

P02 01009

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

40350

A1

**Autoimmun betegségek kezelése B-sejt-felületi
markerekhez kötődő antagonistákkal**

KIVONAT

A találmány tárgyát autoimmun betegségek B-sejt-felületi markerekhez (pl. CD19-hez és CD20-hoz) kötődő antagonistákkal végzett kezelése képezi. A találmány tárgyát képezik továbbá termékek, amelyek a B-sejt-felületi markerekhez kötődő antagonistákat tartalmazó készítményt hordozó tartályokból és a hozzájuk mellékelt felhasználási útmutatóból állnak.

jellemező ábra: Ø

FR

**Autoimmun betegségek kezelése B-sejt-felületi
markerekhez kötődő antagonistákkal**

A találmány tárgyát autoimmun betegségek B-sejt-felületi markerekhez (pl. CD19-hez és CD20-hoz) kötődő antagonistákkal végzett kezelése képezi.

A limfociták a csontvelőben a hematopoiesis során termelődő fehérvérsejtek számos típusának egyikét reprezentálják. A limfociták két fő populációja létezik: a B-limfociták (B-sejtek) és a T-limfociták (T-sejtek). A találmány szerinti megoldás szempontjából jelentős limfociták a B-sejtek.

A B-sejtek a csontvelőben érnek, és a csontvelőt elhagyva sejt-felületükön antigénkötő antitestet termelnek. Amikor egy natív B-sejt először találkozik azzal az antigénnel, amelyre a membránkötött antitest specifikus, a sejt gyors osztódásba kezd, és utódsejtjei memória B-sejtekké és effektor-sejtekké (melyeket "plazmasejtekké" neveznek) differenciálódnak. A memória B-sejtek hosszabb élettartamúak, és tovább termelik a membránkötött antitestet (ugyanolyan specifitással, mint a szülői sejt). A plazmasejtek nem termelnek membránkötött antitestet; ehelyett az antitestet szekretálható alakban termelik. A szekretált antitestek a humorális immunitás fő effektor molekulái.



A CD20-antigén (melyet humán B-limfocita-korlátozott differenciálódási antigénnek, Bp35-nek is neveznek) egy kb. 35 kD molekulatömegű hidrofób transzmembrán protein, amely pre-B-sejteken és érett B-limfocitákon található [Valentine és mtsai.: J. Biol. Chem. 264(19), 11282 (1989); Einfeld és mtsai.: EMBO J. 7(3), 711 (1988)]. Az antigén a nem Hodgkin-limfoma (NHL) B-sejtek több, mint 90 %-án is termelődik [Anderson és mtsai.: Blood 63(6), 1424 (1984)], de megtalálható a vérképzési őssejteken, a pro-B-sejteken, normál plazmasejteken, illetve egyéb, normál szöveteken is [Tedder és mtsai.: J. Immunol. 135(2), 973 (1985)]. A CD20 a sejtciklus iniciálás és differenciálódás aktiválási folyamatának korai lépését (lépéseit) vezérli [Tedder és mtsai., ld. fentebb], és valószínűleg kalciumioncsatornaként funkcionál [Tedder és mtsai.: J. Cell. Biochem. 14D, 195 (1990)].

Mivel a CD20 termelődik a B-sejt limfomákban, ez az antigén az ilyen limfomák megcélzásának eszköze lehet. Az ilyen megcélzás (célbajuttatás) folyamatának általános lépései a következők: a páciensnek a B-sejtek CD20 felületi antigénjére specifikus antitestet adagolunk; ezek az anti-CD20 antitestek specifikusan kötődnek (látszólag) mind a normál, mind a malignáns B-sejtek CD20-antigénjeihez; és a CD20 felületi antigénhez kötődött antitest a neopláziás B-sejtek elpusztítását és számuk megfogyatkozását eredményezheti. Ezenfelül, az anti-CD20 antitesthez a tumor lerombolására képes kémiai hatóanyagok vagy radioaktív jelölők konjugálhatók, miáltal a hatóanyag specifikusan a

neopláziás B-sejtekhez szállítódik. Az elsődleges cél - a kivitelezés módjától függetlenül - a tumor elpusztítása; a konkrét módszer az alkalmazott anti-CD20 antitest alapján választható meg, ilyenformán, a CD20-antigén megcélzására rendelkezésre álló módszerek igen változatosak.

A CD19 egy másik olyan antigén, amely a B-sejtvonalba tartozó sejtek felületén termelődik. Ez az antigén - a CD20-hoz hasonlóan - a sejtvonal teljes differenciálódási folyamatában megtalálható a sejteken; az őssejt-stádiumtól egészen a plazmasejtté történő végső differenciálódást megelőző pontig [Nadler: "Lymphocyte Typing II" 2, 3-37 és függelék; szerk.: Renling és mtsai., Springer Verlag (1986)]. Mindazonáltal, a CD20-tól eltérően, az antitestek CD19-hez történő kötődése a CD19-antigén internalizációját eredményezi. A CD19-antigént, többek között, a HD237-CD19 antitest [más néven B4-antitest; Kiesel és mtsai.: Leukemia Research II 12, 1119 (1987)] ismeri fel. A CD19-antigén a perifériás vér egymagvú sejtjeinek 4-8 %-án, míg a perifériás vérből, lépéből, nyirokcsomókból és mandulából izolált B-sejtek több, mint 90 %-án jelen van. A CD19 perifériás vérből származó T-sejteken, monocitákon és granulocitákon nem detektálható. Gyakorlatilag valamennyi, nem T-sejtes akut limfoblasztos leukémia (ALL), B-sejtes krónikus limfoid leukémia (CLL) és B-sejt limfoma termel B4-antitesttel kimutatható CD19-et [Nadler és mtsai.: J. Immunol. 131, 244 (1983); és Nadler és mtsai. a "Progress in Hematology" XII. kötetének 187-206. oldalán; szerk.: Brown,, Grune & Stratton, Inc. (1981)].

Azonosítottak egyéb olyan antitesteket is, amelyek felismerik a B-sejtvonal által termelt, differenciálódási stádiumra specifikus antigéneket. Ezek közül megemlíthetjük a CD21-antigén elleni B2-antitestet; a CD22-antigén elleni B3-antitestet és a CD10-antigén elleni J5-antitestet [más néven CALLA; ld. 5 595 721 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás, Kaminski és mtsai., 1997. január 21.].

A rituximab antitest (RITUXAN®) génsebészeti módszerekkel manipulált kimérikus egér/humán monoklonális antitest, amely szintén a CD20-antigén ellen irányul. A Rituximab az 5 736 137 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (Anderson és mtsai., 1998. április 7.) "C2B8" néven feltárt antitest. A RITUXAN®-t kiújuló vagy tartós, nem súlyos vagy tüszős, CD20-pozitív, B-sejtes nem-Hodgkin limfomában szenvedő páciensek kezelésére javallják. Az *in vitro* hatásmechanizmus vizsgálatával kimutatták, hogy a RITUXAN® humán komplementhez kötődik, és komplement-dependens citotoxicitáson (CDC) keresztül lizálja a limfoid B-sejtvonalakat [Reff és mtsai.: Blood 83(2), 435 (1994)]. Ezenfelül, ez az antitest az antitest-dependens celluláris citotoxicitási (ADCC) tesztekben jelentős mértékű aktivitást mutat. Újabban a RITUXAN®-ról bebizonyosodott, hogy ³H-timidin beépülési tesztben anti-proliferatív hatású, és közvetlenül apoptózist indukál, miközben más anti-CD19 és anti-CD20 antitestek nem [Maloney és mtsai.: Blood 88(10), 637a (1996)]. Kísérletileg a RITUXAN® és kemoterápiák vagy toxinok közötti szinergikus működést figyelték meg. Közlebről, a RITUXAN® a drog-rezisztens humán B-sejtes

limfoma sejtvonalakat szenzitizálja a doxorubicin, CDDP, VP-16, diphtheria-toxin és ricin citotoxikus hatásaira [Demidem és mtsai.: Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3), 177 (1997)]. *In vivo* pre-klinikai vizsgálatokban kimutatták, hogy a RITUXAN® Cynomolgus majmok perifériás vérében, nyirokcsomóiban és csontvelőjében csökkenti a B-sejtek számát [feltehetően komplement- és sejt-közvetítette folyamatok révén; ld. Reff és mtsai.: Blood 83(2), 435 (1994)].

A találmány szerinti megoldás értelmében eljárást tárunk fel emlősökben autoimmun betegség kezelésére, melynek során az emlősnek B-sejt-felületi markerhez kötődő antagonistá gyógykezelési szempontból hatásos mennyiségét adagoljuk.

A találmány egy következő szempontja értelmében feltárunk egy terméket, amely tartályt és az abban lévő - B-sejt-felületi markerhez kötődő antagonistát tartalmazó - készítményt, valamint a készítmény (autoimmun betegségtől szenvedő vagy arra fogékony páciens kezelésére vonatkozó) alkalmazási útmutatóját tartalmazza.

A következőkben a találmány előnyös megvalósítási módjait ismertetjük részletesen

I) Definíciók

A találmány leírásában a "B-sejt-felületi marker" kifejezésen B-sejtek felületén termelődő antigént értünk, amely a hozzá kötődni képes antagonistákkal célozható meg.



A B-sejt-felületi markerek jellemző példái a következők: CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 és CD86 leukocita felületi markerek. A találmány szerinti megoldás szempontjából lényeges B-sejt-felületi marker elsősorban emlősök B-sejtjein expresszálódik (szemben a nem B-sejtes szövetekkel), és prekursor B-sejteken vagy érett B-sejteken egyaránt termelődik. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a szóban forgó marker olyan marker (mint pl. a CD20 vagy CD19), amely az őssejt-stádiumtól egészen a plazmasejteké történő végső differenciálódás előtti stádiumig megtalálható a B-sejteken. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös B-sejt-felületi marker a CD19 és a CD20.

A "CD20-antigén" egy kb. 35 kD-os, nem glikozilált foszfoprotein, amely a perifériás vérből és nyirokszervekből származó B-sejtek több, mint 90 %-ának felületén megtalálható. A CD20 a korai pre-B-sejt fejlődési stádiumban termelődik, és termelődése egészen a plazmasejtté történő differenciálódásig megmarad. A CD20 normál és malignáns B-sejteken egyaránt jelen van. A CD20 szakirodalomban használt egyéb elnevezései között említhető a "B-limfocita-korlátozott antigén" és a "Bp35". A CD20-antigén leírását ld. pl. Clark és mtsai.: PNAS(USA) 82, 1766 (1985)].

A "CD19-antigén" egy kb. 90 kD-os antigén, amelyet, például, a HD237-CD19- és B4-antitest ismer fel [Kiesel és mtsai.: Leukemia Research II 12, 1119 (1987)]. A CD19 - hasonlóan a CD20-hoz - az őssejt-stádiumtól egészen a plazma-

sejtté történő végső differenciálódást megelőző pontig megtalálható a B-sejteken. Az antagonista vegyületek CD19-hez történő kötődése a CD19-antigén internalizálódását eredményezheti.

Ahogy a leírásban használjuk, az "autoimmun betegség" kifejezésen nem malignáns betegséget vagy rendellenességet értünk, amely a páciens saját szövetei ellen irányul. Az "autoimmun betegség" kifejezés jelentése nem foglalja magában a malignáns vagy rákos betegségeket és állapotokat, különösen nem a B-sejt limfomát, akut limfoblasztos leukémiát (ALL), a krónikus limfocitás leukémiát (CLL), a szőrös sejt leukémiát és a krónikus mieloblasztos leukémiát. Az autoimmun betegségek vagy rendellenességek példái közé tartoznak, többek között, a következők: gyulladásos reakciók, pl. gyulladásos bőrbetegségek, ideértve a psoriasist és a dermatitist (pl. atopiás dermatitis); szisztémás scleroderma és sclerosis; gyulladásos bélbetegséggel összefüggő reakciók (pl. Crohn-kór és fekélyes vastagbélgyulladás); légzési fájdalom tünetegyüttes (pl. felnőttkori légzési fájdalom szindróma, ARDS); dermatitis; meningitis; encephalitis; uveitis; colitis; glomerulonephritis; allergiás állapotok, pl. ekcéma és asthma, valamint egyéb, T-sejtek infiltrációjával és krónikus gyulladásos reakciókkal jellemezhető állapotok; atherosclerosis; leukocita adhézió deficiencia; rheumatoid arthritis; szisztémás lupus erythematosus (SLE); diabetes mellitus (pl. I. típusú diabetes mellitus vagy inzulinfüggő diabetes mellitus); sclerosis multiplex; Reynaud-szindróma; autoimmun

thyroiditis; allergiás encephalomyelitis; Sjorgenszindróma; fiatalkori diabetes; akut és késleltetett - citokinek és T-limfociták által közvetített - hyperszenzitivitással összefüggő immunreakciók, jellemzően tuberculosis, sarcoidosis, polymyositis, granulomatosis és vasculitis esetében; vészes vérszegénység (Addison-kór); leukocita diapedesis-szel járó betegségek; központi idegrendszert érintő gyulladásos rendellenesség; több szervet érintő sérülés szindróma; hemolitikus anaemia (ideértve, többek között, a cryoglobinaemiát vagy Coombs-pozitív anaemiát); myasthenia gravis; antigén-antitest komplex közvetítette betegségek; anti-glomerularis alapmembrán betegség; anti-foszfolipid szindróma; allergiás neuritis; Graves-kór; Lambert-Eaton myastheniás szindróma; pemphigoid bullous; pemphigus; autoimmun poliendocrinopathiák; Reiter-kór; stiff-man szindróma; Behcet-kór; óriássejtes arteritis; immunkomplex nephritis; IgA nephropathia; IgM polineuropathiák; immun trombocytopeniás purpura (ITP) vagy autoimmun trombocytopenia, stb.

Az "antagonista" vagy "antagonista vegyület" kifejezésen olyan molekulát értünk, amely emlőseken B-sejtfelületi markerhez kötődve elpusztítja a B-sejteket vagy csökkenti azok számát és/vagy gátolja a B-sejtek egy vagy több funkcióját (pl. a B-sejt által kiváltott humorális reakció csökkentésével vagy gátlásával). Az antagonista előnyösen képes a vele kezelt emlőseken a B-sejtek számának (azaz a keringésben lévő B-sejtek mennyiségének) csökkentésére. Az ilyen sejtszám-csökkentés különféle mechanizmusok-

kal érhető el, például antitest-dependens sejtközvetítette citotoxicitással (ADCC) és/vagy komplement-dependens citotoxicitással (CDC), a B-sejtek proliferációjának gátlásával és/vagy a B-sejtek pusztulásának indukálásával (pl. apoptózissal). A találmány szerinti antagonista vegyületek közé antitestek, szintetikus vagy natív aminosav-szekvenciájú peptidek vagy kis molekulájú antagonisták tartoznak, melyek képesek a B-sejt-markerhez kötődni, és amelyek, adott esetben, citotoxikus hatóanyaghoz vannak konjugálva vagy fuzionálva. A találmány szerinti előnyös antagonisták az antitestek.

Az "antitest-dependens sejtközvetítette citotoxicitás" és "ADCC" kifejezés olyan sejtközvetítette reakciót jelent, amelynek során Fc-receptorokat (FcR) termelő, nem specifikus citotoxikus sejtek [pl. természetes killer (NK) - sejtek, neutrofilek vagy makrofágok] egy célsejten lévő, kötött antitestet ismernek fel, és ezt követően a célsejt lízisét okozzák. Az ADCC-t közvetítő elsődleges sejtek, az NK-sejtek, csak Fc γ RIII-at termelnek, míg a monociták az Fc γ RI-et, Fc γ RII-t és Fc γ RIII-at egyaránt termelik. A vérképzési sejtek FcR-termelését illetően ld. Ravetch és Kinet cikkének [Annu. Rev. Immunol. 9, 457 (1991)] 3. táblázatát. Egy adott molekula ADCC-aktivitásának értékelésére *in vitro* ADCC-teszt alkalmazható (ld. pl. 5 500 362 és 5 821 337 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás). Az ilyen vizsgálati eljárásokban alkalmazható effektor sejtek közé tartoznak a perifériás vér egymagvú sejtjei (PBMC) és a természetes killer-sejtek. Más módon - vagy ezen túlmenően

- egy adott molekula ADCC-aktivitása *in vivo* is tesztelhető, például állatmodell alkalmazásával [ld. Clynes és mtsai.: PNAS (USA) 95, 652 (1998)].

A "humán effektor sejtek" olyan leukociták, amelyek egy vagy több Fc-receptort termelnek és effektor-funkciót töltenek be. A sejtek előnyösen legalább az Fc γ RIII-at termelik, és ADCC effektor-funkciót töltenek be. Az ADCC-t közvetítő humán leukociták példái közé tartoznak a perifériás vér egymagvú sejtjei (PBMC), a természetes killer (NK)-sejtek, a monociták, a citotoxikus T-sejtek és a neutrofilek, melyek közül a találmány szerinti megoldás szempontjából a PBMC-k és az NK-sejtek előnyösek.

Az "Fc-receptor" vagy "FcR" kifejezésen olyan receptort értünk, amely egy antitest Fc-régiójához képes kötődni. Az Fc-receptor előnyösen natív szekvenciájú humán FcR. Ezenfelül, a találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös Fc-receptor IgG-antitest megkötésére képes (vagyis γ -receptor), mint pl. az Fc γ RI, Fc γ RII és Fc γ RIII alosztályok tagjai, ideértve ezek allélváltozatait és alternatív "splicing" események következtében létrejött alakjait. Az Fc γ RII-receptorok közé tartozik az Fc γ RIIA ("aktiváló receptor"), és az Fc γ RIIB ("gátló receptor"), melyek hasonló aminosav-szekvenciát tartalmaznak - elsősorban citoplazmikus doménjükben térnek el egymástól. Az aktiváló Fc γ RIIA-receptor citoplazmikus doménjében immunreceptor tirozin-alapú aktiváló motívumot (ITAM), míg a gátló Fc γ RIIB-receptor citoplazmikus doménjében immunreceptor tirozin-alapú gátló motívumot (ITIM) tartalmaz [áttekintést

ld. Daëron: Annu. Rev. Immunol. 15, 203 (1997)]. Az Fc-receptorok áttekintő leírását illetően ld. Ravetch és Kinet: Annu. Rev. Immunol. 9, 457 (1991); Capel és mtsai.: Immunomethods 4, 25 (1994); és de Haas és mtsai.: J. Lab. Clin. Med. 126, 330 (1995)]. Az Fc-receptor kifejezés magában foglalja az egyéb Fc-receptorokat (ideértve a még azonosításra váró Fc-receptorokat, valamint az újszülöttkori Fc-receptort [FcRn, amely az anyai IgG-molekulák magzatba történő átviteléért felelős; ld. Guyer és mtsai.: J. Immunol. 117, 587 (1976); és Kim és mtsai.: J. Immunol. 24, 249 (1994)]].

A "komplement-dependens citotoxicitás" vagy "CDC" kifejezés egy molekula célsejtet - komplement jelenlétében - lizáló képességére vonatkozik. A komplement-aktiválási reakcióutat a komplement-rendszer első komponensének (C1q) egy közös eredetű antigénnel komplexált molekulához (pl. antitesthez) történő kötődése indítja be. A komplement-aktiválás vizsgálatára CDC-tesztet [ld. Gazzano-Santoro és mtsai.: J. Immunol. Methods 202, 163 (1996)] végezhetünk.

A "sejtszaporodást gátló" antagonisták olyan antagonistá vegyületek, amelyek gátolják vagy csökkentik az olyan antigént termelő sejtek proliferációját, melyhez az antagonistá kötődni képes. Például, az antagonistá *in vitro* és/vagy *in vivo* gátolja vagy csökkenti a B-sejtek szaporodását.

Az "apoptózist indukáló" antagonisták olyan antagonistá vegyületek, amelyek programozott sejthalált indukálnak (pl. B-sejtekben), amely standard apoptózis-



tesztekkel - pl. annexin V megkötése, DNS fragmentáció, sejtsugorodás, endoplazmatikus retikulum tágulása, sejt feldarabolódás és/vagy membránvezikulák (ún. apoptózis testek) képződése alapján - határozható meg.

A találmány leírásában az "antitest" kifejezést a leg-tágabb értelemben használjuk; idetartoznak a monoklonális antitestek (köztük az ép, teljes hosszúságú monoklonális antitestek), a poliklonális antitestek, a multispecifikus antitestek (pl. bispecifikus antitestek), valamint az anti-test-fragmensek (feltéve, hogy képesek a kívánt biológiai aktivitás kifejtésére).

Az "antitest-fragmensek" egy ép antitest egy részét tartalmazzák (előnyösen annak antigénkötő vagy variábilis régióját). Az antitest-fragmensek példái közé tartoznak a következők: Fab, Fab', F(ab')₂ és Fv fragmensek; diatestek; lineáris antitestek; egyláncú antitest-molekulák; antitest-fragmensekből létrejött multispecifikus antitestek.

A "natív antitestek" rendszerint kb. 150 000 Dalton molekulatömegű heterotetramer glikoproteinek, amelyek két azonos könnyű (L) láncból és két azonos nehéz (H) láncból állnak. Mindkét könnyű lánc egy kovalens diszulfid híddal kapcsolódik a nehéz lánchoz, míg a különböző immunglobulin-izotípusokban a nehéz láncok között eltérő számú diszulfid-kötés található. A nehéz és könnyű láncokban, egymástól szabályos távolságokra, láncon belüli diszulfid-kötések helyezkednek el. Mindkét nehéz lánc egyik végén variábilis domén (V_H) található, melyet számos konstans domén követ. A könnyű láncok egyik végén variábilis domén (V_L), másik vé-



gén konstans domén helyezkedik el; a könnyű lánc konstans doménje a nehéz lánc első konstans doménjével, míg a könnyű lánc variábilis doménje a nehéz lánc variábilis doménjével illeszkedik. Úgy tartják, hogy a nehéz és a könnyű lánc variábilis doménjei között bizonyos aminosavak határfelületet képeznek.

A "variábilis" kifejezés arra vonatkozik, hogy a variábilis domén bizonyos részeinek aminosav-szekvenciája az egyes antitestekben nagymértékben eltér egymástól, és ezek a szakaszok felelősek az adott antitest adott antigénre vonatkozó specifitásáért. Mindazonáltal, a variabilitás az antitest variábilis doménjeiben nem egyenletesen oszlik meg, hanem három szakaszra koncentrálódik: ezek az úgynevezett hipervariábilis régiók, amelyek a könnyű lánc és a nehéz lánc variábilis doménjeiben egyaránt megtalálhatók. A variábilis domén konzerváltabb szakaszait vázrégióknak (FR) nevezzük. A natív antitestek nehéz és könnyű láncainak variábilis doménjei egyenként négy vázrégiót tartalmaznak (melyek többnyire β -redős konfigurációt vesznek fel), és ezeket három komplementaritást meghatározó régió (CDR) köti össze, melyek hurkokat képeznek, és ezek a hurkok kötik össze a β -redős struktúrát (és néhány esetben annak részét is képezik). Az egyes láncokban a vázrégiók szorosan összetartják a komplementaritást meghatározó régiókat, melyek - a másik láncban lévő komplementaritást meghatározó régiókkal együtt - az antitest antigénkötő helyeinek létrehozásában játszanak szerepet [ld. Kabat és mtsai.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. kiadás, Public

Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]. A konstans domének közvetlenül nem játszanak közre az antitest antigénhez történő kötődésében, azonban különféle effektor-funkciókat töltenek be - pl. az antitest részvétele az antitest-dependens celluláris citotoxicitásban (ADCC).

Az antitestek papainos emésztése két azonos antigénkötő fragmenst (Fab-fragmensek, melyek egy-egy antigénkötő helyet tartalmaznak), valamint egy maradék Fc-fragmenst eredményez, amelynek neve kristályosodási hajlamát ("crystallize") tükrözi. A pepszines kezelés $F(ab')_2$ -fragmenst eredményez, amelynek két antigénkötő helye van, és képes az antigén keresztkötésére.

Az "Fv-fragmens" az a minimális méretű antitest-fragmens, amely még komplett antigén-felismerő és antigénkötő helyet tartalmaz. Ez a régió egy nehéz lánc és egy könnyű lánc variábilis domén - szoros, nem kovalens kötésű - dimeréből áll. Erre a konfigurációra jellemző, hogy a két variábilis domén három-három hipervariábilis régiója interakcióba lép, antigénkötő helyet meghatározva ezáltal a V_H - V_L dimer felületén. A hat hipervariábilis régió az antitest számára antigénkötő specifitást biztosít. Mindazonáltal, egyetlen variábilis doménnek (vagy egy Fv-fragmens felének, amely csak három - antigénre specifikus - hipervariábilis régiót tartalmaz) is megvan az a képessége, hogy felismerje és megkösse az antigént, ha kisebb affinitással is, mint a teljes kötőhely megléte esetén.

A Fab-fragmens a könnyű lánc konstans doménjét és a



nehéz lánc első konstans doménjét (CH1) is tartalmazza. A Fab'-fragmensek annyiban térnek el a Fab-fragmensektől, hogy a nehéz lánc CH1-doménjének C-terminálisán néhány plusz aminosavat tartalmaznak, köztük az antitest csukló ("hinge") régiójának egy vagy több ciszteinjét. A "Fab'-SH" olyan Fab'-fragmens, amelyben a konstans domén ciszteinje(i) legalább egy szabad tiocsoportot tartalmaznak. Az F(ab')₂-fragmensek eredetileg két Fab'-fragmensből jönnek létre, melyek között ciszteinek helyezkednek el. Az antitest-fragmensek egyéb kémiai kapcsolási módjai is ismeretesek.

Az gerincesekből származó antitestek (immunglobulinok) "könnyű láncai" - konstans doménjeik aminosav-szekvenciája alapján - két jól elkülöníthető típus valamelyikébe sorolhatók; ez a két típus a kappa (κ) és a lambda (λ).

Az antitestek a nehéz láncukon lévő konstans régió aminosav-szekvenciájától függően különböző osztályokba sorolhatók. Az immunglobulinok öt fő osztálya létezik: IgA, IgD, IgE, IgG és IgM, melyek közül több további alosztályokra (izotípusokra) osztható, például: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 vagy IgA2. A nehéz lánc konstans régióját, az egyes immunglobulin-osztályoknak megfelelően, a következők szerint jelöljük: α , δ , ϵ , γ , illetve μ . A különböző immunglobulin-osztályokra jellemző alegység-szerkezetek és háromdimenziós konfigurációk jól ismertek.

Az "egyláncú Fv-fragmens" vagy "scFv-fragmens" olyan antitest-fragmens, amely egy antitest V_H és V_L doménjeit tartalmazza, oly módon, hogy ezek a domének egyetlen



polipeptid-láncon helyezkednek el. Az Fv-polipeptid a V_H és V_L domén között előnyösen egy kapcsoló ("linker") polipeptidet tartalmaz, amely az scFv számára lehetővé teszi az antigénkötéshez szükséges szerkezet kialakítását. Az scFv áttekintését ld. Plücker: "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" 113, 269 (1994).

A "diatet" kifejezés olyan kis méretű, két antigénkötő helyet tartalmazó antitest-fragmentsre vonatkozik, amely nehéz lánc variábilis domént (V_H) és könnyű lánc variábilis doménhez (V_L) kapcsolva, egyazon peptidláncon (V_H - V_L) tartalmaz. Az azonos láncon lévő két domén közötti párosodáshoz túl rövid kapcsolópeptid beiktatása révén a domének arra vannak kényszerítve, hogy egy másik lánc komplementer doménjeivel párosodjanak, és így képezzenek két antigénkötő helyet. A diatetek részletesebb leírását ld. pl. EP 404 097 számú európai szabadalmi leírás; WO 93/11161 számú nemzetközi közzétételi irat; és Hollinger és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444 (1993).

Ahogy a leírásban használjuk, a "monoklonális antitest" kifejezés lényegében homogén antitestek populációjából származó antitestre vonatkozik, vagyis a populációt alkotó egyes antitestek - az esetlegesen kis mennyiségben jelenlévő természetes mutációkat leszámítva - azonosak. A monoklonális antitestek nagymértékben specifikusak: egyetlen antigén-helyre irányulnak. Ezenfelül, a hagyományos (poliklonális) antitest-készítményekkel ellentétben - amelyek rendszerint különböző determinánsok (epitópok) elleni különböző antitesteket tartalmaznak -, minden egyes

monoklonális antitest egyetlen antigén-determináns ellen irányul. A monoklonális antitestek - specifitásuk mellett - azért is előnyösek, mert olyan hibridóma-tenyészet termeli, amely más immunglobulinokkal nem szennyezett. A "monoklonális" jelző arra vonatkozik, hogy az antitest egy lényegében homogén antitest-populációból származik, és nem úgy értendő, mintha az antitest bármely adott eljárással történő előállítására lenne szükség. Például, a találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazható monoklonális antitestek az elsőként Kohler és mtsai. [Nature 256, 495 (1975)] által leírt hibridóma-eljárással vagy rekombináns DNS-technikák alkalmazásával [ld. pl. 4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás] állíthatók elő. Ezen túlmenően, a "monoklonális antitestek", például, Clackson és mtsai. [Nature 352, 624 (1991)], valamint Marks és mtsai. [J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)] által leírt eljárások alkalmazásával, fág antitest könyvtárakból is izolálhatók.

A szóban forgó monoklonális antitestek közé tartoznak a "kiméra" antitestek (immunglobulinok), amelyekben a nehéz és/vagy könnyű lánc egy része azonos vagy homológ egy adott fajból származó (vagy egy adott antitest-osztályba vagy -alosztályba tartozó) antitestek megfelelő szekvenciáival, míg a lánc(ok) többi része azonos vagy homológ egy másik fajból származó (vagy egy másik antitest-osztályba vagy -alosztályba tartozó) antitestek megfelelő szekvenciáival. A monoklonális antitestek közé tartoznak a kiméra antitestek fragmensei is, feltéve, hogy képesek a kívánt biológiai

aktivitás kifejtésére [4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; és Morrison és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1984)]. A kérdéses kiméra antitestek közé tartoznak a "primatizált" antitestek is, amelyek nem humán főemlősből (pl. óvilági majmokból, pl. páviánból, rhesus majomból vagy cynomolgus majomból) származó variábilis domén antigénkötő szekvenciáját és humán konstans régió szekvenciát tartalmaznak [5 693 780 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás].

A nem humán (pl. egéredetű) antitestek "humanizált" alakjai olyan kiméra antitestek, amelyek minimális hosszúságú, nem humán immunglobulinból származó szekvenciát tartalmaznak. A humanizált antitestek nagyrészt humán immunglobulinok (recipiens antitest), amelynek hipervariábilis régiójából származó aminosavak egy nem humán (pl. egér-, patkány-, nyúl- vagy nem humán főemlős-eredetű), kívánt specifitású, affinitású és specifitású antitest (donor antitest) hipervariábilis régiójából származó aminosavakkal vannak helyettesítve. Néhány esetben a humán immunglobulin vázrégió (FR) aminosavai a megfelelő, nem humán eredetű immunglobulinból származó aminosavakkal vannak helyettesítve. Ezen túlmenően, a humanizált antitestek olyan aminosavakat is tartalmazhatnak, amelyek a recipiens antitestben, illetve a donor antitestben nem találhatók meg. Az ilyen módosítások az antitest hatékonyságának további finomítását szolgálják. A humanizált antitest általában legalább egy - jellemzően legalább két - variábilis domén lényegében teljes egészét tartalmazza, amelyben a hipervariábilis hurkok

mindegyike (vagy lényegében mindegyike) egy nem humán immunglobulin hipervariábilis hurokjainak felel meg, vagy amelyben az FR-régiók mindegyike (vagy lényegében mindegyike) egy humán immunglobulin FR-régióinak felel meg. A humanizált antitest adott esetben egy immunglobulin (jellemzően humán immunglobulin) konstans régiójának (Fc) legalább egy részét tartalmazza [további részleteket illetően ld. Jones és mtsai.: Nature 321, 522 (1986); Riechmann és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); és Presta: Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593 (1992)].

Ahogy a találmány leírásában használjuk, a "hipervariábilis régió" kifejezésen egy antitest antigén-kötésért felelős aminosavaiból álló régiót értünk. A hipervariábilis régió komplementaritást meghatározó régióból (CDR) származó aminosavakat tartalmaz - azaz a könnyű lánc variábilis doménjének 24-34. aminosavai (L1), 50-56. aminosavai (L2) és 89-97. aminosavai (L3), valamint a nehéz lánc variábilis doménjének 31-35. aminosavai (H1), 50-65. aminosavai (H2) és 95-102. aminosavai (H3) [ld. Kabat és mtsai.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. kiadás, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] -, és/vagy "hipervariábilis hurokból" származó aminosavakat [azaz a könnyű lánc variábilis doménjének 26-32. aminosavai (L1), 50-52. aminosavai (L2) és 91-96. aminosavai (L3), valamint a nehéz lánc variábilis doménjének 26-32. aminosavai (H1), 53-55. aminosavai (H2) és 96-101. aminosavai (H3); Chothia és Lesk: J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)] tartalmaz. A vázrégiót alkotó aminosavak a variábi-

lis domén azon aminosavai, amelyek nem a hipervariábilis régió részét képezik.

Egy adott antigént (pl. B-sejt-felületi markert) megkötő antagonistáknak olyan vegyület, amely az antigént kellő affinitással és/vagy aviditással képes megkötni, miáltal terápiás hatóanyagként alkalmazható az antigént termelő sejt megcélzására.

A CD20-antigént megkötő antitestek példái a következők: "C2B8", melyet "rituximab"-nak nevezünk (RITUXAN®; 5 736 137 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk); ⁹⁰Y-izotóppal jelzett 2B8 egéreredetű antitest (Y2B8; 5 736 137 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk) egéreredetű IgG2a "B1", amely adott esetben ¹³¹I-izotóppal jelölhető, miáltal a ¹³¹I-B1 antitestet kapjuk (BEXXAR™; 5 595 721 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk); egéreredetű "1F5" monoklonális antitest [Press és mtsai.: Blood 69(2), 584 (1987); "kiméra 2H7" antitest (5 667 180 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk); valamint az L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 és Nu-B2 monoklonális antitestek, melyek az "International Leukocyte Typing Workshop"-nál férhetők hozzá [Valentine és mtsai.: a "Leukocyte Typing" III. kötetének 440. oldalán (szerk.: McMichael, Oxford University Press, 1987)]].

A CD19-antigénhez kötődő antitestek példái közé tar-

toznak az anti-CD19 antitestek [Hekman és mtsai.: Cancer Immunol. Immunother. 32, 364 (1991); Vlasveld és mtsai.: Cancer Immunol. Immunother. 40, 37 (1995)] és a B4-antitest [Kiesel és mtsai.: Leukemia Research II 12, 1119 (1987)].

A "rituximab" vagy "RITUXAN®" kifejezések CD20-antigén elleni, génsebészetiileg manipulált kimérikus egér/humán monoklonális antitestre vonatkoznak, amelyet az 5 736 137 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk) "C2B8"-nak neveztek el. Ez az antitest IgG₁ kappa immunglobulin, amely egéreredetű könnyű lánc és nehéz lánc variábilis régió szekvenciákat és humán konstans régió szekvenciákat tartalmaz. A Rituximab CD20-antigénre vonatkozó kötési affinitása kb. 8,0 nM.

Az "izolált" antagonisták kifejezésen egy - természetes környezetében megtalálható - komponenstől elválasztott és/vagy elkülönített antagonistát értünk. A természetes környezetben megtalálható szennyező komponensek az antagonisták diagnosztikai vagy gyógyászati felhasználását akadályoznák; az ilyen komponensek közé tartoznak az enzimek, hormonok és egyéb - proteinszerű vagy nem proteinszerű - oldott anyagok. A találmány előnyös megvalósítási módjai értelmében az antagonisták tisztításának mértéke a következő: (1) a Lowry-eljárással végzett meghatározás szerint 95 m/m%-nál nagyobb, legelőnyösebben 99 m/m%-nál nagyobb; (2) forgócsészés ("spinning cup") szekvenátor alkalmazásával legalább 15 aminosavas N-terminális vagy belső aminosav-szekvencia kinyeréséhez szükséges tisztaság; vagy (3) redu-

káló vagy nem redukáló feltételekkel végzett SDS-PAGE-analízissel (Coomassie-kék vagy ezüst festés alkalmazásával) homogenitásnak megfelelő tisztaság. Az izolált antagonista kifejezés jelentése kiterjed a rekombináns sejtekben *in situ* megtalálható antagonistára, mivel az ilyen sejtekben az antagonista természetes környezetének legalább egy komponense hiányzik. Mindazonáltal, az izolált antagonistákat általában legalább egy tisztítási lépést követően kapjuk.

A találmány céljaira az "emlős" kifejezésen az emlősök osztályába sorolt állatokat értünk, ideértve az embert, a háziállatokat és gazdasági haszonállatokat, állatkerti állatokat, sportolási, ill. kedvtelési célból tartott állatokat (pl. kutyák, lovak, macskák, szarvasmarhák, stb.). Az emlős kifejezésen előnyösen embert értünk.

A "kezelés" kifejezésen terápiás célú, illetve megelőzési célú (profilaktikus) kezelést értünk. A kezelésre szoruló páciensek közé tartoznak a már rendellenességtől szenvedők, illetve azok, akiknél a rendellenesség kifejlődésének megelőzésére van szükség. Ilyenformán, egy emlős a betegségtől vagy rendellenességtől szenvedőnek vagy a betegségre fogékornak diagnosztizálható.

A "terápiás szempontból hatásos mennyiség" kifejezésen az antagonista azon mennyiségét értjük, amely hatásos a szóban forgó autoimmun betegség megelőzésére, enyhítésére vagy kezelésére.

Ahogy a leírásban a kísérő terápiák vonatkozásában használjuk, az "immunszuppresszív hatóanyag" kifejezés

olyan anyagra vonatkozik, amelynek hatása a kezelés alatt álló emlős immunrendszerének szuppresszációja vagy álcázása. Az ilyen hatóanyagok közé tartoznak a citokintermelést szuppresszáció anyagai, az sajátantigén-expressziót gátló vagy szuppresszáció anyagai, illetve az MHC-antigéneket álcázó anyagok. Az immunszuppresszív hatóanyagok jellemző példái a következők: 2-amino-6-aryl-5-szubstituírt pirimidinek (ld. 4 665 077 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk); azatioprin; ciklofoszfamid; brómcryptine; danazol; dapsone; glutáraldehid (amely az MHC-antigéneket álcázza; ld. 4 120 649 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás); anti-idiotípusos prednisone, metilprednisolone és dexamethasone; citokin vagy citokin-receptor antagonisták, ideértve az interferon- γ , $-\beta$ vagy $-\alpha$ elleni antitesteket, a tumornekrózis-faktor- α elleni antitesteket, a tumornekrózis-faktor- β elleni antitesteket és az interleukin-2 vagy interleukin-2-receptor elleni antitesteket; anti-LFA-1 antitestek, mint pl. anti-CD11a és anti-CD18 antitest; anti-L3T4 antitestek; heterológ anti-limfocita globulin; pan-T antitestek, előnyösen anti-CD3 vagy anti-CD4/CD4a antitestek; LFA-3 kötődomént tartalmazó szolubilis peptid (WO 90/08187 számú nemzetközi közzétételi irat); sztreptokináz; TGF- β ; sztreptodornáz; gazdából származó RNS vagy DNS; FK506; RS-61443; dezoxispergualin; rapamicin; T-sejt-receptor (Cohen és mtsai., 5 114 721 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás); T-sejt-receptor fragmensek [Offner és mtsai.:

Science 251, 430 (1991); WO 90/11294 számú nemzetközi közzétételi irat; Ianeway: Nature 341, 482 (1989); és WO 91/01133 számú nemzetközi közzétételi irat]; valamint a T-sejt-receptor antitestek (EP 340 109), például T10B9.

Ahogy a leírásban használjuk, a "citotoxikus hatóanyag" kifejezésen olyan anyagot értünk, amely gátolja a sejtek működését és/vagy azok elpusztítását eredményezi. A citotoxikus hatóanyagok közé tartoznak a radioaktív izotópok (pl. At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , és a Lu radioaktív izotópjai); a kemoterápiás hatóanyagok; valamint a toxinok, pl. a kis molekulájú toxinok és az enzimatikusan aktív toxinok, melyek bakteriális, gomba-, növényi vagy állati eredetűek lehetnek (illetve az ilyen toxinok fragmensei).

A "kemoterápiás hatóanyag" kifejezésen rák kezelésére alkalmas vegyületet értünk. A kemoterápiás hatóanyagok példái közé tartoznak a következők: alkilezőszerek, pl. thiotepa és ciklofoszfamid (CYTOXANTM); alkilszulfonátok, pl. buszulfán, improszulfén és piposzulfán; aziridinek, pl. benzodopa, karboquon, meturedopa és uredopa; etilénimine és metilamelaminok, pl. altretamin, trietilénmelamin, trietilénfoszforamid, trietilén-tiofoszforamid és trimetilolomelamin; nitrogén-mustárok, pl. klórambucil, klórnaftazin, chlofoszfamid, esztramusztin, ifoszfamid, meklóretamin, meklóretamin-oxid-hidroklorid, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimusztin, trofoszfamid, uracil-mustár; nitrosureák, pl. carmustin, chlorozotocin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; antibiotikumok,

pl. aclacinomicinek, actinomicin, authramicin, azaszerin, bleomicinek, cactinomicin, calicheamicin, carabicin, carminomicin, carzinofilin, chromomicinek, dactionimicin, aunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucin, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomicin, mitomicinek, mikofenolsav, nogalamicin, olivomicinek, peplomicin, potfiomicin, puomicin, quelamicin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolitok, pl. methotrexát és 5-fluoruracil (5-FU); fólsav-analógok, pl. denopterin, methotrexát, pteropterin, trimetrexát; purin-analógok, pl. fludarabin, 6-merkaptopurin, tiamiprin, tioguanin; pirimidin-analógok, pl. ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, didezoxiuridindoxifluridin, enocitabin, floxuridin, 5-FU; androgének, pl. calusteron, dromostanolon-propionát, epitiosztanol, mepitiosztán, testolakton; mellékvese-hormon elleni hatóanyagok, pl. aminoglutatimid, mitotan, trilostan; fólsav-kiegészítők, pl. frolinsav; aceglaton; aldofoszfamid-glikozid; aminolevulinsav; amsacrin; bestrabucil; bisantren; edatraxát; defofamin; demecolcin; diaziquon; elfornitin; elliptinum-acetát; etoglucid; gallium-nitrát; hidroxikarbamid; leninan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podofillinsav; 2-etilhidrazid; prokarbazin; PSK®; razoxán; sizofiran; spirogermánium; tenuazonsav; triaziquon; 2,2',2''-triklór-trietylamin; uretán; vindezin; dacarbazin;

mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitozin; arabinozid (Ara-C); ciklofoszfamid; tiotepa; taxoidok, pl. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ, USA) és doxataxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Franciaország); klórambucil; gemcitabin; 6-tioguanin; markaptopurin; methotrexát; platina-analógok, pl. cisplatin és carboplatin; vinblasztin; platina; etoposid (VP-16); ifoszfamid; mitomicin-C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposid; daunomicin; aminopterin; xeloda; ibandronát; CPT-11; topoizomeráz inhibitor RFS 2000; difluor-metilornitin (DMFO); retinasav; esperamicinek; capecitabin; valamint a felsorolt vegyületek gyógyászati szempontból elfogadható sói, savai és származékai. A kemoterápiás hatóanyagok közé tartoznak az anti-hormonális hatóanyagok, amelyek a hormonok tumorokra kifejtett hatását szabályozzák vagy gátolják; ilyenek pl. az anti-ösztrogének, pl. a tamoxifen, raloxifen, aromatáz-gátló 4(5)-imidazolok, t-hidroxitamoxifen, trioxifén, keoxifén, LY117018, onapriston és toremifén (Fareston); és anti-androgének, pl. flutamid, nilutamid, bicalutamid, leuprolid, és goserelin; valamint a felsoroltak gyógyászati szempontból elfogadható sói, savai és származékai.

A "citokin" kifejezés egy adott sejtpopuláció által kiválasztott - intercelluláris mediátorként más sejtekre ható - proteinek általános elnevezése. Az ilyen citokinek jellemző képviselői a limfokinek, monokinek és a szokványos polipeptid hormonok. A citokinek közé tartoznak a növekedé-

si hormonok, mint pl. a humán növekedési hormon, a humán növekedési hormon N-metionil-származéka, és a szarvasmarha növekedési hormon; parathyroid hormon; tiroxin; inzulin; proinzulin; relaxin; prorelaxin; glikoprotein hormonok, pl. follikulusz-stimuláló hormon (FSH), pajzsmirigy-stimuláló hormon (TSH) és luteinizáló hormon (LH); májeredetű növekedési faktor; fibroblaszt növekedési faktor; prolaktin; méhlepény-eredetű laktogén; tumornekrózis faktor- α és - β ; müllerianosist gátló szubsztancia; egérreredetű gonadotropin-asszociált peptid; inhibin; aktivin; vascularis endothelialis növekedési faktor; integrin; trombopoietin (TPO); idegsejt növekedési faktorok, pl. NGF- β ; vérlemezke-eredetű növekedési faktor; transzformáló növekedési faktorok (TGF-ek), pl. TGF- α és TGF- β ; inzulinszerű növekedési faktor-I és -II; eritropoietin (EPO); oszteoinduktív faktorok; interferonok, pl. interferon- α , - β és - γ ; kolonizációt stimuláló faktorok (CSF-ek), pl. makrofág-eredetű CSF (M-CSF), granulocita-makrofág-eredetű CSF (GM-CSF), és granulocita-eredetű CSF (G-CSF); interleukinek (IL-ek), pl. IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; továbbá egyéb polipeptid-faktorok, pl. LIF és kit-ligandum (KL). Ahogy a leírásban használjuk, a "citokinek" kifejezés jelentése természetes forrásokból vagy rekombináns sejttenyészetből származó proteinekre (illetve a natív szekvenciájú citokinek biológiai aktivitású ekvivalenseire) egyaránt kiterjed.

Ahogy a találmány leírásában használjuk, a "pro-drog"



kifejezés egy gyógyászatilag aktív vegyület prekursorát vagy származékát értjük, amely a tumorsejtekre az eredeti hatóanyagnál (drognál) kevésbé citotoxikus, és enzimatikusan a nagyobb citotoxicitású alakká aktiválható, illetve alakítható [ld. pl. Wilman: Biochemical Society Transactions 14, 375 (1986); és Stella és mtsai.: "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", a "Directed Drug Delivery" című kiadvány (szerk.: Borchardt és mtsai., Humana Press) 247-267. oldalain (1985)]. A találmány szerinti pro-drogok közé tartoznak, többek között, a következők: foszfáttartalmú pro-drogok, tiofoszfát-tartalmú pro-drogok, szulfáttartalmú pro-drogok, peptidtartalmú pro-drogok, D-aminosavval modifikált pro-drogok, glikozilált pro-drogok, β -laktám-tartalmú pro-drogok, adott esetben szubsztituált fenoxi-acetamid-tartalmú pro-drogok, adott esetben szubsztituált fenil-acetamid-tartalmú pro-drogok, 5-fluorcitozin és egyéb 5-fluoruridin pro-drogok, amelyek nagyobb aktivitású, szabad citotoxikus drogokká alakíthatók. A találmány szerinti felhasználás céljából pro-drog alakká derivatizálható citotoxikus drogok példái közé tartoznak, többek között, a fentebb említett kemoterápiás hatóanyagok.

A "liposzóma" kifejezésen kisméretű hólyagot (vezikulát) értünk, amely különböző típusú lipidekből, foszfolipidekből és/vagy felületaktív anyagokból áll, és amely hatóanyagok (pl. a találmány szerinti antagonisták, adott esetben kemoterápiás hatóanyag) emlősnek történő adagolására alkalmazható.



A "betegájékoztató" kifejezésen a gyógyászati termékekhez szokásosan mellékelt útmutatót értünk, amely a gyógyászati termék alkalmazására vonatkozó indikációkat, a gyógyszer dozírozását, adagolási módját, ellenjavallatait és/vagy figyelmeztetéseket tartalmaz.

II) Az antagonisták előállítása

A találmány szerinti eljárások és termékek B-sejtfelületi markerhez kötődni képes antagonistá vegyületet alkalmaznak (illetve tartalmaznak). Az alábbiakban az ilyen antagonisták előállítási eljárásait ismertetjük.

Az antagonisták előállítására (vagy szkrínelésére) alkalmas B-sejtfelületi markerként, például, az antigén vagy kívánt epitópot tartalmazó részének szolubilis alakját alkalmazhatjuk. Más módon (vagy emellett), az antagonisták előállítására vagy szkrínelésére felületükön B-sejtfelületi markert termelő sejtek is alkalmazhatók. A B-sejtfelületi marker egyéb - antagonisták előállítására hasznos - alakjai szakember számára jól ismertek. B-sejtfelületi markerként előnyösen a CD19 vagy CD20 antigént alkalmazzuk.

Bár a találmány szerinti, előnyös antagonistá antitest, az antitestektől eltérő antagonisták is a találmány oltalmi körébe tartoznak. Például, az antagonistá olyak kis molekulájú antagonistá lehet, amely citotoxikus hatóanyaghoz van fuzionálva vagy konjugálva. A kisméretű molekulák könyvtárai - az antigénhez kötődő kisméretű molekula azonosítása céljából - az adott B-sejtfelületi markerhez törté-



nő kötődésre vizsgálhatók át. A kisméretű molekula tovább tesztelhető antagonistá tulajdonságaira, és/vagy citotoxikus hatóanyaghoz konjugálható.

Az antagonistá vegyület racionális tervezéssel vagy fágón való megjelenítési technika alkalmazásával előállított peptid is lehet (ld. pl. WO 98/35036 számú nemzetközi közzétételi irat). A találmány egyik megvalósítási módja szerint a kiválasztott molekula "CDR-utánzó" molekula vagy antitest-analóg, amely egy antitest komplementaritást meghatározó régiói alapján van megtervezve. Míg az ilyen peptidek önmagukban is antagonistá hatásúak lehetnek, a peptidet - adott esetben - citotoxikus hatóanyaghoz fuzionálhatjuk, hogy javítsuk antagonistá tulajdonságait.

A következőkben a találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazott antitest antagonisták előállításának jellemző technikáit mutatjuk be.

(i) Poliklonális antitestek

A poliklonális antitesteket előnyösen állatokban, a megfelelő antigén és adjuváns többszöri szubkután (sc) vagy intraperitoneális (i.p.) injektálásával termeltetjük. A releváns antigént előnyös lehet olyan proteinhez konjugálni, amely az immunizálni kívánt fajban immunogén hatású. Az ilyen proteinek példái a "keyhole limpet" hemocianin, a szérumalbumin, a szarvasmarha-eredetű thyroglobulin és a szójabab tripszin-inhibitor. A konjugálás bifunkciós vagy derivatizáló ágens alkalmazásával történhet, például,



maleimidobenzoil-szulfoszukcinimid-észter (konjugálás ciszteineken keresztül), N-hidroxiszukcinimid (konjugálás lizineken keresztül), glutáraldehid, borostyánkősav-anhidrid, SOCl_2 vagy $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (amelyben R és R^1 jelentése egymástól eltérő alkilcsoport) alkalmazásával.

Az állatokat az antigén, az immunogén konjugátumok vagy származékok ellen úgy immunizáljuk, hogy a protein vagy a konjugátum, például, 100 μg -ját (nyulak esetében), illetve 5 μg -ját (egerek esetében) háromszoros térfogatú Freund-féle komplett adjuvánssal elegyítjük, és az oldatot intradermálisan az állat testének több pontjába injektáljuk. Egy hónap elteltével az állatoknak - több helyre adott szubkután injekcióval - a peptid vagy konjugátum eredeti mennyiségének 1/5-1/10-ével (Freund-féle komplett adjuvánsban) emlékeztetőoltást adunk. 7-14 nappal később az állatokból vért veszünk, és a vérsavóban meghatározzuk az antitest-titert. Az emlékeztetőoltásokat addig ismételjük, míg az antitest-titer platót nem ér el. Az állatoknak az emlékeztetőoltást előnyösen azonos antigén (de eltérő proteinnel és/vagy eltérő kereszt kötő reagenssel képzett) konjugátumával végezzük. A konjugátumok rekombináns sejtenyészetben, fúziós proteinekként is előállíthatók. Az immunreakció serkentésére aggregációt elősegítő hatóanyagok (pl. timsó, "alum") is alkalmazhatók.

(ii) Monoklonális antitestek

A monoklonális antitestek lényegében homogén antites-

tek populációjából származnak, vagyis a populációt alkotó egyes antitestek egymással azonosak (a minimális mennyiségben esetlegesen előforduló természetes mutációktól eltekintve). Ilyenformán, a "monoklonális" jelző az antitestek azon tulajdonságára vonatkozik, hogy nem különböző antitestek elegyeként léteznek.

A monoklonális antitestek az elsőként Kohler és mtsai. [Nature 256, 495 (1975)] által leírt hibridóma-eljárással, valamint rekombináns DNS-technikák (4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) alkalmazásával állíthatók elő.

A hibridóma-eljárás során egeret vagy egyéb alkalmas gazdaállatot (pl. hörcsögöt) a fentebb leírtak szerint immunizálunk, hogy olyan limfociták termelődését váltsuk ki, amelyek az immunizálásra alkalmazott proteinhez specifikusan kötődő antitesteket termelnek (illetve azok termelésére képesek). Más módon, a limfocitákat *in vitro* immunizálhatjuk. Ezt követően a limfocitákat megfelelő fuzionáltató ágens (pl. polietilén-glikol) alkalmazásával myelomasejtekhez fuzionáljuk, miáltal hibridómasejteket kapunk [Goding: "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", 59-103. old., Academic Press (1986)].

Az így létrehozott hibridómasejteket megfelelő - előnyösen a fuzionálatlan kiindulási myelomasejtek szaporodását és túlélését gátló egy vagy több anyagot tartalmazó - tenyésztő tápközegben szaporítjuk. Például, ha a kiindulási myelomasejtekből hiányzik a hipoxanthin guanin foszforibozil transzferáz enzim (HGPRT vagy HPRT), a



hibridómák tenyésztésére rendszerint hipoxanthint, aminopterint és timidint tartalmazó tápközeget (HAT-tápközeget) alkalmazunk, amely gátolja a HGPRT-deficiens sejtek szaporodását.

A fuzionáltatásra előnyösen olyan myelomasejteket alkalmazunk, amelyek hatékonyan fuzionálhatók; elősegítik a kiválasztott antitest-termelő sejtek stabil és nagymértékű antitest-termelését; és valamely tápközegre (pl. HAT-tápközegre) érzékenyek. Ezek közül előnyösen egérreredetű myelomasejteket alkalmazunk; ilyenek például a MOPC-21 és MPC-11 egértumorokból származó sejtvonalak (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornia, USA) és az SP-2 vagy X63-Ag8-653 sejtek (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA). Humán monoklonális antitestek termelésére humán myelomasejtek és egér/humán heteromyelomasejtek alkalmazását is leírták [ld. Kozbor: J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur és mtsai.: "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", 51-63. old., Marcel Dekker, Inc., New York (1987)].

A tenyésztő tápközeget (amelyben a hibridómasejteket szaporítottuk) az antigén elleni monoklonális antitestek termelődésére vizsgáljuk. A hibridómasejtek által termelt monoklonális antitestek kötési specifitását előnyösen immunprecipitációval vagy *in vitro* kötődési teszttel - pl. radioimmun-teszttel (RIA) vagy enzimkötött immunszorbens vizsgálati eljárással (ELISA) - határozzuk meg.

A monoklonális antitest kötési affinitása, például, a Munson és mtsai. [Anal. Biochem. 107, 220 (1980)] által le-

írt Scatchard-analízissel határozható meg.

A kívánt specifitású, affinitású és/vagy aktivitású antitesteket termelő hibridómasejtek azonosítása után a klónokat limitáló hígítással szubklónozzhatjuk és szokványos eljárásokkal szaporíthatjuk [ld. Goding: "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", 59-103. old. (Academic Press, 1986)]. Az e célra alkalmas tenyésztő tápközegek példái közé tartozik a D-MEM és az RPMI-1640 tápközeg. Más módon, a hibridómasejtek hasúri tumorokként állatokban *in vivo* is szaporíthatók.

A szubklónok által kiválasztott monoklonális antitesteket előnyösen hagyományos immunglobulin-tisztítási technikák (pl. protein-A Sepharose, hidroxilapatit-kromatográfia, gélelektroforézis, dialízis vagy affinitási kromatográfia) alkalmazásával választjuk el a tenyésztő tápközegtől, hasúri folyadéktól vagy vérsavótól.

A monoklonális antitesteket kódoló DNS-ek szokványos eljárásokkal egyszerűen izolálhatók és szekvenálhatók (pl. specifikusan az egéreredetű antitestek nehéz, ill. könnyű láncát kódoló génekhez hibridizáló oligonukleotid-próbák alkalmazásával). Az ilyen DNS-ek előnyös forrásául hibridómasejtek szolgálnak. Izolálás után a DNS-t expressziós vektorokba inszertálhatjuk, és a vektorokkal gazdasejteket - pl. *E. coli* sejteket, majomeredetű COS-sejteket, kínai hörcsög petefészek (CHO) sejteket vagy myelomasejteket (melyek egyébként immunglobulin-proteint nem termelnek) - transzfektálhatunk, miáltal a rekombináns gazdasejtekben monoklonális antitestek termelődnek. Az an-

titestet kódoló DNS baktériumokban rekombináns módszerekkel történő előállítását illetően ld. pl. Skerra és mtsai.: Curr. Opinion in Immunol. 5, 256 (1993); Plückthun: Immunol. Revs. 130, 151 (1992).

A találmány egyéb megvalósítási módjainak megfelelően az antitestek vagy antitest-fragmensek a McCafferty és mtsai. [Nature 348, 552 (1990)] által leírt technikák alkalmazásával létrehozott antitest fágkönyvtárakból izolálhatók. Clarkson és mtsai. [Nature 352, 624 (1991)] és Marks és mtsai. [J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)] egérreredetű, illetve humán antitestek fágkönyvtárak alkalmazásával történő izolálását írták le. Később ismertették a nagy (nM nagyságrendű) affinitású humán antitestek lánc-kombinálással ("chain-shuffling") történő előállítását [ld. Marks és mtsai.: Bio/Technology 10, 779 (1992)]. Ezen túlmenően, a kombinatorikus infekciót és *in vivo* rekombinációt, mint a nagyon nagyméretű fágkönyvtárak előállításának stratégiáját írták le [Waterhouse és mtsai.: Nucl. Acids Res. 21, 2265 (1993)]. Ilyenformán, ezek a technikák a monoklonális antitestek izolálásának hagyományos hibridóma-technikáinak működőképes alternatívái.

Az antitestet kódoló DNS, például, oly módon módosítható, hogy a humán nehéz és könnyű lánc konstans doménjeinek kódolószekvenciájával egérreredetű antitestek homológ szekvenciáit helyettesítjük [4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Morrison és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1984)], vagy az immunoglobulin kódolószekvenciájához kovalens kötéssel egy nem

Az ilyen nem immunglobulin-poliipeptidekkel rendszerint az antitestek konstans doménjeit helyettesítjük, vagy más módon, egy antitest egy antigén-kombinálódási helyének variábilis doménjeit helyettesítjük velük, hogy olyan bivalens kiméra antitestet hozzunk létre, amely egy bizonyos antigénre specifikus antigén-kombinálódási helyet, valamint egy másik antigénre specifikus antigén-kombinálódási helyet tartalmaz.

(iii) Humanizált antitestek

A nem humán antitestek humanizálási eljárásainak leírása az idevonatkozó szakirodalomban megtalálhatók. A humanizált antitest előnyösen egy vagy több, nem humán forrásból származó aminosavat tartalmaz. Ezeket a nem humán aminosavakat gyakran "import" aminosavaknak nevezzük, melyek rendszerint egy "import" variábilis doménből származnak. Az antitestek humanizálását lényegében Winter és mtsai. eljárásával hajtjuk végre [Jones és mtsai.: Nature 321, 522 (1986); Riechmann és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); Verhoyen és mtsai.: Science 239, 1534 (1988)], oly módon, hogy egy humán antitest megfelelő szekvenciáit hipervariábilis szekvenciákkal helyettesítjük. Ennek megfelelően, az ilyen "humanizált" antitestek kiméra antitestek (ld. 4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás), amelyekben az antitest - teljes humán variábilis



doménnél lényegesen kisebb - része van helyettesítve egy nem humán fajból származó, megfelelő szekvenciával. A gyakorlatban a humanizált antitestek rendszerint olyan humán antitestek, amelyekben a hipervariábilis régió néhány aminosava - és esetleg a vázrégió (FR) néhány aminosava - rágcsálóeredetű antitestek analóg pozícióiból származó aminosavakkal van helyettesítve.

Az antigenitás csökkentése szempontjából nagy jelentősége van a humanizált antitestek létrehozására alkalmazandó (nehéz és könnyű láncból származó) humán variábilis domének kiválasztásának. Az úgynevezett "legjobb egyezés" módszer szerint egy rágcsálóeredetű antitest variábilis doménjének szekvenciáját ismert humán variábilis domének szekvenciáit tartalmazó teljes könyvtárral hasonlítjuk össze. A rágcsálóeredetű szekvenciával legközelebbi egyezést mutató humán szekvenciát a humanizált antitest humán vázrégiójának (FR) fogadjuk el [Sims és mtsai.: J. Immunol. 151, 2296 (1993); Chothia és mtsai.: J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)]. Egy másik módszer szerint az összes - egy bizonyos alcsoportba tartozó könnyű és nehéz láncot tartalmazó - humán antitest konszenzus-szekvenciájából származó vázrégiót alkalmazunk. Különböző humanizált antitestek esetében ugyanaz a vázrégió használható [Carter és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992); Presta és mtsai.: J. Immunol. 151, 2623 (1993)].

Lényeges továbbá, hogy az antitestek a humanizálást követően is megtartsák az antigénre vonatkozó affinitásukat és egyéb kedvező biológiai tulajdonságaikat. Ennek érdeké-



ben, az egyik előnyös eljárás szerint, a humanizált antitesteket a kiindulási szekvenciák és a különböző lehetséges humanizált termékek - háromdimenziós modellek felhasználásával végzett - analizálását követően állítjuk elő. Az immunglobulinok háromdimenziós modelljei széles körben hozzáférhetők és szakember számára jól ismertek. Számítógépes programok állnak rendelkezésre a kiválasztott lehetséges immunglobulin-szekvenciák valószínű háromdimenziós konformációs struktúráinak illusztrálására és megjelenítésére. Az így megjelenített struktúrák tanulmányozása elősegíti az egyes aminosavaknak a lehetséges immunglobulin-szekvencia működésében betöltött szerepének vizsgálatát, azaz a lehetséges immunglobulin antigénhez kötődő képességét befolyásoló aminosavak vizsgálatát. Ezen a módon kiválaszthatók a vázrégió aminosavai, és a recipiens és import szekvenciákból úgy kombinálhatók, hogy a kívánt antitest-tulajdonságokat (pl. a célantigén(ek)re vonatkozó fokozott affinitás) kapjuk. A komplementaritást meghatározó régió aminosavai általában közvetlenül és jelentős mértékben játszanak szerepet az antigénkötés befolyásolásában.

(iv) Humán antitestek

Az antitestek humanizálásának alternatíváját jelenti a humán antitestek létrehozása. Például, lehetőség van olyan transzgenikus állatok (pl. egerek) létrehozására, amelyek immunizálást követően - endogén immunglobulin-termelődés nélkül - képesek a humán antitestek teljes repertoárjának



termelésére. Például, leírták, hogy kiméra és csíravonal-mutáns egerekben az antitest nehéz lánc kapcsolódási régiójának (J_H) génjében bekövetkezett homozigóta deléció az endogén antitest-termelődés teljes gátlását eredményezi. A humán csíravonal-eredetű immunglobulin-gének ilyen csíravonal-mutáns egerekbe történő bejuttatása - antigén-stimulus hatására - humán antitestek termelődését eredményezi [ld. pl. Jakobovits és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551 (1993); Jakobovits és mtsai.: Nature 362, 255 (1993); Bruggermann és mtsai.: Year in Immuno. 7, 33 (1993); és 5 591 669; 5 589 369 és 5 545 807 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás].

Más lehetőség szerint, humán antitestek és antitest-fragmensek - immunizálatlan donorokból származó immunglobulin variábilis (V) doménjének gén-repertoárjából történő *in vitro* előállítására a fágon való megjelenítési ("phage-display") technika [McCafferty és mtsai.: Nature 348, 552 (1990)] is alkalmazható. E módszer szerint az antitest V-doménjét kódoló géneket fonalas bakteriofág (pl. M13 vagy fd) nagy vagy kis burokprotein génjével azonos leolvasási fázisban klónozzuk, és a fág-részecske felületén funkcionális antitest-fragmensekként jelenítjük meg. Mivel a fonalas részecske a fág genomjának egyszálú DNS-kópiáját tartalmazza, az antitest funkcionális tulajdonságain alapuló szelekció az ilyen tulajdonságokkal bíró antitestet kódoló gén kiválasztását eredményezi. Ilyenformán, a fág a B-sejt bizonyos sajátosságait utánozza. A fágon való megjelenítés különböző formátumokban valósítható meg; ezek összefoglaló

áttekintését ld. pl. Johnson és mtsai.: Current Opinion in Structural Biology 3, 564 (1993)]. A fágon való megjelenítésre a V-gén-szakaszok különféle forrásai alkalmazhatók. Clackson és mtsai. [Nature 352, 624 (1991)] immunizált egerrek lépjeiből származó V-gének kisméretű random kombinatorikus könyvtárából anti-oxazolon antitestek diverz sorozatát izolálták. Marks és mtsai. [J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)] és Griffith és mtsai. [EMBO J. 12, 725 (1993)] által leírt eljárásokkal immunizálatlan humán donorokból származó V-gének repertoárja hozható létre, és antigének diverz sorozata (beleértve a sajátantigéneket is) elleni antitestek izolálhatók (ld. még 5 565 332 és 5 573 905 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírások).

A humán antitestek *in vitro* aktivált B-sejtekkel is termeltethetők (ld. 5 567 610 és 5 229 275 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

(v) Antitest-fragmensek

Az antitest-fragmensek előállítására különféle technikákat fejlesztettek ki. Ezek a fragmensek hagyományosan intact antitestek proteolitikus emésztésével hozhatók létre [ld. Morimoto és mtsai.: Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24, 107 (1992); és Brennan és mtsai.: Science 229, 81 (1985)], azonban ezek a fragmensek rekombináns gazdasejtek alkalmazásával közvetlenül is előállíthatók. Például, az antitest-fragmensek a fentebb leírt antitest fág-könyvtárakból izolálhatók. Más módon, a Fab'-

SH fragmensek *E. coli*-ból közvetlenül kinyerhetők, és kémiai kapcsolással $F(ab')_2$ -fragmensekké alakíthatók [Carter és mtsai.: *Bio/Technology* 10, 163 (1992)]. Egy másik lehetőség szerint az $F(ab')_2$ -fragmensek közvetlenül rekombináns gazdasajt-tenyészetből izolálhatók. Az antitest-fragmensek előállításának egyéb technikái szakember számára jól ismertek. Más megvalósítási módokban a kiválasztott antitest egyláncú Fv-fragmens (scFv); ld. WO 93/16185 számú nemzetközi közzétételi irat; valamint 5 571 894 és 5 587 458 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás. Az antitest-fragmens lehet "lineáris antitest" is (ld. pl. 5 641 870 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás). A lineáris antitest-fragmensek monospecifikusak vagy bispecifikusak lehetnek.

(vi) Bispecifikus antitestek

A bispecifikus antitestek olyan antitestek, amelyek legalább két különböző epitópra specifikusak. A jellemző bispecifikus antitestek a B-sejt-felületi marker két különböző epitópjához képesek kötődni. Más bispecifikus antitestek kétféle B-sejt-felületi markerhez kötődnek. Más módon, egy B-sejt-felületi markert kötő kar olyan antitest-karral kombinálható, amely leukocitán lévő trigger-molekulához - pl. T-sejt-receptor molekulához (pl. CD2 vagy CD3) vagy IgG Fc-receptorához (FcγR), pl. FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) és FcγRIII (CD16) - kötődik, miáltal a celluláris védekező mechanizmus a B-sejtre összpontosítható. A bispecifikus anti-

testek arra is alkalmazhatók, hogy a citotoxikus hatóanyagokat a B-sejtekhez lokalizáljuk. Ezek az antitestek B-sejt-felületi markert megkötő karból és citotoxikus hatóanyagot (pl. szaporint, anti-interferon- α -t, vinca alkaloidot, ricin A-láncot, methotrexátot vagy radioaktív izotóppal jelölt haptént) megkötő karból állnak. A bispecifikus antitestek teljes hosszúságú antitestekként vagy antitest-fragmensekként [pl. F(ab')₂ bispecifikus antitestek] állíthatók elő.

A bispecifikus antitestek előállítási eljárásai szakember számára jól ismertek. A teljes hosszúságú bispecifikus antitestek szokványos előállítási módja két immunglobulin nehéz lánc/könnyű lánc pár együttes expresszáltatásán alapul [a két lánc különböző specifitású; Millstein és mtsai.: Nature 305, 537 (1983)]. Az immunglobulin nehéz és könnyű láncainak véletlenszerű választéka miatt e hibridómák (kvadrómák) potenciálisan tíz különböző antitest-molekula elegyét termelik, melyek közül csupán egy rendelkezik a megfelelő bispecifikus szerkezettel. A megfelelő molekula - általában affinitási kromatográfiával végzett - tisztítása igen munkaigényes, és a kitermelési százaléka alacsony. Hasonló eljárások leírását illetően ld. a WO 93/08829 számú nemzetközi közzétételi iratot, valamint Traunecker és mtsai.: EMBO J. 10, 3655 (1991).

Egy másik megközelítési mód szerint az antitestek kívánt kötési specifitású variábilis doménjeit (antitest-antigén kombinálódási helyek) immunglobulin konstans domén szekvenciáihoz fuzionáljuk. A fúzió előnyösen egy immunglo-

bulin nehéz lánc konstans doménjével valósítjuk meg, amely legalább a csukló- ("hinge"), CH2- és CH3-régió részét tartalmazza. Előnyös, ha a konstans domén tartalmazza - a könnyű lánchoz történő kötődéshez szükséges helyet magában foglaló - első nehéz lánc konstans régiót (CH1). Az immunoglobulin nehéz lánc fúziókat - és kívánt esetben az immunoglobulin nehéz láncot - kódoló DNS-eket külön expressziós vektorokba inszertáljuk, és azokat együttesen megfelelő gazdaorganizmusba transzfektáljuk. Ez nagy rugalmasságot biztosít a három polipeptid relatív arányának beállításában, azon megvalósítási módokban, ahol az optimális hozam elérése érdekében a konstrukcióban a három különböző polipeptid-láncot nem azonos arányokban alkalmazzuk. Mindazonáltal, lehetőség van arra is, hogy két vagy mindhárom polipeptid-lánc kódolószekvenciáját egyazon expressziós vektorba inszertáljuk (olyan esetekben, ha legalább két polipeptid-lánc azonos arányban történő expressziója eredményezi a nagy hozamot vagy ha a láncok relatív arányának nincs különösebb jelentősége).

E megoldás egy előnyös megvalósítási módja értelmében a bispecifikus antitestek - az egyik karon - hibrid immunoglobulin nehéz láncból (első kötő-specifitás) és - a másik karon - egy hibrid immunoglobulin nehéz lánc/könnyű lánc párból (második kötő-specifitást biztosítva) állnak. Azt találtuk, hogy ez az asszimetrikus struktúra elősegíti a kívánt bispecifikus vegyület nem kívánatos immunoglobulin-lánckombinációktól történő elválasztását, mivel az immunoglobulin könnyű láncnak a bispecifikus molekula csupán

egyik felében való jelenléte egyszerű elkülönítést tesz lehetővé. E megoldás leírását ld. a WO 94/04690 számú nemzetközi közzétételi iratot. A bispecifikus antitestek előállításának további részleteit illetően ld. pl. Suresh és mtsai.: *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

Egy másik megoldás (ld. 5 731 168 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) szerint a rekombináns sejtenyészetből kinyerhető heterodimerek százalékos arányának maximalizálása érdekében antitest-molekula pár közötti határfelület alakítható ki. Az előnyös határfelület egy antitest konstans doménje C_H3 -doménjének legalább egy részét tartalmazza. Az eljárás során az első antitest-molekula határfelületéből egy vagy több kisméretű aminosav-oldalláncot nagyobb oldallánccal (pl. tirozin vagy triptofán) helyettesítünk. A második antitest-molekula határfelületén a nagy oldalánc(ok)ével azonos vagy hasonló méretű kompenzáló "üregeket" hozhatunk létre, oly módon, hogy a nagyobb aminosav-oldalláncokat kisebbekre (pl. alaninra vagy treoninra) cseréljük. Ez a mechanizmus a heterodimer jobb hozamát biztosítja (a nem kívánatos végtermékekhez, pl. homodimerekhez viszonyítva).

A bispecifikus antitestek közé tartoznak a keresztkötéses vagy "heterogkonjugált" antitestek is. Például, a heterokonjugátumban lévő egyik antitest avidinhez, a másik biotinhoz lehet kapcsolva. Az ilyen antitestek alkalmazását, például, az immunrendszer sejtjeinek nem kívánatos sejtek elleni célbajuttatására (4 676 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) és HIV-fertőzés kezelésére

javasolták (WO 91/00360 és WO 92/200373 számú nemzetközi közzétételi irat és EP 03089 számú európai szabadalmi leírás). A heterokonjugált antitestek bármely alkalmas keresztkötés-képző eljárással előállíthatók. Az ilyen célra megfelelő keresztkötés-képző ágensek jól ismertek (leírásukat - különféle keresztkötesi technikákkal együtt - ld. 4 676 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

A bispecifikus antitestek antitest-fragmensekből történő előállításának technikái a szakirodalomból szintén jól ismertek. Például, a bispecifikus antitestek előállíthatók kémiai kapcsolás alkalmazásával. Brennan és mtsai. [Science 229, 81 (1985)] eljárásában az intakt antitesteket proteolitikusan emésztve $F(ab')_2$ -fragmenseket hoznak létre, majd ezeket a fragmenseket - a vicinális ditiolok stabilizálása és az intermolekuláris diszulfid-képződés megakadályozása érdekében ditiol komplexáló ágens (nátrium-arzenit) jelenlétében redukálják. Az így kapott Fab' -fragmenseket tio-nitrobenzoát (TNB) származékokká alakítják, majd az Fab' -TNB származékok egyikét merkapto-etilaminnal végzett redukcióval visszalakítják Fab' -tiollá, és azt a másik Fab' -TNB származék ekvimoláris mennyiségével elegyítik, miáltal a bispecifikus antitesthez jutnak. Az így létrehozott bispecifikus antitestek enzimek szelektív immobilizálására alkalmazhatók.

Az utóbbi években lehetővé vált a Fab' -SH fragmensek *E. coli* sejtekből történő közvetlen kinyerése. E fragmensek kémiai kapcsolásával bispecifikus antitestek hozhatók lét-

re. Shalaby és mtsai. [J. Exp. Med. 175, 217 (1992)] teljesen humanizált bispecifikus antitest $F(ab')_2$ molekula előállítását tárták fel. Mindként Fab'-fragmenst külön-külön *E. coli*-val termeltették, és a bispecifikus antitestet irányított *in vitro* kémiai kapcsolással hozták létre. Az általuk előállított bispecifikus antitest ErbB2-receptort túlzott mennyiségben termelő sejtekhez és normál humán T-sejtekhez képes kötődni, és képes kiváltani a humán citotoxikus limfociták humán emlőtumor sejtek elleni lítikus aktivitását.

A bispecifikus antitestek fragmenseinek közvetlenül rekombináns sejttenyészetekben történő előállítására és izolálására különféle eljárásokat tártak fel. Például, Kostelny és mtsai. [J. Immunol. 148(5), 1547 (1992)] leucin-"cipzárok" alkalmazásával bispecifikus antitesteket állítottak elő. A Fos- és Jun-proteinből származó leucin-cipzár peptideket génfúzió alkalmazásával két különböző antitest Fab'-fragmenséhez kapcsolták. Az antitest-homodimereket a csukló-régiónál redukálva monomereket kaptak, majd ezeket visszaoxidálva antitest-heterodimereket hoztak létre. Ez az eljárás antitest-homodimerek előállítására is alkalmazható. A Hollinger és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444 (1993)] által feltárt "diatest" technika a bispecifikus antitest-fragmensek előállításának alternatív mechanizmusát reprezentálja. Az ilyen fragmensek egy nehéz lánc variábilis domént (V_H) egy könnyű lánc variábilis doménhez (V_L) kapcsolva tartalmazznak, olyan kapcsolószekvencián keresztül, amely túl rövid ahhoz, hogy az

ugyanazon láncon lévő két domén között párosodás következzen be. Ennek megfelelően, az egyik fragmens V_H - és V_L -doménje kényszerítve van, hogy a másik fragmensben lévő komplementer V_L - és V_H -doménnel alkosson párt, miáltal két antigénkötő hely képződik. A bispecifikus antitest-fragmensek előállításának egy másik, egyláncú Fv-dimerek alkalmazásán alapuló módszerét Gruber és mtsai. tárták fel [J. Immunol. 152, 5368 (1994)].

A kettőnél több értékű antitestek szintén a találmány tárgyához tartoznak. Például, előállíthatók trispecifikus antitestek is [ld. Tutt és mtsai.: J. Immunol. 147, 60 (1991)].

III) Konjugátumok és az antagonisták egyéb módosításai

A találmány szerinti eljárásokban alkalmazott, illetve a találmány szerinti termékekben lévő antagonisták, adott esetben, citotoxikus hatóanyagokhoz konjugálhatók.

Az antagonista/citotoxikus hatóanyag konjugátumok létrehozására a fentebb felsorolt kemoterápiás hatóanyagok alkalmazhatók.

A találmány értelmében feltárjuk egy antagonista egy vagy több kis molekulájú toxinnal - pl. calicheamicin, maytansin (5 208 020 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás), trichothene és CC1065 - képzett konjugátumait. A találmány egyik megvalósítási módja értelmében az antagonistát egy vagy több maytansin-molekulához történő konjugálását (pl. egy antagonista-molekulára számítva kb.

1-10 maytansin-molekula). A maytansin, például, May-SS-Me-vé alakítható, amely azután May-SH₃-má redukálható, és módosított antagonistával reagáltatva [Chari és mtsai.: Cancer Research 52, 127 (1992)] maytansinoid-antagonista konjugátum képződik.

Más módon, az antagonistát egy vagy több calicheamicin-molekulához konjugáljuk. Az antibiotikumok calicheamicin-családja pM alatti koncentrációkban a kettős szálú DNS-ben szakadásokat képes okozni. A calicheamicin konjugálás céljára alkalmas strukturális analógjai közé tartozik, többek között, a γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG és Θ^I [Hinman és mtsai.: Cancer Research 53, 3336 (1993) és Lode és mtsai.: Cancer Research 58, 2925 (1998)].

A konjugálásra alkalmazható, enzimatikusan aktív toxinok és fragmenseik közé tartozik a diftéria-toxin A-lánca, a diftéria-toxin nem kötő aktív fragmensei, az exotoxin A-lánca (*Pseudomonas aeruginosa*-ból), ricin A-lánca, abrin A-lánca, modeccin A-lánca, α -sarcin, *Aleurites fordii* proteinek, dianthin-proteinek, *Phytolaca americana* proteinek (PAPI, PAPII és PAP-S), *Momordica charantia* inhibitor, curcin, crotin, *Saponaria officinalis* inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, fenomicin, enomicin és a tricothecének (ld. pl. WO 93/21232 számú nemzetközi közzétételi irat).

A találmány oltalmi körébe tartoznak a nukleolitikus aktivitású vegyülettel [pl. ribonukleázzal vagy DNS-endonukleázzal, pl. dezoxiribonukleázzal (DNáz)] konjugált antagonisták.

A radiokonjugált antagonisták létrehozására számos radioaktív izotóp alkalmazható, mint pl. a At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , valamint a Lu radioaktív izotópjai.

Az antagonista citotoxikus hatóanyaggal alkotott konjugátumai különféle difunkciós proteinkapcsoló ágensek alkalmazásával hozhatók létre, melyek példái a következők: N-szukcinimidil-3-(2-piridil-ditiol)-propionát (SPDP), szukcinimidil-4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karboxilát, iminotiolán (IT), difunkciós imidoészter származékok (pl. dimetil-apimidát-HCl), aktív észterek (pl. diszukcinimidil-szuberát); aldehidek (pl. glutáraldehid), diazidovegyületek [pl. di-(p-azido-benzoil)-hexándiamin], di-diazonium-származékok [pl. di-(p-diazonium-benzoil)-etiléndiamin], diizocianátok (pl. toluol-2,6-diizocianát) és difluor-vegyületek (pl. 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzol). Például, ricin immunotoxin előállítására a Vitetta és mtsai. [Science 238, 1098 (1987)] által leírt eljárás alkalmazható. Radionukleotid antagonistához történő konjugálására alkalmazható kelátképző szerek egyik jellemző példája a karbon-14-jelzett 1-izotiocianatobenzil-3-metildietilén-triamin-pentaecetsav (MX-DTPA; ld. WO 94/11026 számú nemzetközi közzétételi irat). Kapcsolóként ("linker") "hasítható kapcsolót" alkalmazhatunk, amely lehetővé teszi, hogy a citotoxikus hatóanyag a sejtben felszabaduljon. Az ilyen kapcsolók savbomlékonyak vagy peptidáz-érzékenyek, illetve dimetil-kapcsolók vagy diszulfid-tartalmú kapcsolók lehetnek [Chari és mtsai.: Cancer Research 52, 127 (1992)].

Más módon, az antagonistát és citotoxikus hatóanyagot tartalmazó fúziós proteint is előállíthatunk, például, rekombináns technikák vagy peptidszintézis alkalmazásával.

Egy további megvalósítási mód értelmében az antagonistát receptorhoz (pl. sztreptavidinhez) konjugálhatjuk. Az ilyen receptor a tumor előzetes megcélzására alkalmazható, oly módon, hogy az antagonista-receptor konjugátumot beadjuk a páciensnek, majd a nem kötődött konjugátumot megfelelő tisztító ágens alkalmazásával eltávolítjuk a keringésből, és ezután a páciensnek citotoxikus hatóanyaggal (pl. radionukleotid) konjugált ligandumot (pl. avidint) adunk be.

A találmány szerinti antagonisták pro-drog aktiváló enzimmel is konjugálhatók, amely egy pro-drogot (pl. peptidil kemoterápiás hatóanyagot; ld. WO 81/01145 számú nemzetközi közzétételi irat) aktív rákellenes hatóanyaggá alakít át (ld. pl. WO 88/07378 számú nemzetközi közzétételi irat és 4 975 278 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

Az ilyen konjugátumok enzim komponense olyan enzim lehet, amely egy pro-drogot aktívabb, citotoxikus alakká képes átalakítani.

A találmány szerinti eljárásban hasznosan alkalmazható enzimek közé tartoznak, többek között, a következők: alkalikus foszfatáz, amely foszfát-tartalmú pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmas; arilszulfatáz, amely szulfát-tartalmú pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmas; citozin dezamináz, amely nem toxi-

kus 5-fluorcitozin rákellenes hatóanyaggá (5-fluoruracillá) történő átalakítására alkalmas; proteázok, pl. *Serratia* proteáz, termolizin, szubtilizin, karboxipeptidázok és chatepszinek (pl. chatepszin-B és -L), melyek peptid-tartalmú pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmasak; D-alanil-karboxipeptidázok, melyek D-aminosav szubsztituenseket tartalmazó pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmasak; szénhidrát-hasító enzimek, pl. β -galaktozidáz és neuraminidáz, melyek glikozilált pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmasak; β -laktamáz, amely β -laktámokkal derivatizált drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmas; és penicillin amidázok, pl. penicillin-V amidáz vagy penicillin-G amidáz, melyek amin-nitrogénatomjukon fenoxi-acetil-, illetve fenil-acetilcsoporttal derivatizált drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmasak. Más módon, a találmány szerinti pro-drogok aktív szabad drogokká történő átalakítására enzimatis aktivitású antitestek, ún. "abzimek" is alkalmazhatók [ld. pl. Massey: Nature 328, 457 (1987)]. Az antagonista-abzim konjugátumok a leírásban az abzim tumorsejt-populációba történő bejuttatásánál ismertetett módon állíthatók elő.

A találmány szerinti enzimek a szakirodalomból jól ismert eljárások (pl. heterodifunkciós keresztkötő reagensek) alkalmazásával, kovalens kötéssel kapcsolhatók az antagonista vegyületekhez. Más módon, szakember számára jól ismert rekombináns DNS-technikák [ld. pl. Neuberger és mtsai.: Nature 312, 604 (1984)] alkalmazásával olyan fúziós

proteinek hozhatók létre, amelyek egy találmány szerinti antagonistának legalább az antigénkötő régióját egy találmány szerinti enzim legalább egy funkcionálisan aktív részéhez kapcsolva tartalmazzák.

Az antagonisták egyéb módosításai is a találmány oldalmi köréhez tartoznak. Például, az antagonista különféle nem protein polimerhez (pl. polietilén-glikolhoz, polipropilén-glikolhoz, polioxialkilénekhez vagy polietilén-glikol és polipropilén-glikol kopolimereihez) kapcsolható.

A találmány szerinti antagonisták liposzómákba foglalt alakban is előállíthatók. Az antagonistát tartalmazó liposzómák szakember számára jól ismert eljárásokkal állíthatók elő [ld. pl. Epstein és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3688 (1985); Hwang és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4030 (1980); 4 485 045 és 4 544 545 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; és WO 97/38731 számú nemzetközi közzétételi irat]. A megnövelt keringési idejű liposzómákat az 5 013 556 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tárták fel.

A különösen előnyös liposzómák foszfatidilkolint, koleszterint és PEG-gel derivatizált foszfatidil-etanolamint (PEG-PE) tartalmazó lipidkészítmény alkalmazásával végzett - reverz fázisú lepárlási eljárással állíthatók elő. A liposzómákat meghatározott pórusméretű filtereken átréselve kívánt átmérőjű liposzómákhoz juthatunk. A találmány szerinti antitest Fab'-fragmensei diszulfid kicserélődési reakcióval, Martin és mtsai. [J. Biol. Chem. 257, 286 (1982)] leírása szerint konjugálhatók a liposzómákhoz. A

40550



liposzómába adott esetben kemoterápiás hatóanyagot foglalhatunk [ld. Gabizon és mtsai.: J. National Cancer Inst. 81(19), 1484 (1989)].

A találmány tárgyához tartozik a találmány szerinti antagonistá proteinek vagy peptidek aminosav-szekvenciájának módosítása(i) is. Például, kívánatos lehet az antagonistá kötési affinitásának és/vagy egyéb biológiai tulajdonságainak javítása. Az antagonistá aminosav-szekvencia változatait az antagonistát kódoló nukleinsavban megfelelő nukleotid-módosítások beiktatásával vagy peptidszintézissel hozhatjuk létre. Az ilyen módosítások közé tartoznak az antagonistá aminosav-szekvenciáját érintő deléciók és/vagy inszerciók és/vagy szubsztitúciók. A végső konstrukció létrehozása céljából a deléciók, inszerciók és szubsztitúciók bármely kombinációja alkalmazható, feltéve, hogy a végtermék a kívánt tulajdonságokkal bír. Az aminosav-változtatások módosíthatják az antagonistá poszt-transzlációs érési folyamatait is (pl. a glikozilációs helyek számának vagy pozíciójának változtatásával).

Az antagonistá - mutagenézis helyszínéként előnyös - aminosavai vagy régiói azonosításának egyik hasznos eljárása az "alanin-pasztázási mutagenézis" néven ismert technika [Cunningham és Wells: Science 244, 1081 (1989)]. Ezen eljárás szerint azonosítunk egy aminosavat vagy célaminosavak csoportját (pl. töltéssel bíró aminosavak, pl. Arg, Asp, His, Lys és Glu), és ez(eke)t semleges vagy negatív töltésű aminosavval (legelőnyösebben alaninnal vagy polialaninnal) helyettesítjük, abból a célból, hogy befolyásoljuk az ami-



nosavak antigénnel való kölcsönhatását. A szubsztitúcióra funkcionális érzékenységet mutató aminosav-pozíciók meghatározását ezután úgy finomíthatjuk, hogy a szubsztitúció helyén vagy annak közelében újabb vagy egyéb mutációkat hozunk létre. Ilyenformán, bár az aminosav-módosítások helye előre meghatározott, a mutáció természete önmagában nem előre meghatározott. Például, az adott helyen végrehajtott mutáció eredményének vizsgálata céljából a célkodonnál vagy célrégióban alanin-pásztázást vagy random mutagenézist végzünk, és az expresszált antagonistaváltozatokat a kívánt aktivitásra szelektáljuk.

Az aminosav-szekvencia inszerciói lehetnek N- és/vagy C-terminális fúziók, amelyek egy aminosav vagy száz vagy több aminosavas polipeptid aminosav-szekvenciához történő hozzákapcsolását jelentik, illetve egy vagy több aminosavas, szekvencián belüli inszerciók lehetnek. A terminális inszerciók példái közé tartoznak az N-terminális metionint tartalmazó antagonisták, a citotoxikus polipeptidhez fuzionált antagonisták, továbbá az antagonista N- vagy C-terminálisának enzimhez vagy olyan polipeptidhez történő fuzionáltatása, amely fokozza az antagonista vérsavóban mérhető felezési idejét.

Az aminosav-szekvencia változatok egy másik típusát reprezentálják az aminosav-szubsztitúciós változatok, amelyek az antagonista molekula legalább egy aminosava helyett egy másik aminosavat tartalmaznak. Az antitest antagonisták szubsztitúciós mutagenézisének legnagyobb jelentőségű pontjai a hipervariábilis régiók, de a vázrégióban végrehajtott

szubsztitúciók is jelentős hatásúak lehetnek. A konzervatív szubsztitúciókat az 1. táblázat "előnyös szubsztitúciók" oszlopában mutatjuk be. Ha ezek a helyettesítések a biológiai aktivitás megváltozását eredményezik, úgy további szubsztitúciós módosításokat végezhetünk, melyeket az 1. táblázat "lehetséges szubsztitúciók" oszlopában (illetve, a későbbiekben az aminosavak csoportosítása kapcsán) mutatunk be, és az így létrehozott változatokat szelektáljuk.

1. táblázat

Eredeti aminosav	Lehetséges szubsztitúciók	Előnyös szubsztitúciók
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucin	Leu
Leu (L)	Norleucin, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucin	Leu



Az antagonisták biológiai tulajdonságai szempontjából lényeges módosítások úgy valósíthatók meg, hogy kiválasztjuk azokat a szubsztitúciókat, amelyek jelentős mértékben különböznek az eredeti aminosavtól: (a) a szubsztitúció közelében a polipeptid-váz szerkezetének fenntartásában (pl. redős vagy helikális konformáció); (b) a molekula célhelyén a töltés és hidrofóbitás fenntartásában; vagy (c) az oldallánc fizikai kiterjedésének fenntartásában. A természetben előforduló aminosavakat - oldalláncaik tulajdonságai alapján - a következő csoportokba soroljuk:

- (1) hidrofób: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) semleges, hidrofil: Cys, Ser, Thr;
- (3) savas: Asp, Glu;
- (4) bázisos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) lánccorientációt befolyásoló aminosavak: Gly, Pro;
- (6) aromás: Trp, Tyr, Phe.

A nem konzervatív szubsztitúció azt jelenti, hogy az egyik csoportba tartozó aminosav egy másik csoportba tartozó aminosavval van helyettesítve. Az antagonista pontos konformációjának fenntartásában szerepet nem játszó ciszteinek szintén helyettesíthetők (általában szerinnel), ami növeli a molekula oxidatív stabilitását, és megakadályozza a rendellenes keresztkötés-képzést. Ezzel szemben, az antagonista stabilitásának növelése érdekében (különösen olyan esetekben, ha az antagonista egy antitest-fragmens, pl. Fv-fragmens) cisztein-kötések iktathatók be.

A szubsztitúciós változatok egy különösen előnyös típusa az eredeti antitest hipervariábilis régiója egy vagy

több aminosavának szubsztitúcióját foglalják magukban. A további javításra kiválasztott változat(ok) az eredeti antitesthez képest javított biológiai tulajdonságú(ak) lesz(nek). Az ilyen szubsztitúciós változatok létrehozásának egyik alkalmas módja a fágfelületen történő megjelenítéssel végzett affinitás-fejlesztés. Röviden összefoglalva; a hipervariábilis régió több helyén (pl. 6-7 helyen) mutagenezist végzünk, hogy mindegyik helyen valamennyi lehetséges aminosav-szubsztitúciót létrehozzuk. Az így kapott mutáns antitesteket külön-külön, fonalas fágreszecsskéken - az M13 fágreszecszkékbe csomagolt III. géntermékével képzett fúziós proteinekként - jelenítjük meg. A fágon megjelenített változatokat biológiai aktivitásukra (pl. kötési affinitásukra) teszteljük. A hipervariábilis régió módosításra alkalmas helyeinek azonosítása céljából alanin-pásztázási mutagenezist végezhetünk, amellyel meghatározható, hogy a hipervariábilis régió mely aminosavai járulnak hozzá az antigénkötéshez. Más módon, vagy e mellett, az antitest és az antigén közötti érintkezési pontok azonosítása céljából előnyös lehet az antigén-antitest komplex kristályszerkezetének vizsgálata. Az ilyen érintkezési (kontakt) aminosavak és az ezekkel szomszédos aminosavak a szóban forgó technikával végzett szubsztitúcióra kiszemelt aminosavakat reprezentálják. Az ilyen változatok létrehozása után a változatok sorozatát az itt ismertetett módon szkríneljük, és további fejlesztésre az egy vagy több releváns tesztben kimagasló tulajdonságúnak bizonyuló antitesteket választjuk ki.

Az antagonista aminosav-módosításainak egy másik típu-

sa az antagonista glikozilációs mintázatának megváltozását eredményezi. E változáson az antagonista egy vagy több szénhidrát-gyökének eltávolítását és/vagy egy vagy több - az antagonistában eredetileg nem található - glikozilációs hely beiktatását értjük.

A polipeptidek glikozilációja N- vagy O-kötésű lehet. Az N-kötésű glikoziláció azt jelenti, hogy a szénhidrát-gyök egy aszparagin oldalláncához kötődik. A szénhidrát-gyök aszparagin-oldallánchoz történő enzimatis kapcsolásának felismerési helyéül az aszparagin-X-szerin és aszparagin-X-treonin tripeptid-szekvenciák (amelyekben "X" jelentése: tetszőleges aminosav, a prolin kivételével) szolgálnak. Ilyenformán, a polipeptidekben az ilyen tripeptid-szekvenciák jelenléte potenciális glikozilációs helyet teremt. Az "O-kötésű" glikoziláció azt jelenti, hogy az N-acetil-galaktózamin, galaktóz vagy xilóz valamelyike hidroxil-aminosavhoz (többnyire szerinhez vagy treoninhoz) kötődik, bár 5-hidroxiprolin vagy 5-hidroxilizin is alkalmazható.

A glikozilációs helyek antagonistába történő beiktatása úgy is végrehajtható, hogy - N-kötésű glikoziláció esetén - a polipeptid a fenti tripeptid-szekvenciák közül egyet vagy többet tartalmazzon, illetve - O-kötésű glikoziláció esetén - a glikozilációs helyek egy vagy több szerin vagy treonin addíciójával vagy behelyettesítésével hozhatók létre.

Az antagonista aminosav-szekvencia változatait kódoló nukleinsav-molekulák különféle, jól ismert eljárásokkal ál-

líthatók elő. Az ilyen eljárások közé tartozik, többek között, a természetes forrásból történő izolálás (természetben előforduló aminosav-szekvencia változat esetén), valamint az antagonista korábban előállított változatának vagy változatnak nem minősíthető alakjának oligonukleotid-közvetítette (vagy helyspecifikus) mutagenézisével, PCR-mutagenézisével vagy kazetta-mutagenézisével végzett előállítás.

A találmány szerinti antagonistát effektor-funkciója vonatkozásában is módosíthatjuk, pl. antigén-dependens sejtközvetítette citotoxicitásának (ADCC) és/vagy komplement-dependens citotoxicitásának (CDC) növelése céljából. Ez úgy hajtható végre, hogy az antagonista antitest Fc-régiójába egy vagy több aminosav-szubsztitúciót iktatunk be. Más módon, vagy ezen felül, az Fc-régióba cisztein(ek) építhető(k) be, ami e régióban lehetővé teszi a láncok közötti diszulfidhíd-képződést. Az így létrehozott homodimer antitest javított internalizációs képességű és/vagy fokozott mértékű komplement-közvetítette sejtpusztítást és antitest-dependens celluláris citotoxicitást (ADCC) fejt ki [ld. Caron és mtsai.: J. Exp. Med. 176, 1191 (1992); és Shopes: J. Immunol. 148, 2918 (1992)]. Wolff és mtsai. [Cancer Research 53, 2560 (1993)] leírása szerint, heterodifunkciós keresztkötésképzők alkalmazásával, megnövelt tumorellenes aktivitású homodimer antitestek is előállíthatók. Más módon, kifejleszthetünk olyan antitestet, amely két Fc-régiót tartalmaz, ezáltal fokozott mértékű komplement lízist és ADCC-aktivitást mutat [ld. Stevenson és

mtsai.: Anti-Cancer Drug Design 3, 219 (1989)].

Az antagonista vérsavóban mért felezési idejének növe-
lése céljából az antagonistában (előnyösen antitest-
fragmensbe) "mentőreceptor-kötő epitópot" ("salvage recep-
tor binding epitope"; ld. pl. 5 739 277 számú egyesült
államokbeli szabadalmi leírás) iktathatunk be. A
mentőreceptor-kötő epitóp" kifejezésen egy IgG-molekula
(pl. IgG₁, IgG₂, IgG₃ vagy IgG₄) Fc-régiójának olyan
epitópját értjük, amely az IgG-molekula *in vivo* felezési
idejének növeléséért felelős.

IV) Gyógyászati készítmények

A kívánt tisztaságú antagonista és - adott esetben -
fiziológiai szempontból elfogadható hordozók, kötőanyagok
és stabilizálószerrek [ld. Remington's Pharmaceutical
Sciences, 16. kiadás, szerk.: Osol (1980)] - elegyítésével
tárolásra alkalmas gyógyászati készítmények állíthatók elő
(líoofilizátum vagy vizes oldat alakjában). Az erre a célra
alkalmas hordozók, kötőanyagok és stabilizálószerrek az al-
kalmazott dózisokban és koncentrációkban nem lehetnek toxi-
kusak a páciensre. Az ilyen anyagok a következők: pufferek
(pl. foszfát, citrát és egyéb szerves savak); antioxidánsok
(pl. aszkorbinsav és metionin); tartósítószerrek [pl.
oktadecil-dimetil-benzil-ammónium-klorid, hexamethonium-
klorid, benzalkonium-klorid, benzethonium-klorid, fenol,
butil- vagy benzilalkohol, alkilparabének (pl. metil- vagy
propilparabén), catechol, rezorcinol, ciklohexanol, 3-

pentanol és m-krezol]; kis molekulatömegű (legfeljebb kb. 10 aminosavas) polipeptidek; proteinek (pl. szérumalbumin, zselatin vagy immunglobulinok); hidrofil polimerek (pl. polivinilpirrolidon); aminosavak (pl. glicin, glutamin, aszparagin, hisztidin, arginin vagy lizin); monoszacharidok, diszacharidok és egyéb szénhidrátok (pl. glükóz, mannóz vagy dextrinek); kelátképzők (pl. EDTA); cukrok (pl. szacharóz, mannitol, trehalóz vagy szorbitol); sóképző ellenionok (pl. nátrium); fémkomplexek (pl. Zn-protein komplexek); és/vagy nemionos felületaktív anyagok [pl. Tween™, Pluronic™ vagy polietilén-glikol (PEG)].

A jellemző anti-CD20 antitest készítmények leírása a WO 98/56418 számú nemzetközi közzétételi iratban található, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk. E közzétételi iratban többdózisos folyadékkészítményt tártak fel, amelynek összetétele: 40 mg/ml rituximab, 25 mM acetát, 150 mM trehalóz, 0,9 % benzilalkohol, 0,02 % poliszorbát-20 (pH = 5,0). E készítmény minimális tárolhatósági ideje 2-8 °C-on két év. Egy másik anti-CD20 készítmény összetétele: 10 mg/ml rituximab, 9,0 mg/ml nátrium-klorid, 7,35 mg/ml nátrium-citrát-dihidrát, 0,7 mg/ml poliszorbát-80 és steril, injektálható víz (pH = 6,5).

A WO 97/04801 számú nemzetközi közzétételi iratban szubkután adagolásra kifejlesztett liofilizált készítményeket tárnak fel. Az ilyen liofilizált készítmények megfelelő diluendumban nagy proteinkoncentrációra regenerálhatók, és a regenerált készítményt szubkután adagolhatjuk a kezelni kívánt emlősnek.

A találmány szerinti gyógyászati készítmény - az adott indikációtól függően - egynél több (előnyösen egymás hatását károsan nem befolyásoló, komplementer aktivitású) hatóanyagot is tartalmazhat. Például, az ilyen készítmény citotoxikus hatóanyagot, kemoterápiás hatóanyagot, citokint vagy immunszuppresszív hatóanyagot (pl. a T-sejtekre ható vegyületet, pl. ciklosporint vagy T-sejtekhez kötődő antitestet, pl. LFA-1-et megkötő antitestet) is tartalmazhat. Az ilyen egyéb hatóanyagok hatásos mennyisége a készítményben lévő antagonista mennyiségétől, a kezelendő betegségtől vagy rendellenességtől, az alkalmazott kezelés típusától, és egyéb tényezőktől függ. Az egyéb hatóanyagokat a korábbi alkalmazásukkal azonos dózisban és beadási móddal vagy a korábbi dózisaik kb. 1-99 %-ának megfelelő dózisban adagoljuk.

Az aktív összetevők mikrokapszulába is foglalhatók, amely, például, koacervációs technikával (hidroximetilcellulóz vagy zselatin mikrokapszula) vagy határfelületi polimerizációval állítható elő [poli(metilmetakrilát)-mikrokapszula]. Más módon, az aktív összetevők kolloidális célbajuttató-rendszerekbe (pl. liposzómák, albumin-mikrogömbök, mikroemulziók, nanoszemcsék és nanokapszulák) vagy makroemulziókba foglalhatók. Az ilyen technikák leírását ld.: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. kiadás, szerk.: Osol (1980)].

A találmány szerinti megoldás értelmében tartós hatóanyag-kibocsátású készítmények is előállíthatók. Az ilyen készítmények jellemző példái közé tartoznak az antagonista

vegyületet tartalmazó, szilárd hidrofób polimerekből készített féligáteresztő ágyazóanyagok, amelyek pl. filmek vagy mikrokapszulák formájában állíthatók elő. A tartós hatóanyag-felszabadulást biztosító ágyazóanyagok példái a következők: poliészterek; hidrogélek [pl. poli(2-hidroxietilmetakrilát) vagy polivinilalkohol]; polilaktidok (3 773 919 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás); L-glutaminsav és γ -etil-L-glutamát kopolimerei; lebonthatatlán etilén-vinilacetát kopolimerek; lebontható tejsav-glikolsav kopolimerek (pl. LUPRON DEPOT™, amely tejsav-glikolsav kopolimerből és leuprolid-acetátból álló, injektható mikrogömb készítmény); és poli-D-(-)-3-hidroxivajsav.

Az *in vivo* adagolásra szánt készítményeknek sterileknek kell lenniük, ami steril szűrőmembránok alkalmazásával végzett szűréssel egyszerűen biztosítható.

V) Antagonista vegyületekkel végzett kezelés

A B-sejt-felületi antigénhez kötődő antagonistát tartalmazó készítményt a bevált gyógyászati gyakorlatnak megfelelő módon dozírozzuk és adagoljuk. Az e tekintetben figyelembe veendő tényezők közé tartozik a kezelendő betegség vagy rendellenesség, a kezelendő emlősfaj, az adott páciens klinikai állapota, a betegség vagy rendellenesség oka, a hatóanyag beadási helye, az adagolás módja és rendje, valamint egyéb, szakember számára ismert tényezők. Az adagolni kívánt antagonistá terápia szempontból hatásos mennyiségét

ilyen megfontolások alapján határozzuk meg.

Általánosságban elmondható, hogy a parenterálisan adagolt antagonista terápiás szempontból hatásos mennyisége - a páciens testtömegére vonatkoztatva - dózisonként kb. 0,1-20 mg/kg. Az antagonista szokásos kezdődózisa kb. 2-10 mg/kg.

A találmány szerinti megoldás értelmében antagonistaként előnyösen antitestet alkalmazunk; ilyen pl. a RITUXAN®, amely nincs citotoxikus hatóanyaghoz konjugálva. A konjugálatlan antitest alkalmas dózisa kb. 20 mg/m² és kb. 1000 mg/m² közötti tartományba esik. Az egyik megvalósítási mód szerint az antitest dózisa eltér a RITUXAN®-ra jelenleg ajánlott dózistól. Például, az antitestet egy vagy több, 375 mg/m²-nél lényegesen kisebb dózisban adagolhatjuk, például, kb. 20 mg/m² és kb. 250 mg/m² közötti tartományban, pl. 50-200 mg/m² dózisban.

Ezenfelül, az antitest egy vagy több kezdő dózisa után egy vagy több követő dózist adhatunk be, oly módon, hogy a követő dózisok meghaladják a kezdő dózis nagyságát. Például, kb. 20 mg/m² és kb. 250 mg/m² közötti, pl. 50-200 mg/m² nagyságú kezdő dózist után a követő dózis nagysága kb. 250 mg/m² és kb. 1000 mg/m² közötti.

Ahogy fentebb említettük, az antagonista ezen ajánlott dózistartományait nagy gondossággal kell az adott esetre alkalmazni. A megfelelő dózis és adagolási rend kiválasztásánál kulcskérdés az elérni kívánt eredmény. Például, a már diagnosztizált és akut betegségek kezelésére kezdetben viszonylag nagyobb dózisokra van szükség. A legjobb eredmény

elérése érdekében az antagonistát - az adott betegségtől vagy rendellenességtől függően - a betegség első tüneteinek megjelenése vagy diagnosztizálása után a lehető leghamarabb (vagy a betegség vagy rendellenesség kiújulásakor) kell adagolni.

Az antagonista adagolása bármely alkalmas módon végrehajtható, ideértve a parenterális, szubkután, intraperitoneális, intrapulmonáris és intranazális adagolást, illetve - helyi immunszuppresszív kezelés esetén - a lézióba történő adagolást. A peranterális infúziók közé tartozik az intramuszkuláris, intravénás, intraartériás, intraperitoneális és szubkután adagolás. Ezenfelül, az antagonista, alkalmas módon, impulzus infúzióval is adagolható, például, csökkenő dózisok alkalmazásával. Az adagolást előnyösen injektálással, legelőnyösebben intravénás vagy szubkután injektálással végezzük (részben attól függően, hogy rövid vagy hosszú adagolási időtartamról van szó).

Az antagonistákkal együtt egyéb vegyületek is adagolhatók, így pl. citotoxikus hatóanyagok, kemoterápiás hatóanyagok, immunszuppresszív hatóanyagok és/vagy citokinek. A kombinált alkalmazás lehet együttes adagolás (az egyes hatóanyagokat külön készítményekben vagy egyazon készítményben adagolva) vagy bármilyen sorrendben végzett egymás utáni adagolás, melynek során megfelelő időt kell biztosítani ahhoz, hogy az egyes hatóanyagok kifejthessék hatásukat.

Az antagonista protein páciensnek történő adagolásán kívül a találmány tárgyához tartozik az antagonista génterápia formájában történő alkalmazása is. Az "antagonista

terápiás szempontból hatásos mennyiségének adagolása" kifejezés jelentése kiterjed az antagonistát kódoló nukleinsav adagolására is (ld. pl. a WO 96/07321 számú nemzetközi közvéteteli iratot, a génterápia intracelluláris antitestek létrehozására történő alkalmazását illetően).

A nukleinsav (amely adott esetben vektorba lehet inszertálva) páciens sejtjeibe történő juttatására két fő módszer létezik: az *in vivo* és az *ex vivo*. Az *in vivo* bejuttatáshoz a nukleinsavat közvetlenül a páciensbe injektáljuk (rendszerint a páciens testének azon pontján, ahol az antagonistára szükség van). *Ex vivo* kezelésnél a páciens sejtjeit eltávolítjuk, az izolált sejtekbe bejuttatjuk a nukleinsavat, majd az így módosított sejteket közvetlenül vagy például, porózus membránba csomagolva visszaültetjük a páciensbe [ld. pl. 4 892 538 és 5 283 187 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. A nukleinsavak élő sejtekbe történő bejuttatására számos technika áll rendelkezésre. Az alkalmazandó eljárás attól függ, hogy a nukleinsavat tenyészetben lévő sejtekbe *in vitro* vagy a gazdában lévő sejtekbe *in vivo* kívánjuk-e bejuttatni. A nukleinsavak emlőseredetű sejtekbe *in vitro* történő bejuttatására alkalmas technikák közé tartozik a liposzómák alkalmazása, az elektroporáció, mikroinjektálás, sejtfúzió, DEAE-dextrán alkalmazása, kalcium-foszfátos precipitáció, stb. A gének *ex vivo* bejuttatására általánosan alkalmazott vektora retrovírus.

A jelenleg előnyösnek tekinthető *in vivo* nukleinsavbeviteli technikák közé tartozik a vírusvektorok (pl.

adenovírus, herpes simplex I vírus vagy adeno-asszociált vírus), valamint a lipidalapú rendszerek alkalmazásával végzett transzfekció. A lipid-közvetítette génbejuttatásra alkalmas lipidek jellemző példája a DOTMA, a DOPE és a DC-Chol. Bizonyos esetekben a nukleinsav-forráshoz a célsejteket megcélzó hatóanyagot kell mellékelni (például, sejtfelületi membránproteinre vagy magára a célsejtre specifikus antitestet vagy a célsejten lévő receptorra specifikus ligandumot). Liposzómák alkalmazása esetén a liposzóma célbajuttatására és/vagy felvételének elősegítésére endocitózissal kapcsolatos sejtfelületi membránproteinhez kötődő proteineket alkalmazhatunk. A receptor-közvetítette endocitózis technikájának leírását ld. pl. Wu és mtsai.: J. Biol. Chem. 262, 4429 (1987); Wagner és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410 (1990). Az ismert génterápiás eljárások áttekintő leírását illetően ld. Anderson és mtsai.: Science 256, 808 (1992); WO 93/25673 számú nemzetközi közlési irat, valamint az abban felsorolt hivatkozások.

VI) Termékek

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a fentebb említett betegségek és rendellenességek kezelésére alkalmas anyagokat tartalmazó terméket tárunk fel. A találmány szerinti termék tartályból és az azon lévő (vagy ahhoz mellékelte) címkéből vagy tájékoztatóból áll. Az ilyen tartályok, például, palackok, fiolák, fecskendők és hasonlóak lehetnek, és különféle anyagokból (pl. üvegből vagy mű-

anyagból) készülhetnek. A tartály az adott betegség kezelésére hatásos készítményt tartalmaz, és steril nyílással lehet ellátva (pl. szubkután injekciós tűvel átszúrható dugóval lezárt intravénás oldat-tasak vagy fiola). A készítmény legalább egy aktív hatóanyagként B-sejt-felületi markerhez kötődő antagonistát tartalmaz. A címke vagy tájékoztató arról ad felvilágosítást, hogy a készítmény autoimmun betegségtől (pl. a fentebb felsoroltak valamelyikétől) szenvedő vagy arra fogékony páciens kezelésére alkalmazható. A találmány szerinti termék tartalmazhat egy második tartályt is, amely gyógyászati szempontból elfogadható hordozót (pl. bakteriosztatikus injektálható vizet (BWFI), foszfátpuffereelt sóoldatot, Ringer-oldatot vagy dextróz-oldatot) tartalmaz. A termék egyéb, kereskedelmi és felhasználói szempontból hasznos anyagokat is tartalmazhat, így pl. további puffereket, diluendomokat, szűrőket, tűket és fecskendőket.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban kísérleti példák bemutatásán keresztül szemléltetjük, anélkül, hogy a találmány oltalmi körét a példákban bemutatott megvalósítási módokra korlátoznánk. A találmány leírásában említett valamennyi hivatkozást a kitanítás részének tekintjük.

1. példa

Rheumatoid arthritis-szel diagnosztizált betegeket rituximab (RITUXAN®) antitesttel kezelünk. A kezelt páciensben B-sejtes malignáns elváltozás nem mutatható ki. A

pácienszt adott esetben egy vagy több - a rheumatoid arthritis kezelésére általánosan alkalmazott - további hatóanyaggal is kezeljük, pl. szaliciláttal; nem szteroid jellegű gyulladásgátló hatóanyagokkal, pl. indometacinnel, fenilbutazonnal, fenilecetsav-származékokkal (pl. ibuprofen és fenoprofen), naftalin-ecetsavakkal (naproxen), pirrol-alkánsavval (tometin), indolecetsavakkal (sulindac), halogénezett antranilsavval (meclofenamát-nátrium), piroxicammal, zomepirac-kal, és difluonisallal; malária elleni hatóanyagokkal, pl. klorokinna; aranysókkal; penicilliaminnal; vagy immunszuppresszív hatóanyagokkal, pl. methotrexáttal vagy corticoszteroidokkal (az ilyen hatóanyagokra ismert dózisokban vagy ezeknél kisebb dózisokban). Mindazonáltal, a beteget előnyösen csak a RITUXAN[®]-nal kezeljük.

A RITUXAN[®]-t a rheumatoid arthritis-ben szenvedő páciensnek intravénásan (IV), az alábbi adagolási rendek valamelyikének alkalmazásával adagoljuk:

- (A) 1. nap: 50 mg/m^2 IV;
8., 15. és 22. nap: 150 mg/m^2 IV;
- (B) 1. nap: 150 mg/m^2 IV;
8., 15. és 22. nap: 375 mg/m^2 IV;
- (C) 1, 8., 15. és 22. nap: 375 mg/m^2 IV.

Az elsődleges reakciót a Paulus-index [Paulus és mtsai.: Arthritis Rheum. 33, 477 (1990)] alapján határozzuk meg (a reggeli ízületi merevségben, a fájdalmas és gyulladásos ízületek számában és a vértessüllyedésben bekövetkezett javulás, és a betegség súlyosságának öt pontos skáláján (a beteg és a kezelőorvos által megállapított) leg-



alább két pontos javulás). A RITUXAN® adagolása a fentiek szerint kezelt betegben a rheumatoid arthritis egy vagy több tünetének csillapítását eredményezi.

2. példa

Autoimmun hemolitikus anémiával (AIHA), pl. cryoglobinémiával vagy Coombs-pozitív anémiával diagnosztizált betegeket RITUXAN® antitesttel kezelünk. Az AIHA egy szerzett hemolitikus anémia, amely a páciens vörösvértestével reagáló autoantitesteknek köszönhetően alakul ki. A kezelt páciensben B-sejtes malignáns elváltozás nem mutatható ki.

A RITUXAN®-t a páciensnek intravénásan (IV), az alábbi adagolási rendek valamelyikének alkalmazásával adagoljuk:

- (A) 1. nap: 50 mg/m^2 IV;
8., 15. és 22. nap: 150 mg/m^2 IV;
- (B) 1. nap: 150 mg/m^2 IV;
8., 15. és 22. nap: 375 mg/m^2 IV;
- (C) 1, 8., 15. és 22. nap: 375 mg/m^2 IV.

A RITUXAN®-terápiával további hatóanyagok (pl. glükokortikoidok, prednizon, azatioprin, ciklofoszfamid, vinca-laden vérlemezkek vagy Danazol) adagolása kombinálható, azonban a beteget előnyösen csak a RITUXAN®-nal kezeljük.

A kezelés sikerességét a vérsejtszám javulása, a transzfúzió szükségességének csökkenése, a hemoglobin-szint javulása és/vagy a hemolízis - standard kémiai paraméterek



alapján megállapított - mérséklődése alapján határozhatjuk meg. A RITUXAN® adagolása a fentiek szerint kezelt betegekben a hemolitikus anémia egy vagy több tünetének javulását eredményezi. Például, a fentebb leírtak szerint kezelt páciens hemoglobin-szintje legalább 1 g/dl-rel nő, és a hemolízis kémiai paraméterei 50 %-kal javulnak vagy normális szintre állnak vissza (szérum tejsav dehidrogenáz, bilirubin mérése alapján).

3. példa

A felnőttkori immun-trombocitopéniás purpura (ITP) viszonylag ritka hematológiai rendellenesség, amely az immunközvetítette citopéniák legáltalánosabb képviselője. Ez a betegség rendszerint súlyos trombocitaszám-csökkenéssel (trombocitopénia) jár, ami a csontvelőben normálistól magas szintig terjedő megakariocita-szám jelenlétében akut vérzéssel lehet összefüggésben. A legtöbb ITP-s páciensben a trombocitamembrán külső felszínén lévő célantigének elleni IgG-antitestek találhatók meg, ami a lépben a vérlemezék különválását és a vérlemezék retikuloendoteliális lebontásának felgyorsulását eredményezi [Bussell: Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 4, 179 (1990)]. Az ITP kezelésére számos terápiás beavatkozás bizonyult hatásosnak. A szteroidok alkalmazását általánosan elsődleges terápiának tekintik, mely után a legtöbb páciens intravénás immunglobulin (IVIG) kezelésre, splenectomiára vagy egyéb gyógykezelésre (pl. vincristinnel vagy immunszuppresszív/citotoxikus hatóanya-

gokkal végzett kezelésre) szorul. Az ITP-s páciensek akár 80 %-a kezdetben reagál a szteroidos kezelésre, de sokkal kisebb arányban érnek el teljes vagy tartós javulást. A splenectomiát a szteroidos kezelés sikertelensége utáni másodlagos terápiaként javasolják, és ez a beavatkozás az esetek csaknem 60 %-ában tartósabb javulást eredményez, azonban a fertőzésekkel szemben csökkent mértékű immunitást eredményez. A splenectomia az egyik olyan sebészeti beavatkozás, amely jelentős mértékű (15 %) morbiditással és mortalitással (2 %) jár. Az intravénás immunglobulin-adagolást másodlagos terápiaként alkalmazták, bár e kezelés eredményeként a felnőtt ITP-s betegek csak kis hányada mutatott javulást.

Az aktivált B-sejtek általi autoantitest-termelést - a kortikoszteroidokkal és/vagy splenectomiával kapcsolatos morbiditás nélkül - gátló terápiás lehetőségek az immuntrombocitopéniás purpurában szenvedő páciensek bizonyos hányadánál nagy jelentőségű kezelést tesznek lehetővé.

Az ITP-vel diagnosztizált pácienseket (akiknél a vérlemezkeszám $50000/\mu\text{l}$ alatti) rituximab (RITUXAN®) antitesttel kezelünk, adott esetben szteroid-terápiával kombinálva. A kezelt páciensek B-sejtes malignáns elváltozás nem mutatható ki.

A RITUXAN®-t intravénásan, az alábbi adagolási rendek valamelyikének alkalmazásával adagoljuk:

- (A) 1. nap: 50 mg/m^2 IV;
8., 15. és 22. nap: 150 mg/m^2 IV;
- (B) 1. nap: 150 mg/m^2 IV;

8., 15. és 22. nap: 375 mg/m^2 IV;

(C) 1, 8., 15. és 22. nap: 375 mg/m^2 IV.

A pácienseket a RITUXAN® infúzióval történő adagolása előtt diphenhidramin 25-50 mg intravénás dózisával és acetaminofen 650 mg perorális dózisával kezeltük. A RITUXAN® szükséges mennyiségét steril fecskendő és 21-es vagy nagyobb tű alkalmazásával a fiolából - pirogénmentes 0,9 %-os nátrium-klorid oldatot tartalmazó - intravénás tasakba fecskendeztük, hogy a RITUXAN® végkoncentrációja kb. 1 mg/ml legyen. Az első 1/2 órában 25 mg/óra infúziós sebességet alkalmaztunk, majd ezt 30 perces időközönként 50 mg/órával növeltük, egészen 200 mg/óra maximális sebességig. Ha a RITUXAN® első adagolási ciklusát a páciens jól tolerálta, a későbbi ciklusokat 50 mg/órával kezdtük, és az adagolási sebességet 30 perces időközönként 100 mg/órával növeltük (300 mg/órás maximális sebességig). Az életjelenségeket (vérnyomás, pulzus, légzés, testhőmérséklet) 15 percenként négyszer ellenőriztük, míg stabil értékeket nem kaptunk, majd az adagolás befejezéséig óránként ellenőriztük.

A RITUXAN® hatását a négy hetes adagolás után két alkalommal (két hét eltéréssel) a vérlemezkeszám alapján határoztuk meg. A RITUXAN®-nal kezelt betegekben - a placeboval kezelt betegekhez képest - megnövekedett trombocitaszámot mértünk. Például, a $<20000/\mu\text{l}$ trombocitaszámot mutató pácienseknél a $\geq 20000/\mu\text{l}$ trombocitaszám értékelhető kedvező reakcióként, míg a $>20000/\mu\text{l}$ trombocitaszámmal és vérzéssel jellemezhető pácienseknél a $10000/\mu\text{l}$

vagy nagyobb mértékű trombocitaszám-növekedés és a tünetek megszűnése értékelhető reakcióként [ld. George és mtsai.: Blood 88, 3 (1996), melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk].

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás autoimmun betegség kezelésére emlősbén, *azzal jellemezve*, hogy az emlősnek egy B-sejt-felületi markerhez kötődni képes antagonistá vegyület terápiás szempontból hatásos mennyiségét adagoljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az emlősnek olyan antagonistá vegyületet adagolunk, amely a B-sejt-felületi markerek közül a következők valamelyikéhez képes kötődni: CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 és CD86.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antagonistaként antitestet adagolunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként CD20-hoz kötődő antitestet adagolunk.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként CD19-hez kötődő antitestet adagolunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a következő autoimmun betegségek kezelésére végezzük: psoriasis; dermatitis; szisztémás scleroderma és sclerosis; gyulladásos bélbetegséggel összefüggő reakciók; Crohn-kór; fekélyes vastagbélgyulladás; légzési fájdalom tünetegyüttes; felnőttkori légzési fájdalom szindróma (ARDS);

dermatitis; meningitis; encephalitis; uveitis; colitis; glomerulonephritis; allergiás állapotok; ekcéma; asthma; T-sejtek infiltrációjával és krónikus gyulladásos reakciókkal jellemezhető állapotok; atherosclerosis; leukocita adhézió deficiencia; rheumatoid arthritis; szisztémás lupus erythematosus (SLE); diabetes mellitus; sclerosis multiplex; Reynaud-szindróma; autoimmun thyroiditis; allergiás encephalomyelitis; Sjorgen-szindróma; fiatalkori diabetes; akut és késleltetett - citokinek és T-limfociták által közvetített - hiperszenzitivitással összefüggő immunreakciók; tuberculosis; sarcoidosis; polymyositis; granulomatosis; vasculitis; vészes vérszegénység (Addison-kór); leukocita diapedesis-szel járó betegségek; központi idegrendszeret érintő gyulladásos rendellenesség; több szervet érintő sérülés szindróma; hemolitikus anaemia; myasthenia gravis; antigén-antitest komplex közvetítette betegségek; anti-glomerularis alapmembrán betegség; anti-foszfolipid szindróma; allergiás neuritis; Graves-kór; Lambert-Eaton myastheniás szindróma; pemphigoid bullous; pemphigus; autoimmun poliendocrinopathiák; Reiter-kór; stiff-man szindróma; Behcet-kór; óriássejtes arteritis; immunkomplex nephritis; IgA nephropathia; IgM polineuropathiák; idiopathiás trombocytopeniás purpura (ITP) vagy autoimmun trombocytopenia.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy ember kezelésére alkalmazzuk.

8. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve,

hogy antitestként citotoxikus hatóanyaghoz nem konjugált antitestet alkalmazunk.

9. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként rituximab (RITUXAN®) antitestet alkalmazunk.

10. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként citotoxikus hatóanyaghoz konjugált antitestet alkalmazunk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan antitestet alkalmazunk, amely citotoxikus hatóanyagként radioaktív vegyülethez van konjugálva.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként Y2B8-antitestet vagy ^{131}I -B1 antitestet (BEXXAR™) alkalmazunk.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az antagonistát intravénásan adagoljuk.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az antagonistát szubkután adagoljuk.

15. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az emlősnek az antitest 375 mg/m^2 -nél lényegesen kisebb dózisát adagoljuk.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az antitestet kb. 20 mg/m^2 és kb. 250 mg/m^2 közötti dózisban adagoljuk.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az antitestet kb. 50 mg/m^2 és kb. 200 mg/m^2 közötti dózisban adagoljuk.

18. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az antitest kezdő dózisa után követő dózist adagolunk, mely követő dózis mg/m^2 értéke nagyobb, mint a kezdő dózis mg/m^2 értéke.

19. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy immun-trombocitopéniás purpura (ITP) kezelése céljából végezzük.

20. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy rheumatoid arthritis kezelése céljából végezzük.

21. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy hemolitikus anaemia kezelése céljából végezzük.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy cryoglobulinaemia vagy Coombs-pozitív anaemia kezelése céljából végezzük.

23. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy vasculitis kezelése céljából végezzük.

24. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kezelés lényegében abból áll, hogy az emlősnek antagonistát adagolunk.

25. Termék, amely tartályt és az abban lévő - B-sejtfelületi markerhez kötődő antagonistát tartalmazó - készí-

ményt, valamint a készítmény (autoimmun betegségtől szenvedő vagy arra fogékony páciens kezelésére vonatkozó) alkalmazási útmutatóját tartalmazza.

26. A 25. igénypont szerinti termék, amely a következő autoimmun betegségek kezelésére alkalmas készítményt tartalmaz: psoriasis; dermatitis; szisztémás scleroderma és sclerosis; gyulladásos bélbetegséggel összefüggő reakciók; Crohn-kór; fekélyes vastagbélgyulladás; légzési fájdalom tünetegyüttes; felnőttkori légzési fájdalom szindróma (ARDS); dermatitis; meningitis; encephalitis; uveitis; colitis; glomerulonephritis; allergiás állapotok; ekcéma; asthma; T-sejtek infiltrációjával és krónikus gyulladásos reakciókkal jellemezhető állapotok; atherosclerosis; leukocita adhézio deficiencia; rheumatoid arthritis; szisztémás lupus erythematosus (SLE); diabetes mellitus; sclerosis multiplex; Reynaud-szindróma; autoimmun thyroiditis; allergiás encephalomyelitis; Sjorgen-szindróma; fiatalkori diabetes; akut és késleltetett - citokinek és T-limfociták által közvetített - hiperszenzitivitással összefüggő immunreakciók; tuberculosis; sarcoidosis; polymyositis; granulomatosis; vasculitis; vészes vérszegénység (Addison-kór); leukocita diapedesis-szel járó betegségek; központi idegrendszeret érintő gyulladásos rendellenesség; több szervet érintő sérülés szindróma; hemolitikus anaemia; myasthenia gravis; antigén-antitest komplex közvetítette betegségek; anti-glomerularis alapmembrán betegség; antifoszfolipid szindróma; allergiás neuritis; Graves-kór;

Lambert-Eaton myastheniás szindróma; pemphigoid bullous; pemphigus; autoimmun poliendocrinopathiák; Reiter-kór; stiff-man szindróma; Behcet-kór; óriássejtes arteritis; immunkomplex nephritis; IgA nephropathia; IgM polineuropathiák; idiopathiás trombocytopeniás purpura (ITP) vagy autoimmun trombocytopenia.

27. B-sejt-felületi markerhez kötődő antagonistá alkalmazása emlősök autoimmun betegségének kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

28. A 27. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint a következő B-sejt-felületi markerek valamelyikéhez kötődő antagonistát alkalmazunk: CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 és CD86.

29. A 27. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint antagonistaként antitestet alkalmazunk.

30. A 29. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint antitestként CD20-hoz kötődő antitestet alkalmazunk.

31. A 29. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint antitestként CD19-hez kötődő antitestet alkalmazunk.

32. A 27. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az antagonistát a következő autoimmun betegségek kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk: psoriasis; dermatitis; szisztémás scleroderma és sclerosis;

gyulladásos bélbetegséggel összefüggő reakciók; Crohn-kór; fekélyes vastagbélgyulladás; légzési fájdalom tünetegyüttes; felnőttkori légzési fájdalom szindróma (ARDS); dermatitis; meningitis; encephalitis; uveitis; colitis; glomerulonephritis; allergiás állapotok; ekcéma; asthma; T-sejtek infiltrációjával és krónikus gyulladásos reakciókkal jellemezhető állapotok; atherosclerosis; leukocita adhézio deficiencia; rheumatoid arthritis; szisztémás lupus erythematosus (SLE); diabetes mellitus; sclerosis multiplex; Reynaud-szindróma; autoimmun thyroiditis; allergiás encephalomyelitis; Sjorgen-szindróma; fiatalkori diabetes; akut és késleltetett - citokinek és T-limfociták által közvetített - hiperszenzitivitással összefüggő immunreakciók; tuberculosis; sarcoidosis; polymyositis; granulomatosis; vasculitis; vészes vérszegénység (Addison-kór); leukocita diapedesis-szel járó betegségek; központi idegrendszer érintő gyulladásos rendellenesség; több szervet érintő sérülés szindróma; hemolitikus anaemia; myasthenia gravis; antigén-antitest komplex közvetítette betegségek; anti-glomerularis alapmembrán betegség; anti-foszfolipid szindróma; allergiás neuritis; Graves-kór; Lambert-Eaton myastheniás szindróma; pemphigoid bullous; pemphigus; autoimmun poliendocrinopathiák; Reiter-kór; stiff-man szindróma; Behcet-kór; óriássejtes arteritis; immunkomplex nephritis; IgA nephropathia; IgM polineuropathiák; idiopathiás trombocytopeniás purpura (ITP) vagy autoimmun trombocytopenia.

33. A 27. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az antagonistát emberek autoimmun betegségének kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

34. A 29. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint antitestként citotoxikus hatóanyaghoz nem konjugált antitestet alkalmazunk.

35. A 30. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint antitestként rituximab (RITUXAN®) antitestet alkalmazunk.

36. A 29. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint antitestként citotoxikus hatóanyaghoz konjugált antitestet alkalmazunk.

37. A 36. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint olyan antitestet alkalmazunk, amely citotoxikus hatóanyagként radioaktív vegyülethez van konjugálva.

38. A 37. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint antitestként Y2B8-antitestet vagy ^{131}I -B1 antitestet (BEXXAR™) alkalmazunk.

39. A 27. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az antagonistát intravénásan adagolható gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

40. A 27. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az antagonistát szubkután adagolható gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

41. A 32. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint

az antagonistát immun-trombocitopéniás purpura (ITP) kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

42. A 32. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az antagonistát rheumatoid arthritis kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

43. A 32. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az antagonistát hemolitikus anaemia kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

44. A 43. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az antagonistát cryoglobulinaemia vagy Coombs-pozitív anaemia kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

45. A 32. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az antagonistát vasculitis kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására alkalmazzuk.

84 oldal

0 oldal

84 oldal

[Handwritten signature]

A meghatalmazott:

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDELGI IRODA
KARAI SONYI BÉLA
~~szabadalmi ügyvivő~~