

P0600520

71.463/DE



IL-18-at és kemoterápiás szereket tartalmazó
kombinációk rák kezelésére és/vagy megelőzésére
~~IL-KOMPOZÍCIÓK~~

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

KIVONAT

A találmány egy potenciátort, például IL-18-at, más néven γ -interferon-indukáló faktort (IGIF), valamint kemoterápiás szereket tartalmazó kompozíciókra vonatkozik. A kemoterápiás szerek — egyebek mellett — például a következők lehetnek: kamptotecinek, például topotekan (topotecan), antraciklin antibiotikumok, például doxorubicin, alkilezőszerek, például ciklofoszfamid, vagy anti-microtubulus hatóanyagok, például paklitaxel (paclitaxel). A találmány kiterjed ezenkívül az említett kompozíciók előállítási eljárásaira, a kompozícióknak a rák megelőzésére és/vagy kezelésére történő alkalmazására, továbbá a kompozícióknak tumorok vagy rákos sejtek növekedésének elő-
sőkben történő gátlására történő felhasználására.

más jellemző" alra


2006 AUG. 0-8
Dr. BOROS ISTVÁN

Pa600520

71.463/DE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

A2



IL-18-at és kemoterápiás szereket tartalmazó kemoterápiás
rák kezelésére és/vagy megelőzésére

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

ÚJ KOMPOZÍCIÓK

A találmány egy potenciátort, például IL-18-at, más néven γ -interferon-indukáló faktort (IGIF), valamint kemoterápiás szereket tartalmazó kompozíciókra vonatkozik. A kemoterápiás szerek — egyebek mellett — például a következők lehetnek: kamptotecinek, például topotekan (topotecan), antraciklin antibiotikumok, például doxorubicin, alkilezőszerek, például ciklofoszfamid, vagy anti-microtubulus hatóanyagok, például paklitaxel (paclitaxel). A találmány kiterjed ezenkívül az említett kompozíciók előállítási eljárásaira, a kompozícióknak a rák megelőzésére és/vagy kezelésére történő alkalmazására, továbbá a kompozícióknak tumorok vagy rákos sejtek növekedésének megelőzésében történő gátlására történő felhasználására.

A rákhoz vezető, illetve az egyre több rosszindulatú és metasztatikus betegség kifejlődését eredményező genetikai és celluláris változások megértésében már lényeges előrehaladás történt. Kevésbé jelentősek azok az eredmények, amelyeket a metasztatikus rák gyógyításában sikerült elérni, mivel a nagy gyakorisággal előforduló rákok, például a vastagbél-, a tüdő-, a prosztata- és az emlőrák vagy csak rövid ideig reagál, vagy egyáltalán nem reagál még a legújabb kemoterápiás hatóanyagokkal végzett kezelésekre sem. A rák molekuláris biológiai vizsgálatait segítették elő azoknak az okoknak a felismerését, amelyek magyarázatot adnak arra a kérdésre, hogy a tumorok miért nem reagálnak a kemoterápiára. Normál sejtekben a kemoterápiás szerek által kiváltott DNS károsodás vagy más metabolikus sérü-

lés egy programozott sejthalál folyamatot (apoptosis) indít meg. A tumorok genetikai evolúciójának részeként az apoptosist megakadályozó folyamatok felülszabályozottak. Ez az olyan mutációkhoz szükséges szelekció eredményeként történik meg, amilyen például a p53 funkció elvesztése vagy a túlélést elősegítő bcl-2 túlzott expressziója, mivel a rákos sejtekben történő aberráns DNS replikáció normálisan apoptosist váltana ki. Az a tény, hogy tumorsejtekben az anti-apoptoticus folyamatok aktiváltak, arra utal, hogy ezek a sejtek mechanizmustól függetlenül makacsul ellenállnak számos eltérő kemoterápiás szernek, Emiatt a kemoterápiás szereknek makacsul ellenálló rákok esetében igen lényeges volna olyan, új terápiás módzatok bevezetése, amelyek megfelelő, a kemoterápiás szerekre adott választ eredményeznének; ilyen új terápiás módszer lehet például a tumor-indukált angiogenesis gátlása vagy a tumorokra adott immunválasz stimulálása.

Az IL-18, vagy más néven γ -interferon-indukáló faktor (IGIF), egy a közelmúltban felismert új citokin. Az aktív IL-18 157 aminosavcsoportot tartalmaz. Az IL-18-nak igen jelentős biológiai hatásai vannak, amilyenek — egyebek mellett — például a következők: kiváltja a T-sejtek és a splenocyták által történő γ -interferon-termelést, fokozza az NK sejtek ölő hatását, valamint elősegíti a naív $CD4^+$ T sejtek Th1 sejttekké történő differenciálódását. Ezenkívül a humán IL-18 fokozza a GM-CSF termelést és csökkenti az IL-10 termelést. Az IL-18 esetén kimutatták, hogy nagyobb γ -interferon indukáló képességgel rendelkezik, mint az IL-12, továbbá eltérő receptorokkal rendelke-

zik, valamint másféle szignál transzdukciós folyamatot használ.

Az IL-18-nak a rák kezelésében, valamint antitestjének az endotoxikus sokk által indukált májkárosodás (ami hasonló, mint a humán májelégtelenség) kezelésében kifejtett terápiás potenciálját állatmodellekben értékelték, és protektív hatásokat bizonyítottak. Például beszámoltak arról, hogy az IL-18 egerekben gátolja a vastagbél 26 adenokarcinóma metasztázisát és növekedését [lásd: Hanaya et al., *Anti-tumor effect of a new cytokine, IGIF on the metastasis and growth of murine colon 26 adenocarcinoma*, PROCEEDING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 37, 451-452 (1996)]. Az IL-18 tumorelleses aktivitására irányuló más vizsgálatokról számolnak be az alábbi közleményekben: Micaleff et al., *Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T Lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma*, CANCER RES., 57, 4557-4563 (1997); Yoshida et al., *Anti-tumor effect of human pancreatic cancer cells transduced with cytokine genes which activate Th1 helper T cells*, ANTICANCER RES., 18, 333-336 (1998); Osaki et al., *IFN- γ -inducing factor/IL-18 administration mediates IFN- γ - and IL-2-independent antitumor effects*, J. IMMUNOL., 160, 1742-1749 (1998); és Micaleff et al., *Augmentation of in vitro interleukin 10 production after in vivo administration of interleukin 18 is activated macrophage-dependent and is probably not involved in the antitumor effects of interleukin 18*, ANTICANCER RES., 18 (6A), 4267-4274 (1998)].

A CD4⁺T sejtek minden immunválasz centrális szabályozó

elemei. A $CD4^+$ T sejteket két, Th1 és Th2 alcsoportra osztjuk. A két alcsoportot annak alapján különböztetjük meg, hogy az egyes alcsoportok eltérő citokineket képesek kiválasztani. Érdekes módon a differenciálódás leghatásosabb induktorai maguk a citokinek. A Th2 sejteknek a naív prekurzorokból történő kifejlődését az IL-4 indukálja. Az IL-18 felismerése előtt azt gondolták, hogy az IL-12 a legfontosabb Th1 indukáló citokin. Az IL-18 is egy Th1 indukáló citokin, és az IL-18 a γ -interferon termelésének sitmulálásában hatásosabb, mint az IL-12.

A Th1 sejtek IL-2-t, γ -interferont és $TNF-\beta$ -t választanak ki. A γ -interferon, a Th1 citokin szignatúrája, közvetlenül a makrofágokra fejt ki hatást, és így fokozza a makrofágok mikrobiocidális és fagocitikus aktivitását. Ennek eredményeként az aktivált makrofágok hatékonyan pusztítják az intracelluláris patogéneket és a tumorsejteket. A Th2 sejtek IL-4-et, IL-5-öt, IL-6-ot, IL-10-et és IL-13-at termelnek, amelyek a segítő B-sejtek révén elősegítik az antitesttermelő sejtek kifejlődését. Együttesen, a Th1 sejtek elsődlegesen a sejtmediált immunitásért, míg a Th2 sejtek a humorális immunitásért felelősek.

Az IL-18 esetében a kódoló nukleotidszekvencia és a tisztított protein bizonyos fizikai-kémiai, illetve kémiai tulajdonságai ismertek.

A 0 692 536. számú európai szabadalmi bejelentésben [Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kayaku Kankyujo ("Hayashibara"); közzététel: 1996. 01. 17.] egy olyan egér proteint ismeretnek, amely immunkompetens sejtek által történő IFN-gamma termelést indukál; a protein további jellemzésére leírnak bizo-

nyos fizikai-kémiai tulajdonságokat, valamint ismertetnek egy meghatározott részleges aminosav-szekvenciát. Leírnak továbbá egy 157 aminosav-szekvenciából álló proteint, ennek két fragmentumát, a proteint kódoló DNS-t (471 bp), hibridomákat, proteintisztítási eljárásokat, valamint a protein detektálására szolgáló eljárásokat is.

A 0 712 931. számú európai szabadalmi bejelentésben [("Hayashibara"); közzététel: 1996. 05. 22.] a következőket írják le: egy 157 aminosavból álló humán protein és ennek homológjai, a proteint kódoló DNS, transzformánsok, a protein előállítási eljárásai, a proteinnel szembeni monoklonális antitestek, hibridomák, proteintisztítási eljárások, valamint a protein detektálására szolgáló eljárások.

A 0 767 178. számú európai szabadalmi bejelentésben ("Hayashibara"); közzététel: 1997. 04. 09.] leírnak egy olyan, az *N*-terminálisnál egy 10 aminosavból álló szekvenciával rendelkező humán proteint, amely egy immunkompetens sejt által történő γ -interferon-termelést indukál. Ismertetik a protein előállítási eljárásait, a proteint mint gyógyszerhatóanyagot, a protein antioncoticus, tumorellenes, vírusellenes, antibakteriális, immunopathiás hatóanyagként történő alkalmazását, valamint a protein atopicus betegségek kezelésére történő felhasználását.

A Wo 97/24441. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben (Incyte Pharmaceuticals, Inc.; közzététel: 1997. 07. 10.) egy IL-18 prekürzornak megfelelő, 193 aminosavból álló proteint ismertetnek, valamint leírják a kódoló DNS-t is.

A kemoterápiás szerek jól ismertek a szakterületen. Példá-

ul kamptotecineket ismertetnek, ezen belül leírják a topotekant az 5 004 758. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. Kamptotecineket ismertetnek, ezen belül a topotekant leírják a következő helyen is: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, second edition*, edited by Bruce A. Chabner and Dan L. Longo, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia © 1996, pp. 463-484. A topotekant 9687-es sorszám alatt ismertetik a következő kézikönyvben: *The Merck Index, Twelfth Edition*, © 1996 Merck & Co. Inc. Antraciklin antibiotikumokat ismertetnek, ezen belül a doxorubicint is leírják a következő helyen: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, second edition*, edited by Bruce A. Chabner and Dan L. Longo, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia © 1996, pp. 409-434. A doxorubicint 3495-ös sorszám alatt ismertetik a következő kézikönyvben: *The Merck Index, Twelfth Edition*, © 1996 Merck & Co. Inc. Alkilezőszereket ismertetnek, ezen belül a ciklofoszfamidot is leírják a következő helyen: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, second edition*, edited by Bruce A. Chabner and Dan L. Longo, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia © 1996, pp. 297-332. A ciklofoszfamidot 2816-os sorszám alatt ismertetik a következő kézikönyvben: *The Merck Index, Twelfth Edition*, © 1996 Merck & Co. Inc. Anti-microtubulus hatóanyagokat ismertetnek, ezen belül a paklitaxelt a következő helyen írják le: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, second edition*, edited by Bruce A. Chabner and Dan L. Longo, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia © 1996, pp. 263-296. A paklitaxelt 7117-es sorszám alatt ismertetik a következő kézikönyvben: *The Merck Index, Twelfth Edition*, ©

1996 Merck & Co. Inc. Az ezen a területen jártas szakember számára egyéb kemoterápiás szerek is jól ismertek.

A találmány egyik tárgya egy kemoterápiás szerrel kombinált olyan polipeptidre vonatkozik, amely a szekvenciák teljes hosszában legalább 70 %-ban azonos az 1. számú szekvenciának (SEQ ID NO:1) vagy a 2. számú szekvenciának (SEQ ID NO:2) megfelelő aminosav-szekvenciával.

A találmánynak egy másik tárgya egy kemoterápiás szerrel, ezen belül előnyösen egy kamptotecinnel, például topotekannal, egy antraciklin antibiotikummal, például doxorubicinnel, egy alkilezőszerrel, például ciklofoszfamiddal, vagy egy anti-microtubulus hatóanyaggal, például paklitaxellel kombinált olyan polipeptidre vonatkozik, amely a szekvenciák teljes hosszában legalább 70 %-ban azonos az 1. számú szekvenciának (SEQ ID NO:1) vagy a 2. számú szekvenciának (SEQ ID NO:2) megfelelő aminosav-szekvenciával.

A találmánynak egy ismét további tárgya egy olyan gyógyszerkészítményre vonatkozik, amely egy polipeptidet, például IL-18-at, egy kemoterápiás szert, valamint gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaz.

A találmány tárgyát képezi ezenkívül egy eljárás a fentiekben ismertetett kompozíció előállítására, amelynek során a polipeptidet a kemoterápiás szerrel kombináljuk, majd a képződött kompozíciót kinyerjük.

A találmánynak egy további tárgyát képezi egy eljárás rák megelőzésére és/vagy kezelésére emlősökben, amelynek során beadjuk egy polipeptidet, például IL-18-at, és egy kemoterápiás

szert tartalmazó kompozíció rákot gátló mennyiségét.

A találmánynak egy ismét további tárgyát képezi egy eljárás rák megelőzésére és/vagy kezelésére emlősökben, amelynek során beadjuk egy polipeptidet, például IL-18-at, és egy kemoterápiás szert, valamint egy gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmazó kompozíció rákot gátló mennyiségét.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás a tumorsejtek növekedésének a gátlására egy polipeptidet, például IL-18-at, és egy kemoterápiás szert tartalmazó kompozícióra szenzitív emlősökben, amelynek során az említett tumorsejtektől szenvedő emlősnek beadjuk az említett kompozíció hatásos, a tumorsejt-növekedést gátló mennyiségét.

Végül a találmány tárgyát képezi egy eljárás a tumorsejtek növekedésének a gátlására egy polipeptidet, például IL-18-at, és egy kemoterápiás szert, valamint gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmazó kompozícióra szenzitív emlősökben, amelynek során az említett tumorsejtektől szenvedő emlősnek beadjuk az említett kompozíció hatásos, a tumorsejt-növekedést gátló mennyiségét.

Az 1. ábrán látható grafikon önmagának az IL-18-nak vagy az IL-18 topotekannal alkotott kombinációjának az előrehaladott pulmonalis Lewis-tüdőkarcinóma növekedésére gyakorolt hatását mutatja be.

A 2. ábrán látható grafikon önmagának az IL-18-nak vagy az IL-18 topotekannal alkotott kombinációjának a tüdőben lévő Lewis-tüdőkarcinóma kolóniák számára gyakorolt hatását mutatja be.

A 3. ábrán látható grafikon az IL-18-nak és/vagy a topotekannak a pulmonalis tumor gócok számát csökkentő hatását mutatja be (ellenőrző kísérlet).

A 4. ábrán látható grafikon a topotekannal kombinált IL-18-nak a pulmonalis tumornövekedést csökkentő hatását mutatja be (ellenőrző kísérlet).

Az 5. ábrán látható grafikon nőstény BALB/c egerekben az IL-18 kis dózisének az előrehaladott szubkután implantált MOPC-315 plasmacytoma növekedésére gyakorolt hatását mutatja be.

A 6. ábrán látható grafikon az IL-18-nak és a topotekan egy MTD-jének (MTD: maximális tolerálható dózis) az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomára gyakorolt kombinált hatását mutatja be.

A 7. ábrán látható grafikon az IL-18-nak és a topotekan egy szuboptimális dózisének az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomára gyakorolt kombinált hatását mutatja be.

A 8. ábrán látható grafikon az IL-18 nagy dózisének az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomára gyakorolt hatását mutatja be.

A 9. ábrán látható grafikon a topotekannal kombinált IL-18-nak az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomával szembeni hatását mutatja be (ellenőrző kísérlet).

A 10. ábrán látható grafikon a topotekan szuboptimális dózisével kombinált IL-18-nak az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomával szembeni hatását mutatja be (ellenőrző kísérlet).

A 11. ábrán látható grafikon az intraperitonealis vagy szubkután úton egyetlen hatóanyagként alkalmazott nagy dózisú

IL-18-nak az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomával szembeni hatását mutatja be.

A 12. ábrán látható grafikon az intraperitonealis vagy szubkután úton alkalmazott, topotekannal kombinált IL-18-nak az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomával szembeni hatását mutatja be.

A 13. ábrán látható grafikon a szubkután úton, időszakosan alkalmazott, topotekannal kombinált IL-18-nak az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomával szembeni hatását mutatja be.

A 14. ábrán látható grafikon az IL-18-nak az előrehaladott szubkután B16F10 melanoma tumornövekedésének a gátlására gyakorolt hatását mutatja be.

A 15. ábrán látható grafikon az IL-18-nak az előrehaladott szubkután B16F10 melanomában ciklofoszfamid által indukált növekedéskésleltetés prolongálására gyakorolt hatását mutatja be.

A 16. ábrán látható grafikon önmagában a topotekannak vagy az IL-18-cal kombinált topotekannak az előrehaladott szubkután B16F10 melanomát hordozó egerekben kifejtett hatását mutatja be.

A 17. ábrán látható grafikon önmagában az IL-18 nagy dózisának az előrehaladott szubkután B16F10 melanoma tumornövekedésének gátlására gyakorolt hatását mutatja be.

A 18. ábrán látható grafikon a ciklofoszfamid egy MTD-jével (MTD: maximális tolerálható dózis) kombinált IL-18-nak az előrehaladott szubkután B16F10 melanomára gyakorolt hatását mutatja be (ellenőrző kísérlet).

A 19. ábrán látható grafikon a ciklofoszfamid egy szubop-



timális dóziséval kombinált IL-18-nak az előrehaladott szubkután B16F10 melanómára gyakorolt hatását mutatja be.

A 20. ábrán látható grafikon a paklitaxellel kombinált IL-18-nak az előrehaladott szubkután Madison-tüdőkarcinómára gyakorolt hatását mutatja be.

A 21. ábrán látható grafikon a doxorubicinnek az előrehaladott emlő-adenokarcinóma 16/c növekedése dóziszfüggő késleltetésének kialakulására gyakorolt hatását mutatja be.

A 22. ábrán látható grafikon az IL-18-nak az előrehaladott emlő-adenokarcinóma 16/c minimális tumornövekedés-késleltetésének a kialakulására gyakorolt hatását mutatja be.

A 23. ábrán látható grafikon az IL-18-nak a doxorubicin aktivitására gyakorolt hatását mutatja be előrehaladott emlő-adenokarcinóma 16/c-ben.

A találmány általánosan tehát egy potenciátort, például IL-18-at, valamint kemoterápiás szereket tartalmazó kompozíciókra vonatkozik. A kemoterápiás szerek — egyebek mellett — például a következők lehetnek: kamptotecinek, például topotekan, antraciklin antibiotikumok, például doxorubicin, alkilezőszerek, például ciklofoszfamid, vagy anti-microtubulus hatóanyagok, például paklitaxel. A találmány kiterjed ezenkívül az említett kompozíciók előállítási eljárásaira, a kompozícióknak a rák megelőzésére és/vagy kezelésére történő alkalmazására, továbbá tumorok vagy rákos sejtek növekedésének gátlási eljárásaira.

Bizonyos, a leírásban gyakran használt kifejezések és rövidítések egyértelmű megértésének elősegítése érdekében ismer-



tetjük az általunk használt rövidítések jelentését, illetve egyes kifejezések meghatározását.

"CPA" jelentése ciklofoszfamid; "CR" jelentése teljes regresszió; "ip" jelentése intraperitonealis; "iv" jelentése intravénás; "ILS" jelentése megnövekedett élettartam; "LTR" jelentése tartós regresszió; "MTD" jelentése maximális tolerálható dózis; "PR" jelentése részleges regresszió; "q1D" jelentése egy dózis minden nap; "q4D" egy dózis négynaponta; "q4Dx6" egy dózis négynaponta 6 alkalommal; "q4Dx7" egy dózis négynaponta 7 alkalommal; "qDx5" jelentése egy dózis minden nap 5 napon keresztül; "qDx21" jelentése egy dózis minden nap 21 napon keresztül; "qDx26" jelentése egy dózis minden nap 26 napon keresztül; "qDx30" jelentése egy dózis minden nap 30 napon keresztül; "sc" jelentése szubkután; "UID" jelentése egy dózis naponta.

Amint az a szakterületen ismert, az "azonosság" két vagy több polipeptid-szekvencia, illetve két vagy több polinukleotid-szekvencia közötti, a szekvenciák összehasonlításával meghatározott viszonyra vonatkozik. A szakterületen az "azonosság" a polipeptid- vagy polinukleotid-szekvenciák közötti szekvenciarokonságnak, például az említett szekvenciák szálai közötti illeszkedés révén meghatározott mértékét is jelenti. Az "azonosság" és a "hasonlóság" ismert — egyebek mellett — például a következő helyeken közölt eljárásokkal egyszerűen kiszámítható: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York,

1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A. M., And Griffin, H. G., eds., Humana press, New Jersey, 1994; és *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; és Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. APPLIED MATH.*, 48, 1073 (1988). Az azonosság meghatározásához az előnyös eljárásokat úgy tervezzük meg, hogy azok a tesztelt szekvenciák közötti legnagyobb illeszkedést nyújtsák. Az azonosság és a hasonlóság meghatározására szolgáló eljárások bárki számára hozzáférhető számítógépes programokban kodifikáltak. A két szekvencia közötti azonosság és hasonlóság meghatározására szolgáló eljárások előnyös számítógépes programjai közé tartoznak — egyebek mellett — például a következők: GCG programcsomag [Devereux, J., et al., *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 12 (1), 387 (1984)], valamint a BLASTP, a BLASTN és a FASTA programcsomag [Atschul, S. F. et al., *J. MOLEC. BIOL.*, 215, 403-410 (1990)]. A BLAST X program bárki számára beszerezhető például az NCBI-től és más forrásokból [*BLAST Manual*, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. MOL. BIOL.*, 215, 403-410 (1990)]. Az azonosság meghatározására a jól ismert Smith-Waterman-algoritmus is felhasználható.

Az "izolált" jelző a természetes állapotából "az emberi kéz által" megváltoztatott állapotot jelenti. Ha egy "izolált" kompozíció vagy anyag fordul elő a természetben, ez azt jelenti, hogy a kompozíció vagy anyag meg lett változtatva és/vagy el lett távolítva az eredeti környezetéből. Például a jelen leírásban alkalmazott értelmezés szerint egy elő állatban termé-

szetesen jelen lévő polinukleotid vagy polipeptid nem "izolált", de ugyanez a polinukleotid vagy polipeptid a természetes állapotában vele együtt lévő anyagoktól elválasztva már "izolált".

A "polipeptid" kifejezés kiterjed minden olyan peptidre vagy proteinre, amely két vagy több, peptidkötésekkel vagy módosított peptidkötésekkel (lásd például: peptid izoszterek) egymáshoz kapcsolódó aminosavból állnak. A "polipeptid" kifejezés egyaránt magában foglal rövid láncokat, szokásos elnevezéssel peptideket, oligopeptideket vagy oligomereket, valamint hosszú láncokat, általános elnevezéssel proteineket. A polipeptidek a 20 génkódolt aminosavtól eltérő aminosavakat is tartalmazhatnak. A "polipeptid" kifejezés kiterjed a természetes folyamatok által, például poszt-transzlációs folyamat révén, illetve a szakterületen jól ismert kémiai módosítási módszerekkel modifikált aminosav-szekvenciákra is. Az ilyen módosításokat részletesen ismertetik az alapkönyvek, még részletesebben a monográfiák, illetve a rendkívül széles körű szakirodalom. Modifikációk bárhol előfordulhatnak egy peptidben, ezen belül például a peptid főláncban, az aminosav-oldalláncokban, az aminosav vagy a karboxi-végcsoportokban. Hangsúlyozni kívánjuk, hogy ugyanolyan típusú modifikáció azonos vagy változó mértékben egy adott polipeptid számos helyén előfordulhat. Tehát egy adott polipeptid sokféle típusú modifikációt tartalmazhat. A polipeptidek ubikvitinálás eredményeként elágazóak lehetnek, illetve adott esetben elágazásokat tartalmazó gyűrűs szerkezeteket is alkothatnak. A ciklikus, elágazó vagy elágazó ciklikus polipep-

tidek származhatnak poszt-transzlációs természetes folyamatokból, illetve előállíthatók szintetikus eljárásokkal is. A modifikációk körébe tartoznak — egyebek mellett — például a következők: acetilezés, acilezés, ADP-ribozilezés, amidálás, flavin kovalens kapcsolása, egy hem-egység kovalens kapcsolása, egy nukleotid vagy egy nukleotidszármazék kovalens kapcsolása, egy lipid vagy egy lipidszármazék kovalens kapcsolása, foszfitidil-inozit kovalens kapcsolása, térhálósítás, ciklizálás, diszulfidkötés-képzés, demetilezés, formilezés, gamma-karboxilezés, glikozilezés, GPI-horgonyképzés, hidroxilezés, jódozás, metilezés, mirisztoilezés, oxidáció, proteolitikus átalakítás, foszforláció, prenilzés, racemizálás, szelenoilezés, szulfatálás, aminosavaknak proteinekhez történő, transzfer-RNS által mediált hozzáadása, például arginilezés és ubikvitinálás [lásd például: PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Coughton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pp. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", METH. ENZYMOL., 182, 626-646 (1990); és Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", ANN. N.Y. ACAD. SCI., 663, 48-62 (1992)].

A "variáns" kifejezés egy olyan polinukleotidot vagy polipeptidet jelöl, amely eltér ugyan az összehasonlítási alapot képező (referencia) polinukleotidtól vagy polipeptidtől, de

megtartja annak legfontosabb tulajdonságait. Egy polinukleotid tipikus variánsa a nukleotidszekvenciában különbözik a referencia polinukleotidtól. A variáns nukleotidszekvenciájában lévő változások adott esetben megváltoztathatják a referencia polinukleotid által kódolt polipeptid aminosav-szekvenciáját. A nukleotidban lévő változások a referencia szekvencia által kódolt polipeptidben aminosavak szubsztitúcióját, addícióját, delécióját, fúzióját vagy levágását (csonkolását) eredményezhetik (ennek részleteit a későbbiekben tárgyaljuk). Egy polipeptid tipikus variánsa az aminosav-szekvenciában tér el a referencia polipeptidről. Az eltérések általában korlátozottak, még pedig oly mértékben, amelynek hatására a referencia polipeptid és a variáns szekvenciája egészében nagyon hasonló, illetve egyes régiókban azonos. A variáns és a referencia polipeptid az aminosav-szekvenciában egy vagy több szubsztitúció és/vagy addíció és/vagy deléció formájában különbözhet egymástól. Egy szubsztituált vagy inszertált aminosavcsoport adott esetben a genetikai kód által kódolt lehet. Egy polinukleotid vagy polipeptid variánsa lehet természetes előfordulású, amilyen például egy allél variáns, illetve lehet egy olyan variáns, amelyről nem ismert, hogy természetes előfordulású volna. A polinukleotidok és a polipeptidek nem-természetes előfordulású variánsait mutagenézis módszerekkel vagy közvetlen szintézissel állíthatók elő.

A polipeptid-szekvenciák összehasonlítása esetén előnyösek az alábbi paraméterek:

1) Algoritmus: Needleman and Wunsch, J. MOL. BIOL., 48, 443-453

(1970)

Összehasonlító mátrix: BLOSSUM62 [Hentikoff and Hentikoff, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 89, 10915-10919 (1992)]

Térköz (gap) hátrány (penalty): 12

Térköz hosszúság hátrány: 4

Egy ezekkel a paraméterekkel alkalmazható program "gap" program néven bárki számára hozzáférhető (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, Amerikai Egyesült Államok). A fentiekben említett paraméterek jelentik a peptidek összehasonlításának alapértelmezett paramétereit (amik mellett a végső térközöknél nincs hátrány).

A találmány szerinti polipeptid-szekvenciák azonosak lehetnek az 1. számú szekvenciának (SEQ ID NO:1) vagy a 2. számú szekvenciának (SEQ ID NO:2) megfelelő referencia szekvenciával, ahol az azonosság lehet 100 %-os, illetve a találmány szerinti polipeptid-szekvencia a referencia szekvenciához képest tartalmazhat bizonyos egész számnak megfelelő aminosav-változást, azaz a százalékos azonosság értéke 100 %-nál kisebb is lehet. Az ilyen változások a következő csoportból kerülhetnek ki: legalább egy aminosav deléciója, szubsztitúciója, ezen belül konzervatív vagy nem-konzervatív szubsztitúciója, illetve inszerciója, ahol az említett változások a referencia polipeptid-szekvencia amino-terminális vagy karboxi-terminális helyzetében, illetve a két láncvégi pozíció között bárhol előfordulhatnak, és a változások a referencia szekvenciában lévő aminosavak között egyedileg szóródva, illetve a referencia szekvencián belül két vagy több szomszédos csoport formájában is meg-

jelenhetnek. Egy adott százalékos azonosság esetén az aminosav-változások számát úgy határozzuk meg, hogy az 1. számú szekvenciában vagy a 2. számú szekvenciában lévő összes aminosav számát megszorozzuk a megfelelő százalékos azonosság numerikus százaléértékével (osztva 100-zal), majd a szorzat értékét kivonjuk az 1. számú szekvenciában vagy a 2. számú szekvenciában lévő összes aminosav számából:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y)$$

ahol n_a az aminosav-változások száma, x_a az 1. számú szekvenciában vagy a 2. számú szekvenciában lévő összes aminosav száma, és y például 70 %-nál 0,70, 80 %-nál 0,80, 85 %-nál 0,85 stb., és ahol az x_a -ból történő kivonás előtt x_a és y bármely nem egész számnak megfelelő szorzatát lekerítjük a legközelebbi egész számra.

A "fúziós protein" kifejezés egy olyan proteinre vonatkozik, amelyet két, gyakran egymással kapcsolatban nem álló, fuzionált gén vagy génfragmentum kódol. Például a 0 464. számú európai szabadalmi bejelentésben olyan fúziós proteineket ismertetnek, amelyek immunglobulin molekulák konstans régiójának különböző részeit egy másik humán proteinnel vagy egy másik humán proteinnel egy részével együtt tartalmazzák. Gyógyászati vagy diagnosztikai felhasználás esetén gyakran előnyös, ha egy fúziós protein részeként egy immunglobulin Fc régiót alkalmaznak, ami például javított farmakokinetikai tulajdonságokat eredményezhet (lásd például: 0 232 262. számú európai szabadal-



mi bejelentés). Másrészt viszont bizonyos felhasználások esetén előnyös lenne, ha a fúziós protein expresszálása, detektálása és tisztítása után az Fc részt el lehetne távolítani.

Potenciátorok

Egy citoreduktív terápiával kombinálva a potenciátorok általában fokozzák az immunválaszt. Az IL-18 egy széles spektrumú potenciátor, ami különösen típusú kemoterápiás hatóanyagokkal történő kombináláskor is megtartja az immunstimuláló hatását. A kemoterápiás hatóanyagok bizonyos potenciátorai specifikusak és a modulálandó hatóanyag hatásmechanizmusával állnak kapcsolatban, amilyen például a leukovorinnak (leucovorin) az 5-fluor-uracilal kombinált alkalmazása, vagy a tirapazaminnak (tirapazamine) DNS-károsító szerekkel, például ciszplatinnal vagy alkilezőszerekkel történő alkalmazása.

IL-18 polipeptid

A találmány egyik tárgya kemoterapeutikumokkal kombinált IL-18 polipeptidekre vonatkozik. A polipeptidet és kamptotecin vegyületet tartalmazó találmány szerinti kompozícióknak a polipeptid komponensét, valamint ennek izolálását, azonosítását és előállításának bizonyos módszereit leírják a következő szabadalmi dokumentumokban: 0 692 536., 0 712 931. és 0 767 178. számú európai szabadalmi bejelentés, valamint WO 97/2441. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés. A polipeptidek olyan aminosav-szekvenciával rendelkező izolált polipeptideket foglalnak magukban, amely aminosav-szekvenciák legalább 70 %-ban azonosak, előnyösen legalább 80 %-ban azonosak, még előnyösebben legalább 90 %-ban azonosak, még ennél is előnyösebben



legalább 95 %-ban azonosak, legelőnyösebben legalább 97-99 %-ban azonosak az 1. számú szekvenciával (SEQ ID NO:1) (humán IL-18) vagy a 2. számú szekvenciával (SEQ ID NO:2) [rágcsáló (murine) IL-18] az 1. számú szekvenciának (SEQ ID NO:1) vagy a 2. számú szekvenciának (SEQ ID NO:2) a teljes hosszában. Az ilyen polipeptidek körébe tartoznak azok a polipeptidek, amelyek az 1. számú szekvenciának (SEQ ID NO:1) vagy a 2. számú szekvenciának (SEQ ID NO:2) megfelelő aminosav-szekvenciából állnak.

A találmány szerinti polipeptidek γ -interferon-indukáló polipeptidek, amelyek elsődleges szerepet játszanak a sejtmediált immunitás kiváltásában, ezen belül a T-sejtek és a splenocyták γ -interferon-termelésének megindításában, az NK-sejtek ölő aktivitásának a fokozásában, valamint a naív CD4⁺T-sejtek Th1 sejtekké történő differenciálódásának az elősegítésében. Ezeket a tulajdonságokat a továbbiakban együttesen "IL-18 aktivitás" vagy "IL-18 polipeptid aktivitás" vagy "az IL-18 biológiai aktivitása" elnevezéssel hivatkozunk. Az említett aktivitások körébe tartozik még az IL-18 polipeptid antigén és immunogén aktivitása, különösen az 1. számú szekvenciának (SEQ ID NO:1) vagy a 2. számú szekvenciának (SEQ ID NO:2) megfelelő polipeptid antigén és immunogén aktivitása. Előnyösen a találmány szerinti polipeptid az IL-18 legalább egy biológiai aktivitásával rendelkezik.

A találmány szerinti polipeptidek az "érett" vagy "maturus" protein formájában lehetnek, illetve egy nagyobb proteinnak, például egy fúziós proteinnak egy részét alkotják.

Gyakran előnyös, ha a találmány szerinti polipeptidek egy további aminosav-szekvenciát is magukban foglalnak, amely további aminosav-szekvencia például szekréción vagy vezető szekvenciákat, pro-szekvenciákat, a tisztításban segítséget nyújtó szekvenciákat, például többszörös hisztidincsoportokat, vagy a rekombináns előállítás ideje alatti stabilitást biztosító további szekvenciákat tartalmaz.

A találmány magában foglalja a fentiekben említett polipeptidek variánsait is. A variánsok olyan polipeptidek, amelyek a referencia polipeptidhez képest konzervatív aminosav-szubsztitúcióval lettek megváltoztatva, azaz amelyekben egy aminosavcsoport egy hasonló jellegű másik aminosavcsoporttal lett helyettesítve. A jellegzetes szubsztitúciók közé tartoznak a következő aminosavak közötti helyettesítések: Ala, Val, Leu és Ile között; Ser és Thr között; a savas Asp és Glu között; Asn és Gln között; valamint a bázikus Lys és Arg között; illetve az aromás Phe és Tyr között. Különösen előnyösek azok a variánsok, amelyekben tetszőleges kombinációban nagyszámú, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 vagy 1 aminosav van helyettesítve, törölve vagy hozzáadva.

A találmány szerinti polipeptideket bármely alkalmas módszerrel előállíthatjuk. Az ilyen polipeptidek — egyebek mellett — például a következőket foglalják magukban: izolált természetes előfordulású polipeptidek, rekombináns módszerrel előállított polipeptidek, szintetikus úton előállított polipeptidek, illetve az előbbi módszerek valamely kombinációjával előállított polipeptidek. Az említett polipeptidek előállítási lehetőségei jól ismertek a szakterületen.

A találmány szerinti rekombináns polipeptideket rekombináns DNS-technikával kialakított, expressziós rendszereket tartalmazó gazdasejtekből a szakterületen jól ismert eljárásokkal állíthatjuk elő. Ennek megfelelően a találmánynak egy további tárgyát képezik az olyan expressziós rendszerek, amelyek a találmány szerinti polipeptideket kódoló polinukleotidot vagy polinukleotidokat tartalmaznak; a gazdasejtek, amelyek az említett expressziós rendszerekkel végzett rekombináns DNS-technikával lettek kialakítva; valamint a találmány szerinti polipeptidek rekombináns módszerekkel történő előállítására.

A találmány szerinti DNS konstrukciókból származó RNS-ek alkalmazásával sejtmentes transzlációs rendszereket is felhasználhatunk az említett proteinek előállítására.

A megfelelő gazdaszervezetek reprezentatív példái közé tartoznak — egyebek mellett — a következők: bakteriális sejtek, például *streptococci*, *staphylococci*, *E. coli*, *Streptomyces* és *Bacillus subtilis* sejtek; gombasejtek, például élesztősejtek és *Aspergillus* sejtek; roversejtek, például *Drosophila* S2 és *Spodoptera* Sf9 sejtek; állati sejtek, például CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 és Bowes melanoma sejtek; valamint növényi sejtek.

Rendkívül sokféle expressziós rendszert felhasználhatunk, amilyenek — egyebek mellett — például a következők: kromoszomális, episzomális és víruseredetű rendszerek, például bakteriális plazmidokból, bakteriofágokból, transzpozonokból, élesztő episzomákból, inszerciós elemekből, élesztő kromoszomális elemekből, vírusokból, például baculovírusokból, papova vírusok-

ból, például SV40-ből, vaccinia vírusokból, adenovírusokból, baromfihimlő vírusokból, pseudorabies vírusokból és retrovírusokból származó vektorok, valamint az előbbiekből kombinációiból származó vektorok, például a plazmid és bakteriofág genetikai elemekből, így a kozmidokból és fágmidékből származó vektorok. Az expressziós rendszerek az expressziót szabályozó, valamint megindító kontroll régiókat is tartalmazhatnak. Általában bármilyen olyan rendszert vagy vektort felhasználhatunk, amely egy polipeptidnek egy gazdaszervezetben történő képződéséhez képes egy megfelelő polinukleotidot fenntartani, szaporítani vagy expresszálni. A megfelelő nukleotidszekvenciának egy expressziós rendszerbe történő inszertálását bármely, a szakterületen jól ismert vagy szokásosan alkalmazott módszer segítségével elvégezhetjük, amilyenek — egyebek mellett — például a következő szakirodalmi helyen összefoglalt eljárások: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). A transzlált proteinek az endoplasmaticus reticulum lumenébe, a periplasmaticus térbe vagy az extracelluláris környezetbe történő szekréciójának biztosításához megfelelő szekréciós szignálokat építhetünk be a kívánt polipeptidbe. Ezek a szignálok a polipeptid endogén szignáljai vagy pedig heterológ szignálok lehetnek.

A találmány szerinti polipeptideket a rekombináns sejtenyészetekből jól ismert módszerekkel nyerjük ki és tisztítjuk, amilyenek — egyebek mellett — például a következők: ammónium-szulfátos vagy etanolos kicsapás, savas extrakció, anion- vagy

kationcserés kromatográfia, foszfozellulóz-kromatográfia, hidrofób kölcsönhatásos kromatográfia, nagyteljesítményű folyadék-kromatográfia (HPLC), hidroxil-apatit-kromatográfia, valamint lektinkromatográfia. A tisztításhoz legelőnyösebben affinitás-kromatográfiát alkalmazunk. Amennyiben az izolálás és/vagy a tisztítás során a polipeptidet denaturáljuk, az aktív konformáció regenerálásához a proteinek visszahajtogatására szolgáló jól ismert módszereket alkalmazhatunk.

Kemoterápiás szerek/hatóanyagok

A találmány kiterjed a kemoterápiás szerek bármely kategóriájának egy potenciátorral, például IL-18-cal kombinációban történő alkalmazására. A kemoterápiás szereket például a következő kategóriákba sorolhatjuk: kamptotecinek, amilyen például a topotekan (topotecan), antraciklin antibiotikumok, amilyen például a doxorubicin, alkilezőszerek, amilyen például a ciklofoszfamid, vagy anti-microtubulus hatóanyagok, amilyen például a paklitaxel (paclitaxel). Még előnyösebben a kemoterápiás szer topoizomeráz. Legelőnyösebben a kemoterápiás szer topotekan. Más, az ezen a területen jártas szakember számára ismert kemoterápiás szerek is a találmány oltalmi körébe tartoznak.

A szakterületen ismert kemoterápiás szerek példái közé tartoznak a kamptotecinek. A kamptotecinek egyik példája a topotekan. A kamptotecineket, ezen belül a topotekant az 5 004 758. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik. A kamptotecineket, ezen belül a topotekant ezenkívül leírják a következő helyen is: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, second edition*, edited by Bruce A. Chabner and



Dan L. Longo, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia © 1996, pp. 463-484. A topotekant 9687-es sorszám alatt ismertetik a következő kézikönyvben: *The Merck Index, Twelfth Edition*, © 1996 Merck & Co. Inc.

A kemoterápiás szereknek egy másik csoportja antraciklin antibiotikumokként ismertek a szakterületen. Az antraciklin antibiotikumok példái közé tartozik a doxorubicin és a daunorubicin. Napjaink klinikai gyakorlatában ez a két hatóanyagok a legelterjedtebben alkalmazott antineoplasztikus szerek közé tartozik. A doxorubicint jelenleg elsősorban a szolid tumorok, különösen az elmőrák és a lymphoma kezelésére használják. Antraciklin antibiotikumokat ismertetnek, ezen belül a doxorubicint is leírják a következő helyen: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, second edition*, edited by Bruce A. Chabner and Dan L. Longo, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia © 1996, pp. 409-434. A doxorubicint 3495-ös sorszám alatt ismertetik a következő kézikönyvben: *The Merck Index, Twelfth Edition*, © 1996 Merck & Co. Inc.

A szakterületen ismert kemoterápiás szereknek egy további csoportját az alkilezőszerek alkotják. Az alkilezőszerek egyik példája a ciklofoszfamid. Az alkilezőszereket intenzíven alkalmazzák a kemoterápiában, mind hagyományos kombinációs kezelések, mind pedig csontvelő-átültetésekkel kapcsolatos nagy dózisú kezelések formájában. Alkilezőszereket ismertetnek, ezen belül a ciklofoszfamidot is leírják a következő helyen: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, second edition*, edited by Bruce A. Chabner and Dan L. Longo, Lippincott-Raven Publishers, Phila-



delphia © 1996, pp. 297-332. A ciklofoszfamidot 2816-os sorszám alatt ismertetik a következő kézikönyvben: *The Merck Index, Twelfth Edition*, © 1996 Merck & Co. Inc.

A szakterületen ismert kemoterápiás szereknek egy még további csoportját az anti-microtubulus hatóanyagok képezik. Az anti-microtubulus hatóanyagok egyik példájaként a taxánok körébe tartozó paklitaxel említhető. A taxánok rendkívül sokféle típusú tumorra szemben hatásosak. Anti-microtubulus hatóanyagokat ismertetnek, ezen belül a paklitaxelt leírják a következő helyen: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy, second edition*, edited by Bruce A. Chabner and Dan L. Longo, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia © 1996, pp. 263-296. A paklitaxelt 7117-es sorszám alatt ismertetik a következő kézikönyvben: *The Merck Index, Twelfth Edition*, © 1996 Merck & Co. Inc.

A jelen találmány potenciátoroknak, például a fentiekben ismertetett IL-18 polipeptideknek, és a szakterületen ismert kemoterápiás szereknek, például a fentiekben részletezett kemoterápiás szerek egyikének a kombinációira vonatkozik.

A találmánynak egy további tárgyát olyan gyógyszerkészítmények képezik, amelyek egy fentiekben ismertetett kemoterápiás szerrel alkotott kombinációban egy potenciátort tartalmaznak terápiásan hatásos mennyiségben. A gyógyszerkészítményekben gyógyászatilag elfogadható hordozókat vagy vivőanyagokat is alkalmazhatunk. A gyógyszerkészítményekben alkalmazott gyógyászatilag elfogadható hordozók szilárd vagy folyékony halmazállapotúak lehetnek. A szilárd hordozók példái közé tartoznak — egyebek mellett — a következők: laktóz, gipsz, szacharóz, tal-



kum, zselatin, agar, pektin, akácmázga, magnézium-sztearát, sztearinsav stb. A folyékony hordozók példái közé tartoznak — egyebek mellett — a következők: fiziológiás sóoldat (nátrium-klorid-oldat; szalin), pufferelt fiziológiás sóoldat, dextróz-oldat, víz, glicerin, etanol, szirup, mogyoróolaj, olívaolaj és az előbbieket kombinációi. A hordozó vagy a hígító a szakterületen ismert időkésleltető anyagot is tartalmazhat, amilyenek — egyebek mellett — például a következők: gliceril-monosztearát vagy gliceril-disztearát önmagában vagy egy visszal kombinálva, etil-cellulóz, (hidroxi-propil)-metil-cellulóz, metil-metakrilát stb.

A találmány kiterjed az olyan gyógyszer-csomagokra és készletekre (kit) is, amelyek a fentiekben ismertetett találmány szerinti kompozíciók összetevői közül eggyel vagy többel töltött egy vagy több tárolóedényt tartalmaznak. A polipeptidek és kemoterápiás szerek kombinációját alkalmazhatjuk önmagukban vagy más vegyületekkel, például terápiás vegyületekkel együtt.

A kompozíciókat a beadási módnak, például szisztémás vagy orális beadásnak megfelelő formában állítjuk elő. A szisztémás beadás előnyös formái közé tartozik az injekcióval, jellemzően intravénás injekcióval történő beadás. Más injekciós beadást, például szubkután, intramuszkuláris vagy intraperitonealis injekcióval történő beadást is alkalmazhatunk. Ezenkívül, ha a polipeptid és a kemoterápiás szerek kombinációját entericus vagy kapszulázott készítménnyé formáljuk, orális beadásra is lehetőség nyílik. A szisztémás beadás alternatív formái közé tartozik a penetránsok, például epesavsók vagy fuzidinsavak



(fusidic acids), illetve más detergenssek alkalmazásával végzett nyálkahártyán keresztül történő és transdermalis beadás. Az említett kombinációk beadását kenőcsök, paszták, gélek stb. formájában topikálisan és/vagy lokalizáltan is elvégezhetjük.

A kompozíció szükséges dózistartománya függ a potenciátor és a kemoterápiás szer kiválasztásától, a beadás módjától, a készítmény jellegétől, az alany állapotának jellegétől, valamint a gyakorló orvos megítélésétől. A kompozíció alkalmas dózissai IL-18 esetén az alany 1 testtömeg-kilogrammja vonatkoztatva 1 nanogrammtól 1 milligrammig terjednek, míg a kemoterápiás szer esetén a dózis az egyedi kemoterápiás szer klinikailag elfogadott dózisának 1/10-től a az egyedi kemoterápiás szer klinikailag elfogadott dózisának 10-szereséig terjed. Az alkalmazható vegyületek sokféleségének és a különféle beadási módok eltérő hatékonyságának az ismeretében azonban várható, hogy a szükséges dózisok rendkívül eltérőek lehetnek. Például előre látható, hogy transdermalis beadás esetén nagyobb dózisokra van szükség, mint intravénás injekcióval végzett beadás esetén. Az említett dózismennyiségek eltéréseit az optimalizálásra szolgáló, a szakterületen jól ismert standard kísérletekkel állíthatjuk be.

A kompozíciók beadásának ütemezése függ a dózis nagyságától, a potenciátor és a kemoterápiás szer megválasztásától, a beadás módjától, a készítmény jellegétől, az alany állapotának a jellegétől, valamint a kezelést végző orvos megítélésétől. A beadást például alkalmasan napi 1-3 dózistól heti egy dózissig terjedő gyakorisággal hajthatjuk végre. Az alkalmazható vegyü-



letek sokféleségének és a különféle beadási módok eltérő hatékonyságának az ismeretében azonban várható, hogy a szükséges dózis és/vagy a szükséges beadási gyakoriság az egyes esetekben rendkívül eltérő lehet. Például előre látható, hogy transzdermalis beadás esetén nagyobb dózisokra van szükség, mint intravénás injekcióval végzett beadás esetén. Az említett dózismennyiségek eltéréseit az optimalizálásra szolgáló, a szakterületen jól ismert standard kísérletekkel állíthatjuk be.

Véleményünk szerint az előbbi kitanítás ismeretében az ezen a területen jártas szakember teljes terjedelmében meg tudja valósítani a találmányt. Az alábbi példák csupán illusztratív jellegűek, a találmány oltalmi körét, illetve terjedelmét nem korlátozzák.

I. (A) PÉLDA

Tumornövekedés-csökkenés Lewis-tüdőkarcinóma modellben

Kísérleti protokoll

Ebben a kísérletben, amely annak kimutatására szolgált, hogy a topotekanból és IL-18-ból álló kombinációnak milyen hatása van az előrehaladott szolid tumor modellben (nagyértékben metasztatikus Lewis-tüdőkarcinóma), B6D2F₁ nőtény egereket intravénásan 10^5 Lewis-tüdőkarcinóma sejttel inokuláltunk, majd a 7. napon az egereket véletlenszerűen 14-es kezelési csoportokba osztottuk. A kezelést a 7. napig késleltettük, amikor a tumorok már kialakultak és növekedtek a tüdőben. A pulmonalis tumornövekedés kezelési hatékonyságának a meghatározásához az egerek felét minden egyes csoportban leöltük a 16. napon, a

többi egeret pedig tovább kezeltük, és a túlélésre nézve folyamatosan megfigyeltük az állatokat [lásd: I.(B) példa]. A topotekan intraperitonealis q4Dx7 beadását a 7. napon kezdtük és a 32. napon fejeztük be (a feltüntetett dózisokat mg/kg egységben adtuk meg). A rágcsáló (murine) IL-18 intraperitonealis UID beadását a 7. napon kezdtük és a 32. napon fejeztük be (a feltüntetett dózisokat $\mu\text{g}/\text{egér}$ egységben adtuk meg). A három csoportba osztott kontroll állatok mindegyike elpusztult a 17. és a 30. nap között. A túlélésre nézve 61 napon át folytattuk az állatok megfigyelését. (Lásd az 1. és 2. ábrát, valamint az 1. táblázatot).

Eredmények

A kontroll csoportban a 16. napon egy igen nagy, átlagosan 350 mg tömegű tüdőtumornak megfelelő tumorterhelés volt megfigyelhető (lásd: 1. és 2. ábra). A tüdőben lévő, megkülönböztethető makroszkopikus tumorok száma 80-nál nagyobb volt (lásd: 2. ábra).

Az IL-18 önmagában szignifikáns mértékben, de egyértelmű dózis/válasz nélkül csökkentette a tüdőtumorok tömegét és a gócok számát. Önmagában az IL-18-nak a hatása csak mérsékelt volt, és a citokint kapott állatok átlagos túlélési ideje nem növekedett. A topotekannak egy MTD-je, azaz maximális tolerálható dózisa (15 mg/kg, q4D program) 90 %-nál nagyobb mértékben szuppresszálta a tumornövekedést, de az egerekben átlagosan még mindig 45 pulmonalis tumor góc fordult elő. Az IL-18 beadása hasonlóan erős tumornövekedés-gátlást eredményezett. Egyértelmű volt azonban a kombináció előnye a topotekan szuboptimális dó-

zisa (9 mg/kg, q4D program) mellett. (Lásd: 1. és 2. ábra).

I.(B) PÉLDA

Túlélés a Lewis-tüdőkarcinóma modellben

Kísérleti protokoll

Lásd az I.(A) példa szerinti protokollt.

Eredmények

Amint az az alábbi 1. táblázatban látható, előrehaladott szisztémás Lewis-tüdőkarcinómát hordozó egerekben topotekannal kombinált IL-18-cal végzett kísérletek túlélési adatai megerősítik az IL-18-nak a tumormérések során megfigyelt aktivitását. A vártnak megfelelően az önmagában alkalmazott IL-18 nem befolyásolta a túlélési időt. A topotekan önmagában az MTD-jénél 68 %-kal, míg az MTD 0,6-énél 63 %-kal hosszabbította meg az élettartamot. A 0,5 mg/kg IL-18 + MTD (15 mg/kg) topotekan kombináció 145 %-kal növelte meg az élettartamot; a topotekan szuboptimális dózisát (9 mg/kg) az IL-18 0,5 mg/kg dóziséval kombinálva 82 %-os élettartam-növekedést értünk el.

1. TÁBLÁZAT

Kezelés	Dózismennyiség	Átlagos túlélési idő (nap)	Élettartam-növekedés (%)
Kontroll	-	22	-
IL-18	10	24	9
	3	23	4
	1	22,5	2
	0,3	22	0
Topotekan	15	37	68
Topotekan + IL-18	15 + 10	54	145
	15 + 3	32	45
	15 + 1	47	114
	15 + 0,3	41	86
Topotekan	9,0	36	63
Topotekan + IL-18	9,0 + 10	40	82
	9,0 + 3	38	73
	9,0 + 1	35	59
	9,0 + 0,3	28	27

A topotekan intraperitonealis q4Dx7 beadását a 7. napon kezdtük és a 32. napon fejeztük be (a feltüntetett dózisokat mg/kg egységben adtuk meg).

A rágcsáló (murine) IL-18 intraperitonealis UID beadását a 7. napon kezdtük és a 32. napon fejeztük be (a feltüntetett dózisokat µg/egér egységben adtuk meg).

II. (A) PÉLDA

Tumornövekedés-csökkenés Lewis-tüdőkarcinóma modellben

Kísérleti protokoll

Egy további kísérletet végeztünk annak bizonyítására, hogy a topotekanból és IL-18-ból álló kombinációnak jelentős hatása van az előrehaladott szisztémás Lewis-tüdőkarcinóma modellben. B6D2F₁ nőstény egereket (22-24 gramm) intravénásan 10^5 Lewis-tüdőkarcinóma sejttel inokuláltunk, majd a 7. napon az egereket véletlenszerűen 12-14 állatból álló kezelési csoportokba osztottuk. A kezelésnek a pulmonalis tumornövekedésre, ezen belül a tumortömegre és a gócszámra gyakorolt hatásának a meghatározásához az egerek felét minden egyes csoportban leöltük a 14. napon. A többi egeret tovább kezeltük, és a túlélésre nézve folyamatosan megfigyeltük az állatokat. A topotekan intraperitonealis q4Dx6 beadását a 7., 11., 15., 19., 23. és 29. napon hajtottuk végre (a feltüntetett dózisokat mg/kg egységben adtuk meg). A rágcsáló (murine) IL-18 intraperitonealis qDx26 beadását a 7. napon kezdtük és a 33. napon fejeztük be (a feltüntetett dózisokat µg/egér egységben adtuk meg). A három csoportba osztott kontroll állatok mindegyike elpusztult a 14. és a 28. nap között. (Lásd a 3. és 4. ábrát, valamint a 2. táblázatot).

Eredmények

A topotekan MTD-je jól csökkentette a tumortömeget és a gócszámot, míg a topotekan kisebb dózisa mindkét paraméterre csekélyebb hatást fejtett ki. A kombináció nagyobb mértékben csökkentette a tumorterhelést, mint amekkora csökkenést önmagában a topotekannal értünk el. Ez inkább a tumortömeg esetén

volt teljesen egyértelmű, míg a gócszám esetén az IL-18 kisebb dózisainak nagyobb hatásuk volt. Ez megerősíti a Lewis-tüdőkarcinóma esetén a kombinációval végzett kezdeti vizsgálatokban kapott pozitív eredményt. (Lásd a 3. és 4. ábrát).

II.(B) PÉLDA

Túlélés a Lewis-tüdőkarcinóma modellben

Kísérleti protokoll

Lásd a II.(A) példa szerinti protokollt.

Eredmények

A kísérleti állatok túlélő felével nyert eredményeket az alábbi 2. táblázatban összegezzük. A topotekan MTD-jénél szignifikáns mértékben meghosszabbodott a túlélési idő azoknak az egereknek az esetében, amelyek IL-18-at is kaptak. A topotekan szuboptimális dózisa mellett az IL-18 legnagyobb dózisait kapott egerek esetében kétszeresére nőtt az élettartam.

2. TÁBLÁZAT

Kezelés	Dózis- -mennyiség*	n	Átlagos túlélési idő (nap)	Élettartam- -növekedés (%)
Tumor kontroll		18	18	
IL-18	100	6	22	22
	30	6	18,5	3
	10	6	18	0
	3	6	18	0
	1	6	20	11
Topotekan	15	6	33,5	86
Topotekan + IL-18	15 + 100	7	43	139
	15 + 30	7	42	133
	15 + 10	7	41	128
	15 + 2	7	42	133
	15 + 1	6	38	111
Topotekan	9	6	25,5	42
Topotekan + IL-18	9 + 100	7	34	89
	9 + 30	7	30	67
	9 + 10	7	27	50
	9 + 3	7	30	67
	9 + 1	7	29	61

A topotekan intraperitonealis q4Dx6 beadását a 7., 11., 15., 19., 23. és 29. napon hajtottuk végre (a feltüntetett dózisokat mg/kg egységben adtuk meg).

A rágcsáló (murine) IL-18 intraperitonealis qDx26 beadását a 7. napon kezdtük és a 33. napon fejeztük be (a feltüntetett dózisokat µg/egér egységben adtuk meg).

III. PÉLDA

MOPC-315 plasmacytoma

Kísérleti protokoll

Az MOPC-315 plasmacytoma analóg a myeloma multiplex néven ismert humán rákkal. Ez a tumor az antitest-expresszióban szerepet játszó B-limfocita érett formájának megfelelő plazmasejtek rosszindulatú betegsége. Az MOPC-315 syngeneticus BALB/c egerekben gyorsan nagyon nagy méretűvé növekszik. Nem nagyon metasztatikus vagy invazív.

Az IL-18-at kialakult szubkután MOPC-315 plasmacytomában értékeltük. Az immunterápia hatásának a jobb észlelhetősége érdekében az IL-18-at egy hatásos kemoterápiás szerrel kombinálva, valamint monoterápiás alkalmazásban értékeltük. Az IL-18-at 0,3, 1, 3 és 10 µg/egér napi mennyiségben intraperitonealis úton adtuk be, míg a topotekant 9 és 15 mg/kg dózisban egy q4D program szerint ugyancsak intraperitonealisan adtuk be. Mindkét hatóanyag beadását az implantáció utáni 11. napon kezdtük el, amikor a közepes tumorméret 32 mg és 88 mg közötti értékű volt. A kontroll tumorok 17,2 nap alatt érték el az 1 grammos tömeget (lásd: 5-7. ábra).

Eredmények

Az önmagában IL-18-cal végzett kezelés a kísérletben értékelt dózisok mellett csak minimális hatást gyakorolt a kialakult tumorok tumornövekedésére. A tumornövekedés 1,3-3,1 nappal eltolódott (lásd az 5. ábrát). A topotekan önmagában az MTD-jénél 1/7 teljes regressziót eredményezett és körülbelül 12 nappal késleltette a tumornövekedést. Az topotekan MTD-jének és

az IL-18 10, 3 vagy 1 $\mu\text{g}/\text{egér}/\text{nap}$ dózisainak a kombinációja lényegesen hatásosabb volt, mint önmagában a topotekan: a kombinációval a teljes regresszió 5/7-e, valamint tartós regresszió volt elérhető. Megjegyzendő, hogy a regresszió előtt a tumorok egészen nagy méretűvé nőttek. Említésre érdemes továbbá, hogy a kezelés megszakítás után a tumorok vissza nőttek, és a további terápia nélkül ismét regresszázódtak, ami egy immunmediált válaszra utal. (Lásd a 6. ábrát).

Az IL-18 a topotekannak egy szuboptimális dóziséval is fokozott és nemvárt eredményeket nyújtott. A topotekan 9 mg/kg dózisban csak csekély hatást, illetve semmilyen hatást sem gyakorol a tumornövekedésre, és csak egy négynapos tumornövekedés-késletetést eredményez. Az IL-18 nagy dóziséval 7 egérből 5 esetén teljes regressziót, míg egynél részleges regressziót tapasztaltunk. Az egerek közül kettőnek a tartós regressziója még a 94. napon is egyértelmű volt. (Lásd a 7. ábrát).

IV. PÉLDA

MOPC-315 plasmacytoma

Kísérleti protokoll

A topotekannal kombinált IL-18-nak az előrehaladott MOPC-315 plasmacytomát hordozó egerekben kifejtett aktivitását egy nagyobb kísérletben is bizonyítottuk, amelyben az IL-18-at nagyobb dózisokban alkalmaztuk. Ebben a kísérletben a topotekan q4Dx6 program szerinti beadását a 10. napon kezdtük, és ugyan ezen a napon kezdtük meg az IL-18 qDx30 program szerinti beadását is. Mindkét hatóanyagot intraperitonealis úton adtuk be, és

az aktivitást tumormérésekkel értékeltük.

Eredmények

A korábbi kísérletben, amelyben az IL-18-at 10 µg/egér/nap legnagyobb dózisban adtuk be, az IL-18 önmagában nem gyakorolt hatást a tumornövekedésre. Azonban az ellenőrző kísérletben, amelyekben az IL-18-at nagyobb dózisokban, nevezetesen 100 és 30 µg/egér/nap dózisban alkalmaztuk, a legnagyobb dózis önmagában is hatásosnak bizonyult. A legnagyobb dózis késleltetett tumor regressziót indukált, ahol a 6-ból 4 esetben teljes regressziót értünk el. Az IL-18 kisebb dózisaik hatástalanok voltak. (Lásd a 8. ábrát).

Megerősítést nyert, hogy az IL-18-nak a topotekan MTD-jével alkotott kombinációja igen hatékony (lásd a 9. ábrát). A topotekan önmagában elég hatásos. Hatból két esetben teljes regressziót eredményezett és megnyújtotta a tumornövekedés gátlását. A topotekan beadásának a 33. napon történt megszakítása után azonban egyértelmű volt a visszanövekedés. Az IL-18 három legnagyobb dózisánál gyakorlatilag a kezelt egerek mindegyikénél gyors, teljes és hosszan tartó regressziót tapasztaltunk. Ezek a válaszok az IL-18 olyan dózisainál fordultak elő, amelyek az önmagukban történő felhasználás esetén hatástalanok voltak. (Lásd a 9. ábrát).

A topotekan szuboptimális dózisa ténylegesen semmilyen hatást nem gyakorolt az előrehaladott tumorra, míg az IL-18 kombináció három legnagyobb dózisánál lényegében minden állatban teljes regressziót figyeltünk meg. (Lásd a 10. ábrát).

V. PÉLDA

MOPC-316 plasmacytoma

(az beadás ütemezésének és módjának a vizsgálata)

Kísérleti protokoll

A kemotrapiával kombinált IL-18 értékelését megismételtük annak érdekében, hogy megállapítsuk: (a) mennyire hatásos az IL-18 a tumor modellekben, ha szubkután adjuk be, és (b) aktív-e az IL-18, ha időszakos program szerint adjuk be, vagy pedig naponként kezelésre van szükség. A kísérletet ismét topotekannal végeztük az előrehaladott MOPC-315 plasmacytoma modellben, ahol a kezelést a 10. napon kezdtük el, amikor a tumorok térfogata körülbelül 100 mm^3 volt. A topotekan MTD-jét (15 mg/kg) egy q4D programnak megfelelően, az IL-18-at pedig széles dózistartományban, intraperitonealisan vagy szubkután egy q1D vagy egy q4D programnak megfelelően adtuk be. A kísérletben a kombinációval nem észleltünk nagyobb toxicitást, mint a korábbi vizsgálatokban; súlyos tömegvesztés miatt két alkalmazás után a topotekan beadását leállítottuk, az IL-18 beadását azonban folytattuk. (Lásd a 11-13. ábrát).

Eredmények

Az IL-18 $100 \mu\text{g}/\text{nap}$ dózisban önmagában is aktív volt a q1D program során, ami alátámasztja a korábbi kísérlet eredményeit. Az intraperitonealis és a szubkután beadás egyaránt hatásos volt, bár az intraperitonealis beadás hatásosabbnak bizonyult. (Lásd a 11. ábrát). Amint az a 13. ábrán látható, az IL-18 1000 vagy $100 \mu\text{g}/\text{dózis}$ mennyiségben történő időszakos beadása nem váltott ki regressziót, amikor a citokint önmagában alkalmaz-

tuk.

A naponként beadott, topotekannal kombinált IL-18 aktivitását ismét igazoltuk, és az aktivitás azonos mértékű volt, ha az IL-18-at szubkután vagy intraperitonealis úton adtuk be. A fokozott hatás eléréséhez bármelyik beadási mód esetén 10 µg/nap vagy ennél nagyobb dózissal volt szükség. (Lásd a 12. ábrát).

Az IL-18 időszakos program szerinti beadása csak kemoterápiával kombinálva bizonyult hatásosnak. A q4D programban ugyanúgy a 10 vagy 100 µg/egér/dózis volt hatásos, mint a q1D program esetén. (Lásd a 13. ábrát).

VI. PÉLDA

B16 melanoma

Kísérleti protokoll

Ebben a kísérletben egy előrehaladott syngeneticus tumor modellben az IL-18-at önmagában és kemoterápiával kombinálva értékeltük. Előrehaladott szubkután B16F10 melanomát hordozó egereket önmagában IL-18-cal, illetve ciklofoszfamiddal vagy topotekannal kombinált IL-18-cal kezeltünk. A kezelést az implantáció utáni 11. napon kezdtük el. A vivőanyaggal kezelt kontroll állatok esetén az átlagos túlélési idő 20 nap volt.

Eredmények

Az önmagában IL-18-cal végzett kezelés nem volt hatással a tumornövekedésre és csak minimális hatást gyakorolt a túlélési időre ($\leq 30\%$ ILS), bár meg kell említeni, hogy az IL-18-at nem teszteltük abban a nagy dózisban, ami a plasmacytoma modellben

önmagában is aktívnak bizonyult. (Lásd a 14. ábrát). A ciklofoszfamid MTD-jénél a q7D program szerint 300 mg/kg dózist alkalmazva a túlélés 95 %-kal növekedett, míg a tumornövekedés-késleltetés 14 napos volt. (Lásd a 15. ábrát). A topotekan az MTD-jénél hatástalannak bizonyult. (Lásd a 16. ábrát).

Az IL-18-nak a ciklofoszfamid MTD-jével alkotott kombinációja minimális és dóziszfüggetlen hatást gyakorolt a tumorelles aktivitásra. A ciklofoszfamiddal kombinált IL-18 legkisebb dózisa 110 %-kal növelte meg az élettartamot, és további 3 nappal növelte a tumornövekedés-késleltetést. Nagyobb IL-18 dózisú kombinációk nem tértek el az önmagában alkalmazott ciklofoszfamidtól. (Lásd a 15. ábrát).

A metasztatikus tumor modell esetén a B16F10 növekedésének késleltetésében vagy az élettartam meghosszabbításában a topotekan MTD-je IL-18-cal kombinálva nem eredményez nagyobb hatást, mint önmagában a topotekan. (Lásd a 16. ábrát). Megjegyzendő, hogy a B16F10 melanoma egy erőteljes tumor modell, ami csak gyengén reagál a jelenleg elérhető terápiás megoldásokra.

VII. PÉLDA

B16 melanoma

Kísérleti protokoll

Ismételt kísérletet végeztünk annak meghatározására, hogy a ciklofoszfamiddal kombinált IL-18 mennyire hatásos a B16 melanoma tumor modellben. A szövettényészettől nyert B16F10 alvonalat szubkután implantáltuk, majd a kezelés előtt 100 mm^3 átlagos méretig hagytuk növekedni. A kísérletben azt tekintet-

tük tumornövekedés-késleltetésnek, ha a 14. napig a tumor nem ért el 100 mm^3 átlagos méretet; a tumorméretben igen nagy eltérések is előfordultak, mivel több állatnál rendkívül nagy volt a tumor mérete a kezelés kezdetekor.

Eredmények

Sem az IL-18-cal, sem a ciklofoszfamiddal, sem pedig a kettő kombinációjával végzett kezelésnél nem fordult elő regresszió. Az IL-18 önmagában egy minimális, körülbelül kétnapos tumornövekedés-késleltetést eredményezett. A ciklofoszfamid MTD-je 14 nappal késleltette a tumornövekedést, és az IL-18 hozzáadása nem gyakorolt lényeges hatást erre az aktivitásra. A kombinációban alkalmazott IL-18 legnagyobb dózisa esetén látványosan csökkentő hatást észleltünk, de ez egyedül annak volt a következménye, hogy a terápia kezdetekor ebben a csoportban lényegesen nagyobbak voltak a tumorok. Viszont a ciklofoszfamid szuboptimális (180 mg/kg) dózisánál, ami a tumornövekedést csak 4 nappal késleltette, a kombinációval pozitív hatást értünk el, ahol a tumornövekedés késleltetése körülbelül 10 és 15 napra növekedett, kivéve azt a kombinációs csoportot, amely a terápia kezdetekor a legnagyobb tumorokat hordozta. (Lásd a 17-19. ábrát).

VIII. PÉLDA

Madison 109 tüdőkarcinóma

Kísérleti protokoll

Kísérletet végeztünk annak a meghatározására, hogy a paklitaxellel kombinált IL-18 mennyire hatásos a Madison 109 tüdő-

tumor modellben. Ez a tumor modell a leginkább paklitaxel-szenzitív syngeneticus rágcsáló tumor, ennek ellenére csak mérsékelten reagál a hatóanyagra. A tumort szubkután implantáltuk, majd a kezelés előtt 126-326 mm³ átlagos méretig hagytuk növekedni. A tumorméretben igen nagy eltérések is előfordultak, mivel több állatnál rendkívül nagy volt a tumor mérete a kezelés kezdetekor. A paklitaxelt 12, 24 és 48 mg/kg dózisban egy qDx5 programnak megfelelően (9-13. nap) intravénásan adtuk be. Az IL-18-at egerenként 1, 10 és 100 µg mennyiségben, szubkután, egy qDx21 programnak megfelelően adtuk be.

Eredmények

A paklitaxel önmagában és kombinációban 48 mg/kg dózis esetén toxikus volt, és a jelentős tömegvesztés alapján 24 mg/kg dózis esetén is közel toxikus volt. Ilyen paklitaxel dózis mellett az IL-18 nagyobb dózisainak a beadása az állatok korai elpusztulását okozta. Önmagában az IL-18 — a korábbi kísérletekhez hasonlóan — jól tolerálható volt. (Lásd a 20. ábrát és a 3. táblázatot).

Sem az önmagában, sem a kombinációban történő alkalmazáskor nem észleltünk regressziót. A paklitaxel önmagában minimális tumornövekedés-késleltetést és minimális túlélési idő növekedést eredményezett. A kombinációval végzett kezelés sem okozott jelentős javulást a hatékonyságban, azonban 12 mg/kg paklitaxel dózis esetén az IL-18 kisebb dózisaival alkotott kombinációk növelték a tumornövekedés-késleltetést. Az IL-18 önmagában kis dózisban 77 %-kal megnövelte az élettartamot, de a tumornövekedést nem késleltette. Ugyanígy élettartamnövekedést

tapasztaltunk az IL-18 azonos dózisának a paklitaxellel alkotott kombinációja esetén is. (Lásd a 20. ábrát és a 3. táblázatot).

3. TÁBLÁZAT

IL-18 γ g, sc	Paklitaxel mg/kg, iv			
	0	12	24	48
0		T-C 3,5 nap NT 27 % ILS	T-C 9,7 nap -4,7 g 35 % ILS	toxikus
1	T-C 1,7 nap NT 77 % ILS	T-C 9,9 nap -3,7 g 77 % ILS	T-C 9,7 nap -5,6 g 77 % ILS	toxikus
1	T-C 1,7 nap NT 77 % ILS	T-C 9,9 nap -3,7 g 77 % ILS	T-C 9,7 nap -5,6 g 77 % ILS	toxikus
100	T-C 2,8 nap NT 0 % ILS	T-C 3,3 nap -3,5 g 46 % ILS	toxikus	toxikus

T-C: tumornövekedés-késleltetés

NT: nem toxikus, 3 grammnál kisebb testtömeg-csökkenés

IX. PÉLDA

EMLŐ-ADENOKARCINÓMA 16/C

Kísérleti protokoll

Kísérletet végeztünk annak a meghatározására, hogy az IL-18 önmagában és a doxorubicinnel kombinált IL-18 mennyire hatásos a 16/c emlő-adenokarcinóma tumor modellben. A 16/c vonalat szubkután (1:1 brei) implantáltuk, majd a kezelés előtt 52-109 mm³ átlagos méretig hagytuk növekedni. A doxorubicint 7,2, 12 és 20 mg/kg dózisban a 12. és a 19. napon intravénásan adtuk be. Az IL-18-at a 12. napon kezdve, 1, 10 és 100 µg/egér mennyiségben, egy qDx21 program szerint adtuk be szubkután úton. A vizsgálat célja a tumornövekedés-késleltetés és a regresszió értékelése volt.

Eredmények

Sem az IL-18, sem a doxorubicin, sem önmagában, sem kombinációban alkalmazva nem okozott regressziót. Amint az a 4. táblázatban látható, az IL-18 jelentős mértékben fokozta a doxorubicin toxicitását. A doxorubicin MTD-je 20 mg/kg volt. Ez a dózis még abban az esetben is toxikus volt, amikor 1 µg IL-18-cal kombináltuk. Az MTD 1/3-ának megfelelő dózisban alkalmazott doxorubicin, ami nem okozott tömegvesztést és csak alig volt hatékony, illetve hatástalan volt, 10 vagy 100 µg IL-18-cal toxikus volt.

4. TÁBLÁZAT

IL-18 µg/egér, ip	Doxorubicin mg/kg, iv			
	0	7,2	12	20
0		nem toxikus	nem toxikus	nem toxikus
1	nem toxikus	nem toxikus (1/6)	toxikus (4/6)	toxikus (4/6)
10	nem toxikus	toxikus (6/6)	toxikus (5/6)	toxikus (6/6)
100	nem toxikus	toxikus (6/6)	toxikus (5/6)	toxikus (6/6)

(toxikus halál)

A toxicitás miatt a kombinációnak a tumorellenes aktivitásra vonatkozó hatását nem tudtuk meghatározni. A doxorubicin dóziszfüggő tumornövekedés-késleltetést eredményezett. (Lásd a 21. ábrát). Az IL-18 önmagában minimális, egy hétnél rövidebb tumornövekedés-késleltetést váltott ki, ahol az értékelt 100-szoros dózistartományban nem volt dózis/válasz. (Lásd a 22. ábrát). Mindkét hatóanyag legkisebb dózisainál csak a kombináció dózisa volt tolerálható, amelynél a doxorubicin tumorellenes hatása nem fokozódott. (Lásd a 23. ábrát).



A SZEKVENCIÁK ISMERTETÉSE

<110> Johnson, Randall K

<120> NOVEL COMPOUNDS

<130> P50777

<140> Unknown

<141>

<150> 60/086,560

<151> 1999-05-21

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 157

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1				5					10					15		
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
			20					25					30			
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
		35					40					45				
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
	50					55					60					
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile	
65					70					75				80		
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
			85						90					95		
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
			100						105					110		
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
			115				120						125			



Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 2

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
 20 25 30

Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
 35 40 45

Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
 50 55 60

Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
 65 70 75 80

Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
 85 90 95

Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
 100 105 110

Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
 115 120 125

Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
 130 135 140

Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
 145 150 155

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy kemoterápiás szerrel kombinált olyan polipeptid, amely az 1. számú szekvencia (SEQ ID NO:1) teljes hosszában legalább 70 %-ban azonos az 1. számú szekvenciának (SEQ ID NO:1) megfelelő aminosav-szekvenciával.

2. Egy kemoterápiás szerrel kombinált olyan polipeptid, amely a 2. számú szekvencia (SEQ ID NO:2) teljes hosszában legalább 70 %-ban azonos a 2. számú szekvenciának (SEQ ID NO:2) megfelelő aminosav-szekvenciával.

3. Egy kemoterápiás szerrel kombinált olyan polipeptid, amely legalább 70 %-ban azonos az 1. számú szekvenciának (SEQ ID NO:1) megfelelő aminosav-szekvenciával, ahol a kemoterápiás szer topotekan.

4. Egy kemoterápiás szerrel kombinált olyan polipeptid, amely legalább 70 %-ban azonos a 2. számú szekvenciának (SEQ ID NO:2) megfelelő aminosav-szekvenciával, ahol a kemoterápiás szer topotekan.

5. Gyógyszerkészítmény, amely gyógyászatilag elfogadható hordozó mellett az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet és kemoterápiás szert tartalmazza.

6. Eljárás az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti kompozíció előállítására, **azzal jellemezve**, hogy a polipeptidet a kemoterápiás szerrel kombináljuk, és az így nyert kompozíciót kinyerjük.

7. Eljárás rák kezelésére emlősökben, **azzal jellemezve**, hogy beadjuk az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti

polipeptidet és kemoterápiás szert tartalmazó kompozíció rákot gátló mennyiségét.

8. Eljárás rák kezelésére emlősökben, **azzal jellemezve**, hogy beadjuk az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet és kemoterápiás szert, valamint gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmazó kompozíció rákot gátló mennyiségét.

9. Eljárás rák megelőzésére emlősökben, **azzal jellemezve**, hogy beadjuk az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet és kemoterápiás szert tartalmazó kompozíció terápiásan hatásos mennyiségét.

10. Eljárás rák megelőzésére emlősökben, **azzal jellemezve**, hogy beadjuk az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet és kemoterápiás szert, valamint gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmazó kompozíció terápiásan hatásos mennyiségét.

11. Eljárás tumorsejtek növekedésének gátlására az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet és kemoterápiás szert tartalmazó kompozícióra szenzitív emlősökben, **azzal jellemezve**, hogy a tumorsejtek által érintett emlősöknek beadjuk a kompozíció hatásos, tumorsejt-növekedést gátló mennyiségét.


12. Eljárás tumorsejtek növekedésének gátlására az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet és kemoterápiás szert, valamint gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmazó kompozícióra szenzitív emlősökben, **azzal jellemezve**, hogy a tumorsejtek által érintett emlősöknek beadjuk a kompozí-

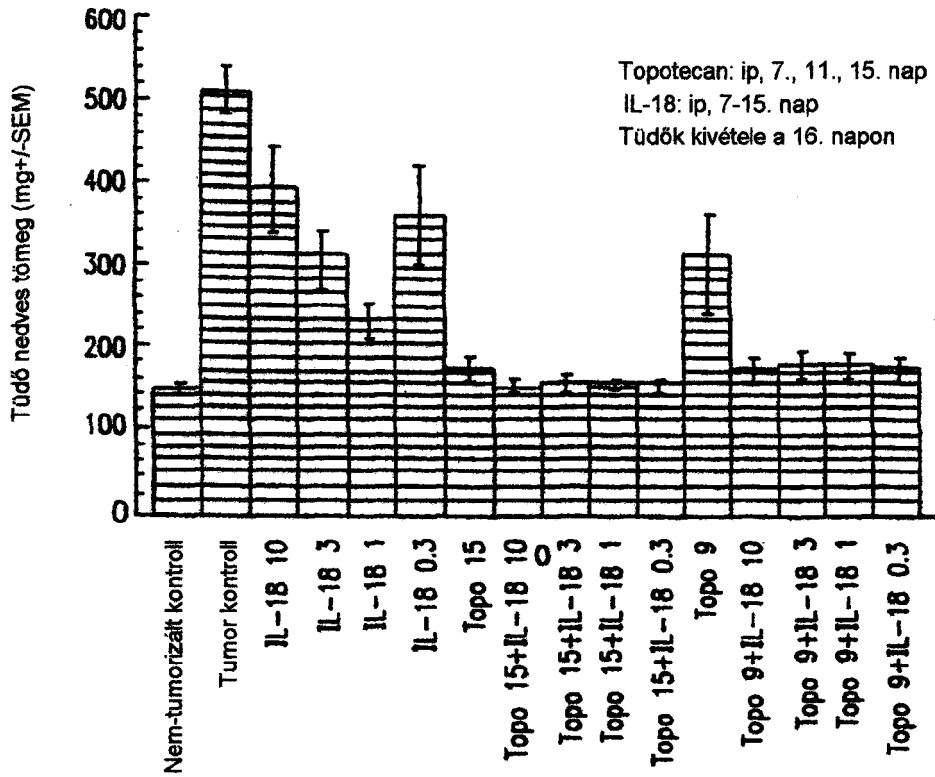
ció hatásos, tumorsejt-növekedést gátló mennyiségét.

A meghatalmazott:

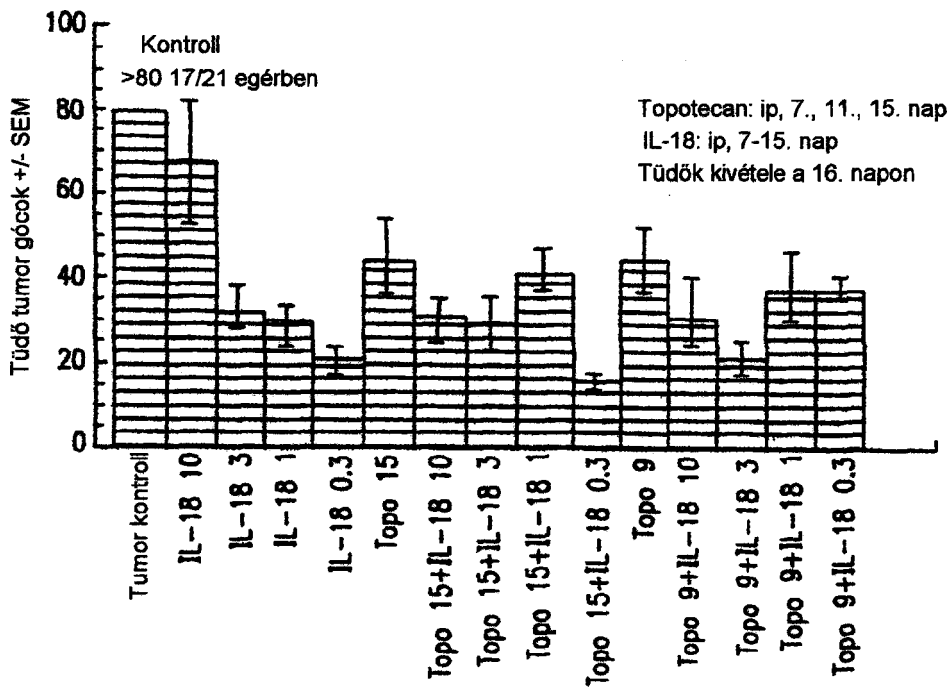
Dorzi Katalin
szelvényi ügyvivő
az S.B. és K. Nemzetközi
Szelvényi Iroda kft.
H-1062 Budapest, Andrássy út 113
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-32.

12 lap rajz

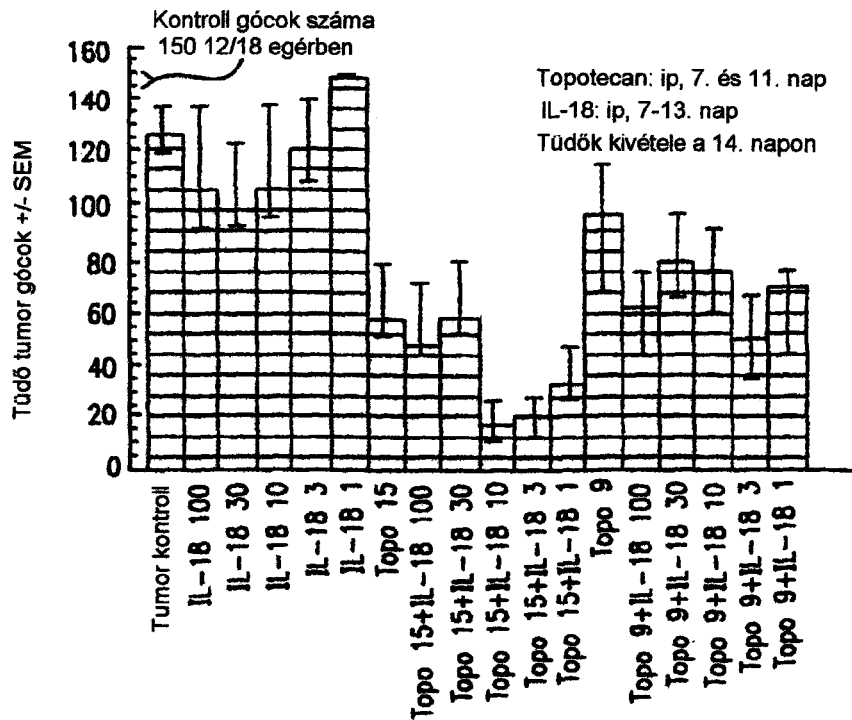

Dr. BOROS ISTVÁN



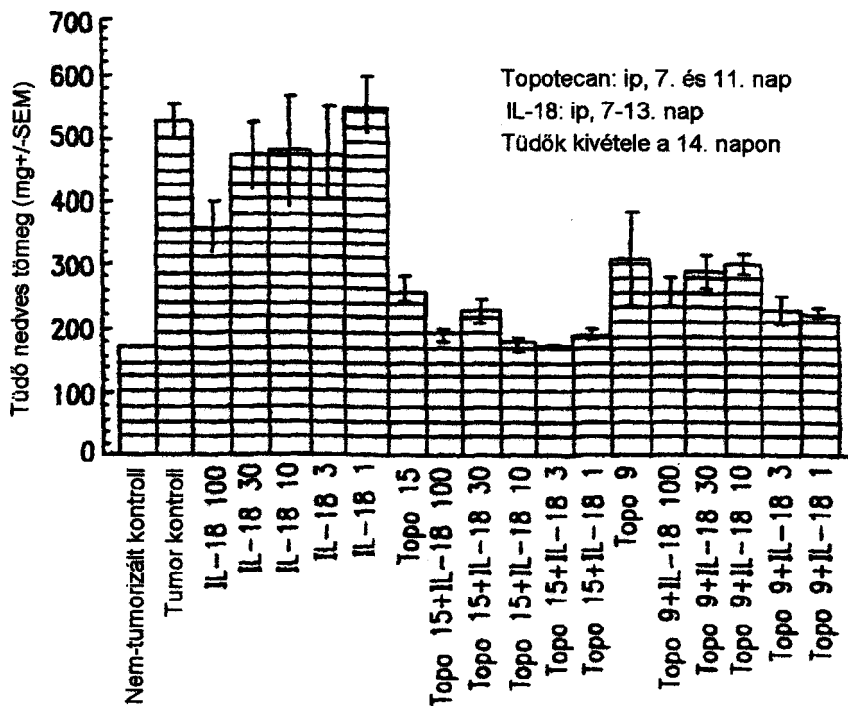
1. ÁBRA



2. ÁBRA



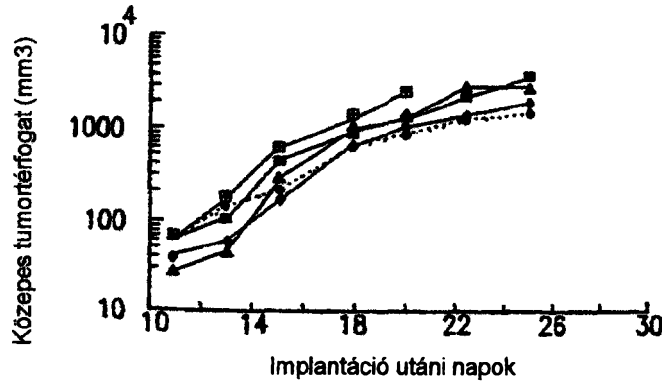
3. ÁBRA



4. ÁBRA

3/12

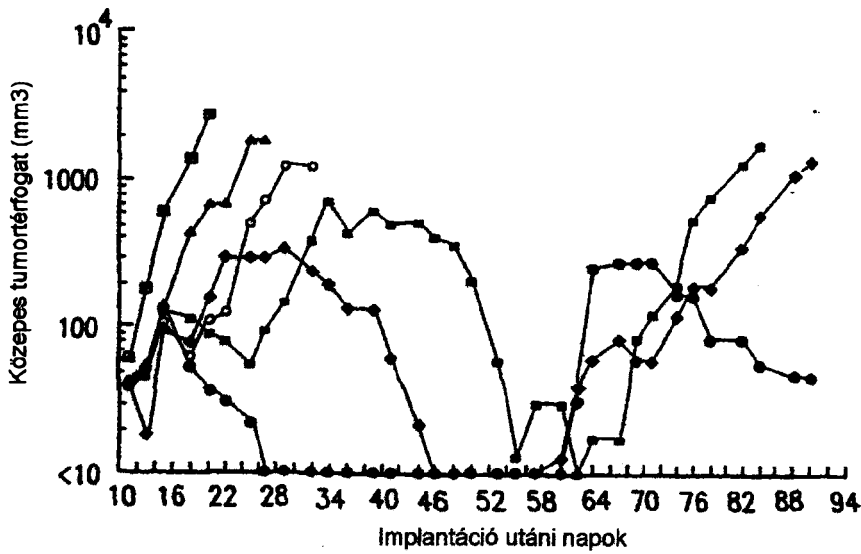
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



