



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 1 613 656 B1**

(51)

Int. Cl.

*C07K 16/18 (2006.01)**G01N 33/574 (2006.01)**A61P 35/00 (2006.01)***(12) EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: <b>E000950</b>	(73) Patendiomanik: <b>Arius Research, Inc. 55 York Street, 16th floor, Toronto Ontario M5J 1RY, CA</b>
(11) Patendikirjelduse tõlke number: <b>EE-EP 1 613 656</b>	(72) Leiutise autorid: <b>YOUNG, David, S., F. 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7, CA</b> <b>HAHN, Susan, E. 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6P 3N7, CA</b>
(30) Prioriteediandmed: <b>14.04.2003 US 413755</b>	(74) Patendivolinik: <b>Harald Tehver Patendibüroo Turvaja OÜ Liivalaia 22, 10118 Tallinn, EE</b>
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>31.03.2004</b>	
(96) Euroopa patendi-taotluse number: <b>04724505.5</b>	
(97) Euroopa patendi väljaand-misest teatamise kuupäev: <b>13.12.2006</b>	
(97) Euroopa patendi number: <b>EP 1 613 656</b>	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: <b>05.03.2007</b>	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: <b>16.04.2007</b>	

**(54) Vähktõbe modifitseerivad antikehad**

## VÄHKTÕBE MODIFITSEERIVAD ANTIKEHAD

### Kirjeldus

#### Leiutise valdkond

Käesolevas leiutises käsitletakse vähktõbe modifitseerivate antikehade (CDMAB) isoleerimist ja valmistamist ning nende kasutamist ravi- ja diagnostikaprotsessides, 5 valikuliselt kombineeritult ühe või mitme kemoterapeutilise ainega. Leiutises käsitletakse ka seondumisteste, kus kasutatakse leiutisekohaseid CDMAB-sid.

#### Leiutise taust

Igal indiviidil esinev vähktõbi on unikaalne ja erineb teistest vähiliikidest nagu selle 10 isiku identiteetki. Vaatamata sellele kohtleb praegu rakendatav teraapia kõiki sama tüüpi ja samas arengujärgus vähkkasvajatega patsiente ühtemoodi. Vähemalt 30% nendest patsientidest ebaõnnestub esimese astme ravi, mis toob kaasa edasised raviastmed, suurendades ravi ebaõnnestumise, metastaaside tekke ja lõpuks surma tõenäosust. Ideaalseks lähenemisviisiks oleks ravi kohaldamine igale üksikule 15 indiviidile eraldi. Ainuke käesoleval ajal individuaalselt kohandatav ravi on kirurgiline. Kemoterapiat ja kiiritusravi ei saa sobitada patsiendile ja kirurgia on oma olemuselt enamikul juhtudel paranemiseks ebasobiv.

Monoklonaalsete antikehade tulekuga muutus kohandatavate ravimeetodite väljatöötamise võimalus realistlikumaks, kuna iga antikeha on võimalik suunata 20 üksikule epitoobile. Peale selle saab valmistada antikehade kombinatsiooni, mida on võimalik suunata iga konkreetse indiviidi kasvajat unikaalselt määratlevale epitoopide konstellatsioonile.

Olles täheldanud olulist erinevust vähirakkude ja normaalsete rakkude vahel, mis seisneb selles, et vähirakud sisaldavad muundunud rakkudele iseloomulikke 25 antigeene, on teadlased ammu viidanud sellele, et monoklonaalseid antikehi võib kavandada spetsiifiliseks suunamiseks muundunud rakkudele, sidudes nad vähi spetsiifiliste antigeenidega; andes sellega lootust, et monoklonaalseid antikehi võib kasutada kui "maagilisi kuule" vähirakkude elimineerimiseks.

Käesoleva leiutise kohaselt isoleeritud monoklonaalsed antikehad on vähi haigusprotsessi modifitseerinud patsiendile soodsalt, näiteks vähendades kasvajat, ning nendele on siin viidatud erineval viisil kui “vähktõbe modifitseerivatele antikehadele” (CDMAB) või “vähivastastele” antikehadele.

- 5 Käesoleval ajal on vähihaigel patsiendil tavaliselt vähe ravivõimalusi. Reglementeeritud lähenemine vähiravile on parandanud globaalseid elujäämis- ja surevusnäitajaid. Ent üksikisikute lõikes ei korreleeru need paranenud statistilised andmed tingimata nende isikliku seisundi paranemisega.

- 10 Seega, kui leiduks metodoloogia, mis võimaldab arstil ravida iga kasvajat sõltumatult teistest sama rühma patsientidest, võimaldaks see unikaalset lähenemist ravi kohandamisele nimelt iga isiku tarbeks. Selline ravikuur võiks ideaalselt suurendada tervenemismäära ja annaks paremaid tulemusi, rahuldades seeläbi igikestvat vajadust.

- 15 Ajalooliselt on polükloonaalseid antikehi kasutatud inimese vähktõbede ravimiseks piiratud eduga. Lümfoome ja leukeemiat on ravitud inimplasmaga, ent pikaajalisi kasvaja taandumisi või vastuseid on olnud vähe. Pealegi on korratavus olnud puudulik ega ole saadud kemoteeraapiaga võrreldes täiendavat kasu. Tihkeid kasvajaid, nagu rinnavähid, melanoomid ja neerurakkude kartsinoomid, on ravitud ka inimvere, šimpansiseerumi, inimplasma ja hobuseseerumiga, ent vastavalt ettearvamatute ja ebaefektiivsete tulemustega.

- 20 Tihkete kasvajate ravimiseks monoklonaalsete antikehadega on tehtud palju kliinilisi katseid. 1980-tel tehti inimese rinnavähi ravimiseks vähemalt neli kliinilist katset, mis andsid vähemalt 47 patsiendist ainult ühe vastuse, kusjuures antikehi kasutati spetsiifiliste antigeenide vastu või nad põhinesid kooselektiivsusel. Alles 1998. a. korraldati edukas kliiniline katse, kasutades humaniseeritud anti-her 2 antikeha  
25 kombineeritult tsisplatiiniga. Selles katses hinnati vastuseid 37 patsiendil, kellest umbes veerandil ilmnisid osalised vastused ja nendest teisel poolel ilmnis väike või püsiv haiguse progresseerumine.

- 30 Kliinilised katsed kolorektaalse vähi uurimiseks hõlmavad nii glükoproteiinsete kui ka glükolipiidsete sihtmärkide vastu suunatud antikehi. Antikehi nagu 17-1A, millel on mõningane spetsiifilisus adenokartsinoomide suhtes, kasutati teise faasi kliinilistes

katsetes enam kui 60 patsiendil, kusjuures ainult ühel patsiendil ilmnes osaline vastus. Teistes katsetes saadi 17-1A kasutamisel ainult üks täielik ja kaks osalist vastust kokku 52 patsiendi kohta, kasutades lisandina tsüklofosfamiidi. Teised katsed 17-1A-ga andsid sarnaseid tulemusi. Esialgu kujutiste saamiseks heakskiidetud hiire humaniseeritud monoklonaalse antikeha kasutamine ei põhjendanud samuti kasvaja taandumist. Efektiivset antikeha kolorektaalse vähi ravimiseks ei ole saadud tänaseni. Tulemused on olnud võrdselt halvad ka kopsuvähi, ajuvähkide, munasarjavähkide, pankreasevähi, eesnäärmevähi ja maovähi puhul. Mõningast piiratud edu on saavutatud monoklonaalse antikeha anti-GD3 kasutamisel melanoomi puhul. Seega on ilmne, et hoolimata edukatest uuringutest väikeloomadega, mis on kliiniliste inimkatsete eelduseks, on testitud antikehad osutunud enamasti ebaefektiivseteks.

#### Varasemad patendid

USA patent nr 5750102 kirjeldab protsessi, milles patsiendi kasvajakarke transfekteeritakse MHC geenidega, mida on võimalik kloonida patsiendi rakkudest või koest. Neid transfekteeritud rakke kasutatakse seejärel patsiendi vaksineerimiseks.

USA patent nr 4861581 kirjeldab etapiviisilist protsessi, kus saadakse monoklonaalsed antikehad, mis on spetsiifilised imetaja neoplastiliste ja normaalsete rakkude rakusisele komponendi, kuid mitte nende väliskomponentide suhtes, see monoklonaalne antikeha märgistatakse, märgistatud antikeha viiakse kokku selle imetaja koega, kes on saanud neoplastilisi rakke hävitavat ravi, ning määratakse kindlaks ravi efektiivsus, mõõtes märgistatud antikeha seondumist degenereeruvate neoplastiliste rakkude rakusise komponendiga. Inimese rakusisele antigeenidele suunatud antikehade valmistamise kohta märgib patendiomanik, et selliste antigeenide sobivaks allikaks on pahaloomulised rakud.

USA patendis nr 5171665 nähakse ette uus antikeha ja selle valmistamismeetod. Täpsemalt, see patent kirjeldab monoklonaalse antikeha valmistamist, millel on inimese kasvajatega, näiteks käärsoole- ja kopsukasvajatega, seotud valgu antigeeni suhtes tugev sidumisvõime, kusjuures tema seondumine normaalsete rakkudega on palju nõrgem.

USA patendis nr 5484596 nähakse ette vähi ravimeetod, mis hõlmab kasvajakoe kirurgilist eemaldamist vähihaigelt patsiendilt, kasvajakoe töötlemist kasvajarakkude saamiseks, kasvajarakkude kiiritamist nii, et rakud oleksid eluvõimelised, kuid mitte tuumorigeensed, ning nende rakkude kasutamist sellise vaktsiini valmistamiseks patsiendi jaoks, mis on võimeline pärssima esmase kasvaja taastumist ja samaaegselt pärssima metastaaside teket. See patent kirjeldab monoklonaalsete antikehade tekitamist, mis reageerivad kasvajarakkude pindmiste antigeenidega. Vastavalt neljanda veeru 45. ja järgnevatele ridadele kasutavad patendiomanikud inimese neoplaasiale aktiivset spetsiifilist immunoteraapiat avaldavate monoklonaalsete antikehade tekitamisel natiivseid kasvajarakke.

USA patendis nr 5693763 kirjeldatakse inimese kartsinoomidele iseloomulikku glükoproteiini antigeeni, mis ei sõltu algsest epiteelkoest.

USA patent nr 5783186 käsitleb Her2 ekspresseerivate rakkude apoptoosi esilekutsuvaid antikehi Anti-Her2, neid antikehi tootvaid hübridoomi rakuliine, vähi ravimeetodeid nende antikehadega ja neid antikehi sisaldavaid farmatseutilisi kompositsioone.

USA patendis nr 5849876 kirjeldatakse uusi hübridoomi rakuliine monoklonaalsete antikehade valmistamiseks mutsiini antigeenidele, mis on puhastatud kasvajakoest ja kasvajat mittesisaldavast koest.

USA patent nr 5869268 käsitleb meetodit inimese lümfotsüütide tekitamiseks, mis toodavad soovitud antigeenile spetsiifilist antikeha, meetodit monoklonaalse antikeha valmistamiseks, samuti selle meetodiga valmistatud monoklonaalseid antikehi. See patent käsitleb eriti vähkkasvajate diagnoosiks ja raviks kasutatava HD-vastase (anti-HD) inimese monoklonaalse antikeha valmistamist.

USA patent nr 5869045 käsitleb antikehi, antikeha fragmente, antikeha konjugaate ning üksikahelalisi immunotoksiine, mis reageerivad inimese kartsinoomirakkudega. Nende antikehade toimemehhanism on kahekordne, nii et algul reageerivad need molekulid inimese kartsinoomide rakumembraani pindmiste antigeenidega ning seejärel on antikehad võimelised sisenema kartsinoomirakkudesse, järgnevalt nendega seostudes ning muutes nad eriti sobivaks antikeha-ravimi ja antikeha-toksiini

konjugaatide moodustamiseks. Modifitseerimata kujul ilmnevad nendel antikehadel kindlate kontsentratsioonide puhul samuti tsütotoksilised omadused.

USA patendis nr 5780033 kirjeldatakse autoantikehade kasutamist kasvaja ravimisel ja ennetamisel. See antikeha on siiski eakalt imetajalt saadud antinukleaarne autoantikeha. Antud juhul on see autoantikeha väidetavalt immuunsüsteemis leiduv 5 üht tüüpi naturaalne antikeha. Kuna see autoantikeha pärineb “eakalt imetajalt”, pole nõutav, et autoantikeha pärineks tegelikult ravitavalt patsiendilt. Lisaks kirjeldab see patent eakalt imetajalt pärinevat naturaalselt ja monoklonaalset antinukleaarset autoantikeha ning hübriidoomi rakuliini, mis toodab monoklonaalset antinukleaarset 10 autoantikeha.

#### Leiutise kokkuvõte

Käesolevad leiutajad on eelnevalt saanud USA patendi nr 6180357 nimetusega “Individaalsed patsiendispetsiifilised vähivastased antikehad”, mis on suunatud individuaalselt kohandatud vähivastaste antikehade selekteerimisprotsessile, mis on 15 kasutatav vähktõve ravimisel.

Selles taotluses on kasutatud patendis ‘357 kirjeldatud patsiendispetsiifiliste vähivastaste antikehade valmistamismeetodit hübriidoomi rakuliinide isoleerimiseks, mis kodeerivad vähktõbe modifitseerivaid monoklonaalseid antikehi. Neid antikehi on võimalik valmistada spetsiifiliselt ühele kasvajale ja seega võimaldada vähiravi 20 kohaldamist. Selle taotluse kontekstis viidatakse vähivastastele antikehadele, millel on kas rakku hävitavad (tsütotoksilised) või rakukasvu pärssivad (tsütostaatilised) omadused, järgnevalt kui tsütotoksilistele. Neid antikehi võib kasutada vähistaadiumi kindlaksmääramiseks ja diagnoosimiseks ning kasvaja metastaaside ravimiseks.

Väljavaade individuaalseks vähivastaseks raviks toob muutuse patsiendi kohtlemisse. 25 Sobiva kliinilise protseduuri järgi võetakse kasvaja eksponeerimisel kasvajaproov, mis säilitatakse. Selle proovi põhjal saab kasvajat tüpiseerida olemasolevate vähkkasvajate modifitseerivate antikehade varasema andmestiku abil. Patsiendi vähistaadium määratakse kindlaks tavapäraselt, kuid kättesaadavaid antikehi saab kasutada patsiendi seisundi edaspidisel hindamisel. Patsiendi ravi võib alustada otsekohe olemasolevate 30 antikehadega ning kasvajale spetsiifiliste antikehade andmestiku saab koostada kas

siintoodud meetodite järgi või kasutades faagiraamatukogusid koos siin kirjeldatud sөлumismeetoditega. Kõik tekitatud antikehad lisatakse vähivastaste antikehade raamatukokku, kuna esineb võimalus, et ka teised kasvajakasvaja võivad kanda mõnd sama epitoopt nagu juba ravitav kasvaja. Sellel meetodil valmistatud antikehad võivad leida kasutamist mis tahes hulgal patsientidel, kui neil on samasuguseid antikehi siduvad vähid.

Lisaks vähivastastele antikehadele on patsiendil võimalik valida mitmelaadilise ravirežiimi osana praegu soovitatud ravimid. Kuna käesoleva metodoloogia järgi isoleeritud antikehad on mittevähirakkudele suhteliselt mittetoksilised, siis on võimalik kasutada antikehade kombinatsioone suurtes annustes kas üksinda või koos tavapärase raviga. Kõrge terapeutiline indeks võimaldab lühikese aja vältel korduvat ravi, mis vähendab ravile resistentsete rakkude tekke tõenäosust.

See leiutus hõlmab veel standardsete kemoterapeutiliste ravivahendite, nt radionukliidide, konjugeerimist leiutisekohaste CDMAB-dega, keskendudes seeläbi nimetatud kemoterapeutikumide kasutamisele.

Kui patsient ei allu esmasele ravile või tekivad metastaasid, saab järelravil korrata kasvajaspetsiifiliste antikehade tekitamise protsessi. Peale selle võib vähivastaseid antikehi konjugeerida patsiendilt saadud vere punalibledega ja neid infusiooni teel uuesti manustada metastaaside raviks. Metastaatilise vähi ravimiseks on efektiivseid meetodeid olnud vähe ja metastaasid ennustavad tavaliselt halba tulemust, mis lõpeb surmaga. Siiski on metastaatilised vähivormid tavaliselt hästi vaskulariseerunud ja vähivastaste antikehade ülekanndmine vere punalibledega võib neid antikehi kontsentreerida kasvaja juurde. Isegi enne metastaase on enamiku vähirakkude ellujäämine sõltuv peremehe verevarustusest ja punaste verelibledega konjugeerunud vähivastane antikeha võib samuti olla efektiivne *in situ* kasvajakasvajate vastu. Antikehi võib alternatiivselt konjugeerida ka teiste vererakkudega, nagu lümfotsüüdid, makrofaagid, monotsüüdid, loomulikud tappurrakud jne.

Antikehi liigitatakse viide klassi ja igaüks neist on seotud funktsiooniga, mille tagab nende raske ahel. Üldiselt arvatakse, et vähiraku hävitamist katteta antikehade vahendatakse kas antikeha-sõltuva rakulise tsütotoksilisuse või komplement-sõltuva

tsütotoksilisuse kaudu. Näiteks hiire antikehad IgM ja IgG2a võivad aktiveerida inimkomplementi, sidudes komplementsüsteemi komponendi C-1 ja aktiveerides seeläbi komplementaktivatsiooni klassikalise raja, mis võib põhjustada kasvaja lüüsi. Inimese antikehade puhul on kõige efektiivsemad komplementi aktiveerivad antikehad 5 põhiliselt IgM ja IgG1. Hiire IgG2a ja IgG3 isotüüpi antikehad on efektiivsed Fc retseptoritega tsütotoksiliste rakkude värbamisel, viies raku hävitamiseni monotsüütide, makrofaagide, granulotsüütide ja teatud lümfotsüütide poolt. Mõlemad inimese antikeha isotüübid, IgG1 ja IgG3, vahendavad ADCC-d.

Teine võimalik antikeha-vahendatud vähi hävitamismehhanism võib kulgeda 10 kasutades antikehi, mis toimivad katalüüsides mitmesuguste keemiliste sidemete hüdrolyüsi rakumembraanis ja sellega ühendatud glükoproteiinides või glükolipiidides, niinimetatud katalüütilisi antikehi.

Esineb kaks täiendavat laiemalt tunnustatud antikeha-vahendatud vähiraku hävitamismehhanismi. Esimene neist seisneb antikehade kasutamises vaktsiinina, et 15 indutseerida organismi tekitama immuunvastust arvatavale kasvajakasvule olevale vähi antigeenile. Teine antikehade kasutamise viis on kasvuretseptorite suunamine ja sekkumine nende talitlusse või selle retseptori tõhus allareguleerimine kuni tema funktsiooni kadumiseni.

Vastavalt on selle leiutise eesmärgiks vähktõbe modifitseerivate antikehade, mis on 20 saadud konkreetselt indiviidilt, on vähirakkudele tsütotoksilised, olles samaaegselt mittevähirakkudele suhteliselt mittetoksilised, valmistamise meetodi kasutamine selleks, et isoleerida hübridoomi rakuliine ning vastavaid isoleeritud monoklonaalseid antikehi ja nende antigeeni siduvaid fragmente, milleks need hübridoomi rakuliinid on kodeeritud.

25 Leiutise täiendavaks eesmärgiks on vähktõbe modifitseerivate antikehade ja nende antigeeni siduvate fragmentide tutvustamine.

Käesoleva leiutise järgmiseks eesmärgiks on selliste vähktõbe modifitseerivate antikehade valmistamine, mille tsütotoksilisust vahendatakse antikeha-sõltuva rakulise toksilisuse kaudu.



Käesoleva leiutise täiendavaks eesmärgiks on veel selliste vähktõbe modifitseerivate antikehade valmistamine, mille tsütotoksilisust vahendatakse komplement-sõltuva rakulise toksilisuse kaudu.

5 Käesoleva leiutise veel üheks eesmärgiks on selliste vähktõbe modifitseerivate antikehade valmistamine, mille on tsütotoksilisus sõltub nende võimest katalüüsida rakuliste keemiliste sidemete hüdrolyüsi.

Käesoleva leiutise veel üheks eesmärgiks on selliste vähktõbe modifitseerivate antikehade valmistamine, mis on kasutatavad seondumistestides vähi diagnoosimisel, prognoosimisel ja jälgimisel.

10 Leiutise muud eesmärgid ja eelised ilmnevad järgnevast kirjeldusest, kus illustreerimiseks ja näitena on esitatud selle leiutise teatud teostused.

#### Jooniste lühikirjeldus

Joonis fig. 1 sisaldab mitmete vähirakuliinide ja mittevähirakkude vastu suunatud 10A304.7 antikehade, isotüübi kontrollantikehade ja anti-EGFR antikehade tüüpilisi  
15 FACS (fluoromeetrilise rakusorteri) histogramme.

#### Näide 1

##### Hübridoomide valmistamine - hübridoomi rakuliin 10A304.7

Hübridoomi rakuliin 10A304.7 deponeeriti vastavalt Budapesti lepingule Ameerika Tüüpkultuuride Kolleksioonis, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209  
20 26. novembril, 2002, deponeerimisnumbriga PTA-5065. 37CFR1.808 kohaselt kinnitavad deponeerijad, et kõik deponeeritud materjale puudutavad kitsendused avalikuks kasutamiseks kõrvaldatakse pöördumatult patendi väljaandmisel.

Vähivastast antikeha tootva hübridoomi saamiseks valmistati külmas PBS-is SCID-  
25 hiirtel kasvatatud käärsöolevähi rakuliinist HT-29 käärsöolevähi üksikraku-suspensioonid. Adjuvant IMMUNEASY™ (Qiagen, Venlo, Holland) valmistati kasutamiseks ette kerge pööritamisega. 10 miljonile HT-29 rakule lisati mikrotsentrifuugi torusse 100 mikrolitrit hiire IMMUNEASY™ adjuvanti, segati ning jäeti 15 minutiks toatemperatuuril seisma. 8-9-nädalased BALB/c hiired

immuniseeriti, süstides neile intramuskulaarselt 100 mikrolitrit 2,5 miljonit rakku sisaldavat antigeeni-adjuvanti. Immunisatsiooni tugevdamiseks manustati hiirtele kaks nädalat pärast esialgset immuniseerimist intraperitoneaalse süstiga 2,5 miljonit rakku 250 mikrolitris värskelt valmistatud antigeeni-adjuvandis. Kaks päeva pärast viimast immuniseerimist kasutati fusiooniks põrna. Hübridoomid valmistati isoleeritud splenotsüütide fusiooni teel müeloomipartneritega NSO-1. Fusioonide supernatante testiti hübridoomide subkloonimiseks.

Määramaks kindlaks, kas hübridoomi rakkudest erituvad antikehad on IgG või IgM isotüüpi, kasutati ELISA testi. ELISA plaatidele lisati üheks ööks 4 °C juures pesa kohta 100 mikrolitrit kitse hiirevastast IgG + IgM-i (H+L) kontsentratsiooniga 2,4 mikrogrammi/ml puhverlahuses (0,1M karbonaat/vesinikkarbonaatpuhver, pH 9,2-9,6). Plaatide pesti 3 korda pesupuhvriga (PBS + 0,05% Tween). Toatemperatuuril lisati üheks tunniks pesa kohta 100 mikrolitrit blokeerimispuhvrit (5% piima pesupuhvris) ja pesti 3 korda pesupuhvriga. Pesa kohta lisati 100 mikrolitrit hübridoomi supernatanti ja plaati inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Plaatide pesti 3 korda pesupuhvriga ja pesa kohta lisati 100 mikrolitrit lahjenduses 1/5000 kas kitse hiirevastase IgG või IgM-i määrõika peroküdaasi konjugaati (lahjendatud PBS-is, mis sisaldas 1% veiseseerumi albumiini). Pärast plaadi 1-tunnist inkubeerimist toatemperatuuril pesti plaati 3 korda pesupuhvriga. Pesa kohta lisatud 100 mikrolitrit TMB lahust inkubeeriti toatemperatuuril 1-3 minutit. Värvusreaktsioon peatati 100 mikrolitri 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lisamisega pesa kohta ja plaati loeti 450 nm juures Perkin-Elmeri plaadilugejas HTS7000. Nagu nähtub tabelist 1, eritusid 10A304.7 hübridoomidest peamiselt IgG isotüüpi antikehad.

Tabel 1	Isotüüp (ELISA) korda (üle tausta)		Tsütotoksilisus (%)						Sidumine (üle tausta)		
			HT-29		SW1116		SW620		HT-29	SW1116	SW620
Kloon	IgG	IgM	keskm.	CV	keskm.	CV	keskm.	CV	korda	korda	korda
10A304.7	39,0	0,7	-57	6	11	13	-23	1	22,8	13,1	23,9
38D-27			-34	5	-26	12	76	49			
NaN <sub>3</sub>			61	10			68	16			
Tsükloheksimiid			23	8	17	14	-2	8			
Anti-EGFR (C225)					13	10					

Ühekordse piiratud lahjendamise järel uuriti hübriidoomi supernatante, leidmaks antikehi, mis seonduvad ELISA rakutestis sihtrakkudega. Uuriti käärsöolevähi kolme rakuliini: HT-29, SW1116 ja SW620. Plaaditud rakud fikseeriti enne kasutamist.

5 Plaat pesti toatemperatuuril 3 korda  $MgCl_2$  ja  $CaCl_2$  sisaldava PBS-ga. Igasse pesa lisati toatemperatuuril 10 minutiks 100 mikrolitrit 2% paraformaldehüüdi lahust PBS-is ja seejärel valati ära. Plaat pesti toatemperatuuril uuesti 3 korda  $MgCl_2$  ja  $CaCl_2$  sisaldava PBS-ga. Blokeerimine viidi läbi toatemperatuuril ühe tunni jooksul, lisades pesa kohta 100 mikrolitrit 5% piimasisaldusega pesupuhvrit (PBS + 0,05% Tween).

10 Plaat pesti 3 korda pesupuhvriga ja lisati toatemperatuuril üheks tunniks pesa kohta 100 mikrolitrit hübriidoomi supernatanti. Plaat pesti 3 korda pesupuhvriga ja lisati pesa kohta 100 mikrolitrit 1/5000 lahjendatud kitse hiirevastast IgG või IgM määrõika peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha (lahjendatud 1% veiseseerumi albumiini sisaldava PBS-ga). Pärast ühetunnist inkubeerimist toatemperatuuril pesti

15 plaat 3 korda pesupuhvriga ja pesa kohta lisatud 100 mikrolitrit TMB substraati inkubeeriti toatemperatuuril 1-3 minutit. Reaktsioon peatati pesa kohta lisatud 100 milliliitri 2M  $H_2SO_4$ -ga ja plaat loeti 450 nm juures Perkin-Elmeri plaadilugejaga HTS7000. Tabelis 1 esitatud tulemused väljendati kordsete arvudena võrreldes kontrolliks kasutatud IgG isotüübi taustaga (3BD-27). Hübriidoomist 10A304.7 saadud

20 antikehad omasid tausta suhtes HT-29, SW1116 ja SW620 rakkudes vastavalt 22,8, 13,1 ja 23,9 korda suuremat sidumisvõimet. Sellest nähtub, et antikeha seondumine antigeeniga avaldus mõnede vähirakkude puhul teistega võrreldes suuremal määral.

Seoses antikeha seondumise testimisega testiti samadel käärsöolevähi rakuliinidel: HT-29, SW 1116 ja SW620 ka hübriidoomi supernatantide tsütotoksilist toimet.

25 Tsütotoksilisuse test Live/Dead saadi firmast Molecular Probes (Eu, OR). Testid viidi läbi vastavalt tootja instruktsioonidele alltoodud muudatustega. Rakud plaaditi enne testi ettenähtud sobiva tihedusega. Kahe päeva pärast kanti mikrotiitrimisplaatidelt 100 mikrolitrit hübriidoomi supernatanti üle rakuplaatidele ja inkubeeriti 5 päeva inkubaatoris 5%  $CO_2$  keskkonnas. Positiivse kontrollina kasutatud pesad imeti tühjaks

30 ja sinna lisati 100 mikrolitrit naatriumasiidi ja/või tsükloheksimiidi. Samuti lisati isotüübi kontrollina monoklonaalne antikeha 3BD-27, kuna oli teada, et see ei seonu käärsöolevähi HT-29 rakkudega. Võrdluseks kasutati testis ka anti-EGFR antikeha

(C225). Pärast viiepäevast töötlust tühjendati plaat ümberpööramisega ja kuivatati kuivatuspaberiga. Mitmekaelalisest pressitavast pudelist doseeriti toatemperatuuril igasse pessa  $MgCl_2$  ja  $CaCl_2$  sisaldav DPBS-i, koputati kergelt 3 korda, pesad tühjendati ümberpööramisega ja kuivatati kuivatuspaberiga. Igasse pessa lisati 50  
5 mikrolitrit Live/Dead värvainet lahjendatult  $MgCl_2$  ja  $CaCl_2$  sisaldava DPBS-ga ja inkubeeriti 37 °C juures 5%  $CO_2$  keskkonnas inkubaatoris 30 minutit. Plaaete loeti Perkin-Elmeri fluorestsents-plaadilugejas HTS7000 ja andmeid analüüsiti Microsoft Excel'ga. Tulemused on toodud tabelis 1. Hübridoomi 10A304.7 poolt põhjustatud spetsiifiline tsütotoksilisus oli SW1116 rakkudes 11%, mis sarnanes anti-EGFR  
10 antikeha C225 näitajatele. 10A304.7 tugev seondumine SW1116 rakkudega näitas, et selline antikeha sidumisaste oli küllaldane tsütotoksilisuse vahendamiseks nende vähirakkude vastu. Kuigi rakulises ELISA testis seendus 10A304.7 tugevasti HT-29 ja SW620 vähirakkudega, ei põhjutanud see tsütotoksilisust. Sellest järeldus, et ainult antikeha sidumine ei olnud piisav 10A304.7 tsütotoksilisuse vahendamiseks HT-29 ja  
15 SW620 rakkude vastu. Tabelist 1 ilmnes, et antikeha 3BD-27, mis on sama isotüüpi kui antikeha 10A304.7 ja teadaolevalt ei seonu käärsöolevähi HT-29 rakkudega, ei olnud sellele rakuliinile tsütotoksiline. Tuntud mittespetsiifilised tsütotoksilised ained nagu naatriumasiid ja tsükloheksimiid põhjustasid oodatult tsütotoksilisuse. Võrdlusena põhjustas hästi määratletud vähivastane antikeha C225 vähirakkudes  
20 SW1116 13% tsütotoksilisuse. Tabeli 1 andmed näitavad, et 10A304.7 seondumine vähirakkudega võib olla tähtsaks etapiks tsütotoksilisuse avaldumisel, kuid see pole iseenesest piisav selle sündmuse vahendamiseks.

## Näide 2

### Antikeha valmistamine

25 Monoklonaalne antikeha 10A403.7 valmistati hübridoomide kultiveerimisega pudelites CL-1000 (BD Biosciences, Oakville, ON), saagi kogumisega ja kaks korda nädalas teostatavate ümberkülvidega, puhastades antikeha standardsete menetlustega kolonnil Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC). See leiutis hõlmab selliste monoklonaalsete antikehade kasutamist, mis on kas  
30 humaniseeritud, kimäärsed või hiire antikehad. 10A304.7 võrreldi tsütotoksilisuse testis mitme nii positiivse (anti-Fas (EOS9.1 IgM, kapa, 20 mg/ml, eBioscience, San

Diego, CA), anti-Her2/neu (IgG1, kapa, 10 mg/ml, Inter Medico, Markham, ON), anti-EGFR (C225, IgG1, kapa, 5 mg/ml, Cedarlane, Hornby, ON), tsükloheksimiid (100 mM, Sigma, Oakville, ON) ja NaN<sub>3</sub> (0,1%, Sigma, Oakville, ON)) kui ka negatiivse (107.3 (anti-TNP, IgG1, kapa, 20 mg/ml, BD Biosciences, Oakville, ON), MPC-11 (antigeenne spetsiifilisus on teadmata, IgG2b, kapa, 20 mg/ml), IgG puhver, 2%)) kontrollprooviga (tabel 2). Testiti rinnavähi (MB-231, MCF-7), käärsoolevähi (Caco-2, DLD-1, Lovo, HT-29, SW1116, CW620), munasarjavähi (OVCAR), pankreasevähi ( BxPC-3), eesnäärmevähi (PC-3) ja mittevähi (CCD 27sk, Hs888 Lu) rakuliine (kõik saadud ATCC-st, Manassas, VA). Tsütotoksilisuse test Live/Dead saadi firmast Molecular Probes (Eugene, OR). Testid viidi läbi vastavalt tootja instruksioonidele koos alltoodud muudatustega.

Tabel 2		Käärsoole						Pankrease	Rinna		Ees- näärme	Muna- sarja
		Caco-2	DLD-1	Lovo	HT-29	SW1116	SW620	BxPC-3	MB-231	MCF-7	PC-3	OVCAR
	10A304.7 (20 µg/ml)					++			++	++++	+++	++++
Positiivsed kontrollid	Anti-Fas (20 µg/ml)		++	++++				++++			++	++++
	Anti-Her2/neu (10 µg/ml)											
	Anti-EGFR (c225, 5 µg/ml)	+++	++++			++++			+			
	Tsükloheksimiid (100 µM)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	IgG1 (107.3, 20 µg/ml)		+						+	+		
Negatiivsed kontrollid	IgG2b (MPC-11, 20 µg/ml)		+									
	IgG puhver (2%)											

Enne testimist plaaditi rakud ettenähtud sobiva tihedusega. Kahe päeva pärast lahjendati 100 mikrolitrit puhastatud antikehi lahustiga, kanti üle rakuplaatidele ning inkubeeriti 5 päeva inkubaatoris 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas. Seejärel plaat tühjendati ümberpööramisega ja kuivatati kuivatuspaberiga. Toatemperatuuril doseeriti mitmekaelalisest pressitavast pudelist igasse pessa MgCl<sub>2</sub> ja CaCl<sub>2</sub> sisaldav DPBS-i, koputati kergelt 3 korda, plaat tühjendati ümberpööramisega ja kuivatati kuivatuspaberiga. Igasse pessa lisati 50 mikrolitrit fluorestseeruvat Live/Dead värvainet lahjendatult MgCl<sub>2</sub> ja CaCl<sub>2</sub> sisaldava DPBS-ga ja inkubeeriti 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas 37 °C juures inkubaatoris 30 minutit. Plaaete loeti Perkin-Elmeri fluorestsents-plaadilugejaga HTS7000, andmeid analüüsiti Microsoft Excel'ga ja tulemused on toodud tabelis 2. Toodud andmed on keskmised neljast katsest, mis teostati kolmes korduses ja on kvalitatiivselt esitatud järgmiselt: neljas katse neljast ületatakse taustsignaali tsütotoksilisus 15% võrra (++++), kahes katse neljast

ületatakse tausta tsütotoksilisus 15% võrra (+++), vähemalt kahes katses neljast ületatakse tausta tsütotoksilisus 10-15% võrra (++) ja vähemalt kahes katses neljast ületatakse tausta tsütotoksilisus 8-14% võrra. Märkuseti lahtrid tabelis 2 näitavad ebajärjekindlat või tsütotoksilisuse lävest madalamat toimet. Antikeha 10A304.7 tagas  
5 35% hästi tuntud anti-EGFR antikeha C225 tsütotoksilisest toimest, mis põhjustas 31% tsütotoksilisuse käärsoole rakuliinis SW1116. Nende mõlema antikeha toime sellele rakuliinile on kooskõlas tabelis 1 esitatud tulemustega. Lisaks sellele põhjustas 10A304.7 C225-ga võrreldes tunduvalt kõrgema tsütotoksilisuse teiste vähirakkude suhtes, kaasa arvatud rinnavähi rakuliinid MDA MB 231 (111%) ja MCF-7 (850%),  
10 eesnäärmevähi rakuliin PC-3 (375%) ja munasarjavähi rakuliin OVCAR (667%). Väga tähtis on see, et 10A304.7 ei põhjustanud tsütotoksilisust mitmete mittevähirakkude, nagu CCD 27sk või Hs888 Lu suhtes, mis näitab selle antikeha spetsiifilisust erinevatele vähirakkudele. Keemilised tsütotoksilised ained põhjustasid oodatud tsütotoksilisuse, samas kui hulk võrdluseks kasutatud antikehi toimised  
15 oodatult bioloogilistele proovidele samuti piirangutega.

Rakud valmistati FACS-i tarbeks ette nii, et algul pesti rakkude monokihti DPBS-ga (ilma  $\text{Ca}^{++}$  ja  $\text{Mg}^{++}$ -ta). Seejärel kasutati rakkude eemaldamiseks kultiveerimisplaatide pesadest 37 °C juures raku dissotsiatsioonipuhvrit (INVITROGEN). Tsentrifugeeritud ja kogutud rakud suspendeeriti uuesti 4 °C juures Dulbecco fosfaatpuhvrit sisaldavas  
20 füsioloogilises lahuses, mis sisaldas  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  ja 25% veiseloote seerumit (pesulahuses), rakud loendati, viidi vastava rakutiheduseni, tsentrifugeeriti rakutombuks ja suspendeeriti 4 °C juures uuesti värvimislahuses (DPBS, mis sisaldab  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  ja 2% veiseloote seerumit) testitavate antikehade (10A304.7) või kontrollantikehade (isotüübi kontroll, anti-EGF-R või anti-Fas) juuresolekul, asetades proovi  
25 kontsentratsiooniga 20 mikrogrammi/ml 30 minutiks jääle. Enne Alexa Fluor 488-ga konjugeeritud sekundaarse antikeha lisamist pesti rakke ühel korral pesulahusega. Seejärel lisati 20 minutiks Alexa Fluor 488-ga konjugeeritud antikeha värvimislahuses. Siis pesti rakke pesti viimast korda ja suspendeeriti uuesti värvimislahuses, mis sisaldas 1 mikrogramm/ml propiidiumjodiidi. Rakkude  
30 läbivoolutsütomeetrist saagist hinnati proovide voolutamiseks FACScan'il, kasutades tarkvara CellQuest (BD Biosciences). Rakkude hajumist ettepoole (FSC) ja külgsuunas (SSC) reguleeriti FSC ja SSC detektorite pingega ja amplituudi

suurendamisega. Kolme fluorestsentsikanali (FL1, FL2 ja FL3) detektoreid reguleeriti rakkude voolutamise, mida oli värvitud puhastatud isotüübi kontrollantikehaga ja seejärel Alexa Fluor 488-ga konjugeeritud sekundaarse antikehaga nii, et rakkudel oleks ühesugune keskmine, ligikaudu 1-5-ühikulise fluorestsentsi intensiivsusega piik.

- 5 Elusrakke selekteeriti FSC kaudu ja propiidiumjodiidi puudumise järgi. Iga proovi jaoks võeti analüüsiks umbes 10000 elusrakku ja tulemused on toodud tabelis 3.

Tabel 3	Käärsoole						Pankre- ase	Rinna		Ees- näärme	Munasarja	Normaalsed rakud	
	Caco-2	DLD-1	Lovo	HT-29	SW1116	SW620		BxPC-3	MB-231			MCF-7	PC-3
10A304.7	++++ (kahene)	++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	++	+++ (kahene)	++++	++++	++++
Anti-Fas	++	++	++	++	+		++				++	++	+++
Anti-EGFR			++	+++	++ (kahene)		+++	++++	++	+++ (kahene)	+++	++	+++

- Tabelis 3 on toodud keskmine fluorestsentsi intensiivsuse suurenemine isotüübi kontrollprooviga võrreldes, mis on kvalitatiivselt esitatud järgmiselt: alla 3 kuni 5 (+); 5-25 (++)
- 10 5-25 (++)
- 25-50 (+++) ja üle 50 (++++). Antikehade 10A304.7 tüüpilised histogrammid on koondatud joonisele fig. 1, samuti nende sidumisomaduste tõendid, kaasa arvatud illustreeritud kahesed (bimodaalsed) piigid mõnel juhtumil. 10A304.7 seondus mittespetsiifiliselt kõigi rakuliinidega, ilmutades kõrget sidumisvõimet ka mittevähirakkudega CCD-27sk ja Hs888.Lu, kuid seondumismäär oli erinevatel
- 15 rakuliinidel erinev. Seega seondub 10A304.7 rakuliinidega selektiivselt erinevatel tasemetel. Tabelites 2 ja 3 toodud tulemused näitavad, et 10A304.7 seondumine kasvajakudega on küll vajalik antikeha-vahendatud tsütotoksilisuse tekkeks, kuid see pole piisav selle sündmuse vallandumiseks.

Tõlke õigsust kinnitan  
Harald Tehver



**PATENDINÕUDLUS**

1. Isoleeritud monoklonaalne antikeha, mis on kodeeritud klooni abil, mis on deponeeritud ATCC-s deponeerimisnumbriga PTA-5065.

2. Nõudluspunktile 1 vastav antikeha, milleks on humaniseeritud antikeha.

5 3. Nõudluspunktile 1 vastav antikeha, milleks on kimäärne antikeha.

4. Isoleeritud kloon, mis on deponeeritud ATCC-s deponeerimisnumbriga PTA-5065.

5. Seondumistest vähirakkude olemasolu kindlaksmääramiseks inimese kasvajast valitud koeproovis, mis hõlmab:

10 ATCC-s deponeerimisnumbriga PTA-5065 deponeeritud klooni abil kodeeritud isoleeritud monoklonaalse antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi valmistamist;

isoleeritud monoklonaalse antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi kokkuviiimist koeprooviga; ja

isoleeritud monoklonaalse antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi koeprooviga seondumise kindlaksmääramist;

15 misläbi vähirakkude olemasolu koeproovis on näidustatud.

6. Nõudluspunktile 5 vastav seondumistest, milles inimese kasvaja koeproof on saadud kasvajast, mis pärineb koest, mis on valitud käärsoole-, munasarja-, kopsu- ja rinnakoest koosnevast rühmast.

20 7. Protsess vähirakkude isoleerimiseks või sõelumiseks koeproovist, mis on valitud inimese kasvajast, mis hõlmab:

ATCC-s deponeerimisnumbriga PTA-5065 deponeeritud klooni abil kodeeritud isoleeritud monoklonaalse antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi valmistamist;

isoleeritud monoklonaalse antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi kokkuviiimist koeprooviga; ja



isoleeritud monoklonaalse antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi koeprooviga seondumise kindlaksmääramist;

misläbi need vähirakud on selle seondumistesti abil isoleeritud ja nende esinemine selles koeproovis on kinnitust leidnud.

- 5 **8.** Nõudluspunktile 7 vastav protsess, milles inimese kasvaja koeproov on saadud kasvajast, mis pärineb koest, mis on valitud käärsoole-, munasarja-, kopsu- ja rinnakoest koosnevast rühmast.
- 9.** Nõudluspunktile 1 vastava isoleeritud monoklonaalse antikeha antigeeni siduvad fragmendid.
- 10 **10.** Nõudluspunktile 2 vastava humaniseeritud antikeha antigeeni siduvad fragmendid.
- 11.** Nõudluspunktile 3 vastava kimäärse antikeha antigeeni siduvad fragmendid.
- 12.** Mis tahes nõudluspunktile 1, 2, 3, 9, 10 või 11 vastav isoleeritud antikeha või antigeeni siduvad fragmendid, mis on konjugeeritud tsütotoksilistest osadest, ensüümidest, radioaktiivsetest ühenditest ja vererakkudest koosnevast rühmast valitud
- 15 liikmega.

Tõlke õigsust kinnitan  
Harald Tehver



FIG. 1

