

ELJÁRÁS TUMOROK ÉS ÁTTÉTELEK KEZELÉSÉRE ANTI-
ANGIOGÉN TERÁPIÁK ÉS IMMUNTERÁPIÁK KOMBINÁCIÓJÁT
ALKALMAZVA

KIVONAT

A találmány kitanítást ad tumorok és tumor áttételek kezeléséről valamely emlősben, amely kezelés abból áll, hogy valamely emlősnek ilyen kezelés szükségessége esetén egy antagonistá angiogenezis gátlására elegendő mennyiséget ^{nek}adjunk be egy tumorelleses immunterápiás szer terápiás mennyiségével kombinálva, ahol ez utóbbi szer egy tumorelleses antigén antitest/citokin fúziós fehérje, amely egy citokinnel és egy rekombináns immunglobulin polipeptid láncsal bír, és ez alkalmas egy citokin-fajlagos biológiai válasz kiváltására.

jellemző a'bra: 1

RZ

ELJÁRÁS TUMOROK ÉS ÁTTÉTELEK KEZELÉSÉRE ANTI-
ANGIOGÉN TERÁPIÁK ÉS IMMUNTERÁPIÁK KOMBINÁCIÓJÁT
ALKALMAZVA

A találmány eljárásokra vonatkozik primer tumorok és áttételek gátlására, amely eljárások valamely anti-angiogén terápiás szer és valamely célzott tumorelles immunterápiás szer kombinált beadásán alapulnak. A találmány elsőbbsége az 1999. február 12-én benyújtott 60/119,721 számú amerikai egyesült államokbeli ideiglenes bejelentésen alapul. Az itt leírt eljárás feltárását részben a National Institutes of Health (NIH) támogatta az Amerikai Egyesült Államok nevében. Ennek megfelelően az Amerikai Egyesült Államok kormánya bizonyos jogokkal rendelkezhet a találmánnyal kapcsolatban.

Az alábbiakban megvilágítjuk a találmány hátterét.

Az új véredények kialakulása, vagyis az angiogenezis kulcsszerepet játszik a rosszindulatú betegségek előrehaladásában, így sok figyelmet fordítottak már olyan szerek kifejlesztésére, amelyek gátolják az angiogenezist [lásd például: Holmgren L., O'Reilly M. S. és Folkman J.: Mikro-áttételek alvó állapota: kiegyensúlyozott burjánzás és apoptózis angiogenezis gátlók jelenlétében (Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression), Nature Medicine 1, 149-153 (1995); Folkman J.: Angiogenezis rákban, érrendszeri, reumás és más betegségekben (Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease), Nature Medicine 1, 27-31 (1995); O'Reilly M. S. és munkatársai: Angiosztatin: új angiogenezis gátló, amely közvetíti a Lewis

tüdő karcinóma általi áttételek visszaszorítását (Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma), *Cell* 79, 315-328 (1994); Kerbel R. S.: A rezisztenciára rezisztens rákterápia (A cancer therapy resistant to resistance), *Nature* 390, 335-336 (1997); Boehm T. és munkatársai: Kísérleti rák anti-angiogén terápiája nem indukál felvett gyógyszer rezisztenciát (Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance), *Nature* 390, 404-7 (1997); és Volpert O. V. és munkatársai: Egy emberi fibroszarkóma gátolja a szisztémás angiogenezist és a kísérleti áttételek növekedését trombospondin-1 révén (A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via trombospondin-1), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95, 6343-6348 (1998)].

Az $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonisták alkalmazása angiogenezis gátlására ismert azokban az eljárásokban, amelyek szilárd tumor növekedés gátlására szolgálnak a vérszolgáltatás csökkentésével a szilárd tumorhoz. Ezzel kapcsolatban meg kell említenünk az 5,753,230 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat (Brooks és Cheresch) és az 5,766,591 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat (Brooks és Cheresch), amelyek leírják a $\alpha_v\beta_3$ antagonisták, például szintetikus polipeptidek alkalmazását és $\alpha_v\beta_3$ utánzók (mimetikumok) alkalmazását, amelyek megkötik az $\alpha_v\beta_3$ receptort és gátolják az angiogenezist.

Ezen kívül leírtak antitest-citokin fúziós fehérje terápiákat, amelyek elősegítik kialakult tumorok, például karcinóma áttételek immunválasz-közvetített gátlását. Így például az interleukin-2 (IL-2) citokin fuzionál egy monoklonális antitest nehéz láncához, amely immunreaktív, két külön fúziós fehérjében, a tumorról társult antigénnel, vagyis a hámsejt adhéziós molekulával (epithelial cell adhesion molecule) (Ep-CAM, KSA,

KS1/4 antigén) vagy a GD₂ diszialoganglioziddal a KS1/4 illetve ch14.18 antitestek alkalmazásával, így alakítva ki a ch14.18-IL-2 illetve KS1/4-IL-2 fúziós fehérjéket. Ezzel kapcsolatban lásd például az 5,650,150 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat (Gillies).

Az angiogenezis érrendszer-fajlagos inhibitorainak, amelyek szinergisták a tumor területét speciálisan becélzó terápiákkal, azonosítása lehetővé teszi, hogy optimálisan hatékony rákkezelés legyen kiszabható.

Az angiogenezist endoteliális sejtek behatolása, vándorlása és burjánzása jellemzi; ezek olyan folyamatok, amelyek függenek a sejt kölcsönhatásoktól az extracelluláris mátrix komponensekkel. Ezzel összefüggésben az $\alpha_v\beta_3$ integrin endoteliális adhéziós receptoráról kimutatták, hogy kulcsszerepet játszik egy érrendszer-fajlagos célpont szolgáltatásával anti-angiogén kezelési stratégiákhoz [Brooks P. C., Clark R. A. és Cheresh D. A.: Az érrendszeri $\alpha_v\beta_3$ integrin követelménye angiogenezishez (Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis), *Science* 264, 569-571 (1994); Friedlander M. és munkatársai: Két angiogén út meghatározása elkülönült α_v integrinekkel (Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins), *Science* 270, 1500-1502 (1995)]. A követelményeket az $\alpha_v\beta_3$ érrendszeri (vaszkuláris) integrinhez angiogenezisben számos in vivo modellben demonstrálták, ahol az új véredények kialakítását, átültetett humán tumorok révén, teljes mértékben gátolták vagy $\alpha_v\beta_3$ integrin peptid antagonistáinak szisztémás beadásával, vagy az LM609 anti- $\alpha_v\beta_3$ antitest beadásával [Brooks P. C. és munkatársai: az előzőekben idézett munka, *Science* (1994); Brooks P. C. és munkatársai: $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonisták elősegítik a tumor elsorvasztását az angiogén véredények apoptózisát indukálva (Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels), *Cell* 79,

1157-1164 (1994)]. Az LM609 rágcsgáló hibridóma letétbe van helyezve az American Type Culture Collection-nél (ATCC, Rockville, Maryland, Amerikai Egyesült Államok), amely intézmény nemzetközi letétbe helyezési intézmény (International Depository Authority) a Budapesti Szerződés szerint. A nevezett hibridóma ATCC HB 9537 letéti számot kapott 1987. szeptember 15-én. Az ilyen antagonisták blokkolják az $\alpha_v\beta_3$ integrin ligálását, amely elősegíti a burjánzó angiogén érsejtek apoptózisát és ezáltal megszakítják az újonnan keletkező véredények érését, amely pedig nélkülözhetetlen esemény a tumorok burjánzásához.

Az érrendszeri endoteliális növekedési faktort [Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)] szelektív angiogén növekedési faktorként azonosították, amely stimulálni képes az endoteliális sejt mitogenezist. A humán tumor biopsziák VEGF mRNS-ek megnövekedett expresszióját mutatják rosszindulatú sejtek révén és VEGF receptor mRNS-ek révén a szomszédos endoteliális sejtekben. A VEGF expresszió, úgy tűnik, a tumor azon területeiben a legnagyobb, amelyek szomszédosak az elhalás (nekrózis) vaszkuláris területeivel [ezzel kapcsolatban érdemes tanulmányozni Thomas és munkatársai összefoglaló munkáját: Érrendszeri endoteliális növekedési faktor, egy hatékony és szelektív angiogén szer (Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent), J. Biol. Chem. 271 (2), 603-606 (1996)]. Hatékony tumorelleses terápiák hasznosíthatnak becélzó VEGF receptort az angiogenezis gátlására monoklonális antitesteket alkalmazva [Witte L. és munkatársai: A VEGF receptor-2-t (F1k1/KDR) becélzó monoklonális antitestek, mint anti-angiogén terápiás stratégia részei (Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (F1k1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy), Cancer Metastasis Rev. 17 (2), 155-61 (1998)].

A szétszóródott rosszindulatú gócok hatékony kezelésének fő akadálya magában foglalja a minimális maradék betegséget, amelyet mikro-áttételek jellemeznek, és ezek nélkülözik a jól kialakult vaszkuláris ellátást a gyógyszerek szolgáltatásához. Ebből a szempontból egy új immunterápiás stratégia bizonyult hatékornak, tumor területre fajlagos monoklonális antitesteket alkalmazva, amelyek a citokineket a tumor mikrokörnyezetébe irányítják. Ezt rekombináns antitest-citokin fúziós fehérjékkel érik el, amelyek úgy vannak kialakítva, hogy fenntartsák a monoklonális antitestek egyedi tumor-fajlagos becélzó képességét és a citokinok immun-módosító funkcióit. Az antitest-IL-2 fúziós fehérje alkalmazása az IL-2 irányítására a tumor területbe indukálja a tumor mikrokörnyezetbe behatoló effektor sejtek aktiválását, ez pedig a létrejött mikroáttételek hatékony kiirtását eredményezi három különböző szingenikus egér tumor modellben [Becker J. C. és munkatársai: Rágcsáló áttételes melanóma T-sejt közvetített kiirtása, amelyet célzott interleukin-2 terápia indukál (T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy), J. Exp. Med. 183, 2361-2366 (1996); Xiang R. és munkatársai: Létrejött rágcsáló vastagbél karcinóma áttételek eltüntetése antitest-interleukin-2 fúziós fehérje terápiával (Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin 2 fusion protein therapy), Cancer Res. 57, 4948-4955 (1997); Lode H. N. és munkatársai: Csontvelőbe terjedő neuroblasztóma áttételek természetes ölü sejt-közvetített kiirtása célzott interleukin-2 terápiával (Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy), Blood 91, 1706-1715 (1998)]. Bár a tumor áttételek korai stádiumaiban elég hatékony, ez a tumor területbe irányító megközelítés csak halasztja az áttételek növekedését a tumor növekedés későbbi stádiumainál, amelyeket a teljesen kifejlődött érrendszeri hálózat

jellemez. Így fel is tehetjük a kérdést, vajon van-e a fajlagos érrendszeri- és tumor területhez irányított kezelési stratégiáknak, amelyek szinergisták, kiegészítő előnye, amikor egymás utáni vagy egyidejű kombinációkban használjuk ezeket.

Ezt három szingenikus rágcsáló tumor modellben, mégpedig vastagbél karcinóma, melanóma és neuroblasztóma modellben vizsgáljuk, ahol az utóbbit spontán máj áttételek jellemzik. Mindhárom modell szoros hasonlóságot mutat emberekben előforduló betegségekkel. A melanóma és neuroblasztóma modellek a GD2 diszialogangliozidot expresszálják, amely jól megalapozott, tumorral társult antigén ilyen neuroektodermális rosszindulatú góciókban [Irie R. F., Matsuki T., és Morton D. L.: Humán monoklonális antitest GM2 gangliozidhoz melanóma kezelésére (Human monoclonal antibody to ganglioside GM2 for melanoma treatment), *Lancet* 1, 786-787 (1989); Handgretinger R. és munkatársai: I. fázisú tanulmány humán/egér kiméra anti-GD2 gangliozid ch14.18 antitestről neuroblasztómában szenvedő betegekkel (A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma), *Eur. J. Cancer* 31A, 261-267 (1995)], míg a vastagbél karcinóma modellt az epiteliális sejt adhéziós molekula (Ep-CAM, KSA, KS1/4 antigén) expressziója jellemzi, ahol az epiteliális sejt adhéziós molekula olyan cél molekula, amely sikeresen hasznosítható passzív immunterápiákhoz emberekben [Riethmuller G. és munkatársai: Monoklonális antitest véletlenszerű kísérlete kimetszett Duke-féle C vastag- és végbél karcinóma adjuváns terápiájához (Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Duke's C colorectal carcinoma), *Lancet* 343, 1177-1183 (1994)]. Ezek az antigének fajlagosan behatárolják a tumor területet ezekben a modellekben, becélózva az antitest-interleukin-2 fúziós fehérjékkel, amelyek

humán/egér kiméra anti-GD2 antitestekkel alakulnak ki (ch14.18-IL-2) [Gillies S. D. és munkatársai: Antitest-célzott interleukin-2 stimulálja autológ tumorsejtek T-sejt pusztítását (Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89, 1428-1432 (1992)], és humanizált anti-Ep-CAM (anti-KSA, Anti-KS1/4 antigén) antitestekkel alakulnak ki (KS1/4-IL-2) [Xiang R. és munkatársai (1997): az előzőekben idézett munka; Gillies S. és munkatársai: Az IL-12 antitest fúziós fehérjék SCID egér modellekben hatékonyak a prosztata- és vastagbél karcinóma áttételek ellen (Antibody-IL-12 fusion proteins are effective in SCID mouse models of prostate and colon carcinoma metastases), J. Immunol. 160, 6195-6203 (1998)]. Ezeknek a tumor modelleknek az érrendszeri területét, ahogyan sok állat modellnél leírták, az $\alpha_v\beta_3$ integrinek expressziója határozza meg újonnan kialakult véredényeken [Brooks P. C. és munkatársai: előzőekben idézett munka (1994)]. Az itt bemutatott adatok szinergikus hatékonyságot demonstrálnak egyidejű és egymás utáni kezeléseknél, fajlagosan célozva tumorokat, primer tumorok érrendszeri területeit és távoli áttételeket. Ennek a szinergizmusnak a mechanizmusát a csökkenés szolgáltatja a véredény képződésben, és növekedés szolgáltatja a gyulladásban csak azokban az állatokban, amelyek kombinált terápiával vannak kezelve. Ezek a megfigyelések hangsúlyozzák az anti-angiogén hatás kombinálásának előnyös hatását tumor-fajlagos, tumorelles immunterápiás megközelítésekkel.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmányt.

A találmány eljárással foglalkozik tumorsejt kezelésére valamely betegben ilyen kezelés szükségessége esetén, amely eljárás abból áll, hogy az említett betegnek beadjuk egy angiogenezis gátló szer tumorsejt burjánzást gátló mennyiségét és beadunk valamely tumorelles immunterápiás szert. A tumorsejt burjánzás gátlása körülölölheti a

tumorsejtek növekedésének gátlását létező tumorokban és tumor áttételekben, további tumor áttételek képződésének gátlását, és még a tumorsejtek elpusztítását is. Az angiogenezist gátló szer és a tumorelles immunterápiás szer beadható lényegében együtt, valamint egymás után is.

Az egyik kiviteli módban a találmány eljárást ír le tumor vagy tumor áttételek kezelésére valamely betegben, a betegnek beadva legalább egy angiogenezist gátló szer és legalább egy tumorelles immunterápiás szer kombinációját. A tumorsejt burjánzás hatékony gátlását az említett betegben ilyen módon érhetjük el.

A beteg ez előbb említett terápiás kompozíciókat befogadhatja a tumornak vagy egy részének eltávolítását szolgáló sebészeti beavatkozás előtt, közben vagy után. A beadás kivitelezhető közvetlen bemerítéssel; szisztémás vagy lokalizált intravénás (i.v.), intra-peritoneális (i.p.), szubkután (s.c.), intramuszkuláris (i.m.) injekcióval vagy közvetlen injekcióval a tumor tömegébe; és/vagy a megfelelő kiegészítések orális bevezetésével.

A találmány szerinti eljárásokban való felhasználáshoz alkalmas angiogenezis gátló szer olyan, amely gátolni képes új véredények kialakulását (neurovaszkularizáció) vagy a meglévő kapilláris hálózatok megnagyobbodását a tumorsejt körüli szövetek felé. A megfelelő angiogenezis gátló szerek lehetnek peptidek angiogenezis gátló aktivitással, ilyen például a tumorról társult PSA antigén. Más alkalmas angiogenezis gátló szerek lehetnek a VEGF-fel társult angiogenezis antagonistái, például a sejtek felületén levő VEGF receptor antagonistái. Előnyös angiogenezis gátló szer a sejtekhez kötődő $\alpha_v\beta_3$ integrin valamely antagonistája. A találmány szerinti eljárásban alkalmazható $\alpha_v\beta_3$ antagonista olyan, amely gátolni képes az angiogenezist a szövethez társult tumorban vagy tumor áttételekben, amikor bevezetjük

a megcélzott szövetbe vagy sejtekbe. Az ilyen antagonisták lehetnek egyedi lineáris- vagy ciklo-poliipeptidek, lineáris- vagy ciklo-RGD-tartalmú poliipeptidek, antitestek, vagy $\alpha_v\beta_3$ utánzó, amelyek az $\alpha_v\beta_3$ receptorhoz kötődnek és gátolják az angiogenezist.

Amikor az $\alpha_v\beta_3$ antagonista valamely antitest, figyelembe vesszük, hogy az lehet poliklonális, monoklonális, vagy ennek valamely antigén kötő fragmentuma, amelynek antigén kötő kapacitása van $\alpha_v\beta_3$ -ra vagy az $\alpha_v\beta_3$ receptorra. Egy előnyös monoklonális antitest, amely kötődik az $\alpha_v\beta_3$ integrinre, az LM609-ként azonosított monoklonális antitest (ATCC HB 9537).

Egy előnyös angiogenezis gátló szer egy olyan poliipeptid, amely egy $\alpha_v\beta_3$ receptor antagonista; ez gátolni képes az integrin receptort a célsejteken. Az $\alpha_v\beta_3$ antagonista legelőnyösebb kiviteli formája a szintetikus RGD-tartalmú peptid, a ciklo (RGDfN-MeV) (SEQ ID NO: 11), és hasonló. Ilyen általános típusú ciklusos peptideket írnak le az 5,262,520 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban (Plow és munkatársai). Nem-RGD tartalmú peptideket írnak le az 5,780,426 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban (Palladino és munkatársai).

Egy tumorellenes immunterápiás szer, amely alkalmas a találmány szerinti eljárásban való felhasználáshoz, egy olyan immunterápiás szer, amely tartalmaz egy sejt effektor alkotórészt, egyesítve egy tumorról társult antigént célzó alkotórésszel. A megfelelő sejt effektor alkotórészek magukban foglalhatnak citotoxikus kémiai anyagokat, citotoxikus radioizotópokat és sejt-jelölő szereket, például citokineket.

Megfelelő tumort becélzó alkotórészek olyan poliipeptid láncok, amelyek kötődnek tumorról társult antigénekkel; ezek valamely tumorsejtet körülvevő szöveti mátrixon vagy mátrixban vannak jelen; ilyenek a receptor fehérje láncok vagy immunglobulin láncok.



A tumorral társult antigének, amelyek immunterápiás szerek célpontjaihoz alkalmazhatók, között találhatók azok a tumorral társult antigének, amelyek az alábbiak közül kerülnek ki: AFP, CA 125, CEA, CD19, CD20, CD44, CD45, EGF receptor, GD₂, GD₃, GM1, GM2, Her-2/Neu, Ep-CAM (KSA), IL-2 receptor, Lewis-Y, Lewis-X (CD15), melanómával társult MCSP proteoglikán, PSA és transzferrin receptor.

Az előnyös immunterápiás szernek olyan effektor alkotórésze van, amely egy citokin polipeptid csatlakoztatva a becélzó alkotórészhez, amely valamely immunglobulin (Ig) polipeptid lánc. Az Ig polipeptid lánc tartalmaz egy változó területet, amely kötődik egy tumorral társult antigénhez. Előnyös, ha az említett immunglobulin lánc, amikor kombinálódik a megfelelő komplementer láncsal (vagyis egy nehéz lánc kiegészít egy könnyű láncot), meghatároz egy antitest aktív helyet, amely fajlagos egy tumorral társult antigénhez.

Az immunterápiás szer tumor becélzó Ig része tartalmazhat egy teljes immunglobulin lánc aminosav szekvenciát, vagy legalább egy olyan fragmentumát, amely tartalmazza a fehérje antigén kötő fajlagosságú részét. Így egy megfelelő Ig polipeptid láncnak van legalább egy Ig változó területe, amely fajlagos egy tumorral társult antigénhez.

Egy antitest és ebből polipeptid láncok, amelyek alkalmasak felhasználásra a találmány szerinti eljárásokban, olyan aminosav-szekvenciával bírnak, amely lehet emlős eredetű. Amikor egy ilyen antitest fehérje nem azonos eredetű, mint a szóban forgó beteg, az antitest fehérje fragmentumai, mint az F(ab')₂, Fab, Fv vagy manipulált Fv egyedi lánc antitest fehérje, alkalmazhatók. Abból a célból, hogy tovább csökkentsük az antitest fehérje antigenicitását, végrehajtható az antitest aminosav szekvenciájának módosítása, hogy ezt csökkentsük, és így a fehérjét sokkal hasonlóbbá tegyük a beteg normális antitest alkotórészeihez. Így például a monoklonális rágcsló antitest aminosav-



szekvenciák módosíthatók, hogy inkább emberi jellegűnek tűnjenek az emberi betegekbe való beavatkozáshoz; az antitestek humanizálásának sokféle munkamenete áll ehhez rendelkezésre.

Egy másik megoldás szerint az antitest lehet humán eredetű (genetikailag kódolt humán Ig gének által), de transzgenikus állatokban termelődik, amely állatok úgy vannak transzformálva, hogy a humán Ig gént expresszáljuk saját natív Ig génjeik helyett. Így például transzgenikus egerek alakíthatók ki, amelyek humán eredetű, humán Ig fehérjét kódoló DNS-eket expresszálnak. Monoklonális antitestek kialakítása ilyen transzgenikus egerekből rágszáló B sejt hibridómákat eredményez, amelyek humán eredetű aminosav-szekvenciákkal bíró antitesteket kódoló humán DNS-eket expresszálnak. Ez nagymértékben csökkenti az ilyen antitestek immungenicitását az emberi betegekben való felhasználáshoz.

Az emberi betegek kezelésére előnyös antitestek a találmány szerint igényelt eljárásban való felhasználáshoz a humanizált anti-GD2 tumorról társult antigén ch14.18 monoklonális antitestje és az anti-KS1/4 tumorról társult antigén (amely ismert Ep-CAM-ként és KSA-ként is) KS1/4 monoklonális antitestje.

Egy immunterápiás szer, amely alkalmas az eljárásban való felhasználáshoz, kompozíciókhoz és készletekhez, sejt effektor alkotórésze a találmány szerinti kiviteli formákban és módokban az alábbi citokinek valamelyike: BDNF, CNTF, EGF, Epo, FGF, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, I-309/TCA-3, γ -IP-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, LT, MCP-1, MCP-2, MCP-3, M-CSF, MIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NGF, NT-3, NT-4, OSM, PBP, PBSF, PGFD, PF-4, RANTES, SCF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , Tpo és VEGF. Megfelelő citokinek, amelyek kemokin jellegűek, az alábbiak közül választhatók:

C10, EMF-1, ENA-78, eotaxin, GCP-2, HCC-1, I-309, IL-8, IP-10, limfotaktin, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MGSA, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NAP-2, PF4, RANTES, SCM-1 és SDF-1. Az előzőekben említett immunterápiás szerek citokin része lehet a teljes citokin fehérje aminosav-szekvencia, vagy lehet egy ilyen fúziós fehérje valamely fragmentuma, amely alkalmas arra, hogy citokin-fajlagos biológiai választ váltson ki.

Egy előnyös kiviteli formában az immunterápiás szer citokin része az IL-2 biológiai aktivitásával bír.

Egy citokin polipeptidet egy Ig polipeptidhez kötve tartalmazó immunterápiás szerben egy megfelelő csatlakozás a citokin polipeptid lánc és egy Ig polipeptid lánc között magában foglalhat egy közvetlen polipeptid kötést, egy olyan csatlakozást, amely valamely polipeptid kapcsolóval (linkerrel) bír a két lánc között, vagy más kémiai kapcsolattal bír a láncok között, ide értve a biotinilezés és az avidin-biotin komplex alkalmazását. Előnyös csatlakozás vagy egy közvetlen csatlakozás, vagy egy polipeptid csatlakozóval történő csatlakozás, amely térközt biztosít a polipeptid láncok között. Ez a közvetlen kapcsolás lehetővé teszi az immunterápiás szer expresszióját egyedi fúziós fehérjeként egy olyan gazdasejtből, amely transzformálva van a fúziós fehérje immunterápiás szert kódoló megfelelő expressziós vektorral.

Így egy előnyös immunterápiás szer a találmány szerinti eljárásokban való alkalmazásokhoz egy kétfunkciós fúziós fehérje, amelynek van egy citokin alkotórésze és egy tumorról társult antigénre célzó alkotórésze, ahol a célzó alkotórész valamely Ig polipeptid lánc, amely fajlagos egy tumorról társult antigénre. Az ilyen előnyös immunterápiás szerekre példák lehetnek a GD2-re célzott ch14.18-IL-2 fúziós fehérje, és a KS1/4 tumorról társult antigénre (amely Ep-CAM-ként és KSA-ként is ismeretes) célzott KS1/4-IL-2 fúziós fehérje.



Egy másik megoldás szerint egy, a találmány szerinti eljárásokban, kompozíciókban és készletekben való felhasználásra alkalmas immunterápiás szer rendelkezhet valamely sejt effektor alkotórésszel, amely valamely citotoxikus szer. A megfelelő citotoxikus szer olyan, amelynek közvetlen citotoxikus hatása van a tumorsejtre, vagyis ezek immuntoxinok, radioizotópok, citotoxikus gyógyszerek, és hasonlóak. Az előzőekben leírt citokin immunterápiás szerekhez hasonlóan a citotoxikus peptidek csatlakoztatva lehetnek a tumorról társult antigént becélzó Ig polipeptidhez fúziós fehérjét alakítva ki vagy közvetlenül, vagy térközzel egy kapcsoló peptid vagy lánc révén. A kémiai citotoxinok kémiai kapcsolása a becélzó Ig láncokhoz szintén elvégezhető. Lehet megalkotni radioaktív izotópokat hordozó antitesteket is.

A találmány egy másik szempontja szerint körülölel egy gyógyászati kompozíciót, amely tartalmaz egy angiogenezist gátló szert és egy tumorellenes immunterápiás szert. Előnyös, ha a tumorellenes immunterápiás szer becélazza a tumort vagy tumor áttétel sejteket, mivel rendelkezik egy tumorról társult antigén fajlagosságú alkotórésszel egy sejt effektor alkotórészhez kapcsolva. Egy találmány szerinti előnyös gyógyászati kompozícióban a tumorellenes immunterápiás szer valamely kétfunkciós fehérje; ez olyan effektor alkotórésszel bír, amely valamely citokin polipeptid egy tumor becélzó alkotórésszel összekapcsolva, és ez egy immunglobulin (Ig) polipeptid lánc, ahol az említett Ig lánc tartalmaz egy olyan változó területet, amely kötődik egy tumorról társult antigénhez.

A találmány egy még további szempontja szerint valamely készlet tumor vagy tumor áttételek kezelésére. A készlet egy csomagot tartalmaz; ez tartalmaz egy angiogenezist gátló szert, például $\alpha_v\beta_3$ antagonistát, amely képes gátolni az angiogenezist az említett tumorban vagy említett tumor áttételekben; tartalmaz továbbá valamely kétfunkciós

fehérje alkotórészt, amelynek citokin aktivitása és tumor antigén fajlagossága van; és tartalmaz útmutatásokat tumorsejtek kezelésére tumorokban és tumor áttételekben. A készlet tartalmazhat még speciális jelöléseket is, amelyek jelzik a készlet alkotórészeinek felhasználását tumorok vagy tumor áttételek kezelésénél.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat.

A találmány előnyös kiviteli formáit és módjait ismertetjük a továbbiakban utalva a mellékelt ábrákra.

Az 1. ábra grafikusán mutatja be egy kombinált terápia hatását anti-angiogén α_v integrin antagonistával és tumorellenes, területre fajlagos immunterápiával antitest-IL-2 fúziós fehérjével primer tumorokon. Az 1A. ábra mutatja be az eredményeket NXS2 neuroblasztóma szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból. Az 1B. ábra eredményeket mutat be CT26-KSA vastagbél karcinóma szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból. Az 1C. ábra eredményeket mutat be B78-D 14 melanóma sejtek szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból.

A 2. ábra grafikusán ábrázolja a kombinált antivaszkuláris és antitumor terápia hatását a vaszkularizálásra és tumorellenes immunválaszra. A 2A. ábra eredményeket mutat be a primer tumorok véredény sűrűségére vaszkuláris és tumor terület kezelést követően α_v integrin antagonistával, ch14.18-IL-2 fúziós fehérjével és ezek kombinációjával (* $P < 0,001$; Student-féle T-teszt). A 2B. ábra bemutatja az eredményeket a primer tumorok leukocita beszűrődéshez vaszkuláris illetve tumor terület kezelése után (* $P < 0,001$; Student-féle T-teszt).

A 3. ábra grafikusán ábrázolja az anti-angiogén α_v integrin antagonista és a tumorellenes terület-fajlagos immunterápia egymás utáni kombinációjának hatását antitest-IL-2 fúziós fehérjével spontán máj neuroblasztóma áttételeken. A spontán máj áttételek számát a máj

gócok makroszkópos számlálásával határozzuk meg (n=8) (**P<0,01; Wilcoxon rangsor összesítő vizsgálat).

A 4. ábra grafikusan ábrázolja az anti-angiogén α_v integrin antagonistá és tumorellenes terület-fajlagos immunterápia lényegében együttes kombinációjának hatását antitest-IL-2 fúziós fehérjével spontán máj neuroblasztóma áttételeken. Az eredményeket mutatjuk be az integrinnel vagy antagonistával (17,5 μ g/h) és tumor-fajlagos ch14.18-IL-2 fúziós fehérjével (5 μ g $\times$ 5) történő kezelésből a primer tumor eltávolítása előtt (4A. ábra) vagy után (4B. ábra) beindítva. A spontán máj áttételeket a máj góccok makroszkópos megszámlálásával határozzuk meg (n=8) (*P<0,01; Wilcoxon rangsor összesítő vizsgálat).

Az alábbiakban részletesen leírjuk a találmányt.

A primer tumorok és távoli áttételek visszaszorítása és kiirtása a rák alternatív kezelési stratégiájának fő célja, ilyen az angiogenezis gátlása és a célzott immunterápia.

Arra jöttünk rá, hogy váratlan szinergizmus létezik a hatékonyságban tumorsejtek kezelésénél tumorokban és tumor áttételekben két terápiás módozat kombinált alkalmazásával, amely két módozatra a következőképpen utalunk: (1) (anti-angiogén) angiogenezis gátló terápia; és (2) tumorellenes terápia. Elsősorban a kombinált α_v antagonistá terápiát és tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérje terápiát írjuk le.

Arra jöttünk rá, hogy szinergizmus lép fel két egyedi monoterápia között, amely vaszkuláris illetve tumor terület ellen irányul; pontosabban egy tumor érrendszer-fajlagos anti-angiogén α_v integrin antagonistá és tumor-fajlagos antitest-interleukin-2 fúziós fehérjék között.

Ezeknek a monoterápiáknak szimultán és egymás utáni kombinációja hatékonyan kiirtja a spontán máj áttételeket neuroblasztóma gyengén immunogén szingenikus modelljében. Ez

ellentétben van a monoterápiáknak kitett kontrollokkal, legyen ez a kontroll akár anti-angiogén integrin α_v antagonistá, akár antitest-IL-2 fúziós fehérje, amelyek csak részben hatékonyak az alkalmazott dózisszinteknél.

Ezen kívül a szimultán kezelés az α_v integrin antagonistával és a tumor-fajlagos antitest-IL-2 fúziós fehérjével drámai primer tumor visszaszorulást indukál három szingenikus rágcsáló tumor modellben, vagyis melanóma, vastagbél karcinóma és neuroblasztóma modellben. Amikor azonban az egyes szereket monoterápiás szerekként alkalmazzuk egymagukban, csak némi késleltetés indukálódik a tumor növekedésben.

A tumorelles választ társul egyidejű 50%-os csökkenéssel a tumor véredény sűrűségben és ötszörös növekedéssel a gyulladásos sejtekben a tumor mikrokörnyezetében. Ezen kívül tumor elhalás (nekrózis) csak olyan állatokban mutatható ki, amelyek kombinált terápiát kapnak, de azoknál viszont nem, amelyek az egyes szereket csak monoterápiaként kapják. Az eredmények azt mutatják, hogy ezek a szinergista kezelési módok új és hatékony eszközt biztosítanak az áttételes rák jövőbeli terápiáihoz.

A találmány eljárásokat ír le tumorok és tumor áttételek kezelésére, továbbá gyógyászati kompozíciókat és gyógyászati készleteket (csomagolt rendszereket), amelyek használhatók az itt leírt szinergista terápiák gyakorlati kivitelezéséhez.

1. Gyógyászati kompozíciók

Sokféle gyógyászati kompozíciót írunk le, amelyek alkalmasak a találmány szerinti eljárások gyakorlati kivitelezéséhez. A kompozíciók magukban foglalnak (anti-angiogén) angiogenezis gátló reagenseket, például $\alpha_v\beta_3$ antagonistákat, és tumorelles szereket, például tumor

antigén/citokin fúziós fehérjéket vagy önmagukban vagy különböző kombinációkban.

A. Angiogenezis gátlók

Angiogenezis gátlókat (inhibitorokat), amelyek gátolják az angiogenezist az ezekkel kezelt szövetekben, lehet alkalmazni a találmány szerinti kompozíciókban és eljárásokban. Egy előnyös angiogenezis gátló egy α_v antagonista, különösen egy $\alpha_v\beta_3$ antagonista. Egy angiogenezis gátló (anti-angiogén) $\alpha_v\beta_3$ antagonista lehet peptid, RGD-tartalmú peptid, anti- $\alpha_v\beta_3$ antitest, anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor antitest, vagy $\alpha_v\beta_3$ utánzó. Az $\alpha_v\beta_3$ antitestekre példák találhatók az 5,753,230 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban (Brooks és Cheresch) és az 5,766,591 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban (Brooks és Cheresch), ezeknek azon leírási részei, amelyek $\alpha_v\beta_3$ antagonisták elkészítésére és alkalmazására vonatkoznak, speciálisan referenciaként beépülnek a jelen bejelentésbe.

Előnyös antagonisták az RGD-tartalmú peptidek, mint például a ciklo(RGDfN-MeV) ciklusos peptid (SEQ ID NO: 11). Az irodalomban leírnak további antagonistákat is, ide értve a szerves utánzó anyagokat, és nem-RGD tartalmú ciklusos peptideket, amelyek $\alpha_v\beta_3$ antagonistaként működnek. Ezzel kapcsolatban tanulmányozható a WO 97/45137 számú PCT közzétételi irat (PCT/US97/09158) (Brooks és munkatársai).

Az antagonistaként való felhasználáshoz alkalmas $\alpha_v\beta_3$ antagonisták azonosítására szolgáló vizsgálatok le vannak írva az említett amerikai egyesült államokbeli szabadalmakban, ennél fogva úgy lehet tekinteni, hogy a különböző antagonistákat könnyű azonosítani a találmány gyakorlati kivitelezéséhez.

A megfelelő anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitesteket úgy lehet módosítani, hogy körülöleljék antigén kötő fragmentumaikat, ide értve a $F(ab)_2$ -t, Fab-t, és a manipulált Fv-t vagy egyláncos antitestet [single-

chain antibody (SCA)]. Az ilyen fragmentumok előállítási eljárásai a szakirodalomban jól ismertek [ilyenek találhatók például Hermanson G. T. szakkönyvében: *Bioconjugate Techniques*, Academic Press (1996)]. A találmány szerinti eljárások, amelyek leírják az antitestek alkalmazását, szintén tartalmazzák a teljes antitest megfelelő módosítását antigén-kötő fragmentumaikká. Egy megfelelő monoklonális antitestet LM609-ként azonosítunk (ATCC HB 9537).

Más $\alpha_v\beta_3$ receptor antagonistákról is kimutatták, hogy hatékonyak angiogenezis gátlásában, és alkalmasak lehetnek a találmány szerinti eljárásokban való felhasználásra. Így például kémiai receptor antagonistákat, például az (S)-10,11-dihidro-3-[3-(piridin-2-il-amino)-1-propil-oxi]-5H-dibenzo[a,d]cikloheptén-10-ecetsavat (amely SB-265123-ként ismeretes), megvizsgálták sokféle emlős modell rendszerben [lásd például Keenan R. M. és munkatársai: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8** (22), 3171-6 (1998); Ward K. W. és munkatársai: *Drug Metab. Dispos.* **27** (11), 1232-41 (1999)].

Az érrendszeri endoteliális növekedési faktort [Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)] úgy azonosították, mint szelektív angiogén növekedési faktort. Így egy alternatív vagy további angiogenezis gátló szer lehet valamely VEGF aktivitású inhibitor, amely alkalmas az angiogén növekedés gátlására. Egy ilyen inhibitor lehet valamely versengő inhibitor vagy egy VEGF kötő/inaktiváló molekula, vagy egy VEGF receptor antagonista. Így például lehetséges inhibitorok lehetnek VEGF nem-angiogén kémiai utánzói, hogy versengjenek a VEGF cél/receptorhoz való kötésért, lehetnek módosított nem-angiogén VEGF származékok, lehetnek antitestek, amelyek fajlagosan kötődnek VEGF-hez olyan alkalmas módon, hogy gátolják az angiogén aktivitást, vagy lehetnek esetleg további fajlagos fehérjék, amelyek kötődnek VEGF-hez (például izolált VEGF receptor fehérje), vagy lehetnek antitestek,

amelyek VEGF receptorhoz kötődnek és blokkolják a kölcsönhatást VEGF-fel.

Más vegyületeket és anyagokat is azonosítottak a vegyületek és anyagok azon képessége alapján, hogy gátolják az angiogenezist, így például az izolált tumorhoz társult PSA antigént.

B. Tumorellenes immunterápia

A találmány szerinti eljárásokban való felhasználásra szolgáló eljárások és kompozíciók célul tűzik ki legalább egy (anti-angiogén) angiogenezis gátló terápiás szer kombinált beadását legalább egy tumorellenes immunterápiás szerrel együtt. Az előnyös tumorellenes immunterápiás szer kombinál egy tumor becélzó alkotórészt valamely sejt effektor alkotórésszel, például citokinnel, immunotoxinnal, radioaktív szerrel és hasonlókkal. A tumor becélzó alkotórész előnyösen tartalmazza egy antitest legalább egy antigén kötő részét egy tumoral társult antigénre irányítva. Az egyik előnyös kiviteli módban az effektor alkotórész valamely citokin.

a) Tumoral társult antigének

A tumoral társult antigének azok a célpontok, amelyek révén az immunterápiás szer a találmány szerinti eljárásokban, kompozíciókban és készletekben való alkalmazásnál végül megcélozza a tumorsejteket. A tumoral társult antigénekről a szakterületen ismert, hogy korrelációban vannak bizonyos típusú rákokkal. Az összes eset legtöbbszörében a tumoral társult antigének sejtfelületi antigének; ezek olyan módon expresszálódnak, amely normálisan nem található meg a rák tumorok eredete körüli társult normális sejteknél. Más tumoral társult antigének olyan molekulákat vagy extracelluláris mátrix-rokon alkotórészeket választanak ki, amelyek normálisan nem találhatók meg az érett normális szövetel társulva.

Bizonyos tumorra társult antigének fehérjék, amelyek a szövet korai fejlődési stádiumaiban expresszálódnak és normálisan nem társulnak az érett szövetekkel (ezeket néha onkofetális fehérjéknek nevezik). Más tumorra társult antigéneket normál érett sejtek expresszálnak ugyan, de a ráksejtek nagyobb mennyiségben expresszálnak. A tumorra társult antigének lehetnek a normálisan expresszált sejt markerek vagy extracelluláris alkotórészek mutált formái. Még további tumorra társult antigének vonatkozhatnak fehérjék, lipidek vagy extracelluláris alkotórészek glikozilezésének megváltozott vagy szokatlan formáira, vagy új szénhidrát részekre.

Így a tumorra társult antigének széles körben változhatnak és legalábbis részben meghatározzák a jelen találmány szerint kezelendő tumor típusát. A tumor típusok és tumor antigének, amelyek expresszálódnak, változatossága nagyfokú, és még továbbra is tanulmányozott a rák szakterületén.

Tumorerók sok további markere van tanulmányozás alatt, és amikor valamit azonosítanak és jellemeznek tumorra társult antigénként, ezek is megfelelő cél antigének immunterápiás szerek becélzásához egy kívánt tumor- vagy áttétel helyhez.

A génterápiás vektorok becélzásáról ráksejtekbe már beszámoltak anti-Lewis-Y antigén monoklonális antitesteket alkalmazva [Kurane S. és munkatársai: Jpn. J. Cancer Res. 89 (11), 1212-9 (1998)]. Hasonlóképpen beszámoltak liposzómák becélzásáról anti-gangliozid GM3 antitestet vagy anti-Lewis-X antigén antitestet alkalmazva [Nam S. M. és munkatársai: Oncol. Res. 11 (1), 9-16 (1999)].

Ahogy a későbbiekben megtárgyaljuk, a szakterületen ismeretesek eljárások azonosított antigének kihasználására megfelelő antitestek kialakítására, amelyek fajlagosan kötődnek ehhez az antigénhez. Ilyen módon tumor antigéneket lehet azonosítani és



monoklonális antitesteket lehet készíteni, amelyek használhatók a jelen bejelentésben. Tumor antigének készítésének összefoglalását adja meg az alábbi szakkönyvben található kitanítás: Human Cancer Markers; kiadó: The Humana Press Inc.; szerkesztők: Sell és Wahren (1982). Antigének és/vagy citokinek és hasonlók előállításához alkalmas standard biokémiai és molekulárbiológiai technikák találhatók például Sambrook és munkatársai szakkönyvében: Molecular Cloning, 2. kiadás; kiadó: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, Amerikai Egyesült Államok (1989).

A tumorsejt felületi antigének fajlagosak lehetnek a tumor valamely osztályára, vagy egy tumor egyedi típusára. Sok nukleinsav és/vagy aminosav szekvencia, amely tumorról társult antigénekre vonatkozik és kódolja azokat, áll rendelkezésre publikus számítógépes adatbázisokból, amelyek Internet révén is hozzáférhetők különböző szolgáltatók segítségével, elsősorban az NCBI-től (National Center for Biotechnology Information; www3.ncbi.nlm.nih.gov), ezek az adatok általában névvel és hozzáférési számmal azonosíthatók (néhány, nem korlátozó jellegű példában, a hozzáférhető szekvencia típusokról való információkban ezekre az alábbi formában utalunk: „hozzáférési szám”).

Az előnyös tumorról társult antigén célpontokként, a korlátozás szándéka nélkül, megemlíjtük az alábbiakat: AFP (hozzáférési szám: NP 001125), CA125 (hozzáférési szám: NP 005890), CEA (hozzáférési szám: AAA62835), CD19 (hozzáférési szám: P15391), CD20 (hozzáférési szám: P11836), CD44 (hozzáférési szám: P16070), CD45 (hozzáférési szám: P08575), EGF receptor (hozzáférési szám: P00533), GD₂, GD₃, GM1, GM2, Her-2/Neu (hozzáférési szám: AAA58637), Ep-CAM (KSA) (hozzáférési szám: P16422, AAA36151), IL-2 receptor (hozzáférési szám: P14784, NP 000197, P01589), Lewis-Y, Lewis-X (CD 15), MCSP melanómával társult proteoglikán (hozzáférési szám: NP



001888), PSA (hozzáféresi szám: P07288), PMSA, transzferrin átvivő receptor (hozzáféresi szám: NP 003218, NP 003225, AAF04564), GA-733-1 hasnyálmirigy karcinóma jelző fehérje (Pancreatic Carcinoma Marker Protein) (hozzáféresi szám: P09758), folát receptor (hozzáféresi szám: NP 000793), L6 (hozzáféresi szám: P30408), és CO-029 (hozzáféresi szám: A36056, P19075).

Különösen előnyös tumorral társult antigén célpontok az immunterápiás szerek becélzásához a GD₂ és a KSA (Ep-CAM; KS1/4 antigén), amint ezt itt leírjuk.

Tumorral társult antigén fehérjék kereskedelmi forgalomban kaphatók vagy kialakíthatók standard rekombináns DNS, sejttenyésztő, és fehérje expresszási technikákkal, amelyek a szakterületen jól ismertek. Így például a Sigma cég (St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) kereskedelmi listáján szerepelnek az alábbiak: GD2 diszialogangliozid (G 0776), GD3 diszialogangliozid (G 5904), GM1 monoszialogangliozid (G 7641), GM2 monoszialogangliozid (G 4651), Ca 19-9 gyomor- és bélrendszeri tumor antigén (Gastrointestinal Tumor Antigen) (G 8660, G 8535), CEA karcinoembrionális antigén (C4835), Lewis-X triszacharid (L 5152) és Lewis-Y (L 7401).

Kereskedelmi forgalomban kaphatók olyan antitestek, amelyek fajlagosak sokra ezek közül a tumorral társult antigének közül (például az USB, RDI, Accurate Chemical and Scientific Corp., Zymed Lab cégektől). Így például a Sigma cég (St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) sokféle monoklonális antitestet hoz forgalomba, ilyenek az anti-AFP (A 8452), anti-CEA (C2331), anti-EGF receptor (E 3138), anti-IL-2 oldható receptor (I 5652, I 5777, I 5902), anti-CD19 (F 3899), anti-CD20 (C8080), anti-CD44 (C7923), és anti-CD45 (C7556).

Még ha kereskedelmi forgalomban nem is kaphatók, a monoklonális antitestek készítésének ismert eljárásait alkalmazva



kialakíthatók tumorral társult antigénekre fajlagos antitestek, immunogénként az antigént alkalmazva. Így például leírták az anti-Lewis-Y antigén rágcsló antitest nehéz és könnyű lánc változó doméneket (hozzáférési szám: AAB25798 és AAB25799). Hasonlóképpen leírták az anti-asialo GM1 gangliozid rágcsló antitest nehéz és könnyű lánc változó doméneket (hozzáférési szám: AAD09194 és AAD09195). Megoldották a kristályszerkezetet egy anti-GD2 gangliozid monoklonális antitest nehéz és könnyű lánchoz (hozzáférési szám: 2554841, 2554842). Beszámoltak olyan antitestekről, amelyek megkötik a folát receptort (kötő fehérje), ezt markerként azonosították petefészek rákhoz (hozzáférési szám: NP 000793). Beszámoltak anti-CA125 monoklonális változó terület nehéz és könnyű lánc nukleinsav szekvenciáról, és ezt felhasználták beiktatásra egy kazetta vektorba (hozzáférési szám: AAB33454, 33455).

Különösen előnyös antitestek az itt leírt ch14.18 és KS1/4 antitestek.

b) Monoklonális antitestek és antigén kötő részeik és hasonló

Amióta a monoklonális antitestek kialakítási eljárásainak hajnalán erről Kohler és Milstein először beszámolt, a szakterületen számos javított eljárás vált ismeretessé [lásd például az alábbi szakkönyveket: Methods in Molecular Biology, 80. kötet: Immunochemical Protocols, 2. kiadás (szerkesztő: Pound J. D., kiadó: Humana Press, Inc. Totowa, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok, 1998), ezen belül a 4. fejezet (Dean C. J.); és Short Protocols in Molecular Biology, 2. kiadás (kiadó: John Wiley and Sons, New York, New York, Amerikai Egyesült Államok, 1992), ezen belül a 11. fejezet (Current Protocols, szerkesztők: Ausubel F. M. és munkatársai)]. Ma már rutinfeladat olyan monoklonális antitesteket kialakítani, amelyek egy adott antigénhez kötődnek. Az



átvizsgálási (screening) munkamenetek szintén javultak a nagy affinitású kötő antigének kiválasztására, ha ezek kívánatosak.

A hibridómák kialakításának gazdaszervezetei általában egér- vagy más rágcsáló eredetűek.

Az egyik gát a rágcsáló monoklonális antitestekkel történő ismételt kezeléshez emberi betegekben a HAMA [humán anti-egér antitestek (human anti-mouse antibodies)] kialakulása, amelyet a beteg alakít ki a kezelésre adott válaszként. Azok között az eljárások között, amelyekkel megkísérlik leküzdeni ezt a gátat, találhatók a rágcsáló antitest fehérjék humanizálása az egér fehérje antigén aminosavak helyettesítésével emberi fehérje szekvenciákkal, amelyekről feltételezhetők, hogy kevésbé antigének. További eljárások lehetnek a kötő fajlagosságot meghatározó aminosav gyökök vagy területek beültetése humán fehérje keretekbe.

Az a képesség, hogy antitest fehérje expresszáldjék fág bemutatási rendszerekben, lehetővé teszi olyan antitestek kiválasztását, amelyek mutagenézisen estek át vagy azért, hogy javítsák kötésüket, vagy azért, hogy csökkentsék immunogenicitásukat [lásd például az alábbi szakkönyveket: Antibody Engineering (szerkesztők: McCafferty és munkatársai; kiadó: Oxford University Press (1996))]. Jelenleg a humán immunglobulin gének helyettesítése transzgenikus egerekbe lehetővé teszi rágcsáló gazdaszervezetek felhasználását antitestek kialakítására, és így olyan monoklonális antitestek kialakítására, amelyek humán nukleinsav szekvencia eredetűek.

Az antitestek csökkenthetők méretükben is fragmentálással, hogy lehetővé váljék a csökkentett antigenicitás, vagy kisebb terápiás molekulák legyenek megalkothatók. Így például egy teljes antitest fehérje csökkenthető vagy emésztéssel a megfelelő enzimek segítségével, vagy kisebb fehérjék kialakításával rekombináns DNS eljárásokkal. A megfelelő fragmentumok között olyanok találhatók, amelyek

tartalmazzák a teljes molekula legalább egy antigén kötő részét, ezek között lehetnek a Fab, F(ab)₂, F(ab)₃, Fv vagy egyedi láncos Fv [egyedi láncos antitest (single chain antibody, SCA)] konstrukciók.

Fel kell idéznünk, hogy minden monoklonális antitest, amely gyógyászati szerek alkotórészeit képezi a találmány szerinti eljárásokban való felhasználásra emberek kezelésére, előnyt szerezhethet a módosítás lehetőségéből az immunogenitás és a lehetséges HAMA csökkentésére, amint ezt az előzőekben leírtuk.

Lehetséges hasznosítani fajlagos receptor fehérjét is, amelyek fajlagosan kötődhetnek egy adott tumorra társult antigénhez; ezek az előzőekben leírt immunterápiás szerek becélzó alkotórészei lehetnek. Működését tekintve egy fajlagos receptor éppen olyan alkalmas, mint egy fajlagos antitest a becélzáshoz a receptor fajlagosságától és affinitásától függően a cél tumorra társult antigénhez. Gondot kell fordítani arra, hogy minimalizáljuk a kereszt-reaktív kötés befolyását hasonló fehérjékre, amelyek nem szükségszerűen tumorra társultak.

c) Citokinek

Az egyik kiviteli formájában a találmány szerinti tumorellenes immunterápiás konstrukciók magukba építenek egy sejt effektor részt, amely előnyösen valamely citokin.

A találmány szerinti tumorellenes terápiás szerek effektor alkotórésze tartalmazhatja sokféle citokin bármelyikét citokin-fajlagos biológiai válasz indukálására olyan sejtek által, amelyek a citokin receptorait hordozzák. A citokinek jól jellemzett anyagok, ennél fogva a találmányt nem kívánjuk egy-egy citokinre korlátozni. A citokinek magukba foglalják a kemokineként ismert molekulákat egyik alosztályként. A jelen találmány összefüggésében a kemokinek a citokin szupercsalád egyik tagjának tekintjük. Ennél fogva a citokin kifejezés, ahogyan itt használjuk, általában utal mind a citokinek, mind a

kemokinekre. A citokinek szakterületének leírására jól használható az alábbi szakkönyv: Callard és Gearing: The Cytokine Facts Book, kiadó: Academic Press, Inc. (1994). A kemokinek szakterületének leírására jól használható az alábbi szakkönyv: Vaddi és munkatársai: The Chemokine Facts Book, kiadó: Academic Press, Inc. (1997). Több, a citokinekkal kapcsolatos nukleinsav és/vagy aminosav szekvencia áll rendelkezésre a publikus adatbázisokban, amelyek Internet révén is hozzáférhetők különböző szolgáltatók segítségével, elsősorban az NCBI-től (National Center for Biotechnology Information; www3.ncbi.nlm.nih.gov), ezek az adatok általában névvel és hozzáférési számmal azonosíthatók (néhány, nem korlátozó jellegű példában az itt idézett szekvencia információk hozzáférhetőségére úgy utalunk a későbbiekben, mint azonosítható „hozzáférési szám”-ra).

A citokinek az emlősöknél fajspecifikusak lehetnek és változhatnak egy fajon belül is mutációnak és/vagy allél variációknak tulajdoníthatóan. A megfelelő citokinek a kezelendő emlős faja szerint választhatók ki a felhasználáshoz. Amikor többszörös allélek léteznek, a szelekciót a citokin aktivitás szerint lehet elvégezni, vagy allél variánsok keverékét lehet alkalmazni mint választék citokint. Így a találmány szerinti eljárások állatorvosi felhasználását meg lehet szabni a kezelendő állat fajokra, vagy szelekciót lehet kivitelezni közelebbi rokon fajok kiválasztott citokinjeiből, ha a cél fajból ilyen nem áll rendelkezésre. Az emberek kezelésénél előnyös, ha humán homológot alkalmazunk, amennyiben ez ismeretes.

A találmány szerinti felhasználáshoz alkalmas citokinek, a korlátozás szándéka nélkül, az alábbiak lehetnek: BDNF (hozzáférési szám: 4502393), CNTF (hozzáférési szám: 4758020), EGF (hozzáférési szám: p01133), Epo (hozzáférési szám: 4503589), FGF (hozzáférési szám: CAB61690), Flt3L és G-CSF (hozzáférési szám: CAA27290), GM-

CSF (hozzáférsi szám: 4503077), I-309/TCA-3 és γ -IP-10 (hozzáférsi szám: P02778), IFN- α (hozzáférsi szám: P01563), IFN- β (hozzáférsi szám: P01574), IFN- γ (hozzáférsi szám: P01579), IL-1-től IL-18-ig (hozzáférsi számok: P01583, P01584, P01585, P08700, P05112, P05113, P05231, P13232, P41324, P15248, P22301, P20809, P29459, P46658, P35225, P40222, P40933, Q14005, NP002181, Q14116), LIF (hozzáférsi szám: AAC05174), LT (hozzáférsi szám: 4504031), MCP-1, MCP-2, MCP-3, M-CSF (hozzáférsi szám: 4503075), MIF (hozzáférsi szám: 4505185), MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NGF (hozzáférsi szám: 4505391), NT-3 (hozzáférsi szám: P20783), NT-4 (hozzáférsi szám: P34130), OSM (hozzáférsi szám: P13725), PBP (hozzáférsi szám: 4505621), PBSF, PGFD, PF-4, RANTES, SCF (hozzáférsi szám: P21583), TGF- α (hozzáférsi szám: P01135), TGF- β (hozzáférsi szám: P01137), TNF- α (hozzáférsi szám: P01375), Tpo (hozzáférsi szám: P40225) és VEGF (hozzáférsi szám: AAD03710).

A találmány szerinti felhasználáshoz alkalmas kemokinek, a korlátozás szándéka nélkül, az alábbiak lehetnek: C10 (hozzáférsi szám: P33861), EMF-1 (hozzáférsi szám: P08317), ENA-78 (hozzáférsi szám: A55010), eotaxin (hozzáférsi szám: BAA84579), GCP-2 (hozzáférsi szám: P80162), HCC-1 (hozzáférsi szám: g1004267), I-309 (hozzáférsi szám: g4506833), IL-8 (hozzáférsi szám: AAA59158), IP-9 (hozzáférsi szám: CAA75510), IP-10 (hozzáférsi szám: 4504701), limfotaktin (hozzáférsi szám: 4506853), MCP-1 (hozzáférsi szám: 4506841), MCP-2 (hozzáférsi szám: P80075), MCP-3 (hozzáférsi szám: CAB59723.1), MCP-4 (hozzáférsi szám: Q99616), MGSA (hozzáférsi szám: P09341), MIG (hozzáférsi szám: P35625), MIP-1 α (hozzáférsi szám: P10855), MIP-1 β (hozzáférsi szám: P13236), MIP-2, NAP-2 (hozzáférsi szám: P20775), PF4 (hozzáférsi szám: 4505733), RANTES (hozzáférsi szám: 4506847),

SCM-1 (hozzáférési szám: P47992) és SDF-1 (hozzáférési szám: P48061). A találmányban való felhasználáshoz előnyös citokinek az IL-2 és IL-12, vagy biológiailag aktív fragmentumaik, amelyek megőrzik a teljes, ép molekula effektor aktivitásának legalább egy részét.

A találmányban való felhasználásra előnyös citokin az IL-2.

A megfelelő citokinek a találmány szerinti eljárásokban való alkalmazáshoz a megfelelő nukleinsav szekvenciákból készíthetők el standard molekulárbiológiai technikákat alkalmazva. A gén expresszióhoz való eljárások a szakterületen jól ismertek [lásd például Goeddel D. V. (szerkesztő) szakkönyvét, a Methods in Enzymology sorozat 185. kötetét: Gene Expression Technology (Academic Press, Inc., New York, New York, Amerikai Egyesült Államok)]. A citokinek rendelkezésre állnak kereskedelmi forrásokból is (elsősorban a Sigma cégtől, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok).

d) Tumorellenes/citokin immunterápiás szerek

Ezek a tumorellenes immunterápiás szerek, amelyek alkalmasak a találmány gyakorlati kivitelezéséhez, egy sejt-effektor alkotórészt építenek be, amely előnyösen valamely citokin egy tumor becélzó alkotórészhez kapcsolva. Egy tumor kötő alkotórész összekapcsolását az effektor alkotórésszel sokféle eljárással hajthatjuk végre.

1) Antitest fúziós fehérjék

Immunterápiás rákellenes reagenseket írtak már le, amelyek citokin funkciót céloznak be egy olyan sejthez vagy szövethez, amely tumor antigéneket visel, a citokin alkalmazásával így felerősítve egy immunválaszt olyan sejtek ellen, amelyek tumor antigént hordoznak vagy társultak a tumor antigénnel. Ezekre az immunterápiás szerekre úgy utalunk, mint tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérjékre, mivel a fúziós fehérje tartalmazza a citokin fúziós terméket egy rekombináns

immunglobulin (Ig) polipeptid láncsal, amely immun-reagál egy előre kiválasztott, tumorra társult antigénnel.

Ahogy itt használjuk, az immunterápiás tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérje szer kifejezés körülöleli a fúziós konstrukciókat antitest fehérje fragmentumok, amelyek tartalmazznak legalább egy antigén kötő részt, és citokinek között, amelyek tartalmazzák a citokin legalább egy effektor részét, amely elegendő ahhoz, hogy megőrizze a citokin biológiai jelző funkcióját. A találmány szerinti fúziós fehérjék lehetnek közvetlen kapcsolásúak vagy át lehetnek hidalva valamely peptid kapcsolóval vagy peptidekkel.

A szakterületen ismeretesek tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérjék, ilyenek vannak leírva elsősorban az 5,650,150 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban (Gillies), amelynek a fúziós fehérjék elkészítésével és alkalmazásával foglalkozó leírási részei referenciaként határozottan be vannak építve a jelen bejelentésbe.

A fúziós fehérjék irányulhatnak sokféle tumor antigén bármelyikére, amelyek sejtfelületi antigének, így a találmány semmiféleképpen nem kíván bármelyikre korlátozódni. Így például ismeretes egy citokint és egy Ig nehéz láncot alkalmazó fúziós fehérje előállítása, akár csak valamely monoklonális antitestből származó rekombináns Ig nehéz lánc előállítása. Ezen kívül a monoklonális antitestek előállítása is jól megalapozott a szakterületen, és ismeretes az is, hogyan lehet ilyen antitesteket előállítani tumor antigének ellen. Monoklonális antitestek előállítására vonatkozó kitanítások találhatók többek között az alábbi tankönyvben: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, szerkesztők: Reisfeld és Sell, kiadó: Alan R. Liss, Inc. (1985).

Az Ig polipeptid lánc tipikusan valamely Ig nehéz vagy könnyű lánc polipeptid, amely tartalmaz egy, valamely sejtfelületi tumor antigént hordozó sejtre fajlagos N-terminális változó területet. A fúziós fehérje

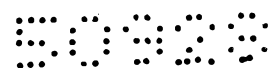


tipikusan rendelkezik az Ig polipeptiddel karboxi terminálisánál csatolva egy peptid kötés révén a citokin amino terminális aminosavához. Amikor az Ig polipeptid egy nehéz lánc, az Ig nehéz lánc továbbá tipikusan tartalmazza a CH1 és CH2 doméneket, és kívánt esetben tartalmazhat továbbá egy CH3 domént. Ha kívánatos, az ilyen konstans terület domén azonban ki lehet küszöbölve, hogy a létrejövő fúziós fehérje konstrukciónak csökkenjen az immunogenitása, mérete vagy nem-fajlagos kötése. Abból a célból, hogy megkönnyítsük a nehéz és könnyű lánc domén asszociációt, kívánatos lehet egy kapcsoló Fv molekulát megalkotni, ahol a nehéz lánc Fv össze lehet pányvázva egy könnyű lánc Fv-vel. A pányva az egyik lánc karboxi vége és a másik lánc amino terminális vége között feszül ki, és elég hosszú ahhoz, hogy ne változtassa meg drasztikusan az antigén kötő zsebet az újra-hajtogatási/domén asszociáció után.

Egy előnyös fúziós fehérje tartalmazza az IL-2 citokint és tartalmaz egy Ig nehéz láncot, amely immun-reagál a GD₂ tumoral társult antigénnel. Egy másik kiviteli formában egy előnyös fúziós fehérje tartalmazza az IL-2 citokint és tartalmaz egy Ig nehéz láncot, amely immun-reagál az Ep-CAM (ismeretes KSA, KS1/4 antigénként is) tumoral társult antigénnel. Ezen kiviteli formák fúziós fehérjeire példák lehetnek a későbbiekben leírt ch14.18-IL-2 illetve KS1/4-IL-2 fúziós fehérjék.

2) Antitest konjugátumok

Alternatív immunterápiás konstrukciók alkalmazhatók a találmány eljárásaiban és kompozícióiban. Így például a nagy affinitású biotin-avidin rendszert hasznosítva független biotinilezett fehérjék alkothatók meg, amelyek tartalmaznak egy tumoral társult antigénre fajlagos antitest láncot biotinhez (vagy avidinhez) kapcsolva, és egy citokint a megfelelő konjugátumhoz (avidin vagy biotin) kapcsolva, a



megfelelő kapcsolásokat alkalmazva. A felhasználáshoz egy biotinilezett antitest fehérje kombinálható a citokin fehérjével in vitro vagy in vivo a beadás előtt vagy után, hogy kétfunkciós immunterápiás szert alkossunk meg, amely rendelkezik egy tumor antigén kötő alkotórésszel és egy effektor citokin alkotórésszel a biotin-avidin komplex révén összekapcsolva.

Biotinilezett antitestek és fehérjék ismertek a szakterületen és előállíthatók kereskedelmi forgalomban kapható reagensek alkalmazásával. Egy biotinilezett tumor antigént becélzó antitest hasznosításának egyik vonása az, hogy a biotin molekulának többszörös avidin kötő helyei vannak, amelyek lehetővé teszik az effektor alkotórész, például egy avidinnel kötött citokin, nagyobb potenciálását az egyes kötött antitestekhez, vagy több, mint egy effektor alkotórész kombinált alkalmazását. Ismeretesek további közvetlen kémiai konjugációs eljárások és reagensek is a szakterületen, és ezek alkalmazhatók antitestek konjugálására effektor molekulákhoz vagy közvetlenül, vagy valamely köztes kapcsoló révén [lásd például Haugland és You közleményeit a Methods in Molecular Biology sorozat 80. kötetében, az Immunochemical Protocols című kötetben, illetve ennek 2. kiadásában (szerkesztő: Pound J. D., kiadó: Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok, 1998, 17. fejezet); lásd továbbá Hermanson G. T. szakkönyvét: Bioconjugate Techniques (kiadó: Academic Press, New York, New York, Amerikai Egyesült Államok, 1996)]. Így a találmány szerinti immunterápiás szerek körülölelik a biotinilezett konstrukciókat, ahogyan az előzőekben leírtuk, antitest fehérje fragmentumok, amelyek tartalmazznak legalább egy antigén kötő területet, és citokinek között, amelyek tartalmazzák a citokin legalább egy effektor részét, amely elegendő, hogy megőrizze a citokin biológiai jeladó funkcióját.

e) További immunterápiás szerek

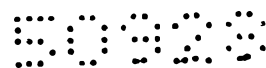
A találmány szerinti eljárásokban, kompozíciókban és készletekben való felhasználásra alkalmas tumorellenes immunterápiás szerek más kiviteli módjaiban és formáiban beépíthetnek olyan effektor molekulákat is, amelyek nem citokinek. Elképzelhető, hogy a sejt effektor alkotórész valamely toxin lehet vagy más módon tumorkárosító citotoxikus szer. További alkalmas tumorellenes terápiás szerek így magukban foglalhatnak konstrukciókat antitest fehérje fragmentumok, amelyek legalább egy antigén kötő részt tartalmaznak, és radioizotópok, immunotoxinok, citotoxikus peptidek vagy citotoxikus gyógyszerek között.

1) Radioaktívan jelölt antitestek

Olyan radioimmun-konjugátumokat, amelyek tumor becélzó monoklonális antitestet és radioaktívan jelzett izotópot tartalmaznak, is alkalmaznak rákellenes szerként. A monoklonális antitest antigén-kötő fajlagossága szolgáltatja a becélzó képességet, hogy lokalizálja a tumor helyeket, míg a radioaktív jelzés szolgáltatja a citotoxikus tulajdonságokat [lásd Hermanson G. T.: a Bioconjugate Techniques című szakkönyvben (Academic Press, New York, New York, Amerikai Egyesült Államok (1996), 8. fejezet]. Ezek a radioimmun-konjugátumok alkalmasak lehetnek tumorellenes terápiás szerként való felhasználásra a találmány szerinti eljárásokban.

2) Immunotoxin-antitest

Vizsgálták már monoklonális antitestek és sokféle forrásból származó fehérje toxinok konjugátumait tumorellenes kezelésekre [lásd Hermanson G. T.: a Bioconjugate Techniques című szakkönyvben (Academic Press, New York, New York, Amerikai Egyesült Államok



(1996), 8. fejezet]. Az ilyen konjugátumok alkalmasak lehetnek a találmány szerinti eljárásokban való felhasználásra.

3) Citotoxin-antitest gyógyszer

Monoklonális antitestek és kémiaiilag szintetizált és/vagy sokféle forrásból tisztított toxin gyógyszerek konjugátumai is alkalmazhatók tumorelles kezeléséhez [lásd Hermanson G. T.: a Bioconjugate Techniques című szakkönyvben (Academic Press, New York, New York, Amerikai Egyesült Államok (1996))]. Az ilyen konjugátumok alkalmasak lehetnek a találmány szerinti eljárásokban való felhasználáshoz.

4) Több fajlagosságú antitest

Az enzimes emésztéssel vagy a kódoló DNS szekvencia manipulálásával kialakított antitest fragmentumok manipulálása lehetővé teszi kettős fajlagosságú (bispecific) antitestek (BsAbs) létrehozását; ezek olyan hibrid molekulák, amelyek két, eltérő kötési fajlagosságú antitestet kombinálnak. Ezen a módon egy fajlagos kötés egy cél tumorhoz kombinálható valamely kötéssel egy celluláris effektor gyógyászati anyaggal (vagyis citokinnel, gyógyszerrel vagy toxinnal), hogy a kezelés a tumor sejtekre lokalizálódjon [ezzel kapcsolatban lásd French R. R. közleményét a Methods in Molecular Biology sorozat 80. kötetében, az Immunochemical Protocols című szakkönyv 2. kiadásában (szerkesztő: Pound J. D., kiadó: Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok, 1998, a 12. fejezetben)]. Az ilyen bi- vagy további többfunkciós antitestek alkalmasak lehetnek a találmány szerinti eljárásokban való alkalmazáshoz.

2. Terápiás eljárások

A találmány szerinti terápiás eljárások tumor sejtek kezelésére tumorokban és tumor áttételekben az angiogenezis gátló (anti-angiogén) terápia és a tumorelles immunterápia kombinált alkalmazásán



alapszanak. Több, mint egy típusú angiogenezis gátló szer alkalmazható több, mint egy típusú tumorellenes immunterápiás szerrel kombinálva. A kombinált alkalmazás történhet egyidejűleg vagy egymás után, vagy egy időköz beiktatásával a kezelések között. Bármelyik fajlagos terápiás szer beadható egynél többször a kezelés folyamán. A találmány szerinti eljárás szolgáltatja az angiogenezis gátló terápiás szerek és tumorellenes immunterápiás szerek kombinált alkalmazását, amely a tumorsejt burjánzás gátlási hatás szinergetikus potencírozását eredményezheti az egyedi terápiás szerekhez viszonyítva, hatékonyabb kezelést alakítva ki, mint amely az egyedi alkotórészek önmagukban történő beadásánál észlelhető. Így egyik szempontja szerint a találmány szerinti eljárás magában foglalja egy angiogenezis gátló szer és egy tumorellenes immunterápiás szer olyan mennyiségeinek beadását kombinációban egy betegbe, amely mennyiségek nem eredményeznének hatékony angiogenezis gátlást vagy tumorsejt elleni aktivitást, ha ebben a mennyiségben egyedül adnánk be ezeket.

A találmány szerinti eljárás magában foglalja módosulatok sokféleségét a találmány gyakorlati kivitelezésében, ami a lépéseket illeti. Így például az antagonista és a tumorellenes immunterápiás szer (például tumor antigén/citokin fúziós fehérje egy előnyös kiviteli formában) beadható az összekeverést követően, vagyis egyidejűleg, vagy be lehet adni egymás után, vagyis külön-külön. Ezen kívül az antagonista és a fúziós fehérje külön-külön bevezethető mintegy 3 hét időintervallumon belül a beadások között, vagyis lényegében az első aktív szer beadásától számítva azonnali beadástól akár a mintegy 3 hét múlva történő beadásig az első szer beadásától számítva beadható a második szer. Ezen kívül elképzelhető az is, hogy a sorrend változtatható, vagyis hogy az $\alpha_v\beta_3$ antagonistát bevezethetjük a fúziós fehérje beadása előtt, vagy a beadás végrehajtható fordított sorrendben.

Az egyik kiviteli módban a találmány szerinti eljárás körülöleli egy angiogenezis gátló szer, például egy $\alpha_v\beta_3$ antagonistá angioenezist gátló mennyiségének és egy tumorellenes immunterápiás szer biológiai válasz kiváltására alkalmas mennyiségének beadását valamely betegbe tumorok vagy áttételek kezelésének szükségessége esetén. Így például elegendő kiváltani egy citokin-fajlagos biológiai választ, ahol egy citokinnel és egy rekombináns immunglobulin (Ig) polipeptid láncsal bíró kétfunkciós fúziós fehérjéről van szó, ahol az Ig lánc tartalmaz egy, tumorról társult sejtfelületi antigént hordozó tumorsejtre fajlagos változó területet, és ahol az Ig lánc egy peptid kötésen keresztül van csatlakoztatva a citokinhez. Ahol egy további immunterápiás szer tartalmaz egy citotoxikus szert, a mennyiség olyan lehet, hogy citotoxikus-biológiai választ alakítson ki a cél tumor sejtekben.

Egy másik kiviteli módban a találmány gyakorlatba vehető sebészeti beavatkozásokkal együtt, ahol a tumor tömeg egy részét vagy egészét eltávolítjuk. Ebből a szempontból az eljárás egy sebészeti munkamenetet követően vehető gyakorlatba. Egy másik megoldás szerint a sebészeti munkamenetet az első aktív szer és a második aktív szer beadása közti időszak során végezhetjük el. Erre az eljárásra, vagyis a jelen eljárás kombinálására sebészeti tumor eltávolítással, a későbbiekben adunk példát.

A találmány szerinti kezelés tipikusan a terápiás kompozíciók beadását tartalmazza a beadás egy vagy több ciklusában. Így például ahol az egyidejű beadást gyakoroljuk, olyan terápiás kompozíciót adunk be, amely tartalmaz mind $\alpha_v\beta_3$ antagonistát, mind tumorellenes immunterápiás szert, mintegy 2 naptól mintegy 3 hét közti időköz során egyetlen ciklusban. Ezután a kezelési ciklus megismételhető, ahogyan a kezelő orvos elbírálása szerint szükséges. Hasonlóképpen, amikor az egymás utáni alkalmazást tartjuk célszerűnek, a beadási időt az egyes

egyedi gyógyászati szerek között úgy állítjuk be, hogy tipikusan az azonos időtartamot fedjen le. Az időköz a ciklusok között változhat zérótól 2 hónapig.

A beadás végrehajtható periódikus egység adagolással, folyamatos infúzióval, perisztaltikus szolgáltatással, bólusz injekcióval, és hasonlókkal. A beadási út lehet intravénás, szubkután, intramuszkuláris, ortotopikus injekció, ortotopikus infúzió, orális alkalmazás, és hasonlók.

Egy, a találmány szerinti eljárásban alkalmazott gyógyászati kompozíció az aktív szert valamely gyógyászatilag elfogadható hordozóban tartalmazza, amint ez a szakterületen jól ismert, ennél fogva a találmányt nem szándékozunk korlátozni a kompozíció tekintetében, csak az a lényeg, hogy az aktív szer vagy szerek koncentrációja a kompozícióban elegendő legyen az idézett aktív szer szolgáltatásához (beadásához) az itt leírt mennyiségben.

A tumorelles immunterápiás szer, például az antigén becélzó/citokin fúziós fehérje adagolása tipikusan 0,01 mg és 10 mg közti mennyiség, előnyösen mintegy 0,1 és 1 mg közti mennyiség, és még előnyösebben mintegy 0,6 mg/testtömeg kg/nap.

A tumorelles immunterápiás szerek, például az antigént becélzó citotoxikus szerek adagolása tipikusan 0,01 mg és 10 mg közti mennyiség, előnyösen mintegy 0,1 és 1 mg közti mennyiség, és még előnyösebben mintegy 0,6 mg/testtömeg kg/nap, ahol a sugárzás dózisát megfelelően be kell állítani a kívánt sugárzási dózistól függően. A sugárzásos kezelésre alkalmasnak talált izotópok között találhatók az 57-kobalt, 67-réz, 99m-technécium, 123-jód, 131-jód és 111-indium, és hasonlók. A radioaktív gyógyszerek és adagolások változhatnak a radioizotóptól és a célszövettől függően. A rosszindulatú neoplazmák immunsugárzásos terápiája nagyobb dózisokat hasznosíthat, mint a

hagyományos besugárzásos terápia, mivel az immunterápiás szer be van célozva a tumor helyébe és/vagy a sejtbe. Így például B-sejtes nem-Hodgkin limfóma kezelésével kapcsolatban olyan radioimmunterápiás szerekkel, amelyek a B-sejteket célozzák meg, kapcsolatban arra jöttek rá, hogy a maximális tűrt dózis 0,4 mCui/testtömeg kg (1 mCui = 37 Mbq) [Witzig T. E. és munkatársai: IDEC-Y2B8 radioimmunterápia I/II fázisú kísérletei visszaeső vagy kezelhetetlen CD20(+) B-sejt nem-Hodgkin limfóma kezeléséhez (Phase I/II trial of IDEC radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma), J. Clin. Oncol. 17 (12), 3793-803 (1999)]. A célzott radioimmunterápia fajlagos tumorokra vagy tumor áttételekre lehetővé teszi a nagyobb tűrt dózisokat, mint a limfómák kezelésénél. Meztelen egerekben 18,5 Mbq-es, 111-indiummal jelölt antitest két adagjának beadása eltűrhető [Saga T. és munkatársai: Humán glióma xenograftok radioimmunterápiája meztelen egerekben indium-111-gyel jelölt, internalizáló monoklonális antitestekkel (Radioimmunotherapy of human glioma xenografts in nude mice by indium-111 labelled internalising monoclonal antibody), Eur. J. Cancer 35 (8), 1281-5 (1999)].

Az $\alpha_v\beta_3$ antagonista tipikus dózisa 10 mg és 1000 mg közti mennyiség, előnyösen mintegy 20 mg és 100 mg közti mennyiség, és még előnyösebben mintegy 50 mg/ testtömeg kg/nap.

Meg kell érteni, hogy a rák mindenütt megtalálható az állatvilágon belül, és azt is, hogy az itt leírt elvek alkalmazhatók minden állatnál, ahol az angiogenezis gátolható valamely $\alpha_v\beta_3$ antagonistával, és ahol citokinek vannak az immunrendszerben. Így úgy lehet tekinteni, hogy a találmány gyakorlatilag alkalmazható minden emlősnél, de elsősorban embernél.

Ezen kívül ismeretes, hogy igen nagy számú különböző tumor létezik, amely növekedéséhez érképzést (vaszkularizációt) igényel,



ennél fogva jelölt a találmány szerinti eljárások kombinált terápiás módosulataiban. Azok között a tumorok között, amelyek növekedésükben angiogenezist indukálnak, találhatók a neuro-ektodermális, epitheliális és hasonló szövetekből kialakuló tumorok. A tumorokra és tumor áttételekre példák lehetnek az adenóma, angioszarkóma, asztrocitóma, epitheliális karcinóma, germinóma, glioblasztóma, glióma, hamartóma, hemangioendotelióma, hemangioszarkóma, hematóma, hepatoblasztóma, leukémia, limfóma, medulloblasztóma, melanóma, neuroblasztóma, oszteoszarkóma, retinoblasztóma, rhabdomioszarkóma, szarkóma, teratóma és hasonló tumorok.

3. Terápiás rendszerek

Az egyik kiviteli formában a találmány olyan rendszereket céloz meg, amelyek csomagolásokat és/vagy készleteket tartalmaznak; ezek szolgáltatják a találmány szerinti eljárás gyakorlati kivitelezéséhez szükséges reagenseket. Egy készlet tumorsejtek kezelésére tumorokban vagy tumor áttételekben egy csomagot tartalmaz az alábbiakból:

- a) valamely angiogenezis gátló szer, mint például valamely $\alpha_v\beta_3$ antagonist, amely angiogenezis gátlására képes a tumorban vagy tumor áttételekben;
- b) valamely tumorelles immunterápiás szer, például egy kétfunkciós fúziós fehérje reagens, amely egy citokinnel és egy rekombináns immunglobulin (Ig) polipeptid láncsal bír, ahol az Ig lánc tartalmaz egy, valamely tumormal társult sejtfelületi antigént hordozó tumorsejtre fajlagos változó területet, ahol az Ig lánc egy peptid kötéssel csatlakozik a citokinhez; és
- c) útmutatások a reagens alkalmazásához tumorok és tumor áttételek kezelésére való eljárásokban.

Egy reagens a találmány szerinti készletben tipikusan terápiás kompozícióként van kiserelve, ahogyan itt leírjuk, ennél fogva a sokféle



lehetséges forma bármelyike lehet, amely alkalmas egy készletbe való elosztáshoz. Az ilyen formák között találhatók a folyadékok, porok, tabletták, szuszpenziók és hasonló kiszerelések a találmány szerinti antagonisták és/vagy fúziós fehérjék szolgáltatására. A reagenseket szolgáltatathatjuk elkülönült tartályokban, amelyek alkalmasak a külön-külön beadáshoz a jelen találmány szerinti eljárásokban, vagy egy másik megoldás szerint szolgáltatathatjuk kombinált kompozícióként egyetlen tartályban a csomagban.

Hasonlóképpen egy ilyen csomag tartalmazhat az előzőekben leírt alkotórészek helyett vagy azokon kívül bármely más tumorellenes terápiás szert, például olyanokat, amelyeket a korábbiakban leírtunk.

A csomagolás tartalmazhat a reagensek egy vagy több adagjához elegendő mennyiséget az itt leírt kezelési eljárások szerint. Tipikusan egy csomag egy kezelési ciklushoz elegendő mennyiséget tartalmaz, ahogyan itt leírjuk. A csomag jelölése jelezheti, hogy a mellékelt reagensek kombinált vagy egymás utáni alkalmazásáról van-e szó a tumor és/vagy az áttételek terápiás kezeléséhez a találmány szerinti eljárás szerint. Az ilyen csomag jelölések rögzítve lehetnek az egyes reagens csövekre és/vagy az anyagok komplett csomagolására.

A találmány szerinti készlet tartalmazza a csomagban található anyagok „felhasználási útmutató”-ját is. Az útmutatók az antagonista és a fúziós fehérje kombinált alkalmazási eljárására vonatkoznak tumorok vagy tumor áttételek kezelésére a találmány eljárásai szerint. Mivel az eljárások széles körben változhatnak a tumortól, a betegtől és a betegség állapotától függően, az útmutatások következésképpen változhatnak a beadás adott munkamenetétől függően. A találmánnyal kapcsolatban nem tekintjük az útmutató természetét korlátozó tényezőnek, így nem tekintjük másnak, mint szabatos segítségnek az



antagonisták és a fúziós fehérjék kombinált alkalmazását illetően a találmány eljárásai szerint.

Hasonlóképpen a reagensek magukban foglalhatnak tumorellenes immunterápiás citotoxikus szereket, például tumor antigén kötő antitesteket radioaktívan jelzett izotópokkal vagy citotoxikus szerekekkel, például citotoxikus peptidekkel vagy citotoxikus gyógyszerekkel és hasonlókkal összekapcsolva.

4. Szintetikus peptidek előállítása

a) Szintézis munkamenet

A későbbiekben, az 1. táblázatban felsorolt lineáris és ciklusos polipeptideket standard szilárd fázisú szintézis technikával szintetizáljuk, ahogyan például Merrifield R. B. és más szerzők leírják [Merrifield R. B.: Szilárd fázisú peptid szintézis (Solid-Phase Peptide Synthesis), Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 32, 221-96 (1969); Merrifield R. B.: Biológiaiaktív peptidek és fehérjék szintézise (The synthesis of biologically active peptides and proteins), JAMA 210 (7), 1247-54 (1969); és Fields G. B. és Noble R. L.: Szilárd fázisú peptid szintézis 9-fluorenil-metoxi-karbonil-aminosavakat hasznosítva (Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids), Int. J. Peptide Protein Res. 35 (3), 161-214 (1990)].

2 gramm (g) BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-Ome-t (SEQ ID NO: 1) először feloldunk 60 milliliter (ml) metanolban, amelyhez hozzáadunk 1,5 ml 2 n nátrium-hidroxid oldatot, hogy keveréket kapjunk. A keveréket azután 3 órán át kevertetjük 20°C hőmérsékleten (20°C). Bepárlás után a maradékot vízben felvesszük, pH 3 értékre savanyítjuk hígított HCl oldattal, majd extraháljuk etil-acetáttal. Az extraktumot Na₂SO₄-en víztelenítjük, ismét bepároljuk, és a létrejövő BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH-t (SEQ ID NO: 2) 20°C hőmérsékleten kevertetjük 2 órán át 20 ml 2 n dioxános HCl oldattal. A létrejövő keveréket bepároljuk, így



kapjuk meg a H-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH-t (SEQ ID NO: 3), amelyet azután feloldunk 1800 ml diklór-metán és 200 ml dimetil-formamid keverékében, majd lehűtjük 0°C hőmérsékletre. Ezután egymás után 0,5 g diciklohexil-karbodiimidet (DCCI), 0,3 g 1-hidroxi-benzotriazolt (HOBt) és 0,23 ml N-metil-morfolint adunk hozzá kevertetés közben.

A létrejött keveréket további 24 órán át kevertetjük 0°C hőmérsékleten, majd 48 órán át 20°C hőmérsékleten. Az oldatot koncentráljuk, majd kevert ágyas ioncserélővel kezeljük, hogy sóiból felszabadítsuk. Miután a létrejött gyantát szűréssel eltávolítottuk, a derített oldatot bepároljuk és a maradékot kromatográfiával tisztítjuk, így nyerjük ki a ciklo(Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val)-t (SEQ ID NO: 4).

Az alábbi, az 1. táblázatban felsorolt peptideket kapjuk meg analóg módon, ott az egybetűs aminosavgyök kódokat alkalmazva és egy peptid szám megjelöléssel azonosítva: ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (SEQ ID NO: 5); ciklo(Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val) (SEQ ID NO: 6); ciklo(Arg-D-Ala-Asp-Phe-Val) (SEQ ID NO: 8); ciklo(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val) (SEQ ID NO: 7); és ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (ahol metilezés található a valin gyök amid kötésének α -amino nitrogénjénél) (SEQ ID NO: 11).

A 66203 jelölésű peptidnek azonos szekvenciája van, mint a 62184 jelzésű peptidnek, azzal az egyetlen különbséggel, hogy ez a HCl só tartalmazza a 62184-gyel ellentétben (SEQ ID NO: 5), ahol a TFA (trifluor-acetát) só van jelen. Ugyanez a helyzet a 69601 és 62185 jelzésű peptideknél is (SEQ ID NO: 6) és 85189 és 121974 jelzésű peptideknél is (SEQ ID NO: 11).

b) Alternatív szintézises eljárás

- i) ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (SEQ ID NO:11) TFA só előállítása



Fmoc-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-NMeVal-ONa (SEQ ID NO: 14) peptidet szintetizálunk szilárd fázisú, Merrifield-típusú munkamenetet alkalmazva, egymás után adva NmeVal-t, D-Phe-t, Asp(OBut)-ot, Gly-t és Fmoc-Arg(Mtr)-t lépcsőzetesen 4-hidroxi-metil-fenoxi-metil-polisztirol gyantához (Wang-típusú gyanta) (a peptid szintézis szokásos Merrifield-típusú eljárásait alkalmazva). A polisztirol gyanta és az aminosav gyök prekursorok kereskedelmi forgalomban kaphatók az Aldrich, Sigma vagy Fluka cégeknél. Miután az aminosav gyökök egymás utáni adagolása befejeződött, a gyantát eltüntetjük a peptid láncról TFA/diklór-metán 1:1 keverékét alkalmazva, amely művelet kialakítja az Fmoc-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-NMeVal-OH terméket (SEQ ID NO: 15). Ezután eltávolítjuk az Fmoc csoportot piperidin/DMF 1:1 arányú keverékével, így kapjuk meg a nyers Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-NMeVal-OH prekuzort (SEQ ID NO: 16), amelyet azután HPLC-vel tisztítunk szokásos módon.

A ciklizáláshoz 0,6 g Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-NMeVal-OH (amelyet az előzőekben szintetizáltunk) 15 ml DMF-fel (dimetil-formamid; Aldrich) képzett oldatát hígítjuk 85 ml diklór-metánnal (Aldrich), majd 50 mg NaHCO_3 -at adunk hozzá. A keveréket szárazjég/aceton keverékben lehűtjük, és 40 μl difenil-foszforil-azidot (Aldrich) adunk hozzá. Szobahőmérsékleten állni hagyjuk 16 órán át, majd az oldatot koncentráljuk. A koncentrátumot gélszűrésnek vetjük alá (Sephadex G10 oszlop izopropanol/víz 8:2-ben), majd HPLC-vel tisztítjuk szokásos módon. A kezelés TFA-val [trifluor-ecetsav/víz (98:2)] szolgáltatja a ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (amelyre itt „ciklo(RGDfN-MeV)”-ként is utalunk; SEQ ID NO: 11) x TFA terméket, amelyet HPLC-vel tisztítunk szokásos módon; RT = 19,5; FAB-MS (M+H): 589.



ii) „Belső só” szintézise

A TFA sót eltávolítjuk az előzőekben előállított ciklikus peptidből olyan módon, hogy a ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (SEQ ID NO: 11) x TFA-t vízben szuszpendáljuk, majd vákuum alatt bepárlást végzünk, hogy a TFA-t eltávolítsuk. A kialakult ciklusos peptidre „belső só”-ként utalunk, és ezt ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal)-nak jelöljük (SEQ ID NO: 11). A „belső só” kifejezést azért használjuk, mert a ciklusos peptid két ellentétes töltésű gyököt tartalmaz, amelyek intra-elektromosan kiegyensúlyozottak egy összességében nem töltött molekulát alakítva ki. A töltött gyökök egyike egy savgyököt tartalmaz, és a másik töltött gyök aminogyököt tartalmaz. Amikor a savgyök és az aminogyök szoros közelségben vannak egymáshoz, a savgyök deprotonálódhat az aminogyök segítségével, amellyel karboxilát/ammónium só fajta keletkezik összességében semleges töltéssel.

iii) Kezelés HCl-lel, ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (SEQ ID NO: 11) x HCl kialakítására

80 mg ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal)-t (SEQ ID NO: 11) feloldunk 0,01 mól/l HCl-ben 5-6 alkalommal, és mindegyik oldási művelet után fagyasztva szárítjuk. Az ezt követő tisztítás HPLC-vel adja a ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (SEQ ID NO: 11) x HCl-t; FAB-MS (M+H): 589.

iv) Kezelés metánszulfánsavval, ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (SEQ ID NO: 11) x MeSO₃H kialakítására

80 mg ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal)-t (SEQ ID NO: 11) feloldunk 0,01 mól/l MeSO₃H-ban (metánszulfonsavban) 5-6 alkalommal, és mindegyik oldási művelet után fagyasztva szárítjuk. Az ezt követő tisztítás HPLC-vel adja a ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (SEQ ID NO: 11) x MeSO₃H-t; RT=17,8; FAB-MS (M+H): 589.

A ciklizálás alternatív eljárásai magukban foglalják az aciklusos peptid prekursor oldalcsoport láncainak származékképzését szulfhidril gyökökkel, és amikor a normális fiziológiai pH körülményeknél valamivel magasabb pH-nak tesszük ki (pH 7,5), intramolekulárisan diszulfid kötések keletkeznek más, a molekulában jelen levő szulfhidril csoportokkal, ciklusos peptidet alakítva ki. Ezen kívül egy aciklusos peptid prekursor C-terminális karboxilát gyöke reagálhat a molekulában jelen levő szabad szulfhidril gyökkel, így tioészter ciklizált peptideket alakítva ki.

1. TÁBLÁZAT

<u>Peptid jelölés</u>	<u>Aminosav szekvencia</u>	<u>SEQ ID NO</u>
62181	Ciklo(GrGDFV)	4
62184 (66203*)	Ciklo(RGDfV)	5
62185 (69601*)	Ciklo(RADfV)	6
62187	Ciklo(RGDFv)	7
62186	Ciklo(RaDFV)	8
62175	Ciklo(ARGDfL)	9
62179	Ciklo(GRGDfL)	10
121974 (85189*)	Ciklo(RGDfN-MeV)	11
112784	Ciklo(RGEfN-MeV)	12
135981	Ciklo(RADfN-MeV)	13

* A csillaggal megjelölt peptideket HCl-ben készítjük el, és ez szekvenciájában azonos azzal a peptiddel, amely ugyanabban a vonalban van megjelölve; a csillag nélküli peptidek TFA-ban vannak elkészítve. A kisbetűk D-aminosavakat jelölnek; a nagybetűk L-aminosavakat jelölnek.

5. Tumorfajlagos antitest-citokin fúziós fehérjék és érrendszer-fajlagos α_v integrin antagonisták kialakítása és jellemzése

a) Fehérjék és érrendszer-fajlagos α_v integrin antagonisták

A ch14.18-IL-2 és huKS1/4-IL-2 antitest-citokin fúziós fehérjék megalkotását és jellemzését már korábban leírták [Xiang R. és munkatársai (1997); Gillies S. és munkatársai (1992), korábban idézett munkák]. Mindkét konstrukció antigénkötő jellemzői azonosak vonatkozó antitestjeik antigénkötő tulajdonságaival és a fajlagos EL-2 aktivitás ekvivalens a kereskedelmi forgalomban kapható rhIL-2-vel. A 121974 [ciklo(RGDfN-MeV)] (SEQ ID NO: 11) $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonista ciklusos peptidet és a 135981 [ciklo(RADfN-MeV)] (SEQ ID NO: 13) kontroll peptidet szintetizáljuk és jellemezzük.

6. Sejtvonalak és állati modellek

Minden sejtvonalat és megfelelő állati modellt lényegében úgy létesítünk, ahogyan ezt korábban leírták [Becker J. C. és munkatársai (1996); Xiang R. és munkatársai (1996); Lode H. N. és munkatársai (1998), korábbiakban idézett munkák]. Az $\alpha_v\beta_3$ integrin távollétét NXS2 és CT26-KSA sejteken anti-egér CD61 (integrin β_3 lánc) antitest (Pharmingen; La Jolla, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) alkalmazásával demonstráljuk. Egyik sejtvonal sem tár fel szignált (1 μ g anti-egér CD61 mAb/ 10^6 sejt) a FACS elemzésben, ellentétben az $\alpha_v\beta_3$ integrin-pozitív B16FG3 és B78-D14 rágcsáló melanóma sejtekkel, amelyeket pozitív kontrollként alkalmazunk. Ezen kívül az NXS2 sejtek nem képesek az anti-egér CD61 mAb-vel borított műanyaghoz tapadni (10 μ g/ml; 4°C; 24 óra), ellentétben a pozitív kontrollként alkalmazott ch14.18 anti-GD₂ anti-testtel (10 μ g/ml; 4°C; 24 óra). Az összes tumorsejt expresszál azonban α_v integrint FACS-sel, és tapad vitronektinen, jelezve az $\alpha_v\beta_5$ integrin jelenlétét.

Az összes sebészeti munkamenetnél egereket érzéstelenítünk ketamin injekcióval [100 mg/kg intraperitoneálisan (i.p.)] és egyidejűleg metofán inhalálással (Pitman-Moore, Mundelein, Illinois, Amerikai Egyesült Államok). Ozmotikus szivattyúkat (Alzet, 2001 modell, Palo Alto, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) alkalmazunk az α_v integrin antagonisták és a kontroll peptid bevezetéséhez, 17,5 $\mu\text{g}/\text{óra}$ szolgáltatási sebességnél. Ezeket a szivattyúkat a gyártó cég útmutatásai szerint kezeljük és beültetjük a dorzális szubkután szövetbe steril körülmények között. Minden szivattyút kicserélünk a 7. napon a beültetés után, és eltávolítjuk a antivaszkuláris kezelés 10. napján. Minden állatkísérletet az NIH „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Irányvonal a laboratóriumi állatok felügyeletéről és alkalmazásáról) című irányvonala szerint hajtunk végre.

7. Hisztológia és immunhisztokémia

Primer tumorok acetonnal rögzített, fagyasztott metszeteit inkubáljuk 4% kecske szérummal, hogy blokkoljuk a nem-fajlagos kötést. Az inkubálást anti-egér CD31 és anti-egér CD45 monoklonális antitestekkel (Pharmingen; La Jolla, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) (1:100) végezzük, és az ezt követő festést rodaminnal jelzett kecske-anti-patkány antitesttel (1:300) nedvesített kamrában hajtjuk végre szobahőmérsékleten. Minden inkubálást mosás követ háromszor PBS-sel (foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldat). A véredény- és fehérvérsejtszámot nagy erejű területenként [„high power field (HPF)] mikroszkóposan határozzuk meg 200-szoros nagyításban [Brooks P. C. és munkatársai: Anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin blokkolja a humán mellrák növekedést és az angiogenezist emberi bőrben (Anti-integrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin), J. Clin. Inves. 96, 1815-1822 (1995)]. A reprezentatív területek 200-szoros

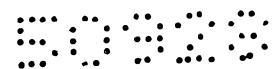


nagyításban (véredények) illetve 800-szoros nagyításban (fehérvérsejtek) vannak lefényképezve.

8. Az antitest-IL-2 fúziós fehérjékkel kezelt primer tumorok egerekben csak α_v integrin antagonistákkal kombinált kezeléssel fejlődnek vissza

Az angiogenezis gátló terápia (α_v integrin antagonista) és immunterápia (antitest-IL-2 fúziós fehérjék) szinergetikus hatását megállapított szubkután tumorokkal (110-130 μ l) bíró egerekben határozzuk meg, illetve mindhárom szingenikus modellben.

Az 1. ábra grafikusán ábrázolja a kombinált terápia hatásait anti-angiogén α_v integrin antagonistával, és antitest-IL-2 fúziós fehérjékkel együtti tumorelleses immunterápiás terület-fajlagos immunterápiával primer tumorokon. Az 1A. ábra mutatja be az eredményeket az NXS2 neuroblasztóma szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból. Az 1B. ábra eredményeket mutat be CT26-KSA vastagbél karcinóma szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból. Az 1C. ábra eredményeket mutat be a B78-D14 melanóma sejtek szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból. A megállapított tumorok (110-130 mm³) kezelését a huKS1/4-IL-2 (10 μ g; vastagbél karcinóma) és ch14.18-IL-2 (5 μ g; neuroblasztóma; 10 μ g; melanóma) tumorfajlagos antitest-IL-2 fúziós fehérjék napi intravénás injekciójával indítjuk be, és az érrendszer-fajlagos α_v integrin antagonista vagy a kontroll peptid folyamatos szubkután infúziójával ozmotikus szivattyúval 7 napon át 17,5 μ g/óránál (felső határ). A kezelés beindulásának időpontját fekete nyíl jelzi. Az egerek primer tumorjainak méretét minden kísérleti csoportban (n=6) mikrokáliber méréssel (szélesség x hosszúság x szélesség/2) (átlag $\pm$ standard hiba) határozzuk meg. A visszafejlődés a kombinációs kezelést kapott egerek primer tumor méretében összehasonlítva a megállapított tumorok méretével a kezelés kiindulásának időpontjában



szignifikáns mindhárom különböző szingenikus tumor modellben ($P < 0,001$; Wilcoxon rangsor-összesítő vizsgálat), ellentétben az összes kontrollal ($P > 0,05$).

Először az egyes gyógyászati módosulatokhoz a szuboptimális mennyiségeket hozzuk létre, és ezután beindítjuk alkalmazásukat különböző kombinációkban. Csak az α_v integrin antagonistával és az IL-2 fúziós fehérjékkel kezelt egerek mutatnak tumor visszafejlődést 50-90% közötti tartományban mindhárom modellben ($P < 0,001$). Valójában a neuroblasztóma és vastagbél karcinóma sejtekkel inokulált állatok fele teljesen visszautasítja primer tumorjait (adatokat nem mutatunk be). Ez ellentétben van az egyes stratégiákkal, amelyeket monoterápiaként alkalmaznak, ez pedig legjobb esetben a késleltetett növekedés, összehasonlítva a kontroll csoporttal. Az egyes kezelési módosulatok és kombinációik hatását elemezzük ezután a vaszkuláris és tumor területekre.

A megállapított primer neuroblasztóma tumorok anti-angiogén és tumor-fajlagos immunterápiájának kombinálását követően hajtjuk végre a hisztológiai vizsgálatokat a tumorsejt inokulálást követő 20. napon sebészeti eltávolított tumorokon. Röviden ismertetve formalinnal rögzített primer tumorokat vetünk alá paraffinos beágyazásnak és az ezt követő hematoxilin/eozin festésnek. Azonosítjuk a nekrotikus területeket, és a leukocita beszűrődéseket.

A 2. ábra grafikusán ábrázolja az anti-vaszkuláris terápia és tumorelles immunterápia kombinációjának hatását az érképzésre és tumorelles immunválaszokra. Egerek ($n=6$) megállapított primer neuroblasztóma tumorokkal kombinált kezelést kapnak érrendszer-fajlagos α_v integrin antagonistával, egy nem-fajlagos peptid kontrollal és egy tumorfajlagos ch14.18-IL-2 fúziós fehérjével, ahogyan az 1. ábrában bemutatjuk, ide értve olyan kontrollokat, amelyek csak egyetlen terápiát



kapnak. A kezelés végén a szubkután (s.c.) tumorokat sebészileg eltávolítjuk. Az egyes tumorok fagyasztott metszeteit immunhisztokémiai úton elemezzük, véredény endoteliális sejtek (CD-31)-re, illetve leukocita beszűrődésre (CD45) fajlagos antitestek alkalmazásával. Az utóbbi jól meghatározott markere a ch14.18-IL-2 fúziós fehérje által indukált a tumor terület-fajlagos immunválasznak [Becker J. C. és munkatársai (1996); Xiang és munkatársai (1996); Lode H. N. és munkatársai (1998); korábban idézett munkák].

A 2A. ábra az eredményeket mutatja be a primer tumorok véredény-sűrűségével kapcsolatban a vaszkuláris és tumor terület kezelést követően az α_v integrin antagonistával, ch14.18-IL-2 fúziós fehérjével és kombinációjukkal (* $P < 0,001$; Student-féle T-teszt). A 2B. ábra az eredményeket mutatja be a primer tumorok leukocita beszűrődésével kapcsolatban a vaszkuláris- illetve tumor terület kezelése után (* $P < 0,001$; Student-féle T-teszt).

Az α_v integrin antagonistát kapott egerek 50%-os csökkenést mutatnak a vaszkularizálásban (2. ábra), ez egybeesik a primer tumorok növekedési késleltetésével, ez pedig a vaszkuláris terület hatékony becélzását demonstrálja. Ebben az esetben a tumor területre közvetlenül nincs hatás (1. ábra). Ezzel ellentétben azok az egerek, amelyek csak az anti-GD2-IL-2 fúziós fehérjével vannak kezelve, elkülönült leukocitás beszűrődést tárnak fel, amely ennek az anti-tumor-területre irányuló terápiának jól meghatározott jellemzője [Becker J. C. és munkatársai (1996); Xiang R. és munkatársai (1996); Lode H. N. és munkatársai (1998), korábban idézett munkák], amely az s.c. tumor növekedés jelentős csökkenéséhez vezet (1. ábra).

Csak azok az egerek tárnak fel azonban ötszörös növekedést a fehérvérsejt beszűrődésben a tumorba a csak anti-GD2-IL-2-vel kezelt egerekkel összehasonlítva, amelyek az α_v integrin antagonista és anti-



GD2-IL-2 fúziós fehérje kombinációjával vannak kezelve, és csak ezek mutatnak hasonló csökkenést a vaszkularizálásban is. A növekedést a gyulladt sejtek számában hisztológiával és immunhisztokémiával demonstráljuk, és ezt makrofágok benyomulásának tulajdonítjuk; ez olyan séma, amely gyakran látható nekrotikus szövetekben sejttörmelék eltávolítása során. Valójában az ilyen nekrotikus területek csak olyan tumorokban vannak jelen, amelyek kombinációs kezelést kaptak, ellentétben a kontrollokkal, amelyek az egyes alkotórészekkel külön-külön kezelték.

9. Az egymás utáni és szimultán vaszkuláris- és tumor becélzás a spontán máj áttételek kiirtását indukálja

A primer tumorok sikeres kezelésén kívül még inkább releváns kérdés az, vajon az elkülönült áttételekre is hat-e az ilyen kombinált anti-vaszkuláris és anti-tumor-fajlagos kezelési stratégia. Ezt a neuroblasztóma modellre értelmezzük, amelyet spontán májáttételek jellemeznek. Ebből a célból a primer tumorok kezelését az anti-angiogén α_v integrin antagonistával egymás utáni formában kombináljuk a tumorelles immunterápiával az antitest-IL-2 fúziós fehérjével.

A 3. ábra grafikusán ábrázolja anti-angiogén α_v integrin antagonista terápia és az antitest-IL-2 fúziós fehérjével együtti anti-tumor terület-fajlagos immunterápia egymás utáni kombinációjának hatását a spontán máj neuroblasztóma áttételekre. Az anti-vaszkuláris kezelést megállapított primer tumorokkal bíró egerekben úgy indítjuk el, ahogyan az 1. ábrában, összesen 10 napon át. A primer tumorok sebészeti eltávolítása után az egerek 5 μ g napi ch14.18-IL-2 fúziós fehérje i. v. (intravénás) injekciójával (x5) tumor-terület fajlagos immunterápiát kapnak. A spontán májáttételek számát a máj gócok (n=8) makroszkópos számlálásával kapjuk meg (**P<0,01; Wilcoxon rangsor-összesítő teszt).

Az összes kontrollokkal ellentétben csak azok az egerek mutatnak 1,5-2 log csökkenést a máj áttételekben, amelyeket mindkét szerrel egymás után kezeltünk, míg a kontroll egereknél az egyes szerekkel monoterápiaként alkalmazott, az egyes szerekkel egyénileg végzett kezelés hatástalan ($P < 0,01$) (3. ábra). Valójában a kombinált terápiának kitett 8 egérből 4 tárja fel a máj áttételek teljes hiányát, míg a többi állat is csak 1-5 kis áttételes elváltozást mutat. Lényegében hasonló eredményeket kapunk az α_v integrin antagonistá egyidejű kombinációival is a ch14.18-IL-2 fúziós fehérjével (4. ábra, felső rész).

A 4. ábra grafikusán ábrázolja az anti-angiogén α_v integrin antagonistá terápia és az antitest-IL-2 fúziós fehérjével együtti anti-tumor terület-fajlagos immunterápia szimultán kombinációjának hatását spontán máj neuroblasztóma áttételekre. A spontán áttételek primer tumorok indukcióját követően indukálódnak a 2×10^6 NXS2 neuroblasztóma sejtekkel s.c.. A kezelés integrinnel vagy antagonistával (17,5 $\mu\text{g}/\text{óra}$) és tumor-fajlagos ch14.18-IL-2 fúziós fehérjével (5 $\mu\text{g} \times 5$) a primer tumor eltávolítása előtt (4A. ábra) vagy után (4B. ábra) indul be. A spontán máj áttételeket a máj gócok ($n=8$) makroszkópos számlálásával határozzuk meg ($*P < 0,01$; Wilcoxon rangsor-összesítő teszt).

Csak olyan egerek tárnak fel vagy teljes hiányt a máj áttételekben (4A. ábra) vagy $>1,5$ log csökkenést a máj áttételekben (5B. ábra) ($P < 0,01$), amelyeket mindkét szerrel kezelünk, a beadásuk módjától függően a primer tumor eltávolítása előtt vagy után. Ez ellentétben áll az összes kontrollal, ahol a kezelés hatástalan, amikor az egyes szereket monoterápiaként alkalmazzuk.

10. A szinergetikus kombináció és a hatékony terápia

A véredények szétzúzása rosszindulatú tumorok vaszkuláris területében erőteljes stratégia a rák elleni harcban. A tumor



érrendszerének endoteliális sejtjeit megcélózva a tumort sikerrel lehet kezelni. Egy peptid antagonist, amely megcélózza az érrendszert az angiogén véredényeken expresszált α_v integrinokkal [Brooks P. C. és munkatársai (Science, 1994); Friedlander M. és munkatársai (1995), az előzőekben idézett munkák] visszaszorítja a véredények képződését és drámai módon visszafejleszti az ezt követő tumor növekedést. Ezt három agresszíven növekvő primer tumorról és egy spontánul áttételeket képző tumorról demonstráljuk. Miközben az alkalmazott α_v integrin antagonist elsődlegesen az $\alpha_v\beta_3$ -ra irányul, ez kötődik a közeli rokon $\alpha_v\beta_5$ integrinre is. A vizsgált végbél karcinóma és neuroblasztóma tumorokból világosan hiányzik az $\alpha_v\beta_3$, de valószínűleg expresszálnak valamennyi $\alpha_v\beta_5$ -öt. A melanóma modell expresszál $\alpha_v\beta_3$ -at is. Ennek az integrin antagonistának a hatása határozottan a tumor érrendszerre korlátozódik mindhárom állat modellben, amint ezt a neuroblasztóma modellben demonstráljuk (2. ábra). Nagyon fontos, hogy a tumor érrendszer becélzásának tumorelles hatását megsokszorozza az egyidejű támadás a tumor terület ellen, amely hatásos mind a primer tumorokra, mind a spontán áttételekre. Ez különösen idevág, mivel a primer tumor eltávolítása a kezelés előtt megnöveli a neuroblasztóma áttételek növekedését és szétszóródását; ez az észlelés jól dokumentált más tumor modellekben a csökkenés miatt az angiogenezis inhibitorok keringő szintjében a primer tumor kimetszését követően [Holmgren L. és munkatársai (1995); Folkman J. (1995), korábban idézett munkák]. A vaszkuláris terület és a tumor terület szimultán becélzása nagyon hatékonynak bizonyul, mivel ez kombinálja a csökkenést a tumorsejt táplálásában a tumorsejtek aktív rombolásával, és ez a primer tumorok sorvadásához és az elkülönült áttételek kiirtásához vezet. Ez ellentétben van az egyedi vaszkuláris területre irányuló megközelítéssel, amely két különböző anti-angiogén kezelési stratégiát alkalmaz, amelyek csak a



s.c. tumor növekedés visszaszorítását eredményezik egy szingenikus modellben [Mauceri H. J. és munkatársai: Az angiosztatin és az ionizáló sugárzás kombinált hatásai a tumorelles terápiban (Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy), *Nature* 394, 287-291 (1998)].

A jelen stratégia szerint a tumor területre fajlagos választ gyulladássos sejtek közvetítik, amelyek a tumor-fajlagos antitest-IL-2 fúziós fehérjék révén aktiválódnak és irányulnak a tumor mikrokörnyezetébe. Nagyon fontos, hogy bár az anti-angiogén stratégia elég hatékony a jól megalapozott érrendszeri szolgáltatással bíró primer tumorok növekedésének visszaszorításában, hiányzik belőle a hatékonyság az elkülönült mikro-átételek ellen, amikor monoterápiaként alkalmazzuk ezt (3. és 4. ábra). Egy ilyen minimális maradék betegségben azonban, amely gyenge vaszkularizációval jellemzett kis tumor terhelésekkel van csillapítva, a kombinációs kezelésben alkalmazott tumorelles terület kezelési fegyver nagyon hatékony, amikor monoterápiaként alkalmazzuk [Xiang R. és munkatársai (1997); Lode H. N. és munkatársai (1998), az előzőekben idézett munkák]. Ebben a szituációban az anti-angiogén kezelés egyik szerepe az, hogy visszaszorítsa a mikro-átétel-indukált neovaszkularizációt és az átétel gócek ezt követő megnagyobbodását [Volpert O. V. és munkatársai (1998), az előzőekben idézett munka]. Ez viszont megkönnyíti az ilyen mikroátételek kiirtását tumor területre irányuló terápikkal, amelyek optimálisan hatékonyak a minimális maradék betegség csillapításában [Becker J. C. és munkatársai (1996), az előzőekben idézett munka].

A primer tumorok és a szétszóródott átételek hatékony kezelése továbbra is nagy kihívás marad a klinikai onkológiában. Az eredmények ebben a leírásban azt mutatják, hogy a fajlagos anti-angiogén- és immunterápiák kombinációi szinergizálnak a primer tumorok

visszafejlesztésében és a mikro-áttételek kiirtásában. Mivel mindkét kezelési módosulat, vagyis az α_v integrin antagonisták és antitest-interleukin-2 fúziós fehérjék, jelenleg a klinikai értékelésben monoterápiaként szerepelnek, kombinációik szinergizmusa új és hatékony eszközt biztosít a rák terápiában.

Az eddig bemutatott kiviteli példák, amelyek leírják a találmány bizonyos kiviteli módjait, csak a bemutatás célját szolgálják, és nem úgy lettek kialakítva, hogy speciálisan korlátozzák a találmány oltalmi körét. Ezen kívül a találmány olyan változatait, amelyek már most ismertek vagy csak később lesznek kifejlesztve, és amelyek azok látókörén belül vannak, akik a szakterületen járatosak, úgy tekintjük, hogy a találmány ez után következő igénypontjainak oltalmi körén belül vannak.

SZEKVENCIALISTA

- <110> Lode Holger N.
Gillies Stephen D.
Cheresh David A.
Reisfeld Ralph A.
The Scripps Research Institute
Lexigen Pharmaceuticals Corporation
- <120> ELJÁRÁS TUMOROK ÉS ÁTTÉTELEK KEZELÉSÉRE ANTI-ANGIOGÉN
A TERÁPIÁK ÉS IMMUNTERÁPIÁK KOMBINÁCIÓJÁT ALKALMAZVA
- <130> tsri6811pc
- <140>
<141>
- <150> 60/119,721
<151> 1999-02-12
- <160> 16
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> BLOKKOLT - BOC

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> ACETILEZÉS - OMe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> D-Arg

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: kiindulási anyag

<400> 1
Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> BLOKKOLT-BOC

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> D-Arg

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: első termék

<400> 2
Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> D-Arg

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: második termék

<400> 3
Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> D-Arg

<220>
<221> LÁNC
<222> (1)..(6)
<223> ciklo

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (GrGDFV)

<400> 4
Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> D-Phe

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (RGDFV)

<220>
<221> LÁNC
<222> (1)..(5)
<223> ciklo

<400> 5
Arg Gly Asp Phe Val

1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> D-Phe

<220>
<221> LÁNC
<222> (1) .. (5)
<223> ciklo

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (RADfV)

<400> 6
Arg Ala Asp Phe Val

1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> D-Val

<220>
<221> LÁNC
<222> (1) .. (5)
<223> ciklo

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (RGDFv)

<400> 7
Arg Gly Asp Phe Val

1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> D-Ala

<220>
<221> LANC
<222> (1) .. (5)
<223> ciklo

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (RaDFV)

<400> 8
Arg Ala Asp Phe Val

1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)⁻
<223> D-Phe

<220>
<221> LÁNC
<222> (1) .. (6)
<223> ciklo

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (ARGDfL)

<400> 9
Ala Arg Gly Asp Phe Leu

1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)⁻
<223> D-Phe

<220>
<221> LÁNC
<222> (1) .. (6)
<223> ciklo

<220>
 <223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (GRGDfL)
 <400> 10
 Gly Arg Gly Asp Phe Leu
 1 5

 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mesterséges szekvencia

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)
 <223> D-Phe

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)
 <223> METILEZÉS, NMeVal

 <220>
 <221> LÁNC
 <222> (1) .. (5)
 <223> ciklo

 <220>
 <223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (RGDfmV)

<400> 11
Arg Gly Asp Phe Val

1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)

<223> METILEZÉS, NMeVal

<220>
<221> LÁNC
<222> (1) .. (5)
<223>

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (RGEfmV)

<400> 12
Arg Gly Glu Phe Val

1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> METILEZÉS, NMeVal

<220>
<221> LÁNC
<222> (1) .. (5)
<223> ciklo

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (RGEfmV)

<400> 13
Arg Ala Asp Phe Val

1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> FORMILEZÉS, FMOC, Mtr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> OBut

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> D-Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

<223> METILEZÉS, NMeVal, -ONa

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása: Alt Syn Start Prod

<400> 14

Arg Gly Asp Phe Val

1

5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> FORMILEZÉS, FMOC, Mtr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> -OBut

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> METILEZÉS, NMeVal

<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: Alt Syn Prod

<400> 15
Arg Gly Asp Phe Val

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia . .

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Mtr

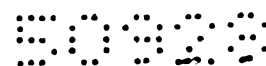
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> -OBut

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> METILEZÉS, NMeVal

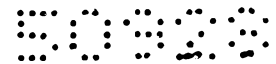
<220>
<223> Mesterséges szekvencia leírása: Alt Syn Prod

<400> 16
Arg Gly Asp Phe Val

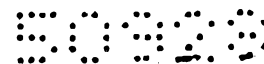


SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás tumorsejt kezelésére valamely betegben azzal jellemezve, hogy az említett betegbe az alábbi szerek tumorsejt burjánzás gátló mennyiségét vezetjük be:
 - a) angiogenezis gátló szer; és
 - b) tumorellenes immunterápiás szer, amely egy sejt effektor alkotórészt és egy tumorról társult antigént becélzó alkotórészt tartalmaz.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett angiogenezis gátló szert és az említett tumorellenes immunterápiás szert lényegében egyidejűleg adjuk be.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett angiogenezis gátló szert és az említett tumorellenes immunterápiás szert egymás után adjuk be mintegy 3 hetes időközön belül.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett angiogenezist gátló szert az említett tumorellenes immunterápiás szer előtt adjuk be.
5. A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorellenes immunterápiás szert az említett angiogenezis gátló szer előtt adjuk be.
6. A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett beadást akkor hajtjuk végre, amikor tumorokat vagy tumor áttételeket az említett betegből sebészileg eltávolítunk, az említett időközön belül.
7. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett beadást az után hajtjuk végre, miután a tumort vagy tumor áttételeket sebészileg eltávolítottuk az említett betegből.



8. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett angiogenezis gátló szer valamely $\alpha_v\beta_3$ antagonistá.
9. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett angiogenezis gátló szer 10 mg és 1000 mg/testtömeg kg/nap közti mennyiségben vezetjük be.
10. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorellenes immunterápiás szer 0,01 mg és 10 mg/testtömeg kg/nap közti mennyiségben vezetjük be.
11. A 8. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett $\alpha_v\beta_3$ antagonistá valamely peptid, valamely RGD-tartalmú peptid, valamely anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitest, valamely anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest vagy valamely $\alpha_v\beta_3$ mimetikum.
12. A 11. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett RGD-tartalmú peptid a ciklo(RGDfN-MeV) (SEQ ID NO: 11) szekvenciával bír.
13. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorellenes immunterápiás szer sejt effektor alkotórésze valamely citokin.
14. A 13. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett citokin BDNF, CNTF, EGF, Epo, FGF, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, I-309/TCA-3, γ -IP-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, LT, MCP-1, MCP-2, MCP-3, M-CSF, MIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NGF, NT-3, NT-4, OSM, PBP, PBSF, PGFD, PF-4, RANTES, SCF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , Tpo vagy VEGF.
15. A 13. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett citokin valamely kemokin, mégpedig az alábbiak közül: C10, EMF-1, ENA-78, eotaxin, GCP-2, HCC-1, I-309, IL-8, IP-10, limfotaktin, MCP-



1, MCP-2, MCP-3, MGSA, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NAP-2, PF4, RANTES, SCM-1 és SDF-1.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorellenes immunterápiás szer tumorral társult antigént becélzó alkotórésze valamely immunglobulin (Ig) polipeptid, ahol ez tartalmaz egy változó területet, amely a tumorral társult antigén célponthoz kötődik.
17. A 16. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorral társult antigén célpont AFP, CA 125, CEA, CD19, CD20, CD44, CD45, EGF receptor, GD₂, GD₃, GM1, GM2, Her-2/Neu, Ep-CAM (KSA; KS1/4 antigén), IL-2 receptor, Lewis-Y, Lewis-X (CD 15), melanómával társult proteoglikán MCSP, PSA vagy transzferrin receptor.
18. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorellenes szer IL-2 citokint és valamely Ig nehéz láncot tartalmaz, amely immun-reagál a GD₂ tumorral társult antigénnel.
19. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorellenes immunterápiás szer IL-2 citokint és valamely Ig nehéz láncot tartalmaz, amely immun-reagál a KSA (Ep-CAM; KS1/4 antigén) tumorral társult antigénnel.
20. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorsejt neuroektodermális vagy epiteliális.
21. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett tumorsejt adenóma, angioszarkóma, asztrocitóma, epiteliális karcinóma, germinóma, glioblasztóma, glióma, hamartóma, hemangioendotelióma, hemangioszarkóma, hematóma, hepatoblasztóma, leukémia, limfóma, medulloblasztóma, melanóma, neuroblasztóma, oszteoszarkóma, retinoblasztóma, rhabdomyosarkóma, szarkóma vagy teratóma.



22. Gyógyászati kompozíció, amely tartalmaz legalább egy angiogenezis gátló szert, és legalább egy tumorellenes immunterápiás szert, ahol az említett tumorellenes immunterápiás szer egy sejt-effektor alkotórészt tartalmaz egy tumorról társult antigént becélzó alkotórésszel összekapcsolva.
23. A 22. igénypont szerinti gyógyászati kompozíció, amely az alábbiakat tartalmazza:
- a) legalább egy angiogenezis gátló szer olyan mennyisége, amely elegendő angiogenezis gátlására valamely tumorban vagy tumor áttételekben; és
 - b) legalább egy tumorellenes immunterápiás szer olyan mennyisége, amely elegendő biológiai válasz kiváltására.
24. A 22. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett angiogenezis gátló szer valamely $\alpha_v\beta_3$ antagonistája.
25. A 24. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett $\alpha_v\beta_3$ antagonistája valamely peptid, valamely RGD-tartalmú peptid, valamely anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitest, valamely anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest vagy valamely $\alpha_v\beta_3$ mimetikum.
26. A 25. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett RGD-tartalmú peptid a ciklo(RGDfN-MeV) (SEQ ID NO: 11) szekvenciával bír.
27. A 22. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett tumorellenes immunterápiás szer sejt effektor alkotórésze valamely citokin.
28. A 27. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett citokin BDNF, CNTF, EGF, Epo, FGF, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, I-309/TCA-3, γ -IP-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, LT, MCP-1, MCP-2, MCP-3, M-CSF, MIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NGF, NT-3, NT-4, OSM, PBP, PBSF, PGFD, PF-4, RANTES, SCF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , Tpo vagy VEGF.



29. A 27. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett citokin valamely kemokin, mégpedig az alábbiak közül: C10, EMF-1, ENA-78, eotaxin, GCP-2, HCC-1, I-309, IL-8, IP-10, limfotaktin, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MGSA, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NAP-2, PF4, RANTES, SCM-1 és SDF-1.
30. A 22. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett tumorelles immunterápiás szer tumorral társult antigént becélzó alkotórésze valamely immunglobulin (Ig) polipeptid lánc, ahol ez tartalmaz egy változó területet, amely a tumorral társult antigén célponthoz kötődik.
31. A 30. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett tumorral társult antigén célpont AFP, CA 125, CEA, CD19, CD20, CD44, CD45, EGF receptor, GD₂, GD₃, GM1, GM2, Her-2/Neu, Ep-CAM (KSA), IL-2 receptor, Lewis-Y, Lewis-X (CD 15), melanómával társult proteoglikán MCSP, PSA vagy transzferrin receptor.
32. A 22. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett tumorelles immunterápiás szer valamely fúziós fehérje, amely IL-2 citokint és valamely Ig nehéz láncot tartalmaz, amely immun-reagál a GD₂ tumorral társult antigénnel.
33. A 22. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett tumorelles immunterápiás szer valamely fúziós fehérje, amely IL-2 citokint és valamely Ig nehéz láncot tartalmaz, amely immun-reagál a KSA (Ep-CAM; KS1/4 antigén) tumorral társult antigénnel.
34. A 30. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett tumorral társult antigén célpont olyan tumorsejtekből való, amely neuroektodermális vagy epiteliális.
35. A 30. igénypont szerinti kompozíció, ahol az említett tumorral társult antigén célpont az alábbi tumorsejtek valamelyikéből való: adenóma, angioszarkóma, asztrocitóma, epiteliális karcinóma, germinóma, glioblasztóma, glióma, hamartóma,



hemangioendotelióma, hemangioszarkóma, hematóma, hepatoblasztóma, leukémia, limfóma, medulloblasztóma, melanóma, neuroblasztóma, oszteoszarkóma, retinoblasztóma, rhabdomyosarkóma, szarkóma vagy teratóma.

36. Készlet tumorban vagy tumor áttételekben levő tumorsejtek kezelésére, amely készlet csomagot képez, és ez a csomag tartalmaz:
 - a) egy angiogenezis gátló szert, amely az angiogenezis gátlására képes az említett tumorban vagy említett tumor áttételekben;
 - b) egy tumorelles immunterápiás szert, amely tartalmaz egy sejt-effektor alkotórészt és egy tumorról társult antigént becélzó alkotórészt; és
 - c) útmutatásokat a szerek alkalmazásához a tumorok és tumor-áttételek kezelésére szolgáló eljárásokban.
37. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett angiogenezist gátló szer valamely $\alpha_v\beta_3$ antagonist.
38. A 37. igénypont szerinti készlet, ahol az említett $\alpha_v\beta_3$ antagonist valamely peptid, valamely RGD-tartalmú peptid, valamely anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitest, valamely anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest vagy valamely $\alpha_v\beta_3$ mimetikum.
39. A 38. igénypont szerinti készlet, ahol az említett RGD-tartalmú peptid a ciklo(RGDfN-MeV) (SEQ ID NO: 11) szekvenciával bír.
40. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorelles immunterápiás szer sejt-effektor alkotórésze valamely citokin.
41. A 40. igénypont szerinti készlet, ahol az említett citokin BDNF, CNTF, EGF, Epo, FGF, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, I-309/TCA-3, γ -IP-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, LT, MCP-1, MCP-2, MCP-3, M-CSF, MIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NGF,

NT-3, NT-4, OSM, PBP, PBSF, PGFD, PF-4, RANTES, SCF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , Tpo vagy VEGF.

42. A 40. igénypont szerinti készlet, ahol az említett citokin valamely kemokin, mégpedig az alábbiak közül: C10, EMF-1, ENA-78, eotaxin, GCP-2, HCC-1, I-309, IL-8, IP-10, limfotaktin, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MGSA, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NAP-2, PF4, RANTES, SCM-1 és SDF-1.
43. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorelles immunterápiás szer tumorral társult antigént becélzó alkotórésze valamely immunglobulin (Ig) polipeptid, ahol ez tartalmaz egy változó területet, amely a tumorral társult antigén célponthoz kötődik.
44. A 43. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorral társult antigén célpont AFP, CA 125, CEA, CD19, CD20, CD44, CD45, EGF receptor, GD₂, GD₃, GM1, GM2, Her-2/Neu, Ep-CAM (KSA), IL-2 receptor, Lewis-Y, Lewis-X (CD 15), melanómával társult proteoglikán MCSP, PSA vagy transzferrin receptor.
45. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorelles immunterápiás szer valamely fúziós fehérje, amely IL-2 citokint és valamely Ig nehéz láncot tartalmaz, amely immun-reagál a GD₂ tumorral társult antigénnel.
46. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorelles immunterápiás szer valamely fúziós fehérje, amely IL-2 citokint és valamely Ig nehéz láncot tartalmaz, amely immun-reagál a KSA (Ep-CAM; KS1/4 antigén) tumorral társult antigénnel.
47. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorsejt neuroektodermális vagy epiteliális.
48. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorsejt vagy tumor áttétel adenóma, angioszarkóma, asztrocitóma, epiteliális karcinóma, germinóma, glioblasztóma, glióma, hamartóma,

hemangioendotelióma, hemangioszarkóma, hematóma, hepatoblasztóma, leukémia, limfóma, medulloblasztóma, melanóma, neuroblasztóma, oszteoszarkóma, retinoblasztóma, rhabdomyosarkóma, szarkóma vagy teratóma.

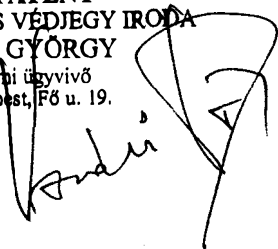
49. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett angiogenezis gátló szer és az említett tumorellenes immunterápiás szer az említett csomagban külön tartályokban helyezkedik el.
50. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett angiogenezis gátló szer és az említett tumorellenes immunterápiás szer egyetlen tartályban van egyesítve az említett csomagban.
51. A 36. igénypont szerinti készlet, ahol az említett angiogenezis gátló szer és az említett tumorellenes immunterápiás szer egyetlen tartályban van egyesítve az említett csomagban, és meg van jelölve a kombinált felhasználáshoz.

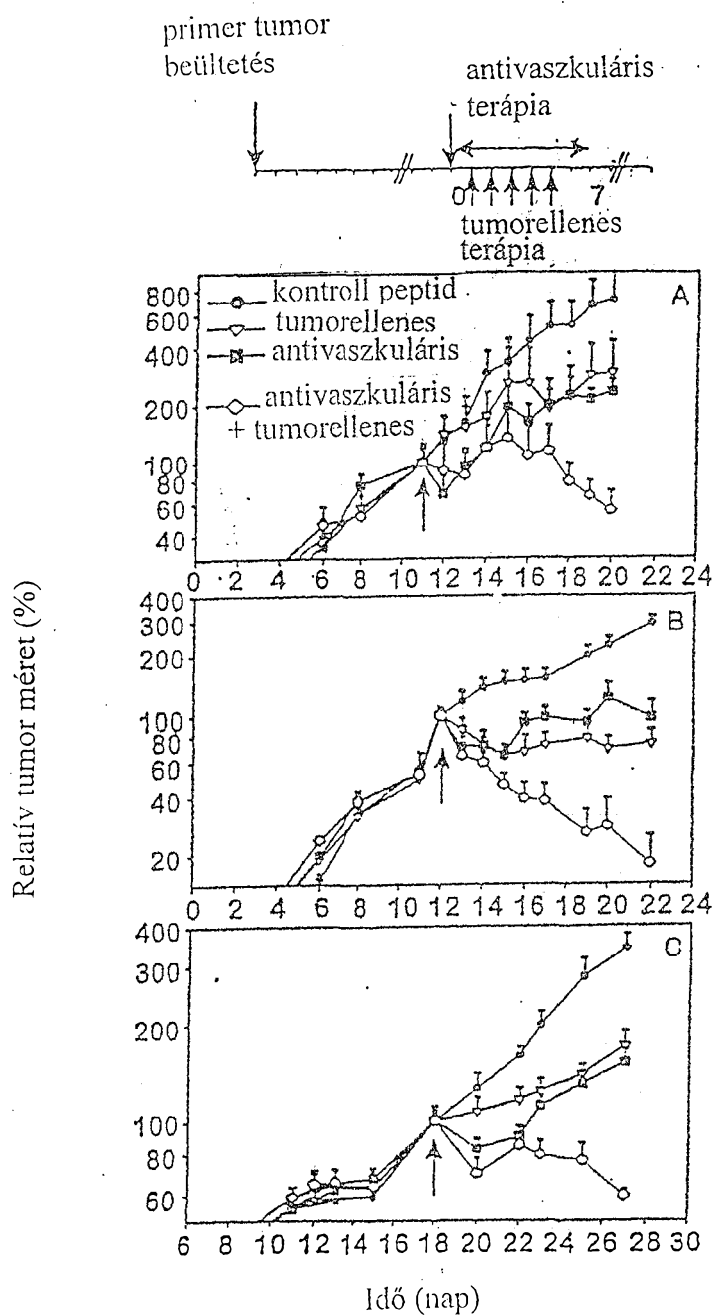
A meghatalmazott:

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA
KOVÁRI GYÖRGY
szabadalmi ügyvivő
1011 Budapest, Fő u. 19.

76 oldal kérés
4 oldal válasz

80 oldal



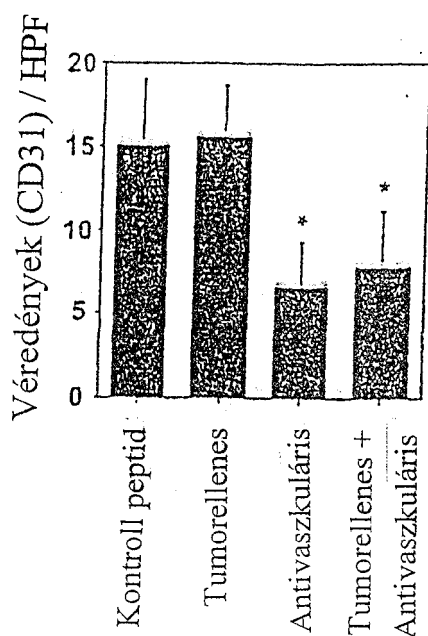


1A. ÁBRA

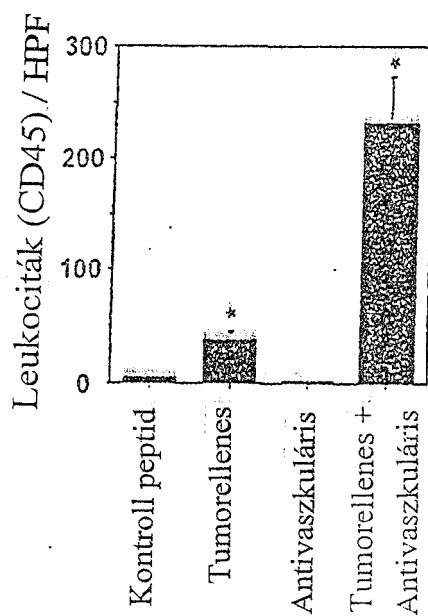
1B. ÁBRA

1C. ÁBRA

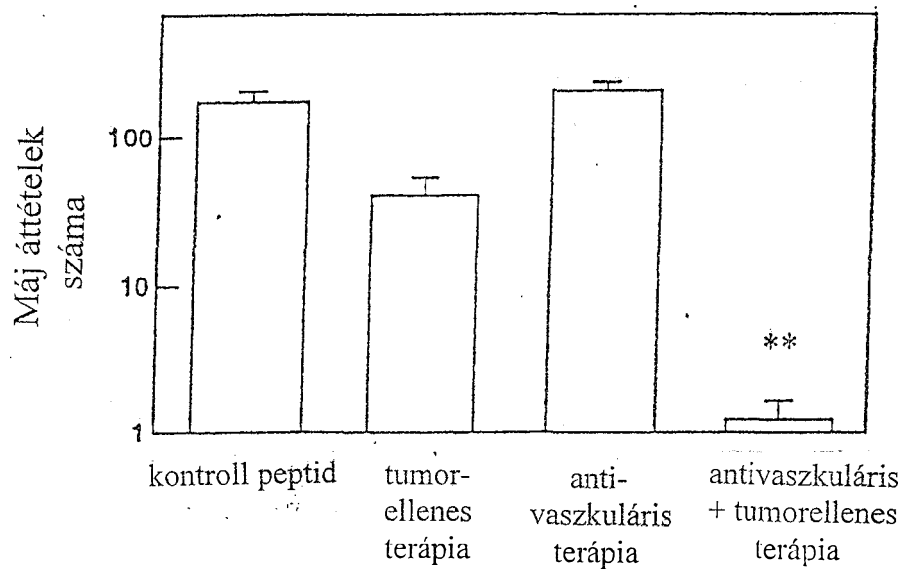
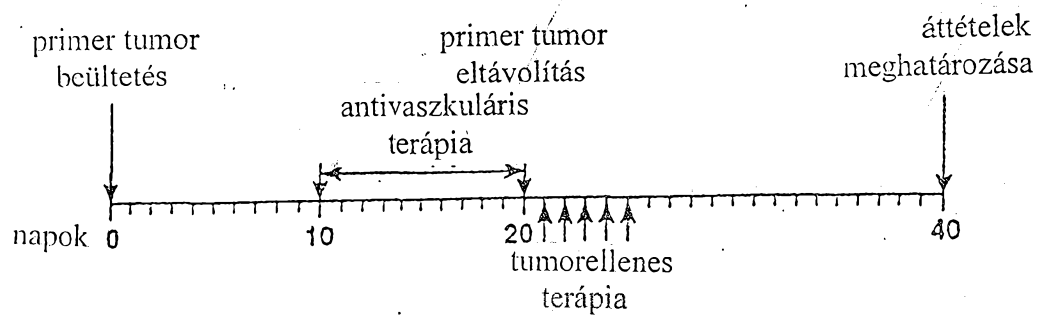
2A. ÁBRA

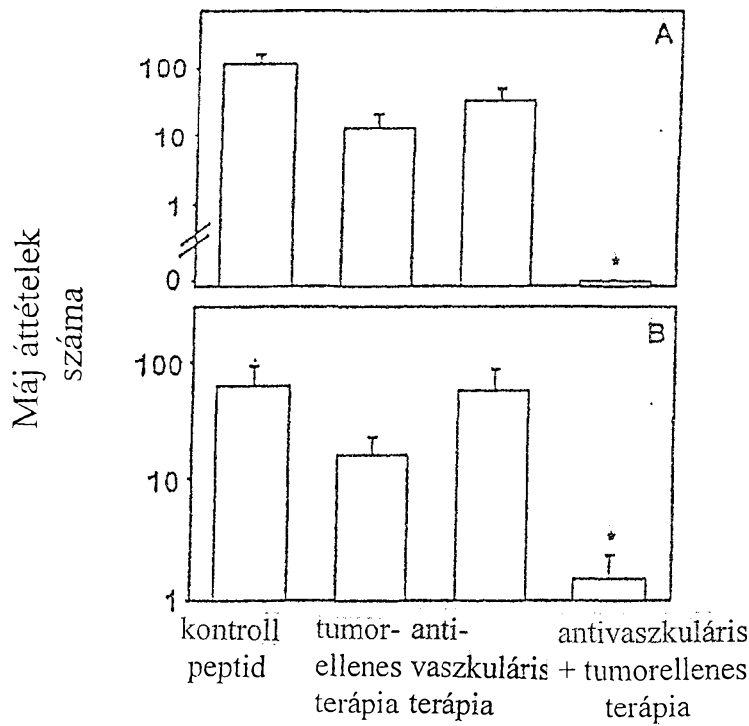
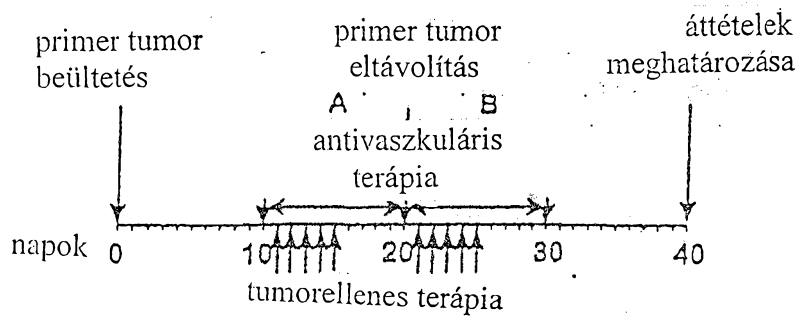


2B. ÁBRA



3. ÁBRA





4A. ÁBRA

4B. ÁBRA