IL-18: ug/egér, ip, 11-15. és 18-22. nap

- IL-18 10ug
- IL-18 3 ug
- ◆ IL-18 1 ug
- ▲ IL-18 0.3ug
- Kontroll

5. ÁBRA



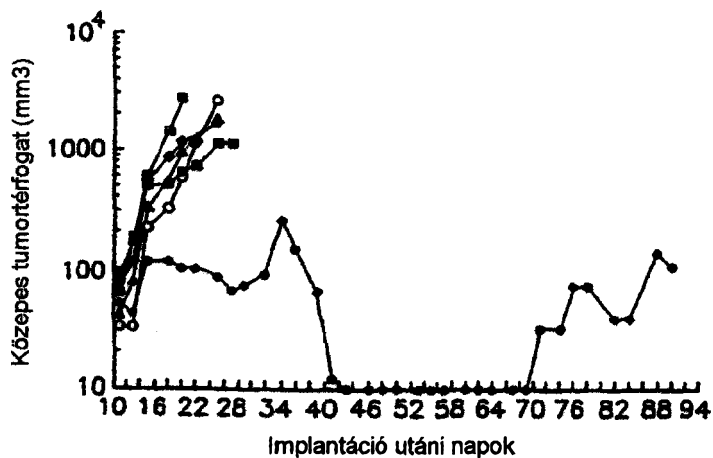
- Topotecan 15; 1 CR
- Kontroll
- Topo 15/ IL-18 10; 5 CR; 3/7 LTR
- ◆ Topo 15/ IL-18 3.0; 3 CR, 1PR 1/7 LTR
- ▲ Topo 15/ IL-18 1; 5CR; 2/7 LTR
- ▼ Topo 15/ IL-18 0.3

IL-18: ug/állat, ip, 11-15., 18-48. nap
 Topotecan: mg/kg, ip, 11., 15., 19., 24., 29., 34., 39., 44. nap
 CR = teljes regresszió, PR = részleges regresszió
 LTR = tartós regresszió (90 nap)

6. ÁBRA

4/12

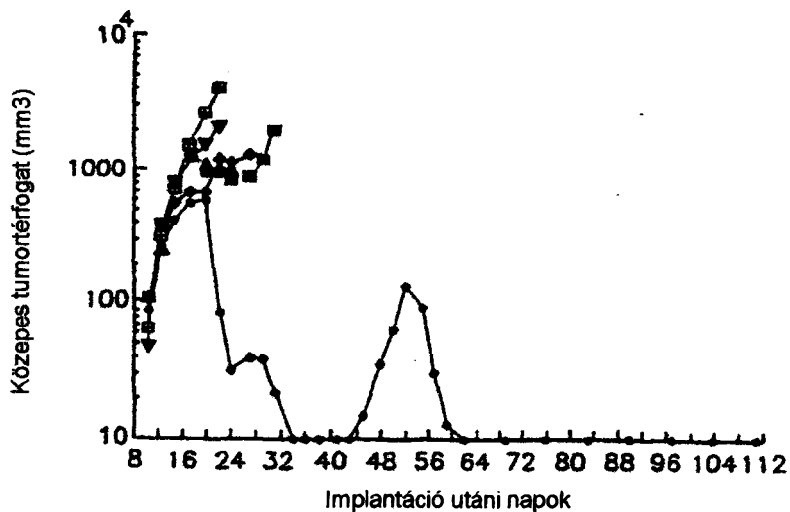
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



IL-18: ug/állat, ip, 11-15., 18-48. nap
 Topotecan: mg/kg, ip, 11., 15., 19., 23., 29., 34., 39., 44. nap
 CR = teljes regresszió, PR = részleges regresszió
 LTR = tartós regresszió (90 nap)

- Topotecan 9
- Kontroll
- ▲ Topo 9/IL-18 10; 5 CR, 1PR
2/7 LTR
- ◆ Topo 9/IL-18 3.0
- ◇ Topo 9/IL-18 1.0
- ▼ Topo 9/IL-18 0.3

7. ÁBRA



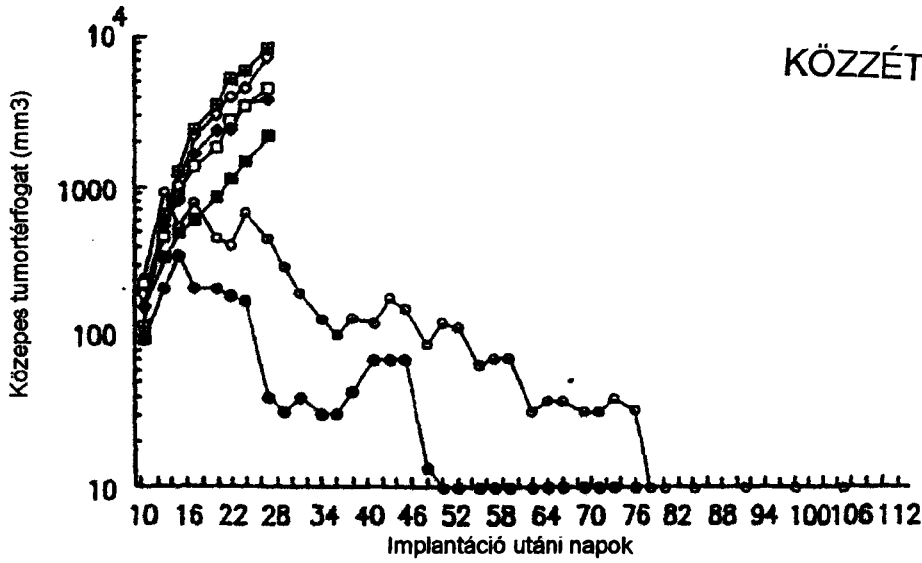
IL-18: ug/egér, ip, 10-39. nap
 LTR = tartós remisszió 112 nap

- ◆ IL-18 100 ug 4/7 CR, 4/7 LTR
- IL-18 30 ug 0/7 CR
- IL-18 10 ug 1/7 CR
- ▲ IL-18 3 ug 0/7 CR
- ▼ IL-18 1 ug 0/7 CR
- Kontroll

8. ÁBRA

6/12

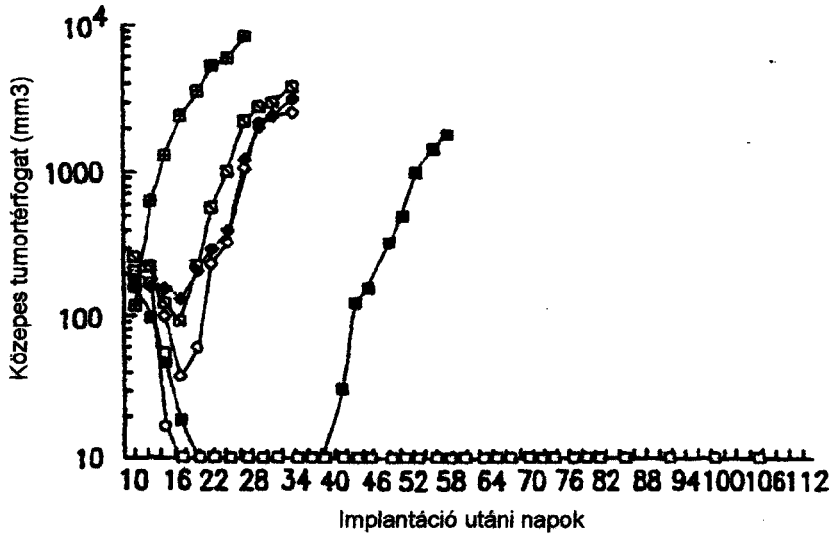
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



IL-18: ip vagy sc, ug/egér; 10-31. nap
 CR = teljes regresszió, PR = részleges regresszió, LTR = tartós regresszió

- IL18:ip 100 ug CR, 4/6 LTR
- IL18:ip 10 ug
- IL18:ip 1 ug
- IL18:sc 100ug 2CR 2PR/6; 4/6 LTR
- ◇— IL18:sc 10 ug
- △— IL18:sc 1 ug
- Kontroll

11. ÁBRA



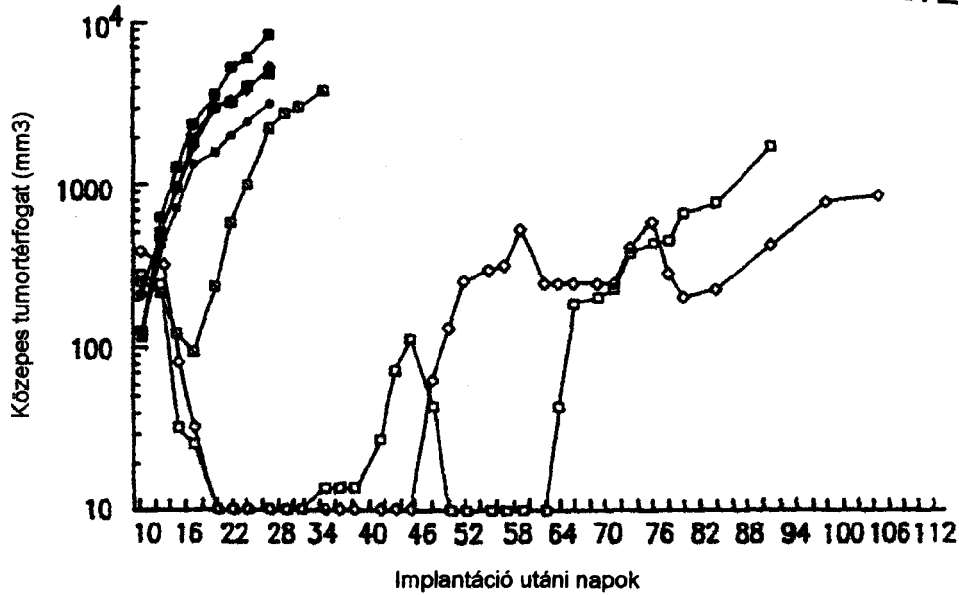
IL-18: ip vagy sc, ug/egér; 10-31. nap
 Topotecan: ip, 15 mg/kg, 10., 14. nap
 CR = teljes regresszió, PR = részleges regresszió, LTR = tartós regresszió

- IL18/Topo: ip/ip, 100/15 Toxic
- IL18/Topo: ip/ip, 10/15; 4/6 CR; 1/6 LTR
- IL18/Topo: ip/ip, 1/15; 0 CR-PR/6
- IL/Topo: sc/ip, 100/15; 4/6 CR; 4/6 LTR
- IL18/Topo: sc/ip, 10/15; 4/6 CR; 4/6 LTR
- ◇— IL18/Topo: sc/ip, 1/15; 2CR 1PR/6; 2/6 LTR
- △— Topotecan: ip, 15; 3/6 CR; 1/6 LTR
- Kontroll

12. ÁBRA

7/12

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



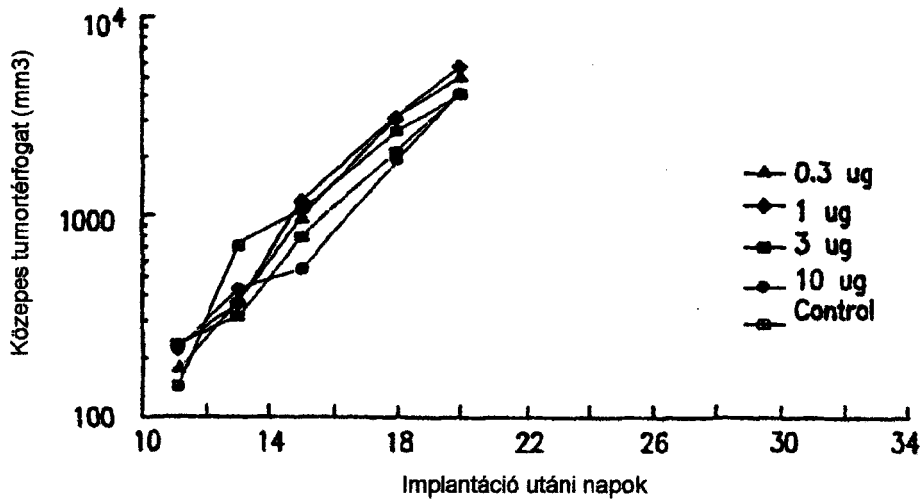
IL-18: sc, ug/egér, 10., 14., 18., 22., 26. nap

Topotecan: ip, mg/kg, 10., 14. nap

CR = teljes regresszió, PR = részleges regresszió, LTR = tartós regresszió

- IL18: 1000ug; 1/6CR, 1/6 LTR
- IL18: 100ug; 1/6CR, 1/6 LTR
- IL18: 10ug; 1/6CR, 1/6 LTR
- IL18/Topo: 1000/15 toxikus
- IL18/Topo: 100/15 ; 4/6CR, 2/6 LTR
- IL18/Topo: 10/15; 4CR 1PR/6, 1/6 LTR
- Topotecan: 15; 3/6CR, 1/6 LTR
- Kontroll

