



HU000229520B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **229 520**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 00128**(22) A bejelentés napja: **2000. 02. 11.**(40) A közzététel napja: **2002. 05. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértésítőben: **2014. 01. 28.**(51) Int. Cl.: **A61K 39/00** (2006.01)(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/US 00/03483(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 0047228

| | |
|---|---|
| (30) Elsőbbségi adatok: 60/119,721 1999. 02. 12. US | (73) Jogosult(ak): Lexigen Pharmaceuticals Corporation, Lexington, Massachusetts (US) The Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornia (US) |
| (72) Feltaláló(k): Gillies, Stephen D., Carlisle, Massachusetts (US) Cheresh, David A., Encinitas, Kalifornia (US) Lode, Holger N., La Jolla, Kalifornia (US) Reisfeld, Ralph A., La Jolla, Kalifornia (US) | (74) Képvisező: Kovári György, ADVOPATENT Szabadalmi és Védjegy Iroda, Budapest |

(54) **Eljárás tumorok és áttételek kezelésére anti-angiogén terápiás szer és immunterápiás szer kombinációját alkalmazva**

(57) Kivonat

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

ELJÁRÁS TUMOROK ÉS ÁTTÉTELEK KEZELÉSÉRE ANTI-
ANGIOGÉN TERÁPIÁS SZER ÉS IMMUNTERÁPIÁS SZER
KOMBINÁCIÓJÁT ALKALMAZVA

A találmány primer tumorok és áttételek gátlására vonatkozik valamely anti-angiogén terápia szer és valamely célzott tumorelles immunterápia szer kombinált beadásán alapuló terápia alkalmazásával.

A találmány elsőbbsége az 1999. február 12-én benyújtott 60/119,721 számú amerikai egyesült államokbeli ideiglenes bejelentésen alapul.

Az itt leírt munkát részben a National Institutes of Health (NIH) támogatta az Amerikai Egyesült Államok nevében. Ennek megfelelően az Amerikai Egyesült Államok kormánya bizonyos jogokkal rendelkezhet a találmánnyal kapcsolatban.

Az alábbiakban megvilágítjuk a találmány háttérét.

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

(Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease), *Nature Medicine* **1**, 27-31 (1995); O'Reilly M. S. és munkatársai: Angiosztatin: új angiogenezis gátló, amely közvetíti a Lewis tüdő karcinóma általi áttételek visszaszorítását (Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma), *Cell* **79**, 315-328 (1994); Kerbel R. S.: A rezisztenciára rezisztens rákterápia (A cancer therapy resistant to resistance), *Nature* **390**, 335-336 (1997); Boehm T. és munkatársai: Kísérleti rák anti-angiogén terápiaja nem indukál szerzett gyógyszer rezisztenciát (Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance), *Nature* **390**, 404-7 (1997); és Volpert O. V. és munkatársai: Egy emberi fibrosarkóma gátolja a szisztémás angiogenezist és a kísérleti áttételek növekedését trombospondin-1 révén (A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via trombospondin-1), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**, 6343-6348 (1998)].

Az $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonisták alkalmazása angiogenezis gátlására ismert azokban az eljárásokban, amelyek szilárd tumor növekedés gátlására szolgálnak a vérszolgáltatás csökkentésével a szilárd tumorhoz. Ezzel kapcsolatban lásd például az 5,753,230 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat (Brooks és Cheresh) és az 5,766,591 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat (Brooks és Cheresh), amelyek leírják az $\alpha_v\beta_3$ antagonisták, így például szintetikus polipeptidek, monoklonális antitestek és olyan $\alpha_v\beta_3$ utánzók (mimetikumok) alkalmazását, amelyek kötődnek az $\alpha_v\beta_3$ receptorhoz és gátolják az angiogenezist.

Ezen kívül leírtak antitest-citokin fúziós fehérje terápiákat, amelyek elősegítik kialakult tumorok, például karcinóma áttételek immunválasz-közvetített gátlását. Így például az interleukin-2 (IL-2) citokin fuzionál egy monoklonális antitest nehéz lánchoz, amely immunreaktív, két külön fúziós fehérjében, a tumorról társult antigénnel, vagyis a hámsejt adhéziós molekulával (epithelial cell adhesion molecule) (Ep-CAM, KSA, KS1/4 antigén) vagy a GD₂ diszialoganglioziddal a KS1/4, illetve ch14.18 antitestek alkalmazásával, így alakítva ki a ch14.18-IL-2, illetve KS1/4-IL-2 fúziós fehérjéket. Ezzel kapcsolatban lásd például az 5,650,150 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat (Gillies).

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

Az angiogenezist endoteliális sejtek behatolása, vándorlása és burjánzása jellemzi; ezek olyan folyamatok, amelyek függenek a sejt és extracelluláris mátrix komponensek kölcsönhatásától. Ezzel összefüggésben az $\alpha_v\beta_3$ integrin endoteliális adhéziós receptoráról kimutatták, hogy kulcsszerepet játszik egy érrendszer-fajlagos célpont szolgáltatásával anti-angiogén kezelési stratégiákhoz [Brooks P. C., Clark R. A. és Cheresh D. A.: Érrendszeri $\alpha_v\beta_3$ integrin szükségessége angiogenezishez (Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis), *Science* 264, 569-571 (1994); Friedlander M. és munkatársai: Két angiogén út meghatározása elkülönült α_v integrinekkel (Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins), *Science* 270, 1500-

1502 (1995)]. Az $\alpha_v\beta_3$ érrendszeri (vaszkuláris) integrin szükségességét angiogenezisben számos in vivo modellben demonstrálták, ahol az új véredények átültetett humán tumorok révén történő kialakítását teljes mértékben gátolták vagy $\alpha_v\beta_3$ integrin peptid antagonistáinak szisztémás beadásával, vagy az LM609 anti- $\alpha_v\beta_3$ antitest beadásával [Brooks P. C. és munkatársai: az előzőekben idézett munka, *Science* (1994); Brooks P. C. és munkatársai (1994): $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonisták elősegítik a tumor elsorvasztását az angiogén véredények apoptózisának indukálásával (Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels), *Cell* 79, 1157-1164 (1994)]. Az LM609 rágcsáló hibridóma letétbe van helyezve az American Type Culture Collection-nél (ATCC, Rockville, Maryland, Amerikai Egyesült Államok), amely intézmény nemzetközi letétbe helyezési intézmény (International Depository Authority) a Budapesti Szerződés szerint. A nevezett hibridóma ATCC HB 9537 letéti számot kapott 1987. szeptember 15-én. Az ilyen antagonisták blokkolják az $\alpha_v\beta_3$ integrin ligálását, ami elősegíti a burjánzó angiogén érsejtek apoptózisát és ezáltal megszakítják az újonnan keletkező véredények érését, amely pedig nélkülözhetetlen esemény a tumorok burjánzásához.

Az érrendszeri endoteliális növekedési faktort [Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)] szelektív angiogén növekedési faktorként azonosították, amely stimulálni képes az endoteliális sejt mitogenezist. A humán tumor biopsziák VEGF mRNS-ek megnövekedett expresszióját mutatják rosszindulatú sejtek révén és VEGF receptor mRNS-ek révén a szomszédos endoteliális sejtekben. A VEGF expresszió

a tumor azon területeiben látszik a legnagyobbnak, amelyek szomszédosak az elhalás (nekrózis) avaszkuláris területeivel [ezzel kapcsolatban érdemes tanulmányozni Thomas és munkatársai összefoglaló munkáját: Érendszeri endoteliális növekedési faktor, egy hatékony és szelektív angiogén szer (Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent), *J. Biol. Chem.* **271** (2), 603-606 (1996)]. Hatékony tumorelleses terápiák hasznosíthatnak becélzó VEGF receptort az angiogenezis gátlására monoklonális antitesteket alkalmazva [Witte L. és munkatársai: A VEGF receptor-2-t (F1k1/KDR) becélzó monoklonális antitestek, mint anti-angiogén terápiás stratégia részei (Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (F1k1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy), *Cancer Metastasis Rev.* **17** (2), 155-61 (1998)].

A szétszóródott rosszindulatú gócok hatékony kezelésének fő akadályá magában foglal minimális maradék betegséget, amelyet olyan mikro-áttételek jellemeznek, amelyek nélkülözik a jól kialakult vaszkuláris ellátást a gyógyszerek szállításához. Ebből a szempontból egy új immunterápiás stratégia bizonyult hatékonynak, tumor területre fajlagos monoklonális antitesteket alkalmazva, amelyek a citokineket a tumor mikrokörnyezetébe irányítják. Ezt rekombináns antitest-citokin fúziós fehérjékkal érik el, amelyek úgy vannak kialakítva, hogy fenntartsák a monoklonális antitestek egyedi tumor-fajlagos becélzó képességét és a citokinok immun-módosító funkcióit. Az antitest-IL-2 fúziós fehérje alkalmazása az IL-2 irányítására a tumor területbe indukálja a tumor mikrokörnyezetbe behatoló effektor sejtek aktiválását,

ez pedig a létrejött mikroáttételek hatékony kiirtását eredményezi három különböző szingenikus egér tumor modellben [Becker J. C. és munkatársai: Rágcsáló áttételes melanóma T-sejt közvetített kiirtása, amelyet célzott interleukin-2 terápia indukál (T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy), *J. Exp. Med.* **183**, 2361-2366 (1996); Xiang R. és munkatársai: Létrejött rágcsáló vastagbél karcinóma áttételek eltüntetése antitest-interleukin-2 fúziós fehérje terápiával (Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin 2 fusion protein therapy), *Cancer Res.* **57**, 4948-4955 (1997); Lode H. N. és munkatársai: Csontvelőbe terjedő neuroblasztóma áttételek természetes ölü sejt-közvetített kiirtása célzott interleukin-2 terápiával (Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy), *Blood* **91**, 1706-1715 (1998)]. Bár a tumor áttételek korai stádiumaiban elég hatékony, ez a tumor területbe irányító megközelítés csak halasztja az áttételek növekedését a tumor növekedés későbbi stádiumainál, amelyeket teljesen kifejlődött érrendszeri hálózat jellemez. Itt fel tehetjük a kérdést, vajon van-e a fajlagos érrendszeri- és tumor területhez irányított kezelési stratégiáknak, amelyek szinergisták, kiegészítő előnye, amikor egymás utáni és egyidejű kombinációkban használjuk ezeket.

Ezt három szingenikus rágcsáló tumor modellben, mégpedig vastagbél karcinóma, melanóma és neuroblasztóma modellben vizsgálták, ahol az utóbbit spontán máj áttételek jellemzik. Mindhárom modell szoros hasonlóságot mutat az emberekben előforduló

betegségekkel. A melanóma és neuroblasztóma modellek a GD2 diszialogangliozidot expresszálják, amely jól megalapozott, tumorral társult antigén ilyen neuroektodermális rosszindulatú góccokban [Irie R. F., Matsuki T., és Morton D. L.: Humán monoklonális antitest GM2 gangliozidhoz melanóma kezelésére (Human monoclonal antibody to ganglioside GM2 for melanoma treatment), *Lancet* 1, 786-787 (1989); Handgretinger R. és munkatársai: I. fázisú tanulmány humán/egér kiméra anti-GD2 gangliozid ch14.18 antitestről neuroblasztómában szenvedő betegekkel (A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma), *Eur. J. Cancer* 31A, 261-267 (1995)], míg a vastagbél karcinóma modellt az epiteliális sejt adhéziós molekula (Ep-CAM, KSA, KS1/4 antigén) expressziója jellemzi, ahol az epiteliális sejt adhéziós molekula olyan cél molekula, amely sikeresen hasznosítható passzív immunterápiához emberekben [Riethmuller G. és munkatársai: Monoklonális antitest véletlenszerű kísérlete kimetszett Duke-féle C vastag- és végbél karcinóma adjuváns terápiájához (Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Duke's C colorectal carcinoma), *Lancet* 343, 1177-1183 (1994)]. Ezek az antigének fajlagosan behatárolják a tumor területet ezekben a modellekben, becélözva az antitest-interleukin-2 fúziós fehérjékkal, amelyek humán/egér kiméra anti-GD2 antitestekkel alakulnak ki (ch14.18-IL-2) [Gillies S. D. és munkatársai: Antitest-célzott interleukin-2 stimulálja autológ tumorsejtek T-sejt pusztítását (Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 892, 1428-1432 (1992)], és humanizált anti-Ep-

CAM (anti-KSA, Anti-KS1/4 antigén) antitestekkel alakulnak ki (KS1/4-IL-2) [Xiang R. és munkatársai (1997); az előzőekben idézett munka; Gillies S. és munkatársai: Az IL-12 antitest fúziós fehérjék hatékonyak a prosztatata- és vastagbél karcinóma áttételek SCID egér modelljeiben (Antibody-IL-12 fusion proteins are effective in SCID mouse models of prostate and colon carcinoma metastases), *J. Immunol.* 160, 6195-6203 (1998)]. Ezeknek a tumor modelleknek az érrendszeri területét, ahogyan sok állat modellenél leírták, az $\alpha_v\beta_3$ integrin expressziója határozza meg újonnan kialakult véredényeken [Brooks P. C. és munkatársai: előzőekben idézett munka (1994)]. Az itt bemutatott adatok szinergikus hatékonyságot demonstrálnak egyidejű és egymás utáni kezeléseknél, fajlagosan célozva tumorokat, primer tumorok érrendszeri területeit és távoli áttételeket. Ennek a szinergizmusnak a mechanizmusát a csökkenés szolgáltatja a véredény képződésben, és növekedés szolgáltatja a gyulladásban csak azokban az állatokban, amelyek kombinált terápiával vannak kezelve. Ezek a megfigyelések hangsúlyozzák az anti-angiogén hatás kombinálásának előnyös hatását tumor-fajlagos, tumorelles immunterápiás megközelítésekkel.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmányt.

A jelen találmány egy $\alpha_v\beta_3$ antagonistá mint angiogenezis gátló szer, amelyet az RGD-tartalmú peptid, anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitest és anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest által alkotott csoportból választunk, és egy tumorelles antigén/citokin fúziós fehérje mint tumor-ellenes immunterápiás szer alkalmazására vonatkozik gyógyászati kompozíció előállítására tumor sejt kezelésére betegben, ahol az említett

angiogenezis gátló szert és anti-tumor immunterápiás szert tumorsejt-burjánzást gátló mennyiségben adagoljuk a betegnek, ahol az említett tumorellenes antigén egy tumor antigénhez irányított antitestnek legalább az antigénkötő részletét tartalmazza.

A tumorsejt burjánzásának gátlása magában foglalhatja a tumorsejtek növekedésének gátlását létező tumorokban és tumor áttételekben, további tumor áttételek képződésének gátlását, és még a tumorsejtek elpusztítását is. Az angiogenezist gátló szer és a tumorellenes immunterápiás szer beadható lényegében együtt, valamint egymás után is.

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

A találmány szerinti felhasználáshoz alkalmas angiogenezis gátló szer olyan, amely gátolni képes új véredények kialakulását (neurovaszkularizáció) vagy a meglevő kapilláris hálózatok megnagyobbodását a tumorsejt körüli szövetek felé. Angiogenezist gátló szerek többek között a lineáris- vagy ciklo-RGD-tartalmú polipeptidok. Egy előnyös monoklonális antitest, amely kötődik az $\alpha_3\beta_1$ integrinhez, az LM609-ként azonosított monoklonális antitest (ATCC HB 9537).

Egy $\alpha\beta_3$ antagonistista legelőnyösebb kiviteli formája a szintetikus RGD-tartalmú peptid, a ciklo(RGDfN-MeV) (SEQ ID NO: 11). Ilyen általános típusú ciklusos peptideket írnak le az 5,262,520 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban (Plow és munkatársai).

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

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

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

Egy antitest és ebből polipeptid láncok, amelyek alkalmasak felhasználásra a találmányban, olyan aminosav-szekvenciával bírnak, amely lehet bármilyen emlős eredetű. Amikor egy ilyen antitest fehérje nem azonos eredetű, mint a szóban forgó beteg, az antitest fehérje fragmentumai, mint az $F(ab')_2$, Fab, Fv vagy manipulált Fv egyedi lánc antitest fehérje, alkalmazhatók. Abból a célból, hogy tovább csökkentsük az antitest fehérje antigenicitását, végrehajtható az antitest aminosav szekvenciájának módosítása, hogy ezt csökkentsük, és így a fehérjét hasonlóbbá tegyük a beteg normális antitest alkotórészeihez. Így például a monoklonális rágcsáló antitest aminosav-szekvenciák módosíthatók úgy, hogy emberibb jellegűnek tűnjenek a humán betegekbe való beadáshoz; az antitestek humanizálásának sokféle munkamenete áll ehhez rendelkezésre.

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

Humán betegek kezelésére előnyös antitestek a találmányban való felhasználáshoz a humanizált anti-GD2 tumorra társult antigén ch14.18 monoklonális antitest és az anti-KS1/4 tumorra társult antigén (amely ismert Ep-CAM-ként és KSA-ként is) KS1/4 monoklonális antitest.

Egy a jelen találmányban való felhasználásra alkalmas immunterápiás szer sejt-effektor alkotórésze egy citokin, amelyet előnyösen az IL-2, IL-12 és az IL-15 által alkotott csoportból választunk. Az előzőekben említett immunterápiás szerek citokin része lehet a teljes citokin fehérje aminosav-szekvencia, vagy lehet egy ilyen fehérje valamely fragmentuma, amely alkalmas arra, hogy citokin-fajlagos biológiai választ váltson ki.

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

Egy citokin polipeptidet egy Ig polipeptidhez kötve tartalmazó immunterápiás szerben egy megfelelő csatlakozás a citokin polipeptid lánc és egy Ig polipeptid lánc között magában foglalhat egy közvetlen polipeptid kötést és egy olyan csatlakozást, amely valamely polipeptid kapcsolóval (linkerrel) bír a két lánc között. Ez a közvetlen kapcsolás lehetővé teszi az immunterápiás szer expresszióját egyedi fúziós fehérjeként egy olyan gazdasejtől, amely transzformálva van a fúziós fehérje immunterápiás szert kódoló megfelelő expressziós vektorral.

Így egy előnyös immunterápiás szer a találmányban való alkalmazáshoz egy kétfunkciós fúziós fehérje, amelynek van egy citokin alkotórésze és egy tumorra társult antigén becélzó alkotórésze, ahol a becélzó alkotórész valamely Ig polipeptid lánc, amely fajlagos egy

tumorraal társult antigénre. Az ilyen előnyös immunterápiás szerekre példa többek között a GD2-re célzott ch14.18-IL-2 fúziós fehérje, és a KS1/4 tumorraal társult antigénre (amely Ep-CAM-ként és KSA-ként is ismeretes) célzott KS1/4-IL-2 fúziós fehérje.

A jelen találmány egy másik aspektusa tumor vagy tumor áttételek kezelésére alkalmas gyógyászati kompozíciót foglal magában, amely tartalmaz legalább egy $\alpha_v\beta_3$ antagonistát mint angiogenezist gátló szert, amelyet az RGD-tartalmú peptid, anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitest és anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest által alkotott csoportból választunk, és legalább egy tumorelleses antigén/citokin fúziós fehérjét mint tumorelleses immunterápiás szert, ahol az említett tumorelleses antigén egy tumor antigénhez irányított antitestnek legalább az antigénkötő részletét tartalmazza.

Előnyös, ha a tumorelleses immunterápiás szer becélazza a tumort vagy tumor áttétel sejtet. Egy találmány szerinti előnyös gyógyászati kompozícióban a tumorelleses immunterápiás szer valamely kétfunkciós fehérje; ez olyan effektor alkotórészszel bír, amely valamely citokin polipeptid egy tumor becélzó alkotórészszel összekapcsolva, és ez egy immunglobulin (Ig) polipeptid lánc, ahol az említett Ig lánc tartalmaz egy olyan változó területet, amely kötődik egy tumorraal társult antigénhez.

A találmány egy további aspektusa egy készlet tumorsejt tumorban vagy tumor áttételekben történő kezelésére. A készlet egy csomagot tartalmaz; ez magában foglal: a) egy $\alpha_v\beta_3$ antagonistát mint angiogenezist gátló szert, amelyet az RGD-tartalmú peptid, anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitest és anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest által alkotott

csoportból választunk, és amely képes angiogenezis gátlására az említett tumorban vagy az említett tumor áttételekben; és b) egy tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérjét mint tumorellenes immunterápiás szert, ahol az említett tumorellenes antigén tartalmazza egy tumor antigénhez irányított antitestnek legalább az antigénkötő részét.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat.

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

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

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

A 3. ábra grafikusan ábrázolja az anti-angiogén α_v integrin antagonistá és a tumorellenes terület-fajlagos immunterápia egymás utáni kombinációjának hatását antitest-IL-2 fúziós fehérjével spontán máj neuroblasztóma áttételeken. A spontán máj áttételek számát a máj gócok makroszkópos számlálásával határoztuk meg (n=8) (**P<0,01; Wilcoxon rangsor összesítő vizsgálat).

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

Az alábbiakban részletesen leírjuk a találmányt.

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

Arra jöttünk rá, hogy váratlan szinergizmus létezik a hatékonyságban tumorokban és tumor áttételekben levő tumorsejtek kezelésénél két terápiás módozat kombinált alkalmazásával, amely két módozatra a következőképpen utalunk: (1) (anti-angiogén) angiogenezis gátló terápia; és (2) tumorellenes immunterápia. Elsősorban a kombinált

α_v antagonist terápia és a tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérje terápia írjuk le.

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

Ezeknek a monoterápiáknak szimultán és egymás utáni kombinációja hatékonyan kiirtja a spontán máj áttételeket neuroblasztóma gyengén immunogén szingenikus modelljében. Ez ellentétben van a monoterápiáknak kitett kontrollokkal, legyen ez a kontroll akár anti-angiogén integrin α_v antagonist, akár antitest-IL-2 fúziós fehérje, amelyek csak részben hatékonyak az alkalmazott dózisszinteknél.

Ezen kívül a szimultán kezelések az α_v integrin antagonistával és a tumor-fajlagos antitest-IL-2 fúziós fehérjékkel drámai primer tumor visszaszorulást indukáltak három szingenikus rágcsáló tumor modellben, vagyis melanóma, vastagbél karcinóma és neuroblasztóma modellben. Amikor azonban az egyes szereket monoterápiás szerekként alkalmaztuk egymagukban, csak némi késleltetést indukáltak a tumor növekedésben.

A tumorellenes válasz társult egyidejű 50 %-os csökkenéssel a tumor véredény sűrűségben és ötszörös növekedéssel a gyulladásosejtekben a tumor mikrokörnyezetében. Ezt követően tumor elhalást (nekrozist) csak olyan állatokban mutattunk ki, amelyek kombinált terápia kaptak, de azoknál viszont nem, amelyek az egyes szereket csak monoterápiaként kapták. Az eredmények azt mutatják, hogy ezek a

szinergista kezelési módok új és hatékony eszközt biztosítanak az áttételes rák jövőbeli terápiáihoz.

A találmány leírja tumorok és tumor áttételek kezelését, ismertet gyógyászati kompozíciókat és gyógyászati készleteket (csomagolt rendszereket), amelyek használhatók az itt leírt szinergista terápiák gyakorlati kivitelezéséhez.

1. Gyógyászati kompozíciók

Sokféle gyógyászati kompozíciót írunk le, amelyek alkalmasak a találmány gyakorlati kivitelezéséhez.

A. Angiogenezis gátló

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

Előnyös antagonisták az RGD-tartalmú peptidok, mint például a ciklo(RGDfN-MeV) ciklusos peptid (SEQ ID NO: 11).

Az antagonistaként való felhasználáshoz alkalmas $\alpha_v\beta_3$ antagonisták azonosítására szolgáló vizsgálatok le vannak írva az említett amerikai egyesült államokbeli szabadalmakban, ennél fogva úgy lehet

tekinteni, hogy a különböző antagonistákat könnyű azonosítani a találmány gyakorlati kivitelezéséhez.

A megfelelő anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitesteket úgy lehet módosítani, hogy körülöleljék antigén kötő fragmentumaikat, ide értve a $F(ab)_2$ -t, Fab-ot, és a manipulált Fv-t vagy egyláncos antitestet [single-chain antibody (SCA)]. Az ilyen fragmentumok előállításai eljárásai a szakirodalomban jól ismertek [ilyenek találhatóak például Hermanson G. T. szakkönyvében: *Bioconjugate Techniques*, Academic Press (1996)]. A találmány megvalósítási módjai, amelyek leírják az antitestek alkalmazását, szintén tartalmazzák a teljes antitest megfelelő módosítását antigén-kötő fragmentumaikká. Egy megfelelő monoklonális antitestet LM609-ként azonosítunk (ATCC HB 9537).

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

Az érrendszeri endoteliális növekedési faktort [Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)] úgy azonosították, mint szelektív angiogén növekedési faