékként

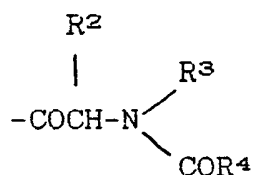
a III általános képletű vegyületet használunk, ahol R jelentése hidrogénatom vagy karbonsavból származó acilcsoport; Q jelentése hidroxilcsoport vagy merkaptó csoport; X jelentése klóratom vagy hidrogénatom; Y jelentése hidrogénatom, rövidszénláncú alkilszulfonil csoport, alkilcsoport vagy aralkilcsoport, ezek közül bármelyik lehet helyettesített vagy ezeknek 4,5-dezoxi származékai.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R

helyén

-COR¹

képletű csoportot tartalmazó III általános képletű vegyületet használunk, amelyben R¹ jelentése 1-18 szénatomot tartalmazó alkilcsoport, vagy a következő képletű csoport:



ahol R², R³ és R⁴ jelentése 1-18 szénatomos alkilcsoport, Q jelentése hidroxil- vagy merkaptocsoport; X jelentése klóratom; Y jelentése 1-8 szénatomos alkilcsoport.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
8.

Válasz

Wang

46 oldal + 6 ábrával

6763/89

1984/90

6763/89

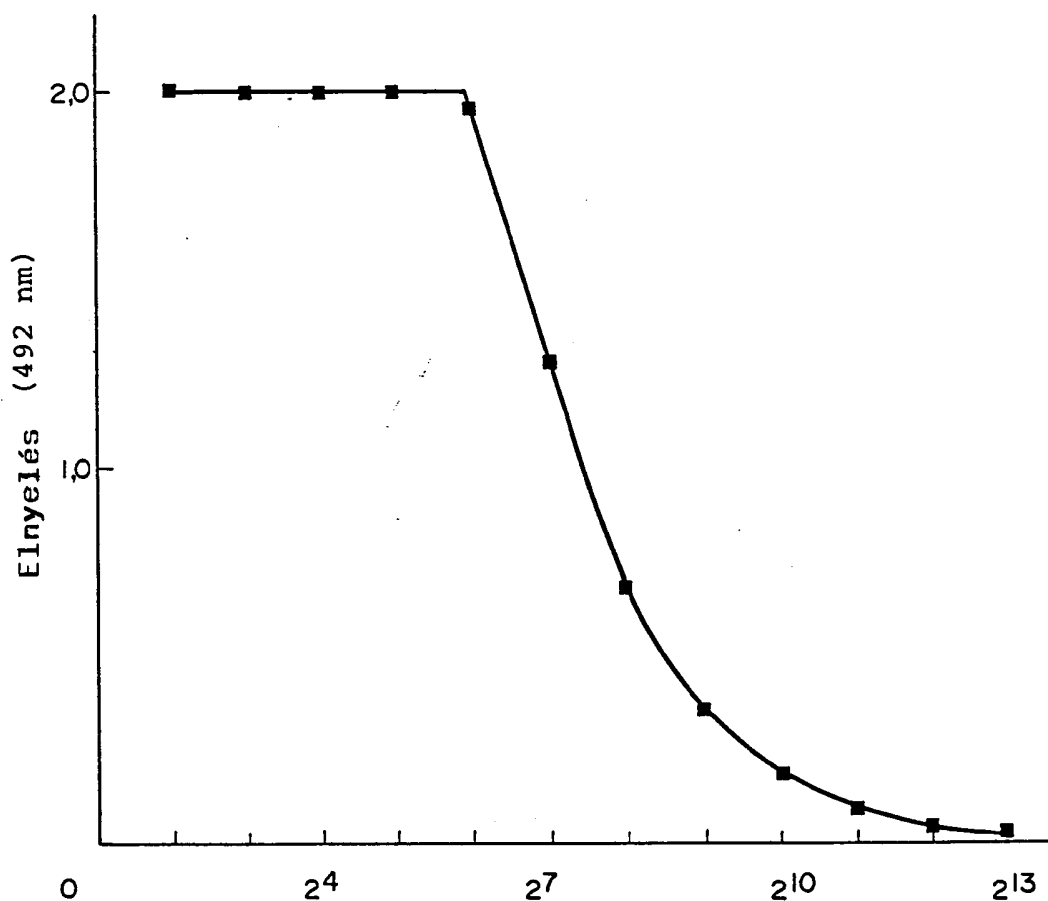
ÖZZÉTÉTELI
MELDÁNY

A

6/1

-53153-

1. ÁBRA



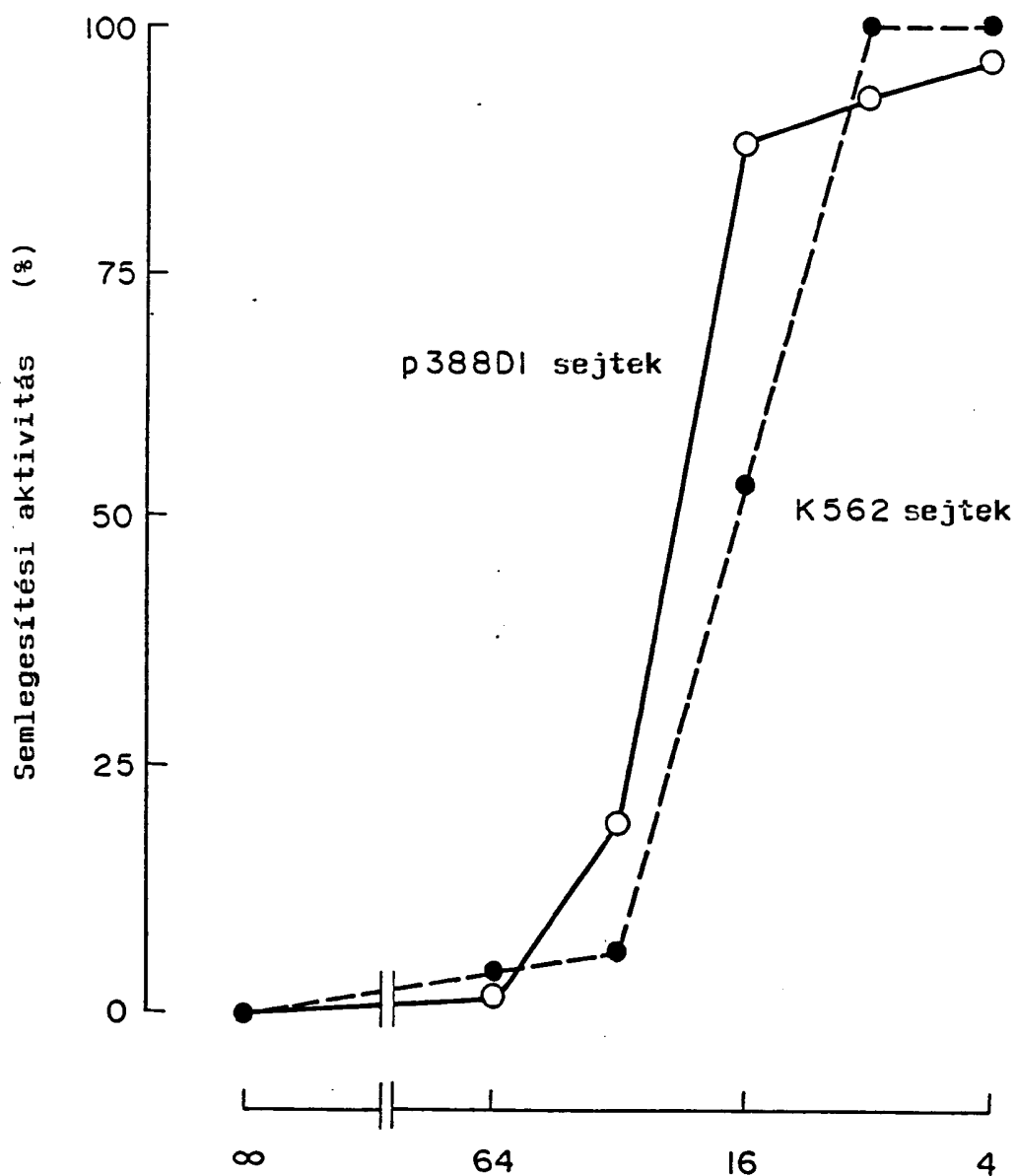
Hibridoma tenyészet felülúszója hígítási faktora

DANUBIA
Szabványi és Védjegy Iroda Kft.

8.
Valos

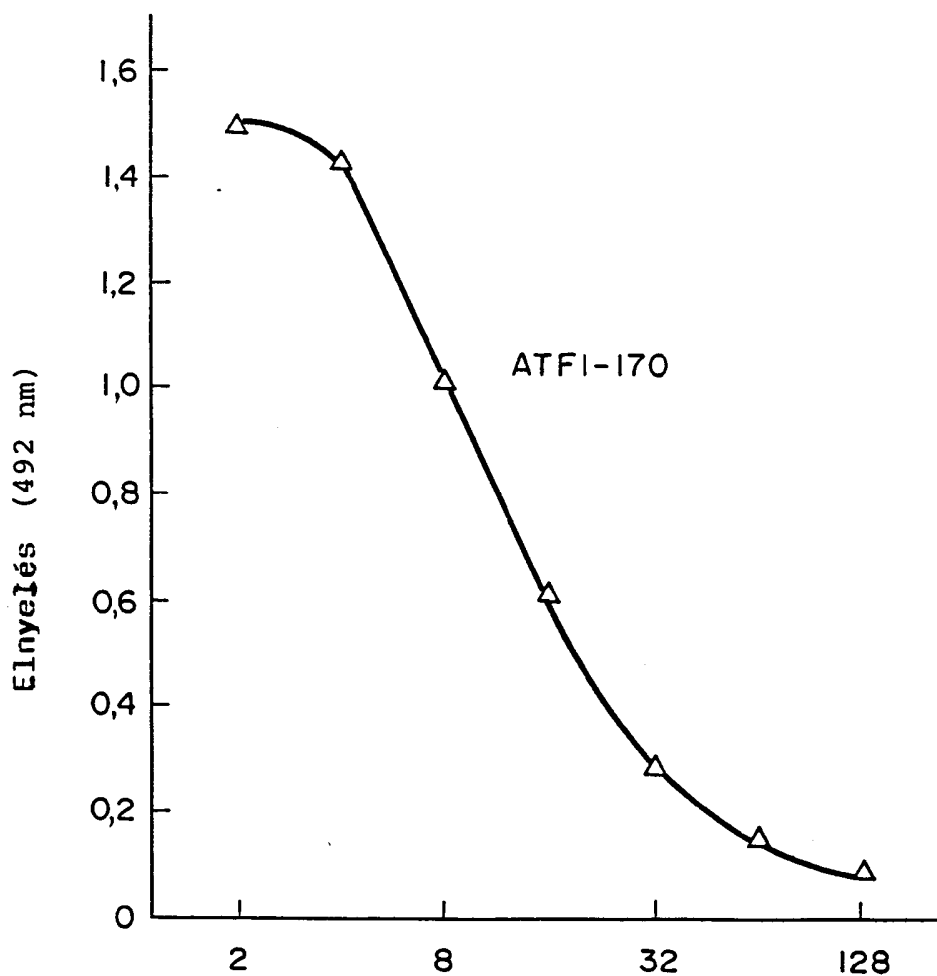
Lin

2. ÁBRA



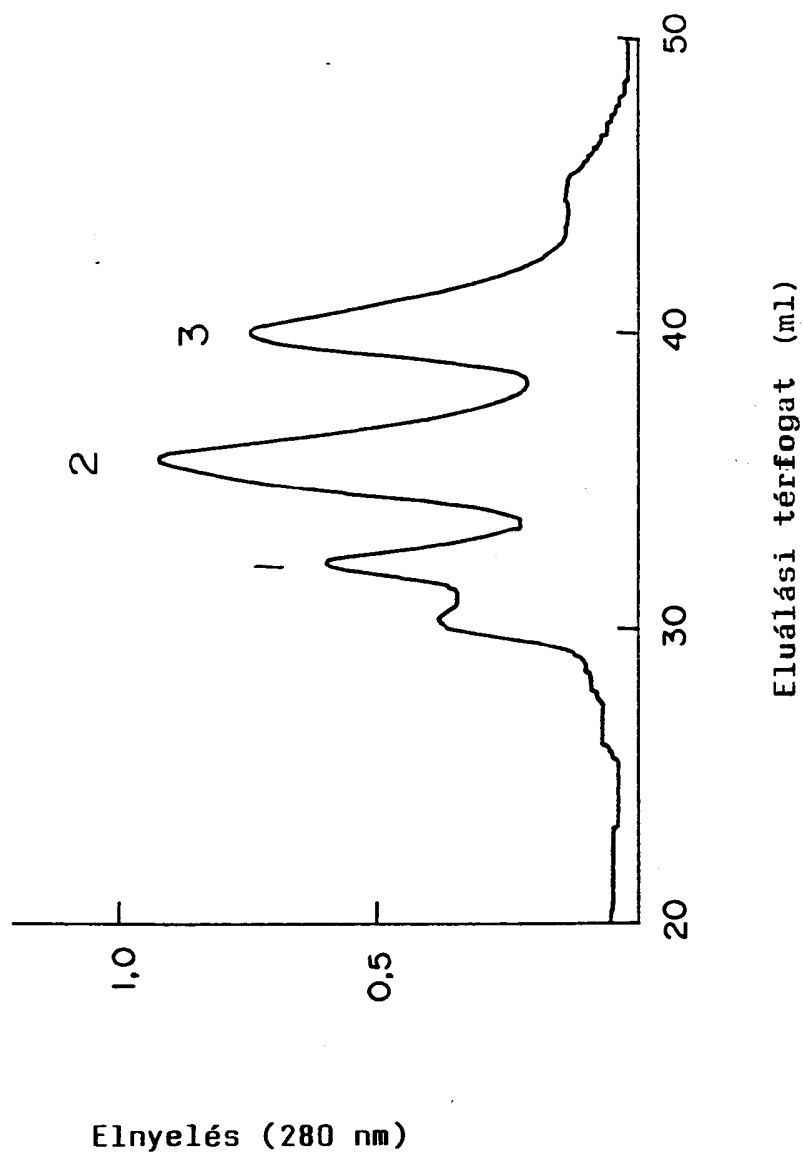
Hibridoma tenyészet felülúszója hígítási faktora