13. ÁBRA

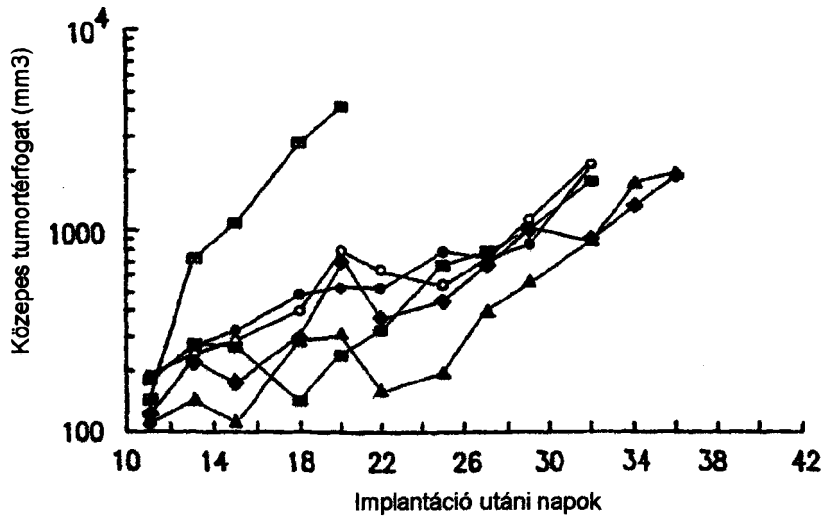


IL-18: ip, 11-15. és 18-22. nap

14. ÁBRA

8/12

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

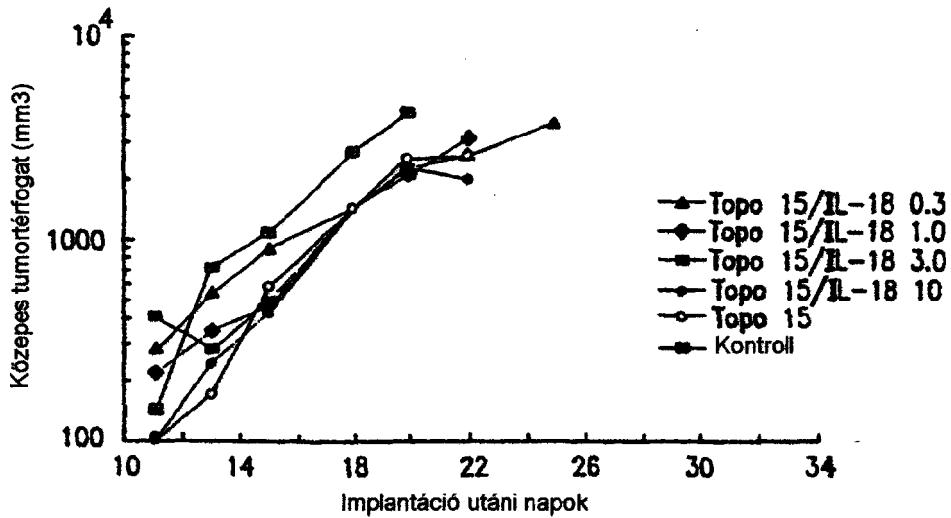


CPA: ip, 11. és 18. nap

IL-18: ip, 11-15., 18-22. és 25. nap

- ▲ 300 mg/kg CPA + 0.3 ug IL-18
- 300 mg/kg CPA + 1 ug IL-18
- 300 mg/kg CPA + 3 ug IL-18
- 300 mg/kg CPA + 10 ug IL-18
- 300 mg/kg CPA
- Kontroll

15. ÁBRA



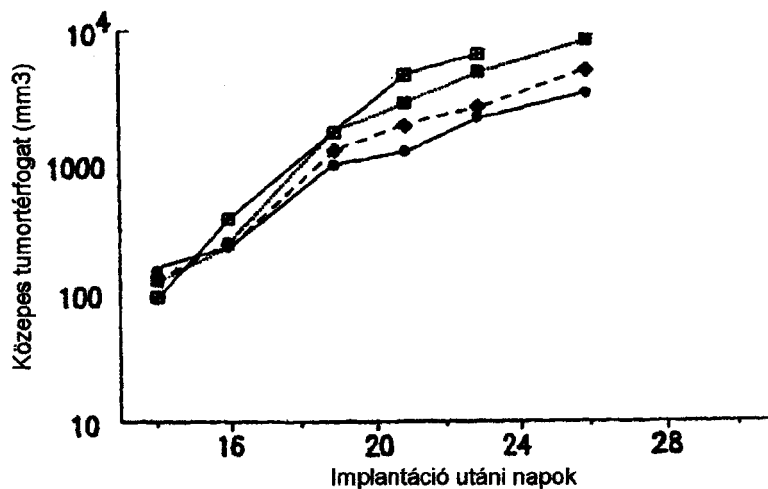
Topotecan: mg/kg, ip, 11., 15., 19. nap

IL-18: ug/egér, if, 11-15., 18-22. nap

16. ÁBRA

9/12

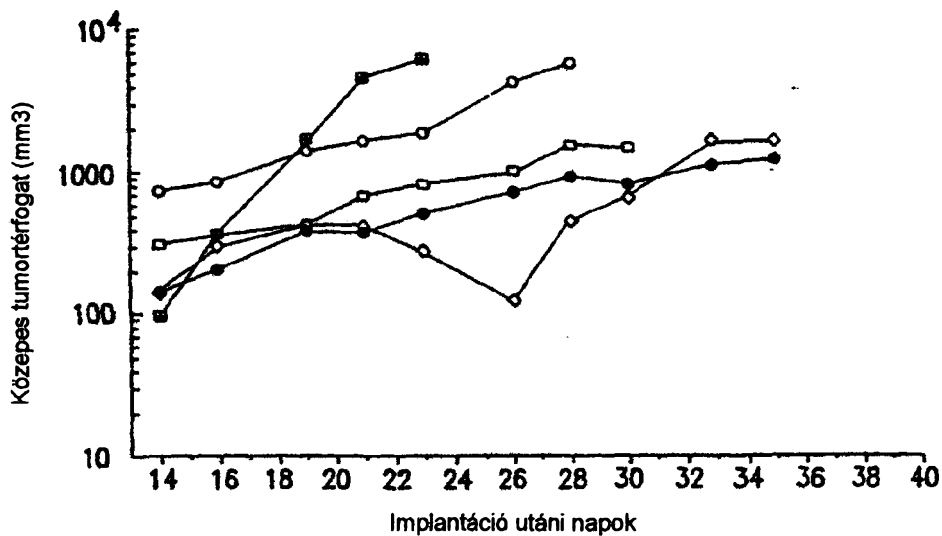
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



IL-18: sc, 14-28. nap

-●- IL-18: 10 µg -○- IL-18: 100 µg
 -□- Kontroll -■- IL-18: 300 µg

17. ÁBRA



IL-18: µg/egér, sc, 14-34. nap

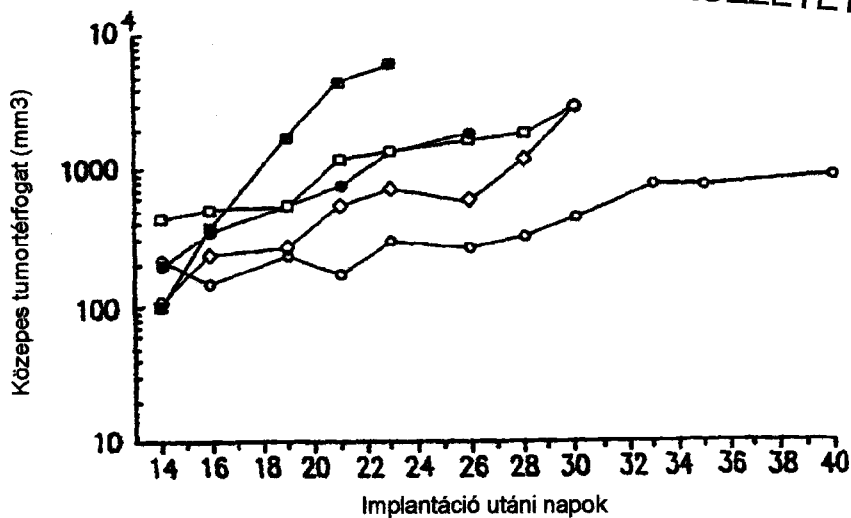
CPA: mg/kg, ip, 14., 21., 28. nap

-○- IL-18 10/CPA300 -○- IL-18 100/CPA300
 -●- CPA300 -□- IL-18 300/CPA300
 -■- Kontroll

18. ÁBRA

10/12

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

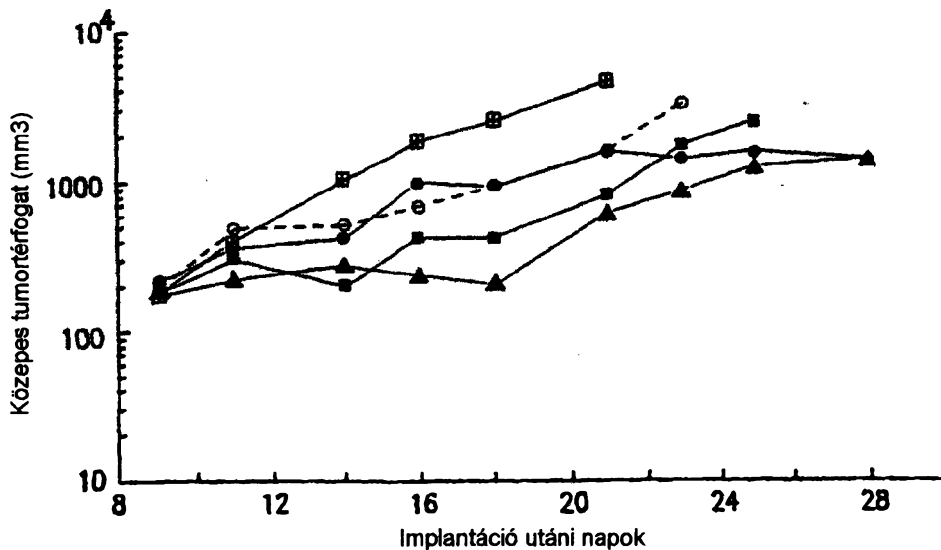


IL-18: ug/egér, sc, 14-34. nap

CPA: mg/kg, ip, 14., 21., 28. nap

- IL-18 100/CPA 180
- ◻ IL-18 30/CPA 180
- ◇ IL-18 10/CPA 180
- CPA 180
- Kontroll

19. ÁBRA



Paclitaxel: 12 mg/kg, iv, 9-13. nap

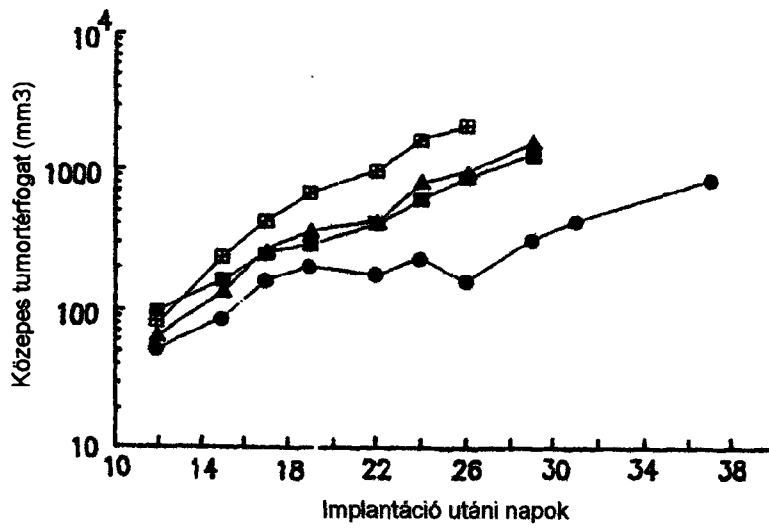
IL-18: ug/egér, sc, 9-17. vagy 25. nap

- | | | | |
|---------------------|---------|-------------------|---------|
| ○ Taxol 12 mg/kg | T-C nap | ▲ Taxol+IL-18 1ug | T-C nap |
| ● Taxol+IL-18 100ug | 3.5 | ◻ Kontroll | 10 |
| ■ Taxol+IL-18 10ug | 3.3 | | |
| | 6.4 | | |

20. ÁBRA

11/12

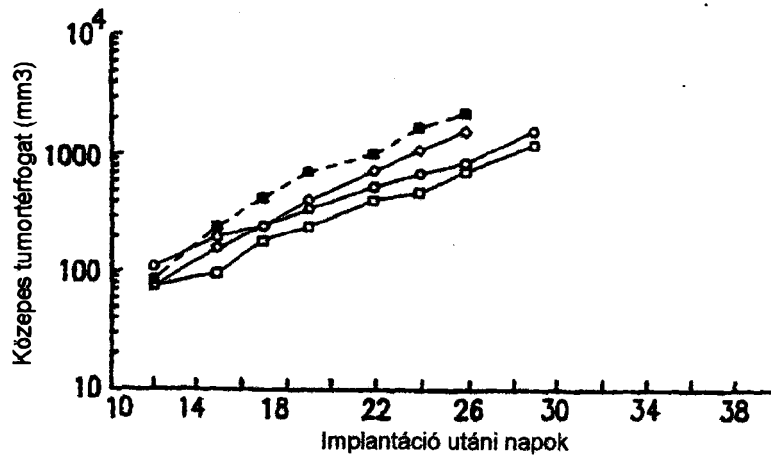
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



Doxorubicin: mg/kg, iv, 12. és 19. nap

	T-C (1000 mm ³) nap
—■— vivőanyag kontroll	
—●— Doxorubicin 20 mg	>16
—■— Doxorubicin 12 mg	5.8
—▲— Doxorubicin 7.2 mg	4.3

21. ÁBRA



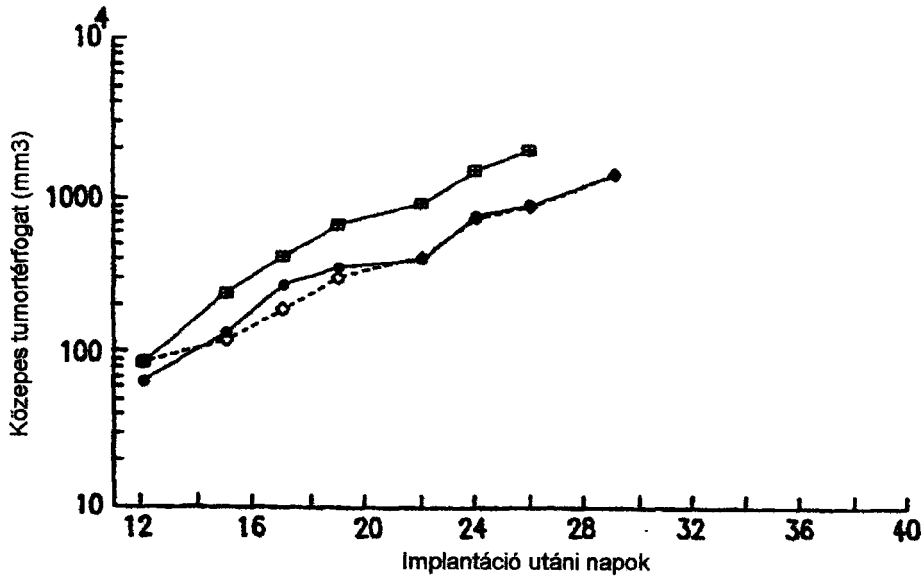
IL-18: ug/egér, sc, 12-29. nap

	T-C nap
—○— IL-18 100 ug	5.2
—○— IL-18 10 ug	6.7
—○— IL-18 1 ug	2.2
—●— Kontroll	

22. ÁBRA

12/12

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



Doxorubicin: mg/kg, iv, 12. és 19. nap
 IL-18: ug/egér, sc, 12-29. nap

Vivóanyag kontroll	T-C
—■— Doxorubicin 7.2 mg	nap
—●— IL-18/DOX-100 ug/7.2 mg	4.3
—●— IL-18/DOX-10 ug/7.2 mg	toxikus
—○— IL-18/DOX-1 ug/7.2 mg	toxikus
	4.8

23. ÁBRA