

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 950696 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 950696

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 38/20

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 17.08.1993

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 16.02.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 16.02.1995

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 17.08.1993 PCT/US1993/007587
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

19.08.1992 US 932134

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Schering Corporation, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Schwartz, Jerome, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä HIV:n replikaation estämiseksi IL-4:ää käyttämällä

Hämning av HIV-replikation under användning av IL-4

Menetelmä HIV:n replikaation estämiseksi IL-4:ää käyttämällä.
 - Hämning av HIV-replikation under användning av IL-4.

Keksintö koskee menetelmää HIV:n replikaation estämiseksi monosyytti/makrofagi-sukuperän soluissa IL-4:ää käyttämällä.

Keksinnön tausta

Ihmisen immuunikatovirus (HIV) tunnistettiin alun perin immuunikato-oireyhtymän (AIDS) aiheuttavana aineena vuonna 1983. Sen jälkeen tämän viruksen rakenteesta ja toiminnasta on opittu paljon. Lisäksi HIV:n on osoitettu asuvan T-auttaja-
 jaimusoluissa ja monosyytti/makrofagi-sukuperän soluissa [Ho et al., New Engl. J. Med. 321(24):1621 (1989)]. HIV-infektion hankkimisen ja AIDS:n alkamisen välinen aikaväli on noin 8 - 11 vuotta [Lifson et al., J. Infec. Dis. 158:1360 (1988)]. Tämä pitkä inkubointiajanjakso viittaa siihen, että isäntätekijät rajoittavat HIV-replikaatiota ainakin osaksi.

Yksitumaisilla fagosyyteillä voi olla huomattava merkitys AIDS:n patogeneesissä. Näm solut ovat ensimmäisten HIV:llä infektoituvien solujen joukossa. Ne ovat myös tärkeitä virusvarastoja keskushermostossa, keuhkoissa ja imusolmukkeissa; mahdollisia vektoreita viruksen leviämislle eri kudoksiin infektoituneen potilaan sisällä ja yksilöiden välillä; ja tärkeimpiä säätelysoluja, jotka kontrolloivat sairauden etenemisen nopeutta ja intensiteettiä [Gendelman et al., AIDS 3:475 (1989)]. Isäntätekijät kuten interferoni (IFN), joka vaikuttaa viraaliseen replikaatioon yksitumaisen fagosyytin sisällä, ovat luultavasti tärkeimpiä elementtejä rajallisen viruskasvun luomisessa ja HIV-sairauden viivytyksessä.

Se seikka, että makrofagit ovat tärkein virusvarasto keskushermostossa, leuhkoissa ja imusolmukkeissa, viittaa siihen, että terapioidella, jotka estävät viraalisen replikaation näissä erityisissä soluissa, voi olla tärkeä vaikutus viruskuor-

mitukseen ja sairauden etenemiseen [Gendelman et al., J. Immunol. 145: 2669 (1990)].

Interleukiini-4 (IL-4) on lymfokiini, jolla on ominaisuuksia, jotka ovat esimerkkejä immuunitunnistus-indusoitujen lymfokiinien sarjan useista ominaispiirteistä [Paul, Blood 77(9): 1859 (1991)]. IL-4 on pääasiallisesti vastuussa IgE-tuotannosta hiirissä vasteena erilaisille ärsykkeille, jotka aiheuttavat sen, että Ig-luokka aloittaa tämän Ig-luokan ekspresion [Finkelman et al., Ann. Rev. Immunol. 8:303 (1990)]. IL-4 kuvattiin alun perin pohjautuen sen kykyyn lisätä DNA-synteesiä puhdistetuilla, lepotilassa olevilla hiiri-B-imusoluilla, joita stimuloitiin anti-IgM-vasta-aineilla [Howard et al., J. Exp. Immunol. 155:914 (1982)].

IL-4:n on myös osoitettu vaikuttavan lepotilassa oleviin B-soluihin indusoiden luokan II MHC-molekyylien ekspressiota [Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6149 (1984)], ja lisäävän sellaisten solujen seuraavaa vastetta anti-IgM-vasta-aineille [Rabin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2935 (1985); Oliver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2465 (1985)].

Ihmisen IL-4 on glykoproteiini, joka esiintyy muodoissa, joiden molekyylimassat ovat välillä 15 000 ja 19 000 Da. On saatu cDNA't, jotka koodittavat sekä hiiri- että ihmis-IL-4:ää [Lee et al., yllä; Noma et al., yllä; Yokota et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5894 (1986)].

IL-4:llä on voimakkaat vaikutukset T-imusoluihin samoin kuin B-soluihin. Lepotilassa olevat T-solut, jotka on käsitelty IL-4:llä, jäävät eloon viljelmässä jakautumatta [Hu-Li et al., J. Exp. Med. 165:157 (1987)]. IL-4 vaikuttaa myös ei-lymfoidisiin hematopoieettisiin soluihin eri tavoilla. Sen on osoitettu estävän makrofagien kasvua [McInnes et al., J. Exp. Med. 167:598 (1988); Jansen et al., J. Exp. Med. 170:577 (1989)], ja lisäävän sytotoksista aktiivisuutta määrättyjä

kasvainsoluja kohtaan [Crawford et al., J. Immunol. 139:135 (1987)].

Nykyiset menetelmät HIV-infektion hoitamiseksi, joihin liittyy AZT:n, ddI:n ja ddC:n käyttö, eivät ole osoittautuneet kovin tehokkaiksi. Siten on tarvetta paremmiolla menetelmillä HIV-infektion hoitamiseksi.

Keksinnön yhteenveto

Keksintö täyttää tämän tarpeen aikaansaamalla sellaisen menetelmän. Erityisemmin keksintö aikaansaa HIV-infektion hoitoon tarkoitettua menetelmää, jossa HIV-infektion saaneelle potilaalle annetaan terapeuttisesti tehokas määrä IL-4:ää.

Piirroksen lyhyt kuvaus

Keksintö voidaan ymmärtää helpommin oheisen kuvion 1 avulla, joka on kaaviomainen esitys HIV-replikaation estosta monosyyteissä erilaisilla IL-4-annoksilla.

Keksinnön kuvaus

Kaikki tässä mainitut viitteet liitetään kokonaisuudessaan viitteeksi.

Keksintö koskee HIV-infektion ja kaikkien sellaisesta infektiosta johtuvien tilojen, kuten AIDS:n hoitoa. Tilojen, joita voidaan hoitaa tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä, määritellään tässä sisältävän morbiditeettitilat ja -tasot, jotka täyttävät yhden tai useita seuraavista kriteereistä: (1) seropositiivinen HIV-virukselle (ja/tai HIV-vasta-aineelle), tai solunsisäisten viruspartikkelien läsnäolo, jotka viruspartikkelit voidaan tunnistaa valkosoluisolaattien sisällä mikroskooppisella arvioinnilla; (2) krooninen imusolmukkeiden sairaus, kuten alalla yleisesti ymmärretään; (3) veren T-aut-tajasolumäärä $<400/\text{mm}^3$; (4) osoitettavissa oleva viivästetyn

liikaherkkyysvasteen osittainen puute; (5) viivästyneille liikaherkkyysihotesteille vasteen täydellinen puute ja/tai sammastaudin esiintyminen.

Edellä olevat kriteerit täyttävien potilaiden sanotaan edenneen "AIDS"-luokitukseen, kun edellä olevan lisäksi ne tulevat alttiiksi opportunistisille infektioille, kuten *Cryptococcus*-sienen aiheuttamalle aivokalvontulehdukselle, histoplasmoosille, tuberkuloosille, toksoplasmoosille tai PCP:lle (*Pneumocystis carinii*-keuhkokuumeelle). [Redfield et al., "HIV Infection: The Clinical Picture", *The Science of AIDS*, yllä, s. 63-73].

Edellä luetellut oireet ovat kuvaavia spesifisistä valintakriteereistä käytettäväksi ehdokkaiden määrittämisessä ehdotettua hoitomenetelmää varten. Hoidon tehokkuus voidaan määrittää tarkkailemalla edellä mainittuja taudin oireita heikkene- mistä varten. Lisäksi viraalisen replikaation estoa voidaan seurata mittaamalla käänteistranskriptaasitasot infektoitujen solujen isolaattien supernatanteista, joka ennustaa taudin etenemistä. On hyvin varmaa, että akuutin faasin infektio ilmenee viruspartikkelien hyvin korkeina seerumitiittereinä [Coombs et al., *New Engl. J. Med.* 321(24):1626 (1989)].

Tässä keksinnössä käytettäessä käsite "HIV" määritellään sisältämään sekä HIV-1:n että HIV-2:n.

Kuten tässä osoitetaan, keksinnön mukaiset menetelmät estävät HIV-replikaation monosyytti/makrofagi-sukuperän soluissa. Voi kuitenkin olla vaikutuksia viraaliseen replikaatioon muissa solutyypeissä. Voi myös olla vaikutuksia immuunijärjestelmään tai muihin järjestelmiin. Ei ole välttämätöntä ymmärtää täsmällis(t/i)ä mekanism(i/ej)a, jo(i)lla IL-4 voi vaikuttaa.

IL-4 on kaupallisesti saatavissa lukuisista lähteistä, kuten Genzyme Corporation, Cambridge, MA., tai sitä voidaan valmistaa tunnetuilla menetelmillä luonnollisia lähteitä tai yhdis-

telmä-DNA-menettelytapoja käyttämällä [Sheenan et al., Immunol. 142:884 (1989) ja Starnes et al., J. Immunol., 145: 4185 (1990)].

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää tunnettuihin IL-4-nukleotidisekvensseihin perustuvia oligonukleotidikoetinseoksia tunnistamaan DNA:n, joka koodittaa IL-4:ää standardimenetelmillä valmistetuissa genomi- tai cDNA-kirjastoissa. Täten tunnistettu DNA voidaan leikata kirjastosta restriktioendonukleasikatkaisulla tai valmistaa käyttämällä sopivia alukkeita ja polymeraasiketjureaktio(PCR)-menetelmää [Saiki et al., Science 239:487 (1988)], sekvensoida ja ekspressoida eukariootissa ekspressiojärjestelmässä tai (standardimenetelmillä tapahtuvan introninpoiston jälkeen mikäli tarpeen) prokariotissa tai eukariotissa ekspressiojärjestelmässä. Sekä cDNA- että genomi-DNA-kirjastoja voidaan tietysti seuloa standardiekspressiokloonauksen menetelmiä käyttämällä oligonukleotidikoettimien tai PCR:n käytön sijasta. Täten tuotettu IL-4 havaitaan käyttämällä tunnettuja menetelmiä kuten immunokemiallisia - tai biomääritysmenetelmiä.

Käytetty IL-4 on edullisesti ihmisen yhdistelmä-DNA-IL-4:ää. On myös edullista käyttää glykosyloitua IL-4:ää (esimerkiksi eukariotiekkspressiojärjestelmässä tuotettua yhdistelmä-DNA-IL-4:ää).

Tämän keksinnön joissain suoritustavoissa IL-4:ää annetaan yhdistelmänä yhden tai usean muun aineen kanssa, jonka tiedetään olevan HIV:tä vastaan tehokasta, kuten 3'-atsido-2',3'-dideoksitymidiinin (AZT), 2',3'-dideoksisytidiinin (ddC) tai 2',3'-dideoksi-inosiinin (ddI).

Keksinnössä käyttöön tarkoitettuja farmaseuttisia koostumuksia voidaan toimittaa lyofilisoidussa muodossa ja sekoittaa sitten juuri ennen käyttöä farmaseuttisesti hyväksyttävään väliaineeseen kuten fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen, tai mihin hyvänsä muista hyvin tunnetuista väliaineista. Kek-

sinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset voidaan injisoida suoraan verivirtaan laskimonsisäisesti tai laskimonsisäisellä (i.v.) tiputusliuoksella, kuten Ringerin laktaatilla. Paren-
teraaliset valmisteet, joita voidaan käyttää, ovat mm. ste-
riilit liuokset tai suspensiot. Nämä valmisteet voidaan val-
mistaa tavanomaisilla farmaseuttisesti hyväksyttävillä täyte-
aineilla ja lisäaineilla kuten stabilointiaineilla ja väliai-
neilla. Annettavat liuokset voivat olla liuotettuja lyofili-
soituja jauheita, jotka voivat lisäksi sisältää esimerkiksi
säilöntäaineita, puskuroimisaineita ja dispergoimisaineita.
Edullisesti koostumukset annetaan i.v.-injektiolla.

Keksinnön mukaisesti HIV-infektion vuoksi hoitoa tarvitsevil-
le potilaille annetaan tehokas määrä IL-4:ää edellä kuvattu-
jen tulosten saavuttamiseksi. Voidaan antaa päivittäisannos
noin 0,001 - 50 $\mu\text{g/kg}$ kehonpainoa. Edullisemmin päivittäisan-
nos on alueella noin 0,01 - 10 $\mu\text{g/kg}$ kehonpainoa. Edullisim-
min päivittäisannos on alueella noin 0,05 - 2 $\mu\text{g/kg}$ kehonpai-
noa. Täsmällisen annettavan IL-4-määrän ratkaisee hoitava
lääkäri ottaen huomioon sairauden etiologian ja vakavuuden,
potilaan tilan, iän ja muut tekijät.

Esimerkki

Tätä keksintöä voidaan kuvata seuraavalla, ei-rajoittavalla
esimerkillä.

Menetelmät ja materiaalit

Monosyyttejä otettiin talteen HIV- ja hepatiitti-B-seronega-
tiivisten luovuttajien ääreisveren yksitumaisista soluista
(PBMC) valkosolujen erottamisen jälkeen, ja puhdistettiin
verisolujen yksitumainen leukosyytti-rikkaiden fraktioiden
vastavirtasentrifugihuuhtelulla. Solususpensiot olivat >98-
%:isesti monosyyttejä solumorfologiakriteereillä Wright-vär-
jätyillä sytotahroilla, jyväsperoksidaasilla (granular perok-
sidase) ja epäspesifisellä esteraasilla. Monosyyttejä kasva-

tettiin tarttuneina yksisolukerroksina ($7,5 \times 10^{-5}/24$ -mm kudosisviljelykaivo) 0,5 ml:ssa DMEM:ää (resepti 78-176AJ, GIBCO, Grand Island, NY), jota oli täydennetty 10 %:illa lämmöllä inaktivoitua A+-ihmisseerumia, 50 mg:lla/ml gentamysiiniä (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), ja 1000 U:lla/ml humaan-yhdistelmä-DNA-koloniaa stimuloivaa tekijää (M-CSF) (Cetus Corp., Emeryville, CA). PBMC:itä, jotka oli eristetty kokoverestä Ficoll-diatritsoaatti(Pharmacia LKB, Piscataway, NJ)-tiheysgradienttisentrifugoinnilla, kasvatettiin tasolla 1×10^6 elävää solua/ml RPMI 1640-väliaineessa (GIBCO) kun läsnä oli 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fytohemagglutiniinia (PHA) (Sigma), 10 % puhdistettua ihmisen IL-2:ta (Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD), ja 15 % lämmöllä inaktivoitua naudan sikiön seerumia (FCS) (Sterile Systems, Logan, UT).

PHA/IL-2-käsiteltyjä monosyyttejä altistettiin infektiomultiplisiteetilla 0,01 kudosisviljely- ID_{50} /kohdesolu 4 kliiniselle HIV-kannalle (GG, YU-2, SM ja ADA), jotka alunperin eristettiin ja kasvatettiin sukupolvien yli monosyyteissä (AIDS Research and Reference Reagent Program, AIDS Program, NAID, NIH). M-CSF:llä käsiteltyjä monosyyttejä kasvatettiin tarttuneina yksikerroksina 7 - 10 päivän ajan ennen kohdesoluina käyttöä. Kaikki viljelmät syötettiin uudelleen tuoreella väliaineella joka 2. - 3. päivä.

Käänteistranskriptaasi(RT) -aktiivisuuden määrittystä varten kasvatussupernatanttifluidien rinnakkaisnäytteitä lisättiin reaktioseokseen, jossa oli NONIDET P-40®:ää (Sigma), poly(rA) oligo(dT):tä (Pharmacia, Piscataway, NJ), ditiotreitolia (Pharmacia), MgCl_2 :ta ja $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dTTP}$:tä (400 Ci/mmol, Amersham Corp., Arlington Heights, IL) 24 tunniksi 37 °C:ssa. Seos lisättiin kromatografiapaperille, kuivattiin ilmassa, ja ajettiin viidesti 0,3 M NaCl-0,03 M natriumsitraatissa (pH 7,4), ja vielä kahdesti 95-%:isessä etanolissa. Paperi kuivattiin ja leikattiin, ja radioaktiivisuus laskettiin nestetuikespektroskopiolla. HTLVIIIIB toimi RT-aktiivisuuden positiivisina kontrolleina.

Infektoimattomia tai HIV:llä infektoiduja PBMC'itä kasvatettiin muovialustoilla IL-4:n läsnä ollessa tai puuttuessa. HIV-infektion läsnäolo viljelmissä määritettiin seulomalla solut plasmamembraaniin liittyneen ja rakkuloidensisäisen HIV:n suhteen. Myös RT-aktiivisuus mitattiin edellä kuvatulla tavalla kasvatussupernatanttifluidien erissä.

Hämmästyttävällä tavalla keksittiin, että HIV:llä infektoidujen solujen IL-4-käsittely antoi tulokseksi viraalisen replikaation annoksesta riippuvan vähenemisen infektion jälkeen. Tämä voidaan nähdä kuviosta 1, jossa viraalisen replikaation esto esitetään radioleimatus RT:n näkymisen vähenemisenä supernatanteissa ($\text{CPM/ml} \times 10^{-5}$) IL-4:llä käsitellyissä viljelmissä, verrattuna käsittelemättömiin infektoiduihin viljelmiin (Kontrolli). RT-tasot mitattiin lukuisina ajankohtina 21-päiväisen inkubointiajanjakson aikana. Kymmenen yksikköä IL-4:ää/ml esti RT-aktiivisuuden selvästi 21 päivän ajan infektion jälkeen. Tämä vaikutus määritettiin mitattavissa olevan RT-aktiivisuuden vähenemisellä kasvatussupernatanteissa.

IL-4:n estovaikutus oli vapaasti reversiibeli. Poistettaessa IL-4:n kasvatusjärjestelmästä viraalisen replikaation (RT-aktiivisuuden) tasot kohosivat tasoille, jotka saatiin käsittelemättömillä, HIV:llä infektoiduilla monosyyteillä.

IL-4-vaikutuksen spesifisyys viraaliseen replikaatioon varmistettiin monoklonaalisilla anti-IL-4-vasta-aineilla esikäsittelemällä (tietoja ei näytetä). Viraalisen replikaation estoa ei nähty näissä kokeissa viljelmissä, jotka oli esikäsitelty anti-IL-4-vasta-aineilla. Havaittiin myös, että väliainekomponentti ihmisseerumin korvaus naudan sikiön seerumilla antoi tulokseksi anti-viraalisen vasteen vähenemisen, ehkä koska naudan sikiön seerumi sisältää joukon muita ainesosia, joiden tiedetään ylössätelevän HIV-geeniekspressiota, ja joita ei esiinny ihmisseerumeissa.

Keksintöön voidaan tehdä useita modifikaatioita ja muutoksia sen hengestä ja suoja-alasta poikkeamatta, kuten ammattimiehet ymmärtävät. Tässä kuvatut erityiset suoritusmuodot esitetään vain esimerkkinä, ja keksintöä rajoittavat vain oheiset patenttivaatimukset.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä HIV-infektion hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että HIV:llä infektoituneelle potilaalle annetaan tehokas määrä IL-4:ää.

2. Menetelmä HIV-infektion hoitamiseen tarkoitettun farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että IL-4:ää sekoitetaan farmaseuttisesti hyväksyttävän väliaineen kanssa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että IL-4 on humaaniiyhdistelmä-DNA-IL-4:ää.

4. HIV-infektion hoitoon tarkoitettu farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää IL-4:ää ja farmaseuttisesti hyväksyttävää väliainetta.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että IL-4 on humaaniiyhdistelmä-DNA-IL-4:ää.

6. IL-4:n käyttö HIV-infektion hoitoon.

7. IL-4:n käyttö HIV-infektion hoitoon tarkoitettun lääkkeen valmistukseen.

8. Joko patenttivaatimuksen 6 tai patenttivaatimuksen 7 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että IL-4 on humaaniiyhdistelmä-DNA-IL-4:ää.



Missing part