3. ÁBRA

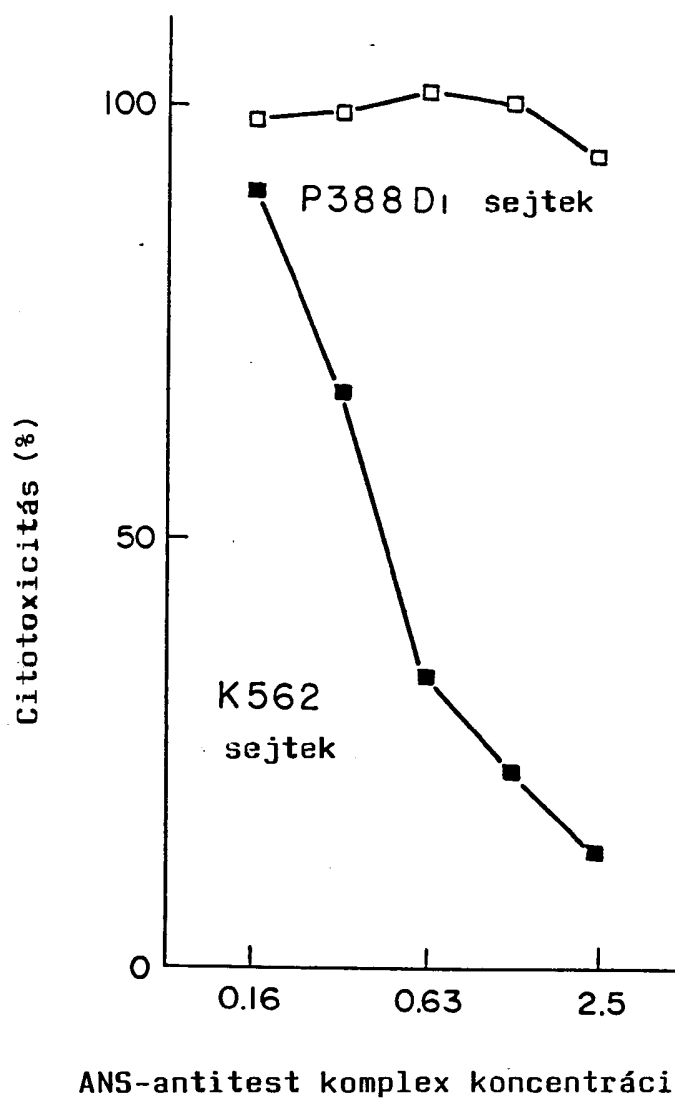


Hibrid hibridoma tenyészet felülúszója
hígítási faktora

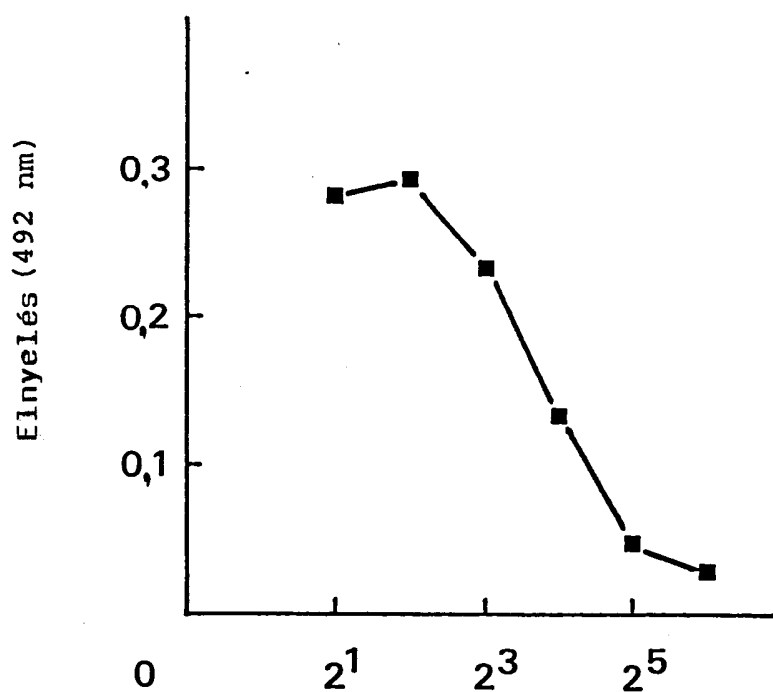
4. ÁBRA



5. ÁBRA



6. ÁBRA



Hibrid hibridoma tenyészet felülűszója
hígítási faktora