



HU000228159B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **228 159**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 00806**(51) Int. Cl.: **C07K 16/00** (2006.01)(22) A bejelentés napja: **2001. 08. 20.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 01/09588(40) A közzététel napja: **2003. 12. 29.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 01. 28.**

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0216436

(30) Elsőbbségi adatok: 0020685.4 2000. 08. 22. GB	(73) Jogosult(ak): Novartis AG., Bazel (CH)
(72) Feltaláló(k): Gram, Hermann, Weil/Rhein (DE) di Padova, Franco E., Birsfelden (CH)	(74) Képviseelő: S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest

(54) **Humán IL-1β elleni antitestek**

(57) Kivonat

A találmány a humán IL-1β elleni antitestekre és ezek alkalmazására vonatkozik IL-1β által közvetített betegségek vagy rendellenességek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására. A találmány tárgyai közelebbről:

- egy IL-1β-kötő molekula, amely mind a nehézlánc mind a könnyűlánc variábilis doméneket és legalább egy antigénkötő helyet tartalmaz;
- legalább egy antigénkötő hellyel rendelkező, IL-1β-kötő molekula, amely egy első és egy második domént tartalmaz;
- expressziós vektor, amely egy első és egy második DNS-szerkezetet tartalmaz;
- eljárás IL-1β-kötő molekula előállítására;
- IL-1β elleni antitest alkalmazása IL-1β által közvetített betegségek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására;
- gyógyszerkészítmény, amely egy IL-1β elleni antitestet tartalmaz gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagokkal együtt.

MEGADÁS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

sz. lírásh → 13-mas levélrel
14-es levélrel

25604 23-31. old.



Humán IL-1 β elleni antitestek

A találmány tárgyát a humán interleukin 1 béta (IL-1 β) elleni antitestek és ezeknek az IL-1-gyel összefüggő betegségek és rendellenességek kezelésére való alkalmazása képezi.

Az interleukin 1-et (IL-1) az immunrendszer sejtjei termelik; aktivitása abban áll, hogy mediátorként hat a gyulladásos válaszok akut fázisában. Az IL-1, különösen az IL-1 β nem megfelelő mértékű vagy túl nagy mennyiségekben való termelése különböző betegségekhez és rendellenességekhez vezet, amilyen pl. vérmérgezés, szeptikus vagy endotoxikus sokk, allergiák, asztma, csontvesztés, isémia, sztrók /gutaütés/, reumás gyulladás és más gyulladásos rendellenességek. Az IL-1 β elleni antitestek alkalmazását már javasolták az IL-1 által közvetített betegségek és rendellenességek kezelésére; lásd például a WO 95/01197 sz. közlési iratot és a bevezető részében foglalt tárgyalást.

Mi most előállítottunk javított tulajdonságokkal rendelkező antitesteket a humán IL-1 β ellen IL-1 által közvetített betegségek és rendellenességek kezelésében történő alkalmazásra.

Ennek megfelelően a találmány egy IL-1 β -kötő molekulát bocsát rendelkezésre, amely tartalmaz egy antigénkötő helyet, amely tartalmaz

a) egy immunglobulin nehézlánc variábilis domént (V_H), amely sorrendben a CDR1, CDR2 és CDR3 hipervariábilis régiókat tartalmazza, ahol az említett CDR1 a Val-Tyr-Gly-Met-Asn aminosav-szekvenciával, az említett CDR2 az Ile-Ile-Trp-Tyr-



Asp-Gly-Asp-Asn-Gln-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly aminosav-szekvenciával és az említett CDR3 az Asp-Leu-Arg-Thr-Gly-Pro aminosav-szekvenciával rendelkezik, és

b) egy immunglobulin könnyűlánc variábilis domént (V_L), amely sorrendben a CDR1', CDR2' és CDR3' hipervariábilis régiókat tartalmazza, ahol az említett CDR1' az Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Ser-Ser-Leu-His aminosav-szekvenciával, az említett CDR2' az Ala-Ser-Gln-Ser-Phe-Ser aminosav-szekvenciával és a CDR3' a His-Gln-Ser-Ser-Ser-Leu-Pro aminosav-szekvenciával rendelkezik;

és ezek közvetlen ekvivalensei, amelyekben a CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' és CDR3' hipervariábilis régiók, egy egészeknek tekintve, legalább 95%-ban homológok az a) és b) alatti hipervariábilis régiókkal,

és kötő specificitással bírnak a humán IL-1 β azon antigénikus epitópjához, amely magában foglalja az érett humán IL-1 β Glu64 maradékát tartalmazó hurkot, és képesek gátni az IL-1 β kötődését saját receptorához, és K_D értékük az IL-1 β -hoz való kötődésre 50 pM vagy ennél kevesebb.

Hacsak másként nem jelezzük, az itt leírt valamennyi polipeptid lánc aminosav-szekvenciája az N-terminális végtől kezdődik és a C-terminális véggel végződik. Ha egy antigénkötő hely mind a V_H mind a V_L domént tartalmazza, ezek elhelyezkedhetnek ugyanazon a polipeptid molekulán, vagy előnyösen a domének különböző láncban találhatók, a V_H domén része lehet egy immun-

globulin nehézláncnak vagy fragmentumának és a V_L domén része lehet egy immunglobulin könnyűláncnak vagy fragmentumának.

Az „IL-1 β -kötő molekula” minden olyan molekulát jelent, amely képes kötődni az IL-1 β antigénhez önmagában vagy más molekulákkal társulva. A kötődési reakció standard módszerekkel (kvalitatív esszékkal) kimutatható, pl. egy bioesszé az IL-1 β receptorához való kötődése gátlásának meghatározására, vagy bármilyen típusú kötődési vizsgálat egy negatív kontroll teszthez viszonyítva, amelyben nem rokon specificitású, de azonos izotípusú antitestet, pl. egy anti-CD25 antitestet alkalmazunk. Előnyösen a találmány szerinti IL-1 β -kötő molekuláknak az IL-1 β -hez való kötődése kompetitív kötődési vizsgálatokkal mutatható ki.

Az antigén-kötő molekulák közé tartoznak pl. a következők: B-sejtek vagy hibridómák által termelt antitestek, és kiméra, CDR-beültetett vagy humán antitestek vagy ezek fragmentumai, pl. $F(ab')_2$ és Fab fragmentumok, valamint az egyetlen láncal vagy egyetlen doménnel rendelkező antitestek.

Egy egyetlen láncú antitest egy antitest nehéz- és könnyűláncainak variábilis doménjeiből áll, amelyeket kovalens kötéssel kapcsol össze egy peptidlinker, mely rendszerint 10-30, előnyösen 15-25 aminosavból áll. Ezért egy ilyen szerkezet nem foglalja magában a nehéz- és a könnyűláncok konstans részét és úgy véljük, hogy a kis peptid távtartónak (spacer) kevésbé antigénnek kell lennie, mint a teljes konstans résznek.

Egy „kiméra antitest” olyan antitestet jelent, amelyben a nehézlánc vagy a könnyűlánc vagy mindkettő konstans régiói humán



eredetűek, míg mind a nehéz- mind a könnyűláncok variábilis régiói nem-humán (pl. egér) eredetűek, vagy humán eredetűek, de egy eltérő humán antitestből származnak. A „CDR-beültetett antitest” („CDR-grafted antibody”) olyan antitestet jelent, amelyben a hipervariábilis régiók (CDR-ek) egy donor antitestből származnak, mint pl. egy nem-humán (pl. egér) antitest vagy egy eltérő humán antitest, mimellett az immunglobulin valamennyi vagy lényegében valamennyi többi része, pl. a konstans régiók és a variábilis domének leginkább konzerválódott részei, azaz a framework régiók, egy akceptor antitestből származnak, pl. egy humán-eredetű antitestből. Egy CDR-beültetett antitest azonban tartalmazhatja a donor szekvencia néhány aminosavát a framework régiókban, például a framework régiók azon részeiben, amelyek szomszédosak a hipervariábilis régiókkal. A „humán antitest” egy olyan antitestet jelent, amelyben mind a nehéz- mind a könnyűláncok konstans és variábilis régiói egyöntetűen humán eredetűek, vagy lényegében azonosak humán eredetű, nem szükségképpen ugyanebből az antitestből származó szekvenciákkal, és magában foglal egér által termelt antitesteket, amelyekben az egér immunglobulin variábilis és konstans részeinek génjei humán megfelelőikkel vannak helyettesítve. Ilyeneket ismertető általános vonatkozásokban az EP 0 546 073 B1, az US 5 545 806, S 569 825, S 625 126, S 633 425, S 661 016, S 770 429, EP 0 438 474 B1 és EP 0 463 151 B1.



A találmány szerinti, IL-1 β -kötő molekulák közül különösen előnyösek a humán antitestek, főként a továbbiakban a példákban leírt ACZ 885 antitest.

Igy az előnyös kiméra antitestekben mind a nehéz- mind a könnyűláncok variábilis doménjei humán eredetűek, pl. az ACZ 885 antitest doménjei, melyeket a Seq.Id.No.1-ben és Seq.Id.No.2-ben mutatunk be. A konstans régió doménjei előnyösen szintén alkalmas konstans humán régió domének; ilyeneket ismertetnek pl. Kabat E.A. és mtsai a következő helyen: „Sequences of Proteins of Immunological Interest”, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.

A hipervariábilis régiók bármilyen framework régióhoz kapcsolódhatnak, bár előnyben részesítjük a humán eredetűeket. Megfelelő framework régiókat ismertet Kabat E.A. és mtsai az előbb idézett helyen. Az előnyös nehézlánc framework egy humán nehézlánc framework, pl. az ACZ 885 antitesté, melyet a Seq.Id. No.1-ben mutatunk be. Ez tartalmazza sorrendben az FR1, FR2, FR3 és FR4 régiókat. Hasonló módon a Seq.Id.No.2 bemutatja az előnyös ACZ 885 könnyűlánc leolvasási keretet, amely sorrendben az FR1', FR2', FR3' és FR4' régiókat tartalmazza.

Ennek megfelelően a találmány egy olyan IL-1 β -kötő molekulát is rendelkezésre bocsát, amely legalább egy antigénkötő helyet tartalmaz, amely magában foglal egy első domént, melynek aminosav-szekvenciája azonos a Seq.Id.No.1-ével az 1. helyzetű aminosavtól kiindulva és a 118. helyzetű aminosavval végezve, vagy egy fent-leírt első domént és egy második domént, amelynek ami-



nosav-szekvenciája azonos a Seq.Id.No.2-ével az 1. helyzetű aminosavtól kiindulva és a 107. helyzetű aminosavval végezve.

A természetben valamennyi emberben előforduló valamely fehérje elleni monoklonális antitestet jellemző módon nem-humán rendszerben (pl. egérben) fejlesztették ki, következésképpen ezek jellemzően nem-humán fehérjék. Ennek egyenes következménye, hogy egy hibridóma által termelt xenogén antitest az emberbe beadva nem-kívánt immunválaszt vált ki, amelyet domináns módon a xenogén immunglobulin konstans része közvetít. Ez a körülmény nyilván korlátozza ezeknek az antitesteknek az alkalmazását, mivel ezek nem adagolhatók hosszabb időtartamon át. Ezért különösen előnyös az egyetlen láncsal, egyetlen doménnel rendelkező, kiméra, CDR-beültetett vagy különösen humán antitestek alkalmazása, amelyek emberbe beadva valószínűleg nem váltanak ki jelentős allogén választ.

A fentiek alapján egy még előnyösebb találmány szerinti IL-1 β -kötő molekulát az 1. igénypont szerinti humán IL-1 β -elleni antitestekből választunk ki.

Alternatív módon, egy találmány szerinti IL-1 β -kötő molekulát kiválaszthatunk egy egyláncú kötő molekulából, amely tartalmaz egy antigénkötő helyet, amely tartalmaz

- a) egy első domént, amely a CDR1, CDR2 és CDR3 hipervariábilis régiókat tartalmazza a szekvenciában, az említett hipervariábilis régiók aminosav-szekvenciáját a Seq.Id.No.1-ben mutatjuk be,

- b) egy második domént, amely a CDR1', CDR2' és CDR3' hipervariábilis régiókat tartalmazza, az említett hipervariábilis régiók szekvenciáját a Seq.Id.No.2-ben mutatjuk be és
- c) egy peptidlinkert, amely az első domén N-terminálisához és a második domén C-terminálisához kötődik, vagy az első domén C-terminálisához és a második domén N-terminálisához kötődik;

és a fent-definiáltak közvetlen ekvivalensei.

Mint ez közismert, az aminosav-szekvenciában beállt kisebb változások, mint pl. egy, néhány vagy több aminosav deléciója, addíciója vagy helyettesítése az eredeti fehérje allél alakjának megjelenéséhez vezethet, amely lényegében azonos tulajdonságokkal rendelkezik.

Ennélfogva a „közvetlen ekvivalensei” kifejezés bármely IL-1 β -kötő molekulát jelent, amely kötéshelyenként legalább két 1. igénypont szerinti doménnel rendelkezik (X' molekula).

Az IL-1 β receptorához való kötődésének a gátlását egyszerűen vizsgálhatjuk különböző, pl. a következőkben leírábdó tesztek segítségével. Az „azonos mértékű (mértékben)” kifejezés azt jelenti, hogy a preferencia és a az ekvivalens molekulák statisztikai alapon lényegében azonos IL-1 β -kötődés gátlási görbéket mutatnaka fent-említett vizsgálatok egyikében. A találmány szerinti IL-1 β -kötő molekulákban például az IL-1 β receptorához való kötődésének a gátlására jellemzően olyan IC₅₀-értékeket kapunk, amelyek a megfelelő referencia molekula azonos módszerrel vég-

zett vizsgálatával kapott IC_{50} -értékekhez képest a ± 5 tartományban helyezkednek el, vagy előnyösen lényegében azokkal megegyeznek.

Így például az alkalmazott esszé lehet az IL-1 β kötődésének kompetitív gátlására irányuló esszé oldható IL-1 receptorokkal és a találmány szerinti IL-1 β -kötő molekulákkal.

Legelőnyösebben, a humán IL-1 β elleni antitest tartalmaz legalább

- a) egy nehézláncot, amely tartalmaz egy variábilis domént, melynek aminosav-szekvenciája azonos a Seq.Id.No.1-ben bemutatottal az 1. helyzetű aminosavtól kiindulva és a 118. helyzetű aminosavval végezve, és egy humán nehézlánc konstans részét; és
- b) egy könnyűláncot, amely tartalmaz egy variábilis domént, melynek aminosav-szekvenciája azonos a Seq.Id.No.2-ben bemutatottal az 1. helyzetű aminosavtól kiindulva és a 107. helyzetű aminosavval végezve, és egy humán könnyűlánc konstans részét.

Egy humán nehéz lánc konstans része γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , μ , α_1 , α_2 , δ vagy ϵ típusú, előnyösen γ típusú és még előnyösebben γ_1 típusú, míg a humán könnyűlánc konstans része κ vagy λ típusú (amely magában foglalja a λ_1 , λ_2 és λ_3 altípust), de előnyösen κ típusú. Kabut et al. előbbiekből említett cikke közli minden ilyen konstans rész aminosav szekvenciáját.

A találmány szerinti, IL-1 β -kötő molekulák rekombináns DNS technikákkal állíthatók elő. Ennek során létre kell hozni egy vagy több, a kötő molekulát kódoló DNS molekulát, behelyezni al-



kalmas kontroll szekvenciák alá és expresszió céljából megfelelő gazdaszervezetbe átvinni.

Egészen általános megfogalmazásban tehát biztosítjuk a találmány szerinti DNS molekulák alkalmazását egy találmány szerinti IL-1 β -kötő molekula termelésére rekombináns módszerekkel.

A technika jelenlegi állása mellett a szakember képes a találmány szerinti DNS molekulák szintetizálására, ha rendelkezésére áll az általuk hordozott információ, azaz a hipervariábilis régiók aminosav-szekvenciája és az ezeket kódoló DNS-szekvenciák. Egy variábilis domén gén létrehozására irányuló eljárást ír le pl. az EPA 239 409, amely röviden a következőkben foglalható össze: klónoznak egy gént, amely egy bármilyen specificitású monoklonális antitest (MAb) variábilis doménjét kódolja. Meghatározzák a leolvasó keretet és a hipervariábilis régiókat kódoló DNS-szegmenseket, majd a hipervariábilis régiókat kódoló DNS-szegmenseket eltávolítják úgy, hogy a leolvasó keret régiókat kódoló DNS-szegmensek a csatlakozásnál megfelelő restriktációs helyekkel kapcsolódjanak össze. A restriktációs helyek a DNS-molekula standard eljárásokkal végzett mutagenézisével alakíthatók ki a megfelelő helyeken. Kettős-szálú CDR-kazettákat készítenek DNS-szintézissel a Seq.Id.No.1-ben vagy 2-ben megadott szekvenciák szerint. Ezekben a kazettákban ragadós végeket biztosítanak annak érdekében, hogy ezeket ligálni lehessen a leolvasó keret csatlakozásainál.

Továbbá nem szükséges, hogy rendelkezésre álljon egy termelő hibridóma sejtvonalból az mRNS annak érdekében, hogy megkapjuk a

találmány szerinti IL-1 β -kötő molekulákat kódoló DNS-szerkezetet. A WO 90/07861 PCT közzétételi irat részletes információkat ad arra vonatkozóan, hogyan állítható elő egy antitest rekombináns DNS-technikákkal, ha csak írásos tájékoztatás áll rendelkezésre a gén nukleotid-szekvenciájára vonatkozóan. Az eljárás magában foglalja nagyszámú oligonukleotid megszintetizálását, PCR módszerrel történő amplifikálását és hasítását a kívánt DNS-szekvencia előállítására.

Expressziós vektorok, melyek egy alkalmas promotert tartalmaznak, vagy a nehéz- és könnyűlánc konstans részeit kódoló gének a köz számára hozzáférhetőek. Így, miután előállítottuk a találmány szerinti DNS-molekulát, egyszerűen átvihetjük azt egy megfelelő expressziós vektorba. Az egyetlen láncú antitesteket kódoló DNS-molekulák standard módszerekkel is (pl. a WO 88/1649-ben leírtak) előállíthatók.

Az előbbiek alapján a leírás teljessége kritériumának kielégítésére nem szükséges a hibridóma vagy a sejtvonal letétbe helyezése.

A találmány magában foglal egy expressziós vektort, amely tartalmaz egy első és egy második DNS-szerkezetet egy IL-1 β -kötő molekula termelésére az alábbiak szerint:

Az első DNS-szerkezet egy nehézláncot vagy fragmentumát kódolja és tartalmaz

- a) egy első részt, amely egy variábilis domént kódol, amely nagyjából framework régiót és hipervariábilis régiókat tartalmaz, az említett hipervariábilis régiók a Seq.Id.No.1-ben



bemutatott CDR1, CDR2 és CDR3 aminosav-szekvenciával rendelkeznek a szekvenciában; ez az első rész egy, a variábilis domén első aminosavát kódoló kodonnal indul és a variábilis domén utolsó aminosavát kódoló kodonnal végződik, és

b) egy második részt, amely egy nehézlánc konstans részét vagy ennek fragmentumát kódolja, amely a nehézlánc konstans része első aminosavát kódoló kodonnal indul és a konstans rész vagy fragmentuma utolsó aminosavát kódoló kodonnal végződik, amelyet egy stop kodon követ.

Az első rész egy variábilis domént kódol, melynek aminosav-szekvenciája azonos a Seq.Id.No.1-ben bemutatott aminosav-szekvenciával az 1. helyzetű aminosavtól kiindulva és a 118. helyzetű aminosavval végezve. Még előnyösebben az első rész a Seq.Id.No.1-ben bemutatott nukleotid-szekvenciával rendelkezik az 1. helyzetű nukleotiddal kezdve és a 354. helyzetű nukleotiddal végezve. Ugyancsak előnyösen a második rész egy humán nehézlánc konstans részét kódolja, még előnyösebben a humán γ 1 lánc konstans részét. Ez a második rész lehet egy genomiális eredetű DNS-fragmentum (ideértve az intronokat) vagy egy cDNS fragmentum (intronok nélkül).

A második DNS-szerkezet egy könnyűláncot vagy fragmentumát kódolja és tartalmaz

a) egy első részt, amely egy variábilis domént kódol, amely nagyjából framework régiót és hipervariábilis régiókat tartalmaz, az említett hipervariábilis régiók a CDR3' és adott esetben CDR1' és CDR2'; melyek aminosav-szekvenciáját a

Seq.Id.No.2-ben mutatjuk be; ez az első rész egy, a variábilis domén első aminosavát kódoló kodonnal indul és a variábilis domén utolsó aminosavát kódoló kodonnal végződik, és

b) egy második részt, amely egy könnyűlánc konstans részét vagy ennek fragmentumát kódolja, amely a könnyűlánc konstans része első aminosavát kódoló kodonnal kezdődik és a konstans rész vagy fragmentuma utolsó aminosavát kódoló kodonnal végződik, amelyet egy stop kodon követ.

Az első rész egy variábilis domént kódol és ennek aminosav-szekvenciája azonos a Seq.Id.No.2-ben bemutatott aminosav-szekvenciával az 1. helyzetű aminosavtól kiindulva és a 107. helyzetű aminosavval végezve. Még előnyösebben az első rész a Seq.Id.No.2-ben bemutatott nukleotid-szekvenciával rendelkezik, amely az 1. helyzetű nukleotiddal indul és a 321. helyzetű nukleotiddal végződik. Ugyancsak előnyösen a második rész egy humán könnyűlánc konstans részét, még előnyösebben a humán κ lánc konstans részét kódolja.

Az első és a második DNS-szerkezetben az első és a második részt egy intron választhatja el egymástól és az intronban, az első és második rész között szokásosan elhelyezhető egy enhancer (fokozó). Egy ilyen enhancer jelenléte, amely átíródik, de nem transzlatálódik, elősegítheti a hatékony transzkripciót. Előnyös kiviteli alakokban az első és a második DNS-szerkezet tartalmazza egy nehézlánc gén enhancerét, előnyösen humán eredetűt.

Mindegyik DNS-szerkezetet megfelelő kontroll szekvenciák, közelebbről egy megfelelő promóter kontrollja alá helyezzük.

Bármilyen promóter használható, feltéve, hogy adaptálva van a gazdaszervezethez, amelybe a DNS-szerkezeteket az expresszióhoz átviszük. Ha azonban az expresszió egy emlős sejttben megy végbe, különösen előnyös egy immunglobulin gén promóterének alkalmazása.

A kívánt antitest előállítható egy sejttenyészetben vagy egy transzgenikus állatban. Egy megfelelő transzgenikus állat megkapható standard módszerekkel, ezek közé tartozik a megfelelő kontroll szekvenciák alá behelyezett első és második DNS-szerkezet mikroinjektálása tojásokba, az így előkészített tojások átvitele a megfelelő pszeudoterhes nőnemű egyedekbe és a kívánt antitestet expresszáló utód kiválasztása.

Ha az antitest-láncokat sejttenyészetben állítjuk elő, a DNS szerkezeteket először vagy egyetlen expressziós vektorba vagy két különálló, de kompatibilis expressziós vektorba kell inszertálni, az utóbbi megoldást részesítjük előnyben.

Következésképpen ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy expressziós vektor, amely replikálódni képes egy prokarióta vagy eukarióta sejtvonalban, amely a fentiekben leírt DNS-szerkezetek legalább egyikét tartalmazza.

Ezután mindegyik, DNS-szerkezetet tartalmazó, expressziós vektort átviszük egy megfelelő gazdaszervezetbe. Ha a DNS-szerkezeteket külön inszertáljuk két expressziós vektorba, az átvitel történhet külön-külön, azaz a vektor egyik típusa/sejt, vagy kotranszformáljuk, ez utóbbi lehetőséget részesítjük előnyben. Megfelelő gazdaszervezet lehet egy baktérium, egy élesztő vagy



egy emlős sejtvonal, ez utóbbit részesítjük előnyben. Előnyösebben az emlős sejtvonal limfoid eredetű, pl. egy mielóma, hibridóma vagy egy normális "halhatatlanná tett" B-sejt, amely szokásosan nem fejez ki semmilyen endogén antitest nehéz- vagy könnyűláncot.

Az emlős sejtekben történő expresszióhoz előnyben részesítjük azt a megoldást, mely szerint az IL-1 β -kötő molekulát kódoló szekvenciát a gazdasejt DNS-ébe egy olyan lokuszon belül integráljuk, amely lehetővé teszi vagy elősegíti az IL-1 β -kötő molekula magas szinten való expresszióját. Azokat a sejteket, amelyekben az IL-1 β -kötő molekulát kódoló szekvencia ilyen előnyös lokuszokba van integrálva, azonosíthatjuk és szelektálhatjuk az általuk kifejezett IL-1 β -kötő molekulák mennyisége alapján. Az IL-1 β -kötő molekulát kódoló szekvenciát tartalmazó gazdasejt előállítására bármely alkalmas szelekciós marker felhasználható, amilyen pl. egy dhfr gén/metotrexát vagy egy ezzel ekvivalens szelekciós rendszer. Alternatív rendszerek a találmány szerinti IL-1 β -kötő molekulák expressziójához pl. a GS-alapú amplifikációs/szelekciós rendszerek. Ilyen rendszereket ismertetnek az EP 0 256 055 B; 0 323 997 B európai szabadalomban és a 89303984.4 sz. európai szabadalmi bejelentésben.

A találmány egy további tárgyát képezi egy eljárás egy IL-1 β -kötő molekula előállítására, amely magában foglalja (i) egy előbbiekben meghatározott expressziós vektorral transzformált organizmus tenyésztését, és (ii) az IL-1 β -kötő molekula kinyerését a sejttenyészetből.



A találmány szerinti kitanításnak megfelelően azt találtuk, hogy az ACZ 885 antitest kötő specificitást mutat a humán IL-1 β antigén epitópja irányába, amely magában foglalja az érett humán IL-1 β Glu 64 maradékát tartalmazó hurkot. (Az érett humán IL-1 β Glu 64 maradéka megfelel a humán IL-1 β prekursor 180. maradékának.) Ez az epitóp úgy tűnik, hogy kívül van az IL-1 receptor felismerő helyén, és ezért nagyon meglepő, hogy ezen epitóp elleni antitestek, pl. az ACZ 885 antitest, képesek az IL-1 β receptorához való kötődésének gátlására. Az antitestek, előnyösen a kiméra és a CDR-beültetett antitestek és különösen a humán antitestek, amelyek kötő specificitást mutatnak az érett humán IL-1 β antigén epitópja iránt, amely magában foglalja a Glu 64 maradékot tartalmazó hurkot, és amelyek képesek gátolni az IL-1 β receptorához való kötődését; és az ilyen antitestek alkalmazása az IL-1 által közvetített betegségek és rendellenességek kezelésére, újak és a találmány oltalmi körébe tartoznak.

A találmány tárgya tehát további vonatkozásokban:

- i) egy találmány szerinti IL-1 β elleni antitest alkalmazása, amely antigénkötő specificitást mutat a humán IL-1 β egy antigén epitópja tekintetében, mely magában foglal egy, az érett humán IL-1 β Glu 64 maradékát tartalmazó hurkot, és amely képes az IL-1 β receptorához való kötődésének gátlására, egy IL-1 közvetített betegség vagy rendellenesség kezelésére;
- ii) gyógyszerkészítmény, amely egy találmány szerinti IL-1 β elleni antitestet tartalmaz, amely antigénkötő specificitást



tást mutat az érett humán IL-1 β egy antigén epitópja tekintetében, mely magában foglal egy, a Glu 64 maradékot tartalmazó hurkot, és amely képes az IL-1 β receptorához való kötődésének gátlására, egy gyógyszerészetileg elfogadható segédanyaggal, hígítóval vagy vivőanyaggal együtt; és

iii) egy találmány szerinti IL-1 β elleni antitest alkalmazása, amely antigénkötő specificitást mutat az érett humán IL-1 β egy antigén epitópja tekintetében, mely magában foglal egy, a Glu 64 maradékot tartalmazó hurkot, és amely képes az IL-1 β receptorához való kötődésének gátlására, egy IL-1 β által közvetített betegség vagy rendellenesség kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

A találmány leírása vonatkozásában egy antitest "az IL-1 β kötődésének gátlására képes", ha képes az IL-1 β receptorához való kötődését lényegében ugyanolyan mértékben gátolni mint az ACZ 885 antitest, ahol az "ugyanolyan mértékben" kifejezés a fentiekben meghatározott.

Igy az ACZ 885 K_D disszociációs egyensúlyi állandója az IL-1 β -kötésre vonatkozóan kisebb, mint kb. 50 pM, például körülbelül 35 pM. Ez a magas kötési affinitás az ACZ antitestet különösen alkalmassá teszi a terápiás alkalmazásra.

Ismertetünk egy IL-1 β elleni antitestet, amelynek K_D disszociációs egyensúlyi állandója az IL-1 β -kötésre vonatkozóan körülbelül 50 pM vagy ennél kisebb. A találmánynak ez a vonatkozása magában foglal alkalmazási módszereket és készítményeket is az ilyen magas aktivitású antitestekkel kapcsolatban, amint ezeket



az előbbiekben az IL-1 β elleni antitestekkel összefüggésben leírtuk, amelyek kötési specificitással rendelkeznek az érett humán IL-1 β antigén determinánsához, amely a Glu 64-et tartalmazó hurkot magában foglalja.

A találmány leírása keretében az "IL-1 által közvetített betegség" minden olyan betegséget és orvosi szempontból értékelhető rendellenességet magában foglal, amelyben az IL-1 közvetlenül vagy közvetve szerepet játszik, ideértve a betegség és orvosi szempontból értékelhető rendellenesség okait, kialakulását, előrehaladását, állandósulását vagy patológiáját.

A találmány leírása keretében a "kezelés" vagy "kezel" kifejezés vonatkozik a megelőzésre vagy megelőző kezelésre és a gyógyítási vagy a betegséget enyhítő kezelésre egyaránt, ideértve az olyan beteg kezelését, aki veszélyeztetett a betegség támadásával szemben vagy aki gyaníthatóan megkapta a betegséget és az olyan betegeket, akik betegek vagy akikről megállapították, hogy egy adott betegségben vagy orvosi szempontból értékelhető rendellenességben szenvednek, és ide tartozik a klinikai visszaesés elnyomása is.

A találmány szerinti antitesteket az igénypontokban definiáljuk.

Előnyösen a találmány szerinti antitestek humán antitestek, még előnyösebben a AC2 885 antitest vagy ennek közvetlen ekvivalensei.

A találmány szerinti antitestek blokkolják az IL-1 β célsejtekre irányuló hatásait, ezért alkalmazásuk javallott az IL-1 β



által közvetített betegségek és rendellenességek kezelésében. A találmány szerinti antitestek ezen és egyéb irányú gyógyászati hatásait standard vizsgálati módszerekkel mutathatjuk ki, pl. a következőkben leírtak szerint.

A PGE₂ és az interleukin-6 IL-1 β -tól függő termelődésének semlegesítése primer humán fibroblasztokkal

A PGE₂ és az interleukin-6 termelődése primer humán fibroblasztokban függ az IL-1 β -tól. Önmagában a TNF nem képes hatásosan indukálni ezeket a gyulladás közvetítőket, de szinergikus az IL-1-gyel. Az IL-1 által indukált sejt-aktiválódáshoz modellként primer bőr fibroblasztokat alkalmazunk.

A primer humán fibroblasztokat rekombináns IL-1 β -val vagy kondicionált táptalajjal stimuláljuk, amelyet LPS-sel stimulált humán PBMC-kből nyerünk ki különböző koncentrációjú (6-18000 pM) találmány szerinti antitestek vagy IL-1RA jelenlétében. Megfelelő izotípus kontrollként a Simulect^R /basiliximab/ kiméra anti-CD25 antitestet alkalmazzuk. 16 órán át való stimulálás után a felülúszóból mintát veszünk és ELISA-val meghatározzuk az IL-6 mennyiségét. A találmány szerinti antitestek IC₅₀-értékei jellemzően az IL-6-termelés gátlási vizsgálatban körülbelül 1 nM vagy ennél kevesebbnek (pl. körülbelül 0,1 - körülbelül 1 nM) adódtak, amikor a fentiek szerint teszteltük azokat.

Amint a fenti vizsgálat mutatja, a találmány szerinti antitestek hatásosan blokkolják az IL-1 β hatásait. Ennek megfelelően



a találmány szerinti antitestek felhasználhatók a gyógyításban, a következők szerint.

A találmány szerinti antitestek felhasználhatók az IL-1 által közvetített betegségek vagy orvosilag értékelhető állapotok megelőzésében és kezelésében, amilyenek pl. a következők: gyulladáscsökkentő állapotok, allergiák és allergiás állapotok, túlérzékenységi reakciók, autoimmun betegségek, súlyos fertőzések, és szerv- vagy szövet-kilökődés transzplantáció után.

A találmány szerinti antitestek alkalmazhatók a recipiens kezelésére szív, tüdő, kombinált szív-tüdő, máj, vese, hasnyálmirigy, bőr vagy szaruhártya átültetés során, ideértve az allograft kilökődést vagy a xenograft kilökődést, és a graft-versus-host betegség megelőzésére, pl. a csontvelő átültetését követően, és az arterioszklerózissal összefüggő szerv transzplantációk során.

A találmány szerinti antitestek különösen felhasználhatók autoimmun betegségek és gyulladáscsökkentő állapotok kezelésére, megelőzésére vagy enyhítésére, ilyenek különösen a következők: gyulladáscsökkentő állapotok, amelyek etiológiájában szerepel egy autoimmun komponens, úgymint artritisz (pl. reumatoid artritisz, krónikus progresszív artritisz és artritisz deformans), és reumás betegségek, beleértve a gyulladáscsökkentő állapotokat és reumás betegségeket, ilyen pl. a csontvesztés, gyulladás okozta fájdalom, túlérzékenység (beleértve mind a légutak, mind a bőr túlérzékenységét) és az allergiák. A találmány szerinti antitestek alkalmazhatók a következő specifikus autoimmun betegségek ese-

tén: autoimmun hematológiai rendellenességek (beleértve pl. hemolítikus anémia, aplasztikus anémia, tiszta vörösvérsejt anémia és idiopátikus trombocitopénia), szisztémás lupus erithematosus, polikondritisz, szklerodoma, Wegener granulomatózis, dermatomiozitisz, krónikus aktív májgyulladás, miaszténia grávisz, pszoriázis, Stevens-Johnson szindróma, idiopátikus sprue, autoimmun gyulladásos bél-betegségek (beleértve pl. fekélyes kolitisz, Crohn-betegség, irritábilis bél-szindróma), endokrin oftalmopátia, Graves-betegség, szarkoidózis, szklerózis multiplex, primer epe cirrózis, ifjúkori diabétesz (I-típusú diabétes mellitus), uveitisz (elülső vagy hátsó), száraz keratokonjunktivitisz és tavaszi keratokonjunktivitisz, intersticiális tüdőfibrozis, pszoriátikus artritisz, glomerulonefritisz (veseelhalási tünetekkel vagy ezek nélkül, ideértve pl. az idiopátias veseelhalási tüneteket vagy a minimális változással járó nefropátiát).

A találmány szerinti antitestek ugyancsak felhasználhatók az asztma, bronhitisz, pneumokokciózis, tüdő emfizéma és a légutakban fellépő más, elzáródással járó vagy gyulladásos betegségek és gyulladásos tünetek kezelésére, megelőzésére vagy enyhítésére.

A találmány szerinti antitestek felhasználhatók olyan nem kívánt, akut és hiperakut gyulladásos reakciók kezelésében is, amelyeket az IL-1 vált ki vagy amelyekben az IL-1, különösen az IL-1 β -termelés szerepet játszik, vagy az IL-1 általi TNF-felszabadulás fokozására, például akut fertőzések, mint pl.

szeptikus sokk (pl. endotoxikus sokk vagy felnőtt légzőszervi diszfunkció szindróma), meningitisz, tüdőgyulladás; és súlyos égési sebek; valamint a kahexia vagy a letális TNF kiválasztással - fertőzés után - összefüggő sorvadásos szindróma, rák vagy szerv-diszfunkció, különösen AIDS-szel járó kahexia, kezelésére, pl. HIV fertőzéssel egyidejűleg vagy azt követően.

A találmány szerinti antitestek különösen felhasználhatók a csont-metabolizmus károsodásának kezelésére, ideértve az oszteoartritist, oszteoporózist és más gyulladásos artritiseket, valamint a csontvesztést általában véve, ideértve a korral összefüggő csontvesztést és különösen a fogbetegségeket.

Az említett indikációs területeken a megfelelő dózis természetesen változik pl. a következő tényezők függvényében: az alkalmazandó konkrét, találmány szerinti antitest, a gazdaszervezet, a beviteli mód, valamint a kezelendő állapot természete és súlyossága. A megelőzésre irányuló alkalmazás során azonban az jelzések szerint általában kielégítő eredmények érhetők el kb. 0,05 mg - kb. 10 mg/testtömeg kg, még közelebbről kb. 0,1 mg - kb. 5 mg/testtömeg kg dózissal. Megelőzésre irányuló alkalmazás esetében az adagolás gyakorisága rendszerint a kb. egyszer/hét - kb. egyszer/minden három hónap tartományba esik. Szokásosabb a kb. egyszer/2 hét - kb. egyszer/10 hét, például egyszer minden 4 - 8 héten tartomány. A találmány szerinti antitest egyszerűen adagolható parenterálisan, intravénásan, pl. az antekubiális vagy más perifériás vénába, intramuszkulárisan vagy szubkután. A profilaktikus kezelés jellemzően abból áll, hogy a

találmány szerinti antitestet havonta egyszer - 2 vagy 3 havonta egyszer gyakorisággal vagy ritkábban adagoljuk.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények a szokásos módon állíthatók elő. Egy találmány szerinti készítményt előnyösen liofilizált formában biztosítunk. Sürgős adagolás esetében a liofilizált anyagot megfelelő vizes vivőanyagban, pl. injekcióhoz alkalmas steril vízben vagy steril, pufferolt fiziológiás sóoldatban feloldjuk. Ha kívánatosnak tűnik nagyobb térfogatú oldat előállítására infúzió helyett bolusz injekcióban való adagolásra, előnyösen humán szérumalbumint vagy a beteg heparinizált saját vérére adjuk a sóoldathoz a formulázás során. Ilyen fiziológiás semleges fehérje feleslegének a jelenléte megakadályozza az antitest veszteséget, amely az infúziós oldat elkészítéséhez használt edényzet és a kémcsövek falára való adszorpció révén lép fel. Ha albumint használunk, a sóoldat megfelelő koncentrációja 0,5-4,5 tömeg%.

A találmányt a továbbiakban szemléltetés céljából példákkal világítjuk meg, amelyek ábrákra hivatkoznak; ez utóbbiak dózisválasz görbéket mutatnak be az IL-1 β kötődésének oldható I. és II. IL-1 receptorok által történő gátlására vonatkozóan.



PÉLDÁK

A humán IL-1 β -nak megfelelő antitestek előállítására transzgenikus egereket használunk, amelyek képesek az egér immunoglobulin repertoár helyett a humán IgG/k repertoár kifejezésére (Fishwald et al., Nat. Biotechnol. 141, 845-851, 1996). Ezekből az egerekből származó B sejteket a standard hibridóma technológia szerint halhatatlanná tettünk és egér hibridóma sejteket állítottunk elő, amelyek a humán IgG/k ACZ885 antitestjét választják ki.

1. példa: Hibridóma termelés és az antitest tisztítása

Genetikailag módosított 18077 egeret (Medarex Inc., Annadale, NJ) KLH-hoz kapcsolt, adjuvánsba adagolt rekombináns humán IL-1 β -val (50 μ g) több ponton s.c. bevitellel immunizálunk. Az egeret azonos módon még ötször kezeljük és az utolsó injekciót 3 nappal a fúzió előtt adjuk be. A fúzió napján a 18077 egeret széndioxid inhaláltatással elpusztítjuk és lép sejteket ($4,1 \times 10^7$) rutin eljárással fuzionáltatjuk - PEG 4000 alkalmazásával - azonos számú PAJ-O sejttel; ez egy egér mielóma sejtvonal. A fuzionált sejteket 624 lyukban szélesztjük (1 ml/lyuk), amelyek (Balb C) egér peritoneális sejtekből álló tápréteget tartalmaznak HAT-ban, amelyet RPM 1640-nel, 10% hővel inaktívált borjúembrió szérummal és 5×10^{-5} M β -merkaptó-etanolal egészítettünk ki. A felülúszókat összegyűjtjük és ELISA-val vizsgáljuk, majd IL-1 β -ra reaktív monoklonális antitestekkel szkríneljük. Öt monoklonális antitestet azonosítunk, amelyek a IgG/k alosztályba tartoznak. A klónozást 4 x 96 lyukas mikrotitráló le-



mezeken végezzük; lyukanként 0,5 sejt szélesztésével. Két hét eltelte után a lyukakat fordított mikroszkóppal vizsgáljuk meg. A növekedést mutató lyukakból összegyűjtjük a felülúszót és ELISA-val értékeljük az anti-IL-1 β monoklonális antitestek termelését. Az eredetileg azonosított hibridóma # 657 négy alklónjából 1-2 liter kondicionált felülúszót állítunk elő és az antitesteket proteín A oszlopon affinitás kromatográfiával tisztítjuk.

