



H U 0 0 0 2 1 7 8 7 1 B

(19) Országkód

**HU****MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL****SZABADALMI  
LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**217 871 B**

(21) A bejelentés ügyszám: P 95 00933  
(22) A bejelentés napja: 1993. 09. 28.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
07/955,523 1992. 10. 01. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 93/09030  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/08606

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>**A 61 K 38/20**

(40) A közzététel napja: 1995. 11. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2000. 04. 28.

(72) Feltalálók:

Bond, Martha, W., Palo Alto, Kalifornia (US)  
Moore, Kevin, W., Palo Alto, Kalifornia (US)  
Pennline, Kenneth, Landing, New Jersey (US)  
Vieira, Paulo, J., Palo Alto, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

SCHERING Corp., Kenilworth, New Jersey (US)

(74) Képviseelő:

Ráthonyi Zoltán, S. B. G. &amp; K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Eljárás hatóanyagként IL-10-et tartalmazó, inzulinfüggő diabetes mellitus megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás interleukin-10-et (IL-10) és kívánt esetben még legalább egy másik, szinergista hatást nem mutató terápiás szert tartalmazó, inzulinfüggő

(1. típusú) diabetes mellitus (IDDM) megelőzésére használható gyógyszerkészítmények előállítására.

**HU 217 871 B**

A találmány interleukin-10-et (IL-10), a korábban citokinszintézist inhibáló faktor (CSIF) néven ismert anyagot hatóanyagként tartalmazó, inzulinfüggő (1. típusú) diabetes mellitus megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására vonatkozik.

Az antigénekre adott immunválaszok lehetnek elsődlegesen sejt által közvetítettek, például a késleltetett típusú hiperérzékenység (DTH) jelensége, vagy humorálisak, például az antitestek termelése. A sejt által közvetített immunitás mindent megelőző fontosságú a dagatok kilökése és számos vírusos, bakteriális, protozoa- és gombafertőzésből való gyógyulás szempontjából. Ezzel szemben a humorális immunválasz az immunitás leghatékonyabb formája a mérgek eltávolítására és a szervezetnek a keringés révén mérgekkel való elárasztása ellen.

Megfigyelték, hogy a különböző antigénekre e két válasz közül valamelyik gyakran egymást kizáró módon domináns jellegű, és hogy bizonyos betegségek, például a lepra, leishmaniasis komolysága és az autoimmunitás bizonyos típusai bekövetkezhetnek valamelyik választípusnak a másik feletti nem megfelelő dominanciája miatt [Mosmann et al.: *Immunol. Today*, 8, 223–227 (1987); Mosmann et al.: *Ann. Rev. Immunol.*, 7, 145–173 (1989); Parish, *Transplant. Rev.*, 13, 35–66 (1972); Liew, *Immunol. Today*, 10, 40–45 (1989)].

Azt is megfigyelték továbbá, hogy adott citokinkészletek külön hozhatók kapcsolatba a DTH-reakciókkal és a humorális immunválaszokkal [Cher et al.: *J. Immunol.*, 138, 3688–3694 (1987); Mosmann et al.: 1987 és 1989, lásd fent], és úgy vélik, hogy az ezen válaszcsoportokkal kapcsolatos betegségeket az asszociált citokinkészletek nem megfelelő termelése váltja ki.

Számos bizonyíték utal arra, hogy a gamma-interferon (IFN-gamma) a felelős a fő hisztokompatibilitási komplexszel (MHC) kapcsolatos autoimmun betegségekért [Hooks et al.: *N. Eng. J. Med.*, 301, 5–8 (1979) (megemelkedett IFN-gamma szérumszintek korrelálnak az autoimmunitással); Basham et al.: *J. Immunol.*, 130, 1492–1494 (1983) (az IFN-gamma megnövelheti az MHC géntermék kifejeződését); Battazzo et al.: *Lancet*, 1115–1119. oldalak (11/12/83) (aberráns MHC géntermék-kifejeződés korrelál az autoimmunitás egyes formáival); Hooks et al.: *Ann. N. Y. Sci.*, Vol. 21–32. oldalak (1980) (magasabb IFN-gamma-szintek korrelálnak a komolyabb fokú betegséggel az SLE-pácienseknél, és az interferon hisztaminfelszabadulást növelő aktivitása antiinterferon szérummal gátolható); Iwatani et al.: *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 63, 695–708 (1986) (anti-IFN-gamma monoklonális antitest megszüntette a leukoagglutinin-stimulált T-sejtek HLA-DR-kifejeződést indukáló képességét)]. Feltételezhető, hogy az IFN-gamma-felesleg az MHC géntermékek nem megfelelő kifejeződését okozza, és ez viszont autoimmun reakciókat vált ki azokkal a szövetekkel szemben, amelyeknek sejtjei nem megfelelően fejezik ki az MHC termékeket, és autoantigént termelnek a termékek hatására.

Az inzulinfüggő diabetes mellitus (IDDM), más néven fiatalkori vagy 1. típusú diabetes autoimmun rendellenesség, amelyet a Langerhans-féle hasnyálmirigy-szigetek (hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtek) sejtbeszűrődése (insu-

litis) jellemez. Úgy tartják, hogy az IDDM a sejt által közvetített autoimmun folyamatok eredménye, és konkrétan a II. osztályú HLA típusokra korlátozódik.

A nem elhízással kapcsolatos cukorbetegségben szenvedő (NOD) egérről ismert, hogy IDDM fejlődhet ki benne. Spontán IDDM következik be a nőstény NOD-egereknél 70–90%-os előfordulási aránnyal 18–25 hetes korban. Mivel ez a betegség a humán betegség összes patológiás és autoimmun tünetét mutatja, a NOD-egér kiváló modell azoknak a szerekeknek az azonosítására, amelyek megelőzhetik az IDDM-et vagy enyhítik a betegség tüneteit.

Embernél az IDDM kialakulása elvileg stádiumokra osztható, a betegség a humán leukocita antigén (HLA) által megszabott genetikai hajlammal kezdődik. Némely genetikailag hajlamos egyénben a kiváltó esemény mind a celluláris, mind a humorális autoimmunitást aktiválja. A glükózstimulált inzulinszekréció és a  $\beta$ -sejttömeg csökken, ahogy a szigetekkel szembeni autoimmunitás előrehalad. E folyamat végül kifejezett diabetesben végződik, mikor csak a maradék  $\beta$ -sejttömeg (<10%-ra becsült hányad) marad meg. A  $\beta$ -sejtek teljes bomlása rendszerint a diagnózist követő hónapokon, éveken belül bekövetkezik.

Az IDDM kezelésére irányuló legújabb erőfeszítések nagyszámú immunszuppresszív terápiás szer, például azatioprin, prednizon és ciklosporin alkalmazásából állnak. Ezek a szerek azonban károsíthatják a májat, vesét és egyéb szerveket, és nemkívánatos hatásuk, hogy hátrányosan befolyásolják az immunvédelmet a fertőzésekkel és egyéb betegségekkel szemben.

A fentiek alapján előnyös lenne olyan szerek és eljárások kidolgozása, amelyek el tudnák tolni az immunválasz egyik osztályának dominanciáját a másikéra, és konkrétan, amelyek el tudnák nyomni vagy meg tudnák növelni az IFN-gamma és/vagy más citokinek szintézisét, a kívánt terápiától függően. Ilyen szerek és eljárások igen előnyösek lennének a nem megfelelő immunválaszok okozta betegségek kezelésében, például a szövetki-lökődéskor, a leishmaniasis és egyéb, paraziták okozta betegségeknel és az MHC-vel kapcsolatos immunrendellenességek esetén, például a reumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus (SLE), myasthenia gravis, inzulinfüggő diabetes mellitus és pajzsmirigygyulladás esetén.

Konkrétabban: szükség van kevésbé toxikus és specifikusabb immunszuppresszív szerekre, amelyek hatékonyak az IDDM kezelésére, de nem mutatják a jelenleg használatos szerek nemkívánatos tulajdonságait.

A találmány tárgyát inzulinfüggő diabetes mellitus megelőzésére használható olyan gyógyszerkészítmények előállítására szolgáló eljárás képezi, amelyek hatóanyagként ismert módon előállított interleukin-10-et (IL-10) tartalmaznak.

Az „ismert módon előállított” hatóanyag az eddig ismert és publikált eljárások bármelyike szerint előállított hatóanyag értendő.

A találmány egy előnyös megvalósításában az IL-10 rekombináns humán IL-10, amely parenterálisan beadható készítménnyé van formázva.

A találmány könnyebben érthető az itt következő leírás és példa, valamint ábrák alapján.

Az 1. ábra a rekombináns humán IL-10 hatását ábrázolja grafikusán a diabetes előfordulására NOD-egérben, a diabetes gyakoriságát az idő függvényében ábrázolva.

A 2. ábra grafikusán bemutatja a rekombináns humán IL-10 hatását a NOD-egerekben talált átlagos glükózszintekre, a glükózszintet az idő függvényében nézve.

Minden felsorolt irodalmi közleményt teljes egészében referenciaként tekintünk.

A továbbiakban az „interleukin-10” vagy „IL-10” olyan fehérjét jelent, amelynek (a) aminosavsorrendje lényegében azonos az érett (vagyis szekréción leader szekvencia nélküli) IL-10 ismert szekvenciájával, ahogy az a 07/917,806 sorozatszámú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben szerepel, amely megfelel a PCT/US 90/03554 számú, WO 91/00349 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésnek, és (b) biológiai aktivitása olyan, mint a természetes IL-10-é. A találmány szempontjából mind a glikozilált (például eukaryota sejtekben, köztük CHO-sejtekben termelt), mind a nemglikozilált (például kémiai úton szintetizált vagy *E. coli*-ban termelt) IL-10 egyenértékű, és egymással felcserélhetően alkalmazható. Muteinek vagy más analógok szintén szóba jöhetnek, köztük a BCRFI (Epstein–Barr-vírus virális IL-10) fehérje, amely megtartja az IL-10 biológiai aktivitását.

A találmány szempontjából megfelelő IL-10 számos forrásból előállítható. Izolálható például fehérjeszokréción képes, aktivált T-sejtek táptalajából. Ezenkívül az IL-10 vagy aktív részei kémiai úton szintetizálhatók a szakirodalomból jól ismert szokásos technológiával. [Lásd Merrifield: *Science* 233, 341–347 (1986) és Atherton et al.: *Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*, 1989, I. R. L. Press, Oxford című munkát.]

A fehérjét vagy polipeptidet előnyösen rekombináns technikával, az IL-10 polipeptidet kódoló izolált nukleinsavakkal állítják elő. A molekuláris biológia általános módszereit ismertetik például Sambrook és munkatársai a *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publish., Cold Spring Harbor, New York, 2. kiadás, 1989 és Ausubel és munkatársai (szerkesztők) a *Current Protocols in Molecular Biology*, Green/Wiley, New York (1987 és időszaki kiegészítések) című munkáikban. A megfelelő szekvenciákat szabvány módszerekkel vagy a genom vagy a cDNS-könyvtárakból lehet kinyerni. Az előállításra polimeráz láncreakció (PCR) használható. [Lásd például a *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Innis és munkatársai (szerkesztők), Academic Press, New York, New York című munkát.]

A könyvtárakat a megfelelő sejtekből extrahált nukleinsavból állítják össze. (Lásd például a WO 9100349 számú, nemzetközi szabadalmi leírást, amely rekombináns eljárást ismertet IL-10 előállítására. Használható gén-szekvenciákat lehet találni például különböző szekvencia-adatbázisokban, például a Gen Bankban és az EMBL-ben nukleinsavakra, és a PIR-ben és Swiss-

Protban fehérjékre, az Intelligenetics, Mountain View, California; vagy a Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wisconsin címenek.)

5 A humán IL-10-et kódoló szekvenciákat tartalmazó klónokat az American Type Culture Collection telepén (ATCC – Amerikai Tenyészet Típus Gyűjtemény), Rockville, Maryland, 68191 és 68192 számon lehet megtalálni. További, IL-10-et kódoló szekvenciákat tartalmazó klónokat vagy nukleinsav-hibridizációval vagy – ha expressziós vektort alkalmazunk – a kódolt fehérje immunológiai jelzésével lehet előállítani. A WO 9100349 számú, nemzetközi szabadalmi leírásban szereplő, törzsgyűjteményben letétbe helyezett szekvenciákon alapuló oligonukleotid próbák különösen jól alkalmazhatók. A szekvenciák azonosítására alkalmas oligonukleotid próbák előállíthatók más fajokban levő megfelelő gének konzervált régióiból is. Másik megoldásként az IL-10 aminosavszekvencián alapuló degenerált próbák alkalmazása jöhet szóba.

20 A szabványtranszfekeciós módszerekkel elő lehet állítani prokaryota, emlős-, élesztő- vagy rovarsejtvonalakat, amelyek nagy mennyiségű polipeptidet fejeznek ki. Mind expresszióra, mind klónozásra megfelelő *E. coli*-törzsekre példaként említhetők a W3110 (ATCC No. 27325), a JA221, C600, ED767, DH1, LE392, HB101, X1776 (ATCC No. 31244), X2282, RR1 (ATCC No. 31343) törzsek. Emlős-sejtvonalak lehetnek például a COS-7-sejtek, az egér-L-sejtek és a CHO-sejtek. [Lásd Sambrook (1989) és Ausubel és munkatársai (1987 és kiegészítők) munkáit.]

25 Különböző expressziós vektorok alkalmazhatók IL-10-et kódoló DNS kifejezéséhez. Használhatók a rekombináns fehérjék prokaryota és eukaryota sejtekben való kifejezésére megfelelő hagyományos vektorok. Előnyös vektorok a pcD vektorok, amelyeket Okayama és munkatársai írnak le a *Mol. Cell. Biol.*, 3, 280–289 (1983) munkában és Takebe és munkatársai a *Mol. Cell. Biol.*, 8, 466–472 (1988) munkában. További SV40-alapú, emlős-expressziós vektorokat ismertetnek Kaufman et al.: a *Mol. Cell. Biol.*, 2, 1304–1319 (1982) munkában és a 4,675,285 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. Ezek az SV40-alapú vektorok különösen jól használhatók a COS7 majomsejtekben (ATCC No. CRL 1651), valamint más emlőssejtekben, például egér-L-sejtekben. [Lásd még Pouwels et al.: (1989 és kiegészítők) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York című munkát.]

50 Az IL-10 előállítható oldható formában, például transzformált vagy transzfekektált élesztő- vagy emlőssejtek szekréción termékei formájában. A peptid azután a szakirodalomból jól ismert eljárásokkal tisztíthatók. Például a tisztítási lépések között szerepelhet az ammónium-szulfátos kicsapás, az ioncserélő kromatográfia, a géliszűrés, az elektroforézis, az affinitáskromatográfia stb. [Lásd például Jakoby (szerk.) *Enzyme Purification and Related Techniques. Methods in Enzymology*, 22, 233–577 (1977) és Scopes, R. *Protein Purification Principles and Practice* (Springer-Verlag, New York, 1982).]

Az IL-10 előállítható továbbá oldhatatlan formában, például aggregátumok vagy zárványanyagok formájában. Az IL-10 ebben a formában a szakirodalomból ismert eljárásokkal tisztítható. A tisztítási lépések között szerepelhet a zárványanyagok elválasztása a roncsolt gazdasejtektől centrifugálással, a zárványanyagok oldása kaotrop szerekkel és redukálószerekkel, az oldott keverék hígítása, és a kaotrop szer koncentrációjának csökkentése úgy, hogy a peptid biológiailag aktív konformációt vegyen fel. Ezen eljárások paramétereit Winkler és munkatársai írják le a *Biochemistry*, 25, 4041–4045 (1986) munkában; valamint Winkler és munkatársai a *Biotechnology*, 3, 992–998 (1985) munkában, és Koths és munkatársai a 4,569,790 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

A gazdasejteket transzfektáló nukleotidszekvenciák a szokásos eljárásokkal módosíthatók különböző tulajdonságokkal rendelkező IL-10-fragmensek előállítására. Az ilyen, módosított IL-10 különbözhet a természetben előforduló szekvenciától a primer szerkezetek, például az aminosavinszerciók, -helyettesítések, -deleciók és -füziók terén. Ezek a modifikációk számos kombinációban alkalmazhatók a végső módosított fehérjelánc előállítására.

Az aminosavszekvencia-változatok különböző céllal készíthetők, köztük a szérumfelezési idő növelésére, a tisztítás és előállítás megkönnyítésére, a terápiás hatékonyság javítására és a terápiás felhasználás során fellépő mellékhatások súlyosságának vagy megjelenésének enyhítésére. Az aminosavszekvencia-változatok általában a természetben elő nem forduló, előre meghatározott szekvenciák, bár lehetnek köztük utótranszlációs változatok, például glikozilációs változatok vagy amelyek polietilén-glikolhoz (PEG) konjugált fehérjék stb. Ezek a változatok alkalmazhatók a találmány céljára, amennyiben az IL-10 biológiai aktivitását megőrzik.

A polipeptideket kódoló szekvenciák módosítása könnyen megvalósítható egy sor eljárással, például helyre irányított mutagenézissel [Gillman et al.: *Gene*, 8, 81–97 (1979); Roberts et al.: *Nature*, 328, 731–734 (1987)]. A legtöbb módosítás rutinszerűséssel követhető a kívánt tulajdonságot kimutató megfelelő teszttel. (Például a WO 91/00349 számú, nemzetközi szabadalmi bejelentés számos in vitro vizsgálatot ismert az IL-10-aktivitás mérésére.)

Eberek kezelésére előnyösen a humán IL-10-et használjuk, bár a vírus- vagy egér-IL-10 vagy más emlősből származó IL-10 szintén használható. Legelőnyösebb a humán rekombináns IL-10. A humán és egér-IL-10 előállítását a WO 91/00349 számon közzétett nemzetközi szabadalmi leírás adja meg. Az Epstein–Barr-vírus alapú IL-10 (BCRFI fehérje) klónozását és kifejezését Moore és munkatársai ismertetik [*Science*, 248, 1230 (1990)].

A rekombináns humán IL-10 a kereskedelemben is beszerezhető, például a PeproTech, Inc. (Rocky Hill, NJ.) cégtől.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítménnyel mindenki kezelhető, aki az IDDM klinikai tüneteinek kialakulására hajlamos. Legtöbb esetben ilyen egyének a fiatal nők, bár a betegség férfiaknál is

kialakulhat. Mivel az IDDM klinikai tüneteinek megjelenésével egyidejűleg rendszerint  $\beta$ -szigetsejt-károsodás is fellép, előnyös a kezelést a megjelenés előtt megkezdeni. Van lehetőség az IDDM klinikai tüneteinek mutató egyének kezelésére is, ha a szigetsejtek bomlása nem túl kiterjedt a kezelés időpontjában.

Mivel az IDDM genetikai alapú betegség, a kialakulás kockázatának kitett egyének gyakran kiszűrhetők a családban előfordult betegségek áttekintésével. Az egyedi kockázat biztosabban azonosítható az IDDM kialakulását előrejelző, megfelelően specifikus bármely ismert marker kiszűrésével. Ilyen markerek például – nem kizárólag – a citoplazmaszigetsejt-ellenanyagok (ICA), az inzulin-ellenanyagok (IAA) és az intravénás glükózterhelésre (IVGTT) válaszként adott, csökkentett, első fázisú inzulinszekréció. A markerek áttekintését Wilson és munkatársai közzölték [*Ann. Rev. Med.*, 41 497–508 (1990)].

A citoplazmaszigetsejt-ellenanyagok az (IgG) immunoglobulin-alosztály ellenanyagai, amelyek humán és állathasnyálmirigy fagyasztott részeihez való specifikus kötődés alapján mutathatók ki [Colman et al.: *Diabetes Care*, 11, 367–368 (1988)]. Az ICA-pozitivitás az esetek 80%-ában pozitív előrejelzési értékkel bír a kórtörténeti áttekintés 9 évének elemzése alapján [Dib et al.: *Br. Med. J.*, 292, 1670 (1986)].

Az inzulin-ellenanyagok (IAA) gyakran kimutathatók a cukorbetegknél az IDDM megállapításakor, és néhány elsőfokú leszármazottnál  $^{125}\text{I}$ -inzulinnal végzett folyadékfázisú radioimmun-vizsgálattal, amint azt Vardi és munkatársai [*Diabetes*, 36, 1286–1291 (1987)] és Srikanta és munkatársai [*Diabetes*, 35, 139–142 (1986)] közzölték. Az a vélemény alakult ki, hogy az IAA koncentrációja tükrözi az autoimmunitás csökkenési sebességét, és hogy a magas IAA-szintet mutató gyermekekben gyorsabb a betegség előrehaladása.

A csökkentett, első fázisú inzulinszekréciót a  $\beta$ -sejt-bomlási fok mértékének tartják [Ganda et al.: *Diabetes*, 33, 516–521 (1984)]. Egy tanulmány szerint egy IVGTT-teszt 79 vizsgált személynél az egy százaléknál kevesebb érték viszonylagos kockázatot mutatott a diabetes előrehaladására. E tanulmány változóinak felhasználásával Jackson és munkatársai [*Clin. Res.*, 36, 588A (1988)] kettős paraméteres modellt dolgoztak ki a kifejldött diabetes beállási időpontjának becslésére.

A továbbiakban a „hatásos mennyiség” kifejezés az IL-10-nek azt a mennyiségét jelenti, amely elegendő az IDDM kialakulását előrejelző egy vagy több marker mennyiségének csökkentésére vagy az IDDM egy vagy több ismert szimptomája javítására (csökkentésére), például glükóztolerancia-tesztekkel [Klimt et al.: *Diabetes*, 18, 299 (1969)] vagy a vérglükózszint mérésével [Jarret et al.: *Lancet*, 2, 1009 (1976)], ketontestekkel [National Diabetes Group, *Diabetes*, 28, 1039 (1979)], a vér inzulinszintje mérésével [Soeldner et al.: *Diabetes*, 14, 771 (1965)] vagy szigetsejtekkel szembeni ellenanyagok [Lernmark et al.: *N. Eng. J. Med.*, 299, 375 (1978)] segítségével való meghatározás szerint.

Az IL-10-et általában hatásos mennyiségű, IL-10-ből és gyógyszerészeti vivőanyagból álló gyógyszerké-

szítmény formájában adagoljuk be. Gyógyszerészeti vívőanyag lehet bármely kompatibilis, nem toxikus anyag, amely alkalmas a találmány szerinti készítmény betegnek való beadására.

A beadagolás előnyösen parenteralis, intraperitonealis, intravénás, szubkután vagy intramuscularis injekció vagy infúzió formájában vagy bármely más elfogadható szisztemikus eljárással történhet. Az intramuscularis vagy szubkután injekció az előnyös. Másik megoldásként az IL-10-et beültethető vagy befecskendezhető gyógyszerbeviteli rendszerrel adagoljuk be [lásd például Urquhart et al.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 24, 199 (1984); Lewis (Szerk.): Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals, 1981, Plenum Press, New York, New York; és a 3,773,919, valamint a 3,270,960 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat]. A gyógyszer orálisan is beadható a jól ismert készítmények alakjában, amelyek megvédik az IL-10-et a gyomor-bél rendszerben található proteázoktól.

Az ilyen gyógyszerek parenteralis adagolására alkalmas készítmények jól ismertek [lásd például Remington, Pharmaceutical Science, 18. kiadás (Mack Publishing Company, Easton, PA 1990)]. Parenteralis adagolás esetén az IL-10-et injektálható dózisegységek formájában (oldat, szuszpenzió, emulzió) készítik, gyógyszerészeti vívőanyaggal. Ilyen vívőanyagra példaként szolgálhat a normál sóoldat, a Ringer-oldat, dextrózoldat és a Hank-féle oldat. Nemvizes hordozók, például a megkötött olajok, valamint az etil-oleát szintén alkalmazható. Előnyös hordozó az 5%-os dextróz/só oldat. A hordozó tartalmazhat kisebb mennyiségű adalékanyagot, köztük olyanokat, amelyek növelik az izotonitást és a kémiai stabilitást, például puffereket és tartósítószerket. Az IL-10-et előnyösen tisztított, lényegében aggregátumoktól és más fehérjeforrásoktól mentes formában készítik, körülbelül 5 és 20 µg/ml közötti koncentrációtartományban. Adott esetben a jól ismert hordozófehérjék, például a humán szérumalbumin szintén hozzáadható.

Az IL-10 bevihető a szabványos génterápiás technikákkal, köztük a DNS-nek közvetlenül a szövetbe való beinjektálásával, rekombináns vírusvektorok alkalmazásával és transzfektált sejtek beültetésével. [Lásd Rosenberg: J. Clin. Oncol., 10, 180 (1992) munkáját.]

Az IL-10 beadagolható magában vagy egy vagy több olyan terápiás szerrel kombinálva, amelyeket az IDDM-szimptomák enyhítésére vagy kezelésére szoktak használni. (Például az inzulin, ciklosporin, prednizon vagy azatioprin együtt adható IL-10-zel.) Az IL-10 aktivitása miatt a többi immunszuppresszív gyógyszer kisebb mennyiségben adható, ezáltal csökkennek az ilyen gyógyszerekkel rendszerint együtt járó komoly mellékhatások.

Az IL-10 aktivitását növelő más citokinagonisták vagy -antagonisták szintén beadagolhatók IL-10-zel kombinálva. Az IL-10 például feltehetőleg úgy fejt ki cukorbetegség elleni hatását, legalábbis részben, hogy inhibálja a TH1-sejtaktivitást, és elősegíti a TH2-sejtaktivitást. A TH1-sejtek növelik a celluláris immunaktivitást, és valószínűleg felelősek a szigetsejtbomlásban részt vevő autoimmun sejtfolyamatok szabályozásában.

A TH2-sejtek részt vesznek a humorális válaszban. Az IL-10 nettó hatása tehát az immunválasz eltolódásában nyilvánul meg, vagyis a szigetsejtek autoimmun sejt-bomlásának csökkenésében. Az IL-4 és az IL-10 együttesen fokozzák a TH2-immunitást. Egy vagy több további szer együttes beadása lehet egyidejű (az IL-10 beadásával együtt) vagy egymást követő (az IL-10 beadása előtt vagy után). Az összes beadott szernek terápiásan hatásos koncentrációban kell jelen lennie a betegben. Ha második szert is beadunk az első szer lebomlási felezési idején belül, akkor a két szer együttadagolásáról beszélünk.

Az IL-10 hatásos adagja körülbelül 1 ng és körülbelül 100 mg között van 1 kg testtömegre számítva, naponta. A dózis általában körülbelül 0,1 és 1000 µg IL-10 közötti tartományban van 1 kg testtömegre, naponta. Konkrét esetben a hatásos mennyiség függ a kezelt IDDM súlyosságától, a páciens általános egészségi állapotától és korától, a bevitel módjától és az esetleg fellépő mellékhatások súlyosságától.

#### Példa

A következő, az oltalmi kört nem korlátozó példa a találmány szerinti gyógyszerkészítmény hatásának szemléltetésére szolgál.

Az IL-10 IDDM kialakulására gyakorolt hatásának meghatározására 10 darab, 10 hetes nőstény NOD-egérnek (Taconic Farms, Inc. Germantown, NY) bőr alá 1 µg, kínai hörcsög petefészeksejtjeiben (CHO) termelt és a szokásos módszerrel tisztított, rekombináns humán IL-10-et adunk be. Az injekciókat naponta megismételjük, amíg az állatok eléri a 27 hetes kort. A kontrollállatcsoport hasonló injekciókat kap, de itt egérszérumalbumint használunk IL-10 helyett.

Hetente farokvéna-véreztetést végzünk a vér glükózszintjének (BGL) meghatározására, és a diabetes-előfordulás meghatározására. Az állatokat normál laboratóriumi táppal etetjük (Purina Pico Lab Rodent Chow) ad libitum, és délután injekciózzuk. A BGL-értékeket a reggeli órákban olvassuk le a nem éheztetett állatokon, a farokvéna-véreztetésből vett vércseppek glükózpróbacsikron való abszorpciójával, az eredmény GLUCOSCAN 3000 típusú vérglükóz-koncentráció mérőn való leolvasásával (Life-scan Inc., Mountain View, CA). A 200 mg/dl fölötti BGL-értéket mutató állatokat vesszük cukorbetegnek. Az eredmények az 1. és 2. ábrán láthatók.

Amint az 1. ábrán látható, ahol a cukorbeteg állatok számát (függőleges tengely) az idő függvényében ábrázoljuk, az IL-10 adagolása (alsó görbe) jelentősen csökkenti a diabetes előfordulását; a 10 állatból csak 1 mutatott olyan magas BGL-értéket, hogy cukorbetegnek jellemezhetjük. Ezzel szemben a 10 kontrollállatból 9 (felső görbe) ilyenek osztályozható.

A 2. ábrán, ahol az átlagos BGL-értéket (vér átlagos glükózszintje mg/dl-ben) az idő függvényében tüntetjük fel, látható, hogy a kontrollcsoport átlagos BGL-értéke 575 mg/dl volt, míg az IL-10-zel kezelt állatoknál az átlagérték 200 mg/dl volt a 29. héten.

Tehát az 1. és 2. ábrákból világosan kiténik, hogy az IL-10 adagolásával megelőzhető a diabetes kialakulása a NOD-egerekben. Nem ismeretesek azok a mecha-

nizmusok (vagy mechanizmus), amelyekkel az IL-10 ezt az eredményt adja, de ez a találmány alkalmazása szempontjából nem fontos.

A találmány számos módosítása és változata megvalósítható a találmány szellemétől és oltalmi körétől való eltávolodás nélkül, amint az a szakemberek számára nyilvánvaló. A leírásban szereplő konkrét megvalósítások csak példaként szolgálnak, és a találmány oltalmi körét csak az itt következő szabadalmi igénypontok korlátozzák.

#### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

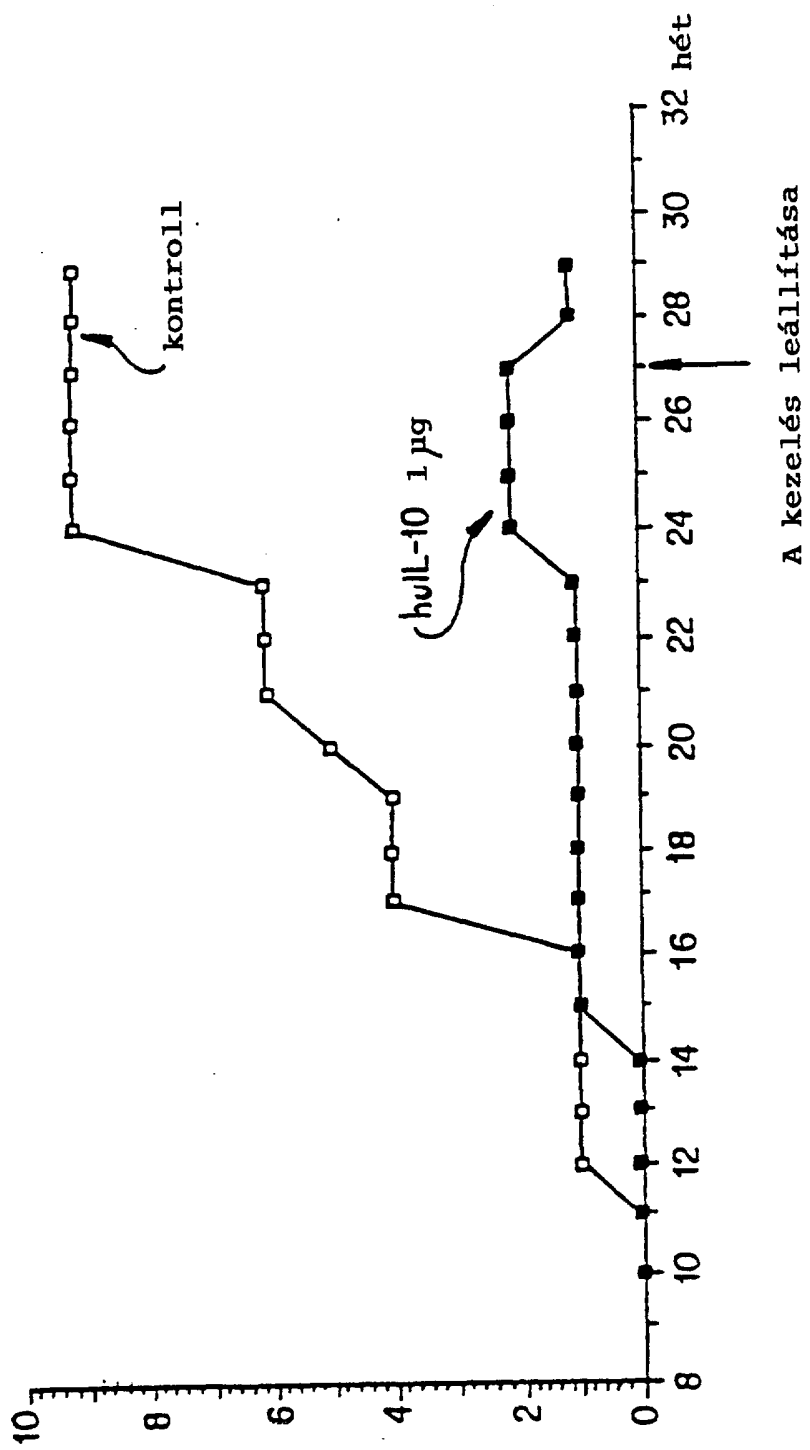
1. Eljárás hatóanyagként interleukin-10-et tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az ismert módon előállított hatóanyagot és ki-

vánt esetben még legalább egy, szinergista hatást nem mutató terápiás szert egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval, hígítóval, oldószerrel és/vagy egyéb segédanyaggal összekeverve inzulinfüggő diabetes mellitus megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítménnyé készíreljük.

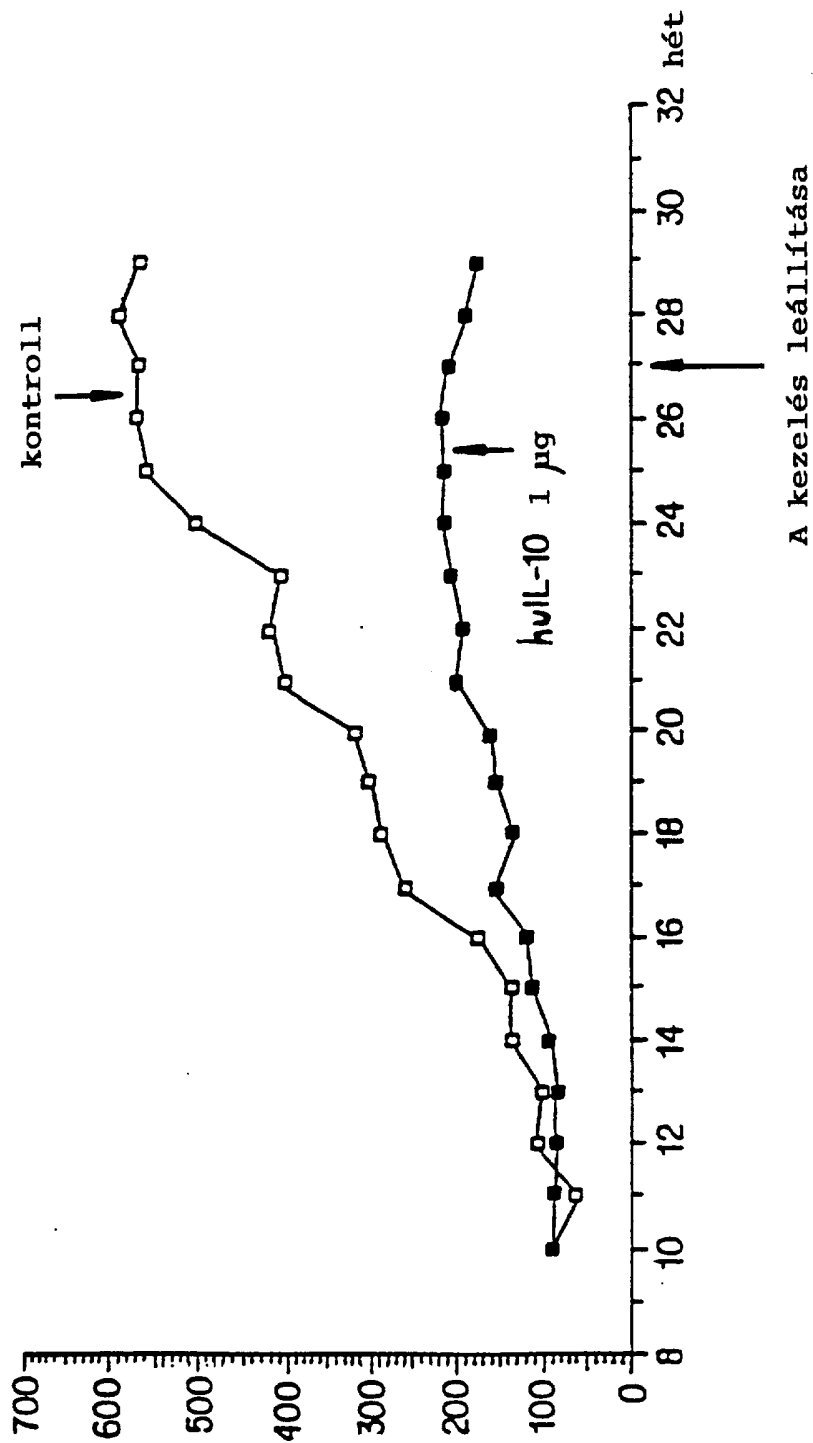
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként humán interleukin-10-et alkalmazunk.

10 3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként rekombináns humán interleukin-10-et alkalmazunk.

15 4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy terápiás szerként inzulint, ciklosporint, azatioprint, prednizont vagy IL-4-et alkalmazunk.



1. ábra



2. ábra