

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

210 009 B

- (21) A bejelentés száma: P 93 01719
(22) A bejelentés napja: 1991. 12. 10.
(30) Elsőbbségi adatok:
90 403585 1990. 12. 13. EP
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 91/02380
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/10201

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 38/20

- (40) A közzététel napja: 1994. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1995. 01. 30. SZKV 95/01

(72) Feltalálók:

Banchereau, Jacques, Ecully (FR)
de France, Thierry, Ecully (FR)

(73) Szabadalmaz:

Schering-Plough, Levallois-Perret (FR)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

**(54) Eljárás IL-4-et tartalmazó, non-Hodgkin malignus limfoma kezelésére
szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás interleukin-4-et (IL-4) hatóanyagként tartalmazó, non-Hodgkin malignus limfoma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítmények ismert eljárással előállított IL-4 hatóanyagot tartalmaznak.

HU 210 009 B

A találmány tárgya eljárás interleukin-4-et (IL-4) hatóanyagként tartalmazó, non-Hodgkin malignus limfoma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítmények ismert eljárással, azaz a bejelentésünk előtt ismert, a technika állásához tartozó bármely eljárással előállított IL-4 hatóanyagot tartalmazhatnak.

Az interleukin-4 (a továbbiakban „IL-4”), más néven B-sejt serkentő faktor – „B Cell Stimulatory Factor 1” vagy BSF-1 – első ismertetése M. Howard és munkatársai nevéhez fűződik [J. Exp. Med. 155, 914-923 (1982)], akik olyan, T-sejt eredetű növekedési faktorként írták le, amely különbözik az IL-2-től, és amely lehetővé teszi normál eger B-limfociták hosszan tartó szövettenyészetének létrehozását, és amely kölcsönhatásba lép az aktivált B-limfocitákkal, és ily módon proliferációjukat akár 4 hónapon keresztül is fenntartja. Bár a tenyésztés beindítására kevert B-limfocita explantátumokat használnak, úgy tűnik, hogy az éretlen fenotípusú B-limfocitákat az IL-4 különösen serkenti szövettenyészetben. [Lásd például: C. Peschel et al., J. Immunol. 142, 1558-1568 (1989)]. Trenn és munkatársai arról számoltak be továbbá [J. Immunol. 140, 1101-1106 (1988)], hogy az IL-4 serkenti citotoxikus T-sejteknek nyugvó eger T-limfociták Lyt-2+ szubpopulációjából történő kifejlődését.

Az eger IL-4 gént COS-7 sejtekben klónozták és fejezték ki [T. Otsuka et al, Nuc. Acids. Res. 15, 333-334 (1987)]. A klónozott faktor minden olyan tulajdonsággal (aktivitással) rendelkezett szövettenyészetben, melyek a T-sejttenyészet felülszójából tisztított faktor esetében láthatók. A humán IL-4 gén klónozását és kifejezését N. Arai és munkatársai [J. Immunol. 142, 274-282 (1989)] és T. Yokota és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 5844-5848 (1986)] ismertették azzal a faktorról, melyet az eredeti (natív) molekulához hasonló aktivitású COS-7 sejtek termelnek, szövettenyészetben vizsgálva. Mivel az IL-4-et mind emberi, mind eger sejtszerekben tanulmányozták, az alábbi in vitro jellegzetességeket sikerült még a molekulával kapcsolatban felfedezni:

i) az IL-4 fontos szerepet játszik az IgE szintézis beindításában (indukciójában) és szabályozásában, abban a folyamatban, amely akkor megy végbe, amikor a B-limfociták szubpopulációinak proliferációját előidézzük (indukáljuk) [Pene, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6880-6884 (1988)]; ii) az IL-4 alacsony affinitású Fcε receptorokat (CD23) indukál szövettenyészetben, normál emberi B-limfocitákon [T. De France et al., J. Exp. Med. 165, 1459-1467 (1987)]; iii) az IL-4 rendkívül pontosan meghatározható módon lép kölcsönhatásba egyéb limfokinekkal, nevezetesen az γ-interferonnal [R. L. Coffman et al., Immunol. Res. 102, 5-27 (1988)]; Pene et al., J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6880-6884 (1988)], valamint a T-sejtekkel [R. L. Coffman et al, lásd előbb; Pene et al., lásd előbb M.D. Widmer et al., Nature 326, 795-798 (1987)] B-sejt proliferáció és alteráció létrehozása céljából; és végül iv) az IL-4 fokozza az MHC II osztályba tartozó anti-

gén kifejezését nyugvó B-sejteken [R. Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6149-6153 (1984)]. T-R. Mosmann és munkatársai [J. Immunol. 138, 1813-1816 (1987)] arról számolnak be, hogy az 1-90. és 129-149. aminosavszekvencia tekintetében 50%-ban homológ humán és eger IL-4 fajspezifikus.

Emberetek esetében végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az IL-4 befolyásolja a monoklonális B-sejt tumorkat. S. Karray és munkatársai [J. Exp. Med. 168, 85-94 (1988)] arról számolnak be, hogy a humán IL-4 gátolja in vitro körülmények között a B-típusú krónikus limfocitás leukémia (B-CLL) sejteinek IL-2-függő proliferációját. T. De France és munkatársai [J. Exp. Med. 168, 1321 (1988)] arról számolnak be, hogy az IL-4 gátolja az IL-2-vel aktivált humán sejtek in vitro proliferációját, differenciálódásukat azonban nem befolyásolja [lásd még D. F. Jelinek et al., J. Immunol. 141, 164 (1988)]. C. M. Higuchi és munkatársai [Can. Res. 49, 6487-6492 (1989)] arról számolnak be, hogy az IL-2-vel előzetesen aktivált, humán perifériás vérből származó limfocitákban az IL-4 limfokine által aktivált sejtölő aktivitást (LAK – lymphokine-activated killer activity) vált ki. J. J. Mule és munkatársai [J. Exp. Med. 166, 792-797 (1987)] ismertetik, hogy eger eredetű rendszer esetében az önmagában alkalmazott IL-4-gyel vagy IL-2-vel való kombinációjával kezelt, nyugvó szplenociták LAK aktivitást hoznak létre – in vitro körülmények között – friss, szingen(et)ikus tumorsejtekkel szemben. G. Forni és munkatársai [Int. J. Can. Sup. 4, 62-65 (1989)] arról számolnak be, hogy a tumorelles aktivitás oly módon váltható ki, ha eger eredetű IL-4-et injektálunk a tumorral összeköttetésben álló nyirokcsomó köré továbbá arról, hogy amikor az IL-4-et humán IL-1β-ből származó nonapeptiddel kombináljuk, igen erőteljes (aktív), limfokine által aktivált tumor gátlás (LATI-lymphokine-activated tumor inhibition) figyelhető meg. J. J. Mule és munkatársai [J. Immunol. 142, 726-733 (1984)] úgy vélik, hogy az eger eredetű IL-4 által indukált sejtek legfontosabb fenotípusára az (aszialo) -GM₁, Thy⁺, Lyt²⁺, T³⁺ felületi kifejezése jellemző, továbbá, hogy az IL-2 és IL-4 kombinációjával létrehozott LAK sejtekben növekszik a szemcsékhez kötött szerin-észteráz koncentrációja. D. J. Peace és munkatársai [J. Immunol. 140, 3679-3685 (1988)] arról számolnak be, hogy az IL-4 által kiváltott LAK aktivitás két különböző sejtípussal áll összefüggésben, ezek egyike NK-szerű (NK 1.1⁺, Lyt²⁻), a másik pedig T-sejt-szerű (NK 1.1⁻, Lyt²⁺). R. I. Tepper és munkatársai [Cell 57, 503-512 (1989)] leírják, hogy eger IL-4-gyel transzfektált eger tumor-sejtvonalak szaporodása in vivo körülmények között gátolható, de amennyiben az IL-4-gyel transzfektált tumorsejteket összekeverjük IL-4-gyel nem transzfektált tumorsejtekkel, in vivo körülmények között a nem kezelt tumor növekedésének gátlása jön létre, amennyiben a kétféle tumorsejt együttesen fordul elő. R. I. Tepper és munkatársai arról is beszámolnak, hogy amikor a nem kezelt tumor disztálisan helyezkedik el az IL-4-gyel kezelt tumortól, gátlás nem volt megfigyelhető. R. I. Tepper végül azt is ismerteti, hogy valamely

citokin – például IL-2 vagy IL-4 – parenterális adagolása. a tumort hordozó állatnak azért nehéz, mert a faktor felezési ideje rövid (ez a helyzet az IL-2 esetében), továbbá azért is, mivel a citokint olyan mennyiségben kell nyerni, amely eléggé nagy ahhoz, hogy hatékony dózisszinteket érthessünk el. G. D’Orazi és munkatársai [Proceeding of the American Association for Cancer Research 31, 252 (1990. március, Abstract No. 1490)] leírják, hogy az IL-4 tumorelles választreakciót váltott ki szőrtelen egér modell esetében.

Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a non-Hodgkin malignus limfoma különböző előfordulási alakjai kezelhetők olyan gyógyszerkészítményekkel, amelyek hatóanyagként IL-4-et tartalmaznak.

A találmány tárgya tehát eljárás gyógyszerkészítmények előállítására, amelyek hatóanyagként ismert módon előállított IL-4-et tartalmaznak és non-Hodgkin malignus limfoma kezelésére alkalmasak.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítmények ismert eljárással, azaz a bejelentésünk előtt ismert, a technika állásához tartozó bármely eljárással előállított IL-4 hatóanyagot tartalmazhatnak.

A találmány szerinti gyógyszerkészítménnyel a non-Hodgkin malignus limfoma növekedése, terjedése gátolható vagy visszaféjlődése érhető el az immunválasz kiváltásával vagy fokozásával.

Találmányunk részletesebb megvilágítására szolgálnak az 1. és 2. ábrák (az abszcisszán az IL-4 koncentrációja egység/ml-ben, az ordinátán a perccénti beütések száma van feltüntetve).

Az 1. ábra az IL-4 in vitro növekedésgátló hatásának dózishatás görbáját szemlélteti a nyirokcsomókból nyert, rosszindulatú B-sejtek IL-2-vel kiváltott proliferációjára.

A 2. ábra az IL-4 növekedésgátló hatásának dózishatás görbáját szemlélteti a találmány értelmében, a nyirokcsomókból nyert, rosszindulatú B-sejtek anti-Ig M-mel kiváltott proliferációjára.

A továbbiakban a találmányt annak példaszerű kiviteli alakjai segítségével ismertetjük részletesebben.

A találmányi leírásban a „B-sejtes rosszindulatú daganat”, illetve a „malignus B-sejt” kifejezést abban az értelemben használjuk, hogy azok az alacsony, közepes, illetve magas malignitási fokú B-sejt tumorok és B-sejt neoplazmák széles skálájára utalnak, ide sorolva – nem korlátozó jelleggel – a leukémiás eredetű B-sejteket, például a krónikus limfocitás leukémiák (a továbbiakban „CLL” – chronic lymphocytic leukemia) B-sejtjeit, a B-sejtes limfómák (beleértve a non-Hodgkin malignus limfoma, a továbbiakban „NHML”) B-sejtjeit, a centroblasztos-centrocitás limfómát, a follikuláris kis hasadt sejt („FSC” – follicular small-cleaved cell) B-sejt limfómát, a diffúz kis hasadt sejt („DSC” – diffuse small-cleaved cell) B-sejt limfómát, a kis nem-hasadt sejt („SNC” – small non-cleaved cell) B-sejt limfómát, az immunblasztos nagy sejt („IBS”) B-sejt limfómát, a kis sejt limfocitás („SCL”) B-sejt limfómát és a diffúz nagy sejt („DLC”) B-sejt limfómát, valamint azokat a B-sejtes limfómákat, amelyeket R. A. Miller és munkatársai

ismertetnek [New England J. Med. 321, 851–856 (1989)].

Egy in vitro, preklinikai vizsgálatban azt tapasztaltuk, hogy a találmány szerint adagolt IL-4 gátolta a malignus B-sejtek interleukin-2 („IL-2”) indukálta proliferációját tizenhat (16) krónikus limfocitás leukémiás („CLL”) beteg közül tizenötben (15), valamint tíz (10) alacsony malignitási fokú limfómában szenvedő beteg közül hétnél (7). Egy klinikai vizsgálat során 5 mikrogramm/kg/nap dózisban IL-4-et adtunk be szubkután bólusz injekció formájában tíz betegnek, közöttük egy CLL-es és egy alacsony fokozatú limfómás betegnek. Az említett limfómás betegnél a nyirokcsomók és a lép nagyságának gyors csökkenése (zsugorodása) volt megfigyelhető, a CLL-ben szenvedő betegnél pedig 6 órával az egyszeri, 5 µg/kg dózisu, szubkután IL-4 injekció beadása után – több, mint háromszoros csökkenés következett be a keringő B-sejtek számában.

Egy in vitro vizsgálatban kimutattuk, hogy az IL-4 gátolja a frissen izolált non-Hodgkin malignus limfoma (a továbbiakban „NHML”) B-sejtjeinek in vitro proliferatív választreakcióját. Ezen, in vitro, anti-proliferációs (proliferáció-gátlást vizsgáló) vizsgálat céljára a leukémiás NHML B-sejteket oldhatatlanná tett anti-IgM antitestekkel vagy a Staphylococcus Aureus Cowan-féle 1-es törzsével (a továbbiakban „SAC”) aktiváltuk. A leukémiás NHML B-sejtek esetében 9 közül 8-nál az IL-2 volt az egyetlen olyan citokin/B-sejt növekedést elősegítő faktor, amely szignifikánsan és reprodukálható módon stimulálta a DNS-szintézist ezekben, a felületi Igs-eiken keresztül aktivált NHML B-sejtekben. Az IL-4 erőteljesen gátolta azokat a proliferatív jelzéseket, amelyeket önmagukban az anti-Ig reagensek, illetve az IL-2 és az anti-Ig reagensek kombinációja közvetített az NHML B-sejtek felé. Ezek az in vitro adatok azt mutatják, hogy elsősorban az IL-4 biztosítja a növekedést gátló jelzések eljutását az NHML B-sejtekhez, amely B-sejtek aktiválása felületi Ig-receptorai révén történik. Ezen in vitro eredmények alapján azt várhatjuk, hogy az IL-4 hatékonyan alkalmazható lehet a magas malignitási fokú (érett, jól differenciált) B-sejtes rosszindulatú folyamatok klinikai kezelése során.

A találmányi leírás értelmében a „B-sejtes rosszindulatú daganatok kezelése” kifejezés a találmány szerint alkalmazott IL-4 adagolás hatására kialakuló B-sejt ellenes választreakciók széles tartományát öleli fel, mégpedig a következőket: (1) a B-sejtes rosszindulatú daganat visszaféjlődésének (regressziójának) kiváltása; (2) a malignus B-sejtes daganatok növekedésének gátlása; (3) a malignus B-sejtek proliferációjának gátlása; (4) olyan hatékony immunválasz kiváltása, amely gátolja a malignus B-sejt tumor növekedését, illetve a malignus B-sejtes tumor regresszióját hozza létre; és (5) a hatékony immunválasz fokozása a malignus B-sejt tumorok növekedésének gátlása, illetve visszaféjlődésük kiváltása érdekében, emlősök esetében. A találmány értelmében alkalmazott IL-4 hiányában bizonyos emlősök választreakciója nem eléggé erős és nem eléggé gyors ahhoz, hogy kiválthassa a malignus B-sejt

tumorkok növekedésének gátlását, illetve a malignus B-sejtes daganatok regresszióját, sikerült azonban olyan hatékony eljárásokat találnunk, amelyek során a malignus B-sejt tumort hordozó emlősöknek az IL-4 – előnyösen a rekombináns IL-4 – olyan mennyiségét adagoltuk, mely valamennyi említett cél tekintetében hatékonyan bizonyul.

A találmány szerint bármilyen előnyös IL-4-alkalmazható. Nemrégiben számos laboratóriumban sikerült az IL-4 komplementer DNS-ek (cDNS-ek) klónozása és szekvenálásuk [például Yokota et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5694–5898 (1986) (humán)] Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2061–2065 (1986) (egér); Noma et al., Nature 319, 640–646 (1986) (egér); Genzyme Corporation, Boston, Massachusetts (humán és egér)]. Nem rekombináns IL-4 klónozása is sikerült továbbá különböző tenyészetek felülűszoiból [például Grabstein et al., J. Exp. Med. 163, 1405–1413 (1985) (egér); Ohara et al., J. Immunol. 135, 2518–2523 (1965) (egér BSF-1)]. A fenti cikkekben foglaltak a találmány szempontjából referenciaként e tekinthetők, a DNS-sel és az aminosavszekvenciával kapcsolatos, valamint azon módszerekre vonatkozó tanításai tekintetében, amelyek segítségével előnyös, a találmány szerint felhasználható IL-4 anyagok állíthatók elő.

A találmány szerinti eljárás során felhasznált IL-4 előnyösen emberi IL-4, legelőnyösebben pedig az alábbi közlemények által ismertetett szekvenciájú humán változat: 1. Yokota és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5894–5898 (1986) és a 87/02990 számú, 1987. május 21-én közzétett PCT szabadalmi bejelentés; ezen IL-4 kifejezése és izolálása E. coliból történt.

A fenti cikkekben, és PCT szabadalmi bejelentésben foglaltak referenciáiként tekintendők a találmányi leírásunk szempontjából.

A találmány értelmében emlősöknek az IL-4 hatékony mennyiségét adagoljuk a malignus B-sejt tumor növekedésének gátlása, a malignus B-sejt tumor regressziójának előidézése, valamint hatékony immunválasz kiváltása céljából, miáltal a malignus B-sejt tumor növekedésének gátlása, a B-sejt tumor regressziója (visszafejlődése) hozható létre, illetve a hatékony immunválasz fokozásával is kiváltható a B-sejtes tumor növekedésének gátlása, illetve az ilyen tumor regressziója. Előnyös adagolás esetén körülbelül 0,25 és körülbelül 15 mikrogramm közötti mennyiségű IL-4-et alkalmazunk naponta tömegkilogrammonként, előnyösen olyan humán IL-4-et („hIL-4”), melyet E. coliból vagy CHO sejtekből állítunk elő rekombináns eljárással, még előnyösebben E. coliból kivont rekombináns hIL-4-et. Még előnyösebben az emlősöknek naponta körülbelül 5 és körülbelül 15 mikrogramm közötti mennyiségű rekombináns hIL-4-et adunk testtömegkilogrammonként, legelőnyösebben pedig az emlősök körülbelül napi 5 és 10 mikrogramm közötti mennyiségű rekombináns hIL-4-et kapnak testtömegkilogrammonként, egyszeri vagy több részre osztott dózisokban.

Az adagolás mennyisége, gyakorisága és időtartama különböző tényezők függvénye, ilyenek például a

neutrofil sejtek száma és a monociták száma (például a monocitopénia vagy a granulocitopénia súlyossága), a beteg életkora, tápláltsága, stb. Az IL-4 adagolása kezdetben általában naponta történik, és periodikusan a beteg egész élete folyamán folytatódhat. Az adagolt mennyiség nagysága és az adagolás gyakorisága oly módon határozható meg, hogy kezdetben gyakran ellenőrizzük a neutrofil sejtek számát és az IL-4-nek az antitestszintek növekedésére gyakorolt hatásának nagyságát.

Az adagolás módja lehet intravénás, parenterális, szubkután, intramuszkuláris vagy pedig bármilyen egyéb elfogadható szisztémás eljárás. Az IL-4 adagolása történhet bármilyen hagyományos adagolási formában. A parenterális készítmények közé tartoznak a steril oldatok és a szuszpenziók. Azon dózisok, melyek meghaladják a körülbelül 10 és körülbelül 15 mikrogramm rekombináns IL-4 mennyiséget testtömegkilogrammonként, előnyösen intravénásan vagy szubkután eljárással (például szubkután bólusz formájában) adagolandók emberek esetében.

A fenti adagolási formákban létrehozott gyógyszerkészítmények előállítása során bármilyen, hagyományosan alkalmazott, gyógyszerészeti szempontból elfogadható kötőanyag és adalékanyag felhasználható, hagyományos eljárások alkalmazásával.

Jelenleg az IL-4-et előnyösen szisztémásan – injekció formájában – alkalmazzuk, előnyösen szubkután bólusz vagy intraperitoneális injekció vagy pedig intravénás injekció formájában. Az alkalmazandó oldatok lehetnek helyreállított (rekonstruált) liofilizált porok, melyek tartalmazhatnak továbbá tartósítók szereket, puffereket, diszpergáló szereket, stb. is.

Az IL-4 helyreállítása (rekonstruálása) előnyösen 10 mM citrát-pufferrel és tartósító szertől mentes steril vízzel történik oly módon, hogy a maximális koncentráció ne lépje túl a 100 mikrogrammot milliliterenként, az adagolás pedig szisztémásan történik szubkután injekció, intraperitoneális injekció vagy folyamatos intravénás infúzió, illetve intravénás injekció formájában. Folyamatos infúzió esetében a napi dózist 5 ml normál sóoldathoz adhatjuk hozzá, az oldat infúziós formában történő bevitelét pedig mechanikus pumpa vagy a gravitáció segítségével biztosíthatjuk.

Az IL-4-nek a B-sejtes rosszindulatú daganatokra gyakorolt hatását többek között a nyirokcsomók és a lép zsugorodásával (nagyságának csökkenésével), a keringő malignus B-sejtek számának csökkenésével, valamint a tumor térfogatának csökkenése alapján [ennek mérése standard technikák, például mérőkörrző, röntgenvizsgálat és MRI (mágneses rezonancia vizsgálat) segítségével történhet], valamint annak alapján, hogy az ilyen emlősök élettartama, illetve túlélése megnövekszik, amint azt az alábbi kísérleti terv alapján megállapíthatjuk.

Példa

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A malignus (leukémiás) B-sejtek izolálása és tisztítása

A kórszövettani mintákat Pr. Sotto (Hospital Albert Michallon, Grenoble, France), Dr. J. F. Rossi (Hospital Val d'Aurelle, Montpellier, France) és Dr. J. P. Magaud (Hospital Edouard Herriot, Lyon, France) biztosította számunkra. A vizsgálat céljára kilenc olyan beteget választottunk, akik a műtétet megelőző négy hónap folyamán nem részesültek kemoterápiás kezelésben, és diagnózisuk – a Kiel-féle osztályozás szerint – alacsony malignitási fokú non-Hodgkin, non-Burkitt B-sejtes malignus limfoma (NHML) volt. A feldolgozásra kerülő minták közül 5 nyirokcsomó-eredetű (EMZ, GAN, PP, MAI, PRO), 4 pedig lép-eredetű volt (BOU, DEL, BRE, THE). A szervek acélból készült szűrőn keresztül történő szétmorzsolása, valamint a sejtszuszpenzió Ficoll/Hypaque grádiensen történő centrifugálása után mononukleáris sejteket nyertünk. A B-sejtek tisztítása céljából a mononukleáris sejteket először juhoktól nyert vörösvérsejtekkel E-rozettaképzésnek tettük alá. A rozettát nem képező sejtek (E frakció) ezt követően inkubálásra kerültek anti-T-sejtek (anti-CD3, anti-CD2) és anti-monocita (anti-CD14) monoklonális antitestek keverékével. A visszamaradó nem-B-sejteket ezután eltávolítottuk az E sejtpopulációból, anti-egér IgG-vel bevont mágneses golyókkal (Dynabeads, Dynal, Oslo, Norway) végzett inkubálás után.

Reagensok

Oldhatatlanná tett anti-IgM antitesteket szereztünk be a BioRad Laboratories-től (Richmond, CA) és 10 µg/ml-es végső koncentrációban használtuk fel. Staphylococcus Aureus Cowan I-es törzsébe tartozó (SAC) formalinozott részecskéket – Pansorbin – szereztünk be a Calbiochem-Behring Corporationtól (La Jolla, CA). A SAC-ot 0,005%-os (tömeg%) végső koncentrációban alkalmaztuk.

Citokinek

Tisztított rekombináns IL-2-t (3×10^6 U/ml) szereztünk be az Amgen Biologicals (Thousand Oaks, CA) cégtől, és 20 U/ml-es végső koncentrációban használtuk, melyet optimálisnak találtak az oldhatatlanná tett anti-IgM antitestekkel ko-stimulált normális B-sejtek optimális szaporodása szempontjából.

A tisztított rekombináns humán IL-4-et (melyet E. coliból nyertek, koncentrációja 1×10^7 U/mg) Dr. P. Trotta és Dr. T. L.

Nagabhushan (Schering-Plough Research, Bloomfield, NJ) bocsájtotta rendelkezésünkre. Ezekben a kísérletekben az IL-4-et 500 U/ml-es végső koncentrációban használtuk, mely a B-sejtek szaporodását maximális mértékben serkenti, oldhatatlanná tett anti-IgM antitestekkel aktivált, normál B-sejtekkel nyert becslések alapján.

Tenyészetek

A kilenc tisztított leukémiás NHML B-sejtet Iscove-féle táptalajban tenyésztettük (Flow Laboratories, Irvine, CA) amelyet 50 Ng/ml humán transzferinnel (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,5% szarvasmarha szérum-albuminnal (Sigma), 5 µg/ml szarvasmarha inzulinnal (Sigma), 5% szelektált, hővel inaktivált főtális borjú-szérummal, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml Streptomycinnel (a fentiek mindegyikét a

Flow Laboratories-től szereztük be) és 10^5 M β-merkaptoetanollal (Sigma) egészítettünk ki. A proliferációs vizsgálatok céljából 1×10^5 leukémiás B-sejtet 100 µl tenyésztő közegben vékony rétegben felvittünk kerek aljú mikrovázatokba, majd 5% szén-dioxidot tartalmazó, nedvesített légkörben, 37 °C hőmérsékleten, 5 napon keresztül inkubáltuk PBA-SAC poliklonális B-sejt aktivátorok, illetve oldhatatlanná tett anti-Ig M antitestek Fs/vagy IL-4 (500 U/ml) és/vagy IL-2 (20 U/ml) faktorok jelenlétében, amelyeket a tenyésztés megkezdésekor adtunk hozzá a sejt kultúrához. A DNS-szintézist (3H)-timidinnel jelzett sejtek a továbbiakban „(3H)Td R” radioaktivitásának mérése révén állapítottuk meg a tenyésztési periódus utolsó 16 órája során. A leukémiás B-sejtminták válaszreakcióinak heterogenitása következtében a DNS szintézist a tenyésztés megkezdését követő 4 különböző időpontban (a 3., 4., 5. és 6. napon) is felbecsültük. Az 1. táblázatban közölt eredmények megfelelnek annak az időpontnak, amikor a maximális stimulációs indexet találtuk. A (3H)Td R inkorporáció per centenkénti beütésszámát ($\text{cpm} \times 10^3$) háromszoros meghatározások átlagaként fejeztük ki.

A standard deviáció sosem haladta meg az átlagérték 10%-át. Az eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

Az IL-4-et magvizsgáltuk azon képessége szempontjából, hogy antagonizálni képes-e az NHML B-sejtek IL-2-re adott, proliferatív válaszreakcióját. Az NHML B-sejtek 9 mintájának mindegyikét tehát együtt tenyésztettük IL-2-vel (20 U/ml) és IL-4-gyel (500 U/ml), előzetesen az aktiválás szempontjából optimálisnak ítélt anti-Ig reagens jelenlétében. Mivel a leukémiás sejtek az IL-2 szaporodást elősegítő hatására adott válaszreakció idő-kinetikája tekintetében is különböztek egymástól, a DNS-szintézist a tenyésztés megkezdését követő 4., 5., 6. és 7. napon is mértük. Az 1. táblázatban látható adatok minden egyes klón esetében bemutatják a (3H)Td R azon szintjeit, melyeket az IL-2-re adott proliferatív válaszreakció csúcsértékének megfelelő időpontban mértünk. Egy klón (MAI) nem mutatott szignifikáns szaporodási válaszreakciót IL-2-re, illetve IL-4-re, egyik aktivációs rendszerben sem, így módon ezeket az adatokat nem tüntettük fel az 1. táblázatban.

8 eset közül 7-ben az IL-4 nem fejtett ki szinergista hatást az anti-Ig reagensekkel az NHML B-sejtek DNS-szintézisének elősegítése tekintetében. Egy klón (BRE) azonban ellentétes válasszintet mutatott, és proliferáció volt megfigyelhető az IL-4-gyel és anti-IgM antitestekkel végzett tenyésztés során. A BRE klón kivételével valamennyi NHML B-sejtből származó minta szaporodási válaszreakciót adott IL-2-re, Valamennyi, IL-2-re reagáló klón esetében az IL-4 szignifikánsan gátolta a sejtek IL-2 okozta proliferációját. Az IL-4-nek a GAN jelű leukémiás klón 1×10^5 sejtjén megfigyelt, IL-2 által kiváltott, 0,005% SAC-kal és 10 U/ml IL-2-vel stimulált, sejtszaporodást gátló hatásának titrálása IL-4 hiányában, illetve az IL-4 hígítási sorozatának jelenlétében történt. A (3H)Td R inkorporáció mérését a 4. napon végeztük. Az 1. ábra egy olyan dózis-hatás görbét mutat be,

mely három kísérlet eredményeit összesíti és grafikus ábrázolással azt mutatja be, hogy az IL-2-re adott válaszreakció teljes gátlása már olyan alacsony IL-4 koncentráció esetén is megfigyelhető, mint a 16 U/ml.

A 2. ábra olyan dózis-hatás görbét szemléltet, amely grafikus ábrázolással összegzi 4 kísérlet eredményeit, és az IL-4-nek a PRC klón anti-IgM-indukálta proliferációjára kifejtett, sejtszaporodást gátló hatását szemlélteti. Ezeket a leukémiás sejteket (1×10^5 PRO) oldhatatlanná tett anti-IgM antitestekkel (10 mikrog/ml) stimuláltuk, IL-4 hígítási sorozatának távollétében, illetve jelenlétében. A (3H)TdR hozzáadása a 4 napos tenyésztési periódus utolsó 16 órája során történt. A (3H)TdR inkorporációja nem-stimulált tenyészetekben 346 ± 28 cpm volt. Az

IL-4 gátolta továbbá a három másik NHML B-sejtminta (BOU, EMZ, PRO) szaporodását is, amelyek már szignifikáns proliferatív válaszreakciót mutattak felületi Ig-ik SAC-kal vagy anti-IgM antitestekkel való kötődésekor (lásd 1. táblázat és 2. ábra). Jelen vizsgálatunkban azt mutatjuk ki, hogy felületi Ig receptoraikon keresztül aktivált NHML B-sejtek nagy többségének DNS-szintézise IL-2 segítségével stimulálható. Bizonyos (a 9-ből 3) tumormintáknál úgy is kiváltható volt proliferatív válaszreakció, ha exogén növekedési faktorok nélkül, pusztán a felületi Ig-k kötődése történt. Az IL-4 nem csak ezen sejtek IL-2-re adott szaporodási válaszreakcióját gátolta szignifikánsan, hanem a magára az anti-Ig reagensre létrejött reakciót is.

1. táblázat

AZ IL-4 ANTI-PROLIFERATIV HATÁSAI FRISSEN IZOLÁLT NON-HODGKIN MALIGNUS LIMFOMA („NHML”) B SEJTEK¹ IL-2 ÁLTAL KIVÁLTOTT SZAPORODÁSÁRA

	PBA=	SAC ²	PBA=			Anti-IgM		
NHML B-sejtek ³ :	BOU	THE	PP	DEL	GAN	EMZ	PRO	BRE
Tenyésztő közeg	0,5	0,3	0,2	1,2	0,6	0,2	0,3	0,2
PBA ⁴	21,4	2,3	6,2	0,6	0,6	18,2	64,8	2,4
PBA+IL-4 ⁵	11,9	2,0	3,0	1,6	4,0	7,8	30,1	9,1
PBA+IL-2 ⁶	35,5	7,9	47,2	8,4	22,2	56,8	72,3	4,5
PBA+IL-2+IL-4	12,8	3,9	9,5	3,7	9,5	13,6	27,8	11,1

1. (3H)TdR inkorporáció ($\text{cpm} \times 10^{-3}$), 5 nap múlva mérve, és három meghatározás; átlagaként kifejezve
2. SAC = Staphylococcus Aureus Cowan 1-es törzs
3. 1×10^5 NHML sejt, 5 napig 37 °C hőmérsékleten inkubálva
4. PBA = poliklonális B-sejt aktivátor
5. 500 U/ml (E/ml) IL-4
6. 20 U/ml (E/ml) IL-2

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hatóanyagként IL-4-et tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az ismert módon előállított hatóanyagot a szokásos gyógyszerészeti segédanyagokkal összekeverve non-Hodgkin malignus limfoma kezelésére alkalmas gyógyszerkészítménnyé feldolgozzuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy non-Hodgkin malignus limfoma növekedését gátló gyógyszerkészítményt állítunk elő.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy non-Hodgkin malignus limfoma terjedését gátló gyógyszerkészítményt állítunk elő.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy non-Hodgkin malignus limfoma növekedését gátló vagy visszafejlesztő hatásos immunválaszt kiváltó gyógyszerkészítményt állítunk elő.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy non-Hodgkin malignus limfoma növekedését gátló vagy visszafejlesztő hatásos immunválaszt fokozó gyógyszerkészítményt állítunk elő.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy intravénás, intraperitoneális vagy szubkután beadásra alkalmas gyógyszerkészítményt állítunk elő.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 0,25-15 $\mu\text{g/kg}$ testtömeg napi IL-4 adagot tartalmazó gyógyszerkészítményt állítunk elő.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy IL-4-ként E. coli-ból származó rekombináns humán IL-4-et alkalmazunk.