A nehéz- és a könnyűlánc tisztasága és részleges aminosav-szekvenciái

Aminosav-szekvenálás

A tisztított ACZ885 antitestből könnyű- és nehézláncokat választunk szét SDS-PAGE-vel és Edman lebontással meghatározzuk az amino-terminális aminosavakat. Az ezekben a vizsgálatokban alkalmazott antitest tisztasága szekvenálással meghatározva max. 90%. A nehéz és a könnyű lánc variábilis doménjét kódoló cDNS szekvenciákat annak a cDNS-nek az amplifikálásával (PCR) határozzuk meg, amelyet a klónozott hibridóma sejtekből származó és teljesen szekvenált mRNS-ből kaptunk. A nehéz- és a könnyűlánc variábilis doménjének amino-terminális szekvenciáját és a megfelelő DNS szekvenciákat a Seq.Id.No. 1 és a Seq.Id.No. 2 mutatja be (1.ábra).

Expressziós vektorok szerkesztése a könnyű- és a nehézláncokhoz

Egy GS alapú amplifikációs/szelekciós rendszert alkalmazunk, amelyeneket az EP 256 055, EP 323 997 vagy a 893 03 964.4 sz. európai szabadalmi bejelentés leír; a választott szelekciós marker egy GS kódoló szekvencia.

2. példa: Biokémiai és biológiai adatok

Azt állapítottuk meg, hogy az ACZ885 monoklonális antitestet *in vitro* semlegesíti az interleukin IL-1 β aktivitását. A monoklonális antitestet a továbbiakban a rekombináns humán interleukin IL-1 β -hoz való kötődésével jellemeztük (Biacore elemzés). A semlegesítés módját kompetitív kötődési vizsgálatokkal határoztuk meg oldható IL-1 receptorok alkalmazásával. Az ACZ885 antitest biológiai aktivitását a rekombináns ill. a természetes úton termelt IL-1 β -val szemben primer humán sejtben határozzuk meg (3. példa), amely reagál az IL-1 β -val történő stimulálásra.

A disszociációs egyensúlyi állandó meghatározása

A rekombináns humán IL-1 β ACZ885-höz való kötődése asszociációs és disszociációs sebességi állandóit Biacore elemzéssel határozzuk meg. Az ACZ885-öt immobilizáljuk és az 1 -4 nM tartományban felületi plazmarezonanciával mérjük a rekombináns humán IL-1 β kötődését. A választott kivitelí mód monovalens reakciót jelent, így lehetővé teszi az IL-1 β ACZ885-höz való kötődése eseményének 1:1 sztöchiometriai alapon való kezelését. Az adatok elemzését a BIA értékelési szoftver alkalmazásával végezzük.

	k_{on} [10 ⁵ /Ms]	k_{off} [10 ⁻⁵ /s]	K_D [pM] _f	
Humán IL-1 β	11,0 +/- 0,23	3,3 +/- 0,27	30,5 +/- 2,6	n = 22

Következtetés: Az ACZ885 igen nagy affinitással kötődik a rekombináns humán IL-1 β -hoz.

Kötődési kompetíció vizsgálata oldható IL-I és IL-II típusú receptorokkal

Az ACZ885 és az oldható IL-I és IL-II típusú receptorok közötti kötődési kompetíciót Biacore módszerrel végezzük. Az ACZ885-öt a csip felületén rögzítjük és az ACZ885 megkötésére (1 nM) rekombináns humán IL-1 β -t injektálunk növekvő koncentrációjú (0-12 nM) rekombináns humán oldható IL-I és IL-II típusú receptor távollétében és jelenlétében (4-4 független kísérlet). A kapott eredményeket a 2. ábra mutatja be.

Az NVP-ACZ885 humán IL-1 β -hoz való kötődését rekombináns humán oldható IL-I vagy IL-II típusú receptorok jelenlétében határozzuk meg. A maximum félértékeket (IC50) grafikusan határozzuk meg, Origin 6.0 szoftver alkalmazásával. A kapott középérték \pm SEM-et adjuk meg (n = 4).

Következtetés: Az ACZ885 IL-1 β -hoz való kötődése kompetitív mind az oldható IL-I, mind az oldható IL-II típusú receptor tekintetében.

Reaktivitási profil a humán IL-1 α , humán IL-1RA és a más fajokból származó IL-1 β vonatkozásában

Az ACZ885 reaktivitási profilját a humán IL-1 α , humán IL-1RA és a más fajokból (cynomolgus majom, nyúl, egér és patkány) származó IL-1 β vonatkozásában Biacore elemzéssel határozzuk meg.



Az ACZ885-öt rögzítjük és a vizsgálandó citokineket 8 nM koncentrációban alkalmazzuk (6 független kísérlet).

3. táblázat: Az NVP-ACZ885 kereszt-reaktivitása IL-1 α -val, IL-1Ra-val és IL-1 β -val

	Kötődés % (átlag \pm SEM)
Rekombináns humán IL-1 β (n = 6)	100
Rek. cynomolgus IL-1 β (n = 11)	7,8 +/- 1,0
Rek. nyúl IL-1 β (n = 6)	-0,5 +/- 0,2
Rek. egér IL-1 β (n = 6)	-2,6 +/- 0,6
Rek. patkány IL-1 β (n = 6)	-6,2 +/- 1,0
Rek. humán IL-1 α (n = 6)	8,4 +/- 2,4
Rek. humán IL-1Ra (n = 6)	-3,7 +/- 1,7

A rezonancia egységeket 1000 sec-nél (az injektálás után) olvassuk le; a futtató puffer injektált mennyiségét valamennyi szenzogram esetében kivonjuk és az alapvonalat az anti-Fcy szet leállítása után nullára állítjuk. A kötődést a humán IL-1 β kumulált rezonancia egységei %-ában fejezzük ki.

Következtetés: Az ACZ885 nem mutat szignifikáns keresztreakciót a humán IL-1 α -val, a humán IL-1Ra-val vagy a más fajokból (cynomolgus majom, nyúl, egér és patkány) származó IL-1 β -val.

3. példa: Az IL-8 humán bőr fibroblasztokból való felszabadulásának semlegesítése ACZ885-tel

A következő metodikát alkalmaztuk az AC2885 humán IL-1 β hatásának semlegesítése során kifejtett biológiai aktivitásának meghatározására:

1. Az IL-1 β -t tartalmazó kondicionált tápközeg előállítása

A kondicionált tápközeg humán perifériás mononukleáris vérsejtekből való előállítását a következők szerint végeztük. Majmok perifériás véréből mononukleáris sejteket állítottunk elő a ficoll-hypaque sűrűség szerinti szétválasztásra vonatkozó Hansel módszerrel (T.T. Hansel et al., J. Immun. Methods 145, 105-110, 1991). 10^5 sejt/lyuk koncentrációt alkalmaztunk RPMI/10%-os FCS (borjúembrió szérum) tápközegben. 100 E/ml IFN γ -t és 5 μ g/ml töménységű LPS-t adagoltunk, majd a sejteket 6 órán át inkubáltuk. Az inkubálás befejezésekor a közeget 1200 ford/perc sebességgel 10 percen át centrifugáltuk. Az IL-1 β mennyiségét a felülúszóban ELISA módszerrel határoztuk meg.

2. Semlegesítési vizsgálat

A humán előbőr fibroblasztokat a Clonetics-től szereztük be (CC-2509) és FBM-ben (Clonetics CC-3131) tenyésztettük, amely bFGF-t (1 ng/ml, CC-4065), inzulint (5 pg/ml, CC-4021) és 2% FCS-t (CC-4101) tartalmazott.

Az IL-6 indukálására a sejteket 48 lyukas szövet klaszterbe vittük be 10^5 sejt/lyuk sűrűség mellett. A következő napon a sejteket 6-7 órán át 2% FCS-t tartalmazó FBM-ben a citokin hozzáadása előtt éhezettük. A stimuláláshoz a tenyészközeget FBM + 2% FCS-sel cseréltük fel, amely kb. 50 pg/ml IL-1 β figyelembe vé-

tele alapján megfelelő mennyiségű kondicionált közeget tartalmazott. Egy másik kísérletben 50 pg/ml végkoncentrációban rekombináns humán IL-1 β -t alkalmaztunk.

A semlegesítő anti-IL-1 β antitestet hígított kondicionált közegben a sejtekhez való hozzáadás előtt titráltuk. Pozitív kontrollként rekombináns IL-1 α -t (R & D Systems # 280-RA-010) alkalmaztunk.

A stimulálás után 16-17 órával a sejt felülűszót elkülönítjük és szendvics ELISA-val meghatározzuk a felszabadult IL-6 mennyiségét.

3. IL-6 ELISA

ELISA mikrotitráló lemezeket egér anti-humán IL-6 MAb-vel (314-14 Novartis Pharma, EN23,961, 5,5 mg/ml; 100 μ g/ml mellett) PBS-ben (0,02% NaN $_3$) egy éjjelen át +4°C-on inkubáltunk. Másnap a mikrotitráló lemezeket négyszer mossuk, 3 óra alatt, a következőkkel: FBS (0,05% Tween, 0,02 % NaN $_3$; 300 μ l PBS-sel blokkolva); 3% szarvasmarha szérum albumin (BSA), 0,02 % NaN $_3$. A lemezeket ismét négyszer mossuk és két-két párhuzamosban 100 μ l felülűszót (végső hígítás 1:20) vagy rekombináns humán standardot (Novartis Pharma # 91902) adagolunk; a titrálási görbe az 1 - 0,0156 ng/ml tartományra terjed ki, kétszeres hígításban. Szobahőmérsékleten egy éjjelen át inkubáljuk, majd négyszer mossuk a lemezeket és egy eltérő egér anti-humán IL-6 MAb-t (110-14, Novartis Pharma; 6,3 mg/ml; 100 μ l 1 μ g/ml-nél; 3 óra szobahőmérsékleten) adagolunk. További négyszeri mosás után biotinnal jelzett kecske

anti-egér IgG2b antiszérumot (Southern Biotechnology #1090-08) adagolunk 1/1000 véghígításban (100 μ l/lyuk, 3 óra szobahőmérsékleten). Az inkubálás után a lemezeket négyszer mossuk és lúgos foszfátához kapcsolt sztreptavidint (Jackson Immunoresearch #016-050-0084) adagolunk 1/3000 véghígításban (100 μ l/lyuk, 30 perc szobahőmérsékleten). Négyszeri mosás után adagoljuk a szubsztrátot (p-nitro-fenil-foszfát dietanol-amin pufferben, 100 μ l) és 30 percen át állni hagyjuk az elegyeket. A reakciót 50 μ l/lyuk 1,5 M NaOH hozzáadásával blokkoljuk. A lemezeket mikrotiter leolvasóval (Bio-Rad) olvassuk le, 405 és 490 nm-es szűrőket használva.

A tenyészet felülúszójának IL-6 szintjeit a standard görbével való összehasonlítás alapján számítjuk ki, a köbös görbe illesztés alkalmazásával. A statisztikai értékelést és az IC50 meghatározását a szigmoid görbe illesztés (curve fitting) alkalmazásával végeztük el.

Eredmények

Táblázat: Az IL-1 β által indukált IL-6 kiválasztás gátlása

	NVP-ACZ885 1. tenyészet IC ₅₀ [pM] \pm SEM	NVP-ACZ885 2. tenyészet IC ₅₀ [pM] \pm SEM	IL-1 β a IC ₅₀ [pM] \pm SEM
IL-6 kiválasztás kondicionált közeg	54 \pm 6,1 (9,1 \pm 1,0 ng/ml) (n = 6)	44 \pm 3,6 (7,4 \pm 0,6 ng/ml) (n = 6)	30 \pm 3,1 (0,51 \pm 0,05 ng/ml) (n = 5)
IL-6 kiválasztás rekombináns humán IL-1 β	42 \pm 3,4 (7,1 \pm 0,56 ng/ml) (n = 4)	63 \pm 2,8 (10,5 \pm 0,5 ng/ml) (n = 6)	Nd



Az IC50 értékek IL-6 IL-1 β által indukált, humán bőr fibroblasztokból való kiválasztásának gátlására vonatkoznak. A fibroblasztokat rekombináns humán IL-1 β -val vagy 50-100 μ g/ml IL-1 β -t tartalmazó kondicionált táptalajjal stimuláltuk.

4. példa: Az ACZ885 epitópjának meghatározása

Az ACZ885 nagy affinitással kötődik a humán IL-1 β hoz, de nem ismeri fel a rhesus majmokból származó, gyakorlatilag homológ IL-1 β -t. A rhesus és a humán IL-1 β közötti egyik legfeltűnőbb különbség az aminosav-szekvenciában mutatható ki, az érett IL-1 β 64. helyén. A humán IL-1 β ezen a helyen glutaminsavat, a rhesus pedig alanint tartalmaz. Egy mutáns humán IL-1 β a megfelelő Glu64Ala helyettesítés esetén elveszti azon képességét, hogy mérhető affinitással kötődjön az ACZ885-höz. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a Glu64 a humán IL-1 β -ban az ACZ885 antitest felismeréséhez lényeges. A Glu64 az IL-1 β -ban egy olyan hurokban helyezkedik el, amely nem része az I. típusú IL-1 β receptorhoz kötődő felületnek és nincs ezzel szoros közelségben. Ennek folytán a Glu64-et magában foglaló kötő epitóp elleni antitestek képesek semlegesíteni a humán IL-1 β biológiai aktivitását.

Szabadalmi igénypontok

1. Egy IL-1 β -kötő molekula, amely mind a nehézlánc (V_H) mind a könnyűlánc (V_L) variábilis doméneket tartalmazza, ahol az IL-1 β -kötő molekula legalább egy antigénkötő helyet tartalmaz, amely magában foglal

a) egy immunglobulin nehézlánc variábilis domént (V_H), amely sorrendben a CDR1, CDR2 és CDR3 hipervariábilis régiókat tartalmazza, ahol az említett CDR1 a Val-Tyr-Gly-Met-Asn aminosav-szekvenciával, az említett CDR2 az Ile-Ile-Trp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Asn-Gln-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly aminosav-szekvenciával és az említett CDR3 az Asp-Leu-Arg-Thr-Gly-Pro aminosav-szekvenciával rendelkezik, és

b) egy immunglobulin könnyűlánc variábilis domént (V_L), amely sorrendben a CDR1', CDR2' és CDR3' hipervariábilis régiókat tartalmazza, ahol az említett CDR1' az Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Ser-Ser-Leu-His aminosav-szekvenciával, az említett CDR2' az Ala-Ser-Gln-Ser-Phe-Ser aminosav-szekvenciával és a CDR3' a His-Gln-Ser-Ser-Ser-Leu-Pro aminosav-szekvenciával rendelkezik;

és ezek közvetlen ekvivalensei, amelyekben a CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' és CDR3' hipervariábilis régiók, egy egészeknek tekintve, legalább 95%-ban homológok az a) és b) alatti hipervariábilis régiókkal,

és kötő specificitással bírnak a humán IL-1 β azon antigénikus epitópjához, amely magában foglalja az érett humán IL-1 β Glu64



maradékát tartalmazó hurkot, és képesek gátolni az IL-1 β kötődését saját receptorához, és K_D értékük az IL-1 β -hoz való kötődésre 50 pM vagy ennél kevesebb.

2. Az 1. igénypont szerinti IL-1 β -kötő molekula, amely egy humán antitest.

3. Egy IL-1 β -kötő molekula, amely legalább egy antigénkötő helyet tartalmaz, amely magában foglal egy első domént, melynek aminosav-szekvenciája azonos a Seq.Id.No.1-bemutatott szekvenciával az 1. helyzetű aminosavtól kiindulva és a 118. helyzetű aminosavval végezve, és egy második domént, amelynek aminosav-szekvenciája azonos a Seq.Id.No.2-ben bemutatott szekvenciával az 1. helyzetű aminosavtól kiindulva és a 107. helyzetű aminosavval végezve.

4. Egy expressziós vektor, amely egyetlen expressziós vektort vagy két kompatibilis expressziós vektorból álló szettet foglal magába, amelyek tartalmazzák:

1) egy első DNS-szerkezetet, amely egy nehézláncot vagy fragmentumát kódolja és tartalmaz

a) egy első részt, amely egy variábilis domént kódol, amely nagyjából framework régiót és hipervariábilis régiókat tartalmaz, az említett hipervariábilis régiók sorrendben a CDR1, CDR2 és CDR3, melyek a Seq.Id.No.1-ben bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkeznek; ez az első rész egy, a variábilis domén első aminosavát kódoló kodonnal indul és a variábilis domén utolsó aminosavát kódoló kodonnal végződik, és



b) egy második részt, amely egy nehézlánc konstans részét vagy ennek fragmentumát kódolja, amely a nehézlánc konstans részének első aminosavát kódoló kodonnal indul és a konstans rész vagy fragmentuma utolsó aminosavát kódoló kodonnal végződik, amelyet egy stop kodon követ; és

2) egy második DNS-szerkezetet, amely egy könnyűláncot vagy fragmentumát kódolja és tartalmaz

a) egy első részt, amely egy variábilis domént kódol, amely nagyjából framework régiót és hipervariábilis régiókat tartalmaz; az említett hipervariábilis régiók a CDR1' és CDR3', melyek a Seq.Id.No.2-ben bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkeznek; ez az első rész egy, a variábilis domén első aminosavát kódoló kodonnal indul és a variábilis domén utolsó aminosavát kódoló kodonnal végződik, és

b) egy második részt, amely egy könnyűlánc konstans részét vagy ennek fragmentumát kódolja, amely a könnyűlánc konstans részének első aminosavát kódoló kodonnal kezdődik és a konstans rész vagy fragmentuma utolsó aminosavát kódoló kodonnal végződik, amelyet egy stop kodon követ.

5. A 4. igénypont szerinti expressziós vektor, amely képes prokarióta vagy eukarióta sejtvonalba replikálódni.

6. Eljárás egy IL-1 β -kötő molekula termelésére, amely magában foglalja (i) egy 5. igénypont szerinti expressziós vektorral transzformált organizmus tenyésztését és (ii) az IL-1 β -kötő molekula kinyerését a sejttenyészetből.



7. Egy 2. igénypont szerinti IL-18 elleni antitest alkalmazása egy IL-18 által közvetített betegség vagy rendellenesség kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.

8. Gyógyszerkészítmény, amely egy 2. igénypont szerinti IL-18 elleni antitestet tartalmaz egy gyógyszerészetileg elfogadható segédanyaggal, hígítóval vagy vívőanyaggal együtt.

A meghatalmazott:

Dr. Láng Tünde

szabadalmi ügyvéd

SBGN Szabadalmi Iggyvívői Iroda

N-1062 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: +361-1000 Fax: +361-1099

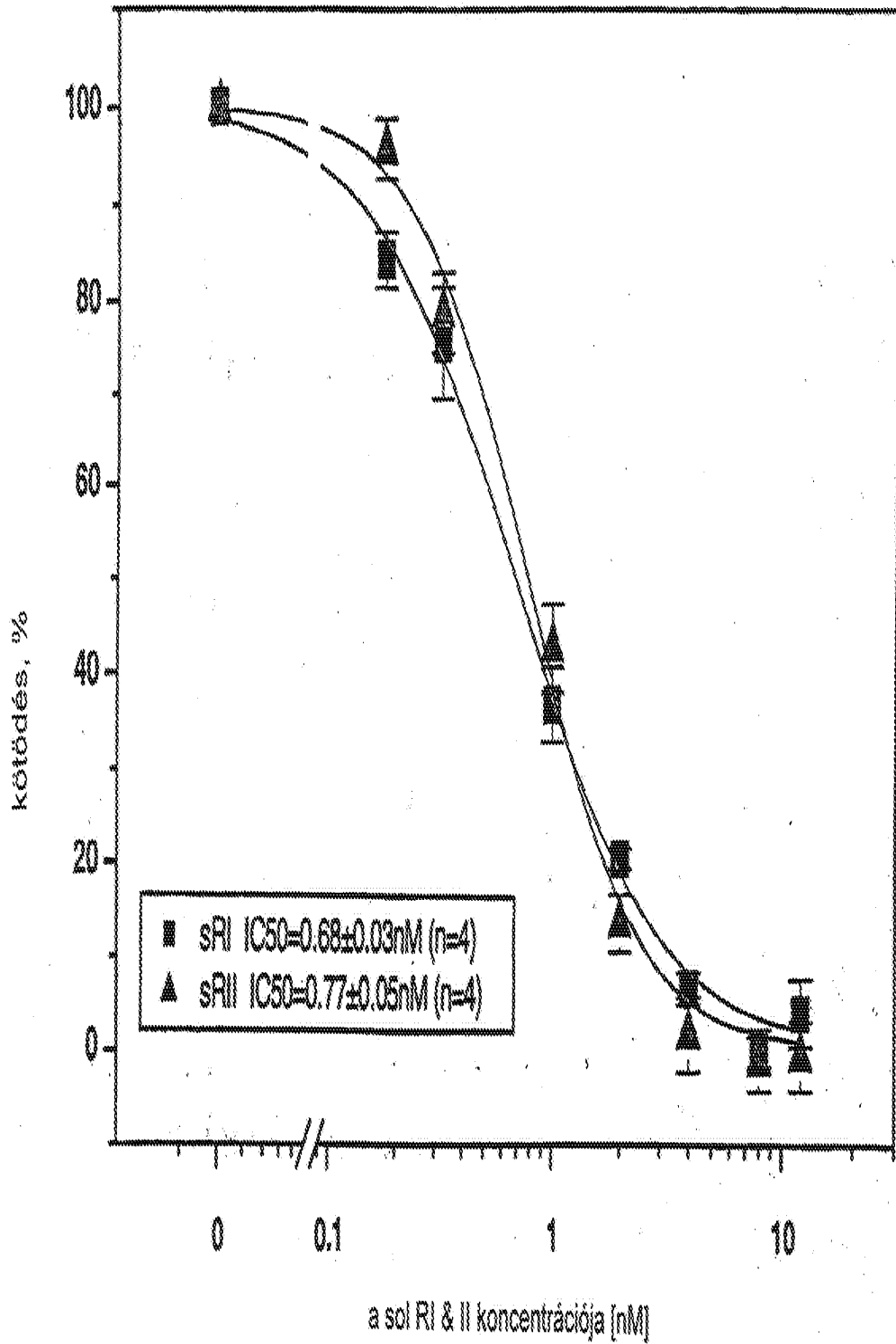
Email: lang@sbgn.hu

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

MEGADÁS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

1/2

1. ábra



P03008000

76.296/125

2/2

Az ACZ885 nehéz lánc variábilis régiója, Seq. Id. No. 1.

```

ATGGAGPTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTCTCTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAG
-19 M E F G L S W V F L V A L L R G V Q C Q - 1
GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCGTGGTCCAGCCTGGGAGCTCCCTGAGACTCTCC
V Q L V E S G G G V V Q F G R S L R L S - 21
TGTGCAGCGTCTGGATTACACCTTCAGTGTPTTATGGCATEAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
C A A S G F T F S V Y G M N W V R Q A P - 41
GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTGGTATGATGGAGATAATCAATACTATGCA
G K G L E W V A I I W Y D G D N Q Y Y A - 61
GACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L - 81
CAANTGAACGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCCAGAGATCTTAGG
Q M N G L R A E D T A V Y Y C A R D L R - 101
ACTGGGCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCCACCGTCTCCCTC
T G P F D Y W G Q G T L V T V S S - 118

```

Az ACZ885 könnyű lánc variábilis régiója, Seq. Id. No. 1

```

ATGTTGCCATCACAACTCAFTGGGPTTCTGCTGCTCTGGGTTCCAGCCTCCAGGGGTGAA
-19 M L P S Q L I G F L L L W V P A S R G E - 1
ATGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATC
I V L T Q S P D F Q S V T P K E K V T I - 21
ACCTGCCGGGGCCAGTCAGAGCATTTGGTAGTAGCTTACACTGGTACCAGCAGAAACCAGAT
T C R A S Q S I G S S L E W Y Q Q K P D - 41
CAGTCTCCAAGCTCCTCATCAAGTATGCTTCCAGTCTTCTCAGGGGTCCCTCGAGG
Q S P K L L I K Y A S Q S F S G V P S R - 61
TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCCCTCAACATCAATAGCCTGGAAGCTGAA
F S G S G S G T D F T L T I N S L E A E - 81
GATGCTGCAGCGTATTACTGTTCATCAGAGTAGTAGTATTACCATTCACTTTCGGCCCTGGG
D A A A Y Y C H Q S S S L P F T F G P G - 101
ACCAAGTGGATATCAAA
T K V D I K - 107

```

Kurziv: Vezető szekvencia (nem az érett antitestben)

félkövér: CDR-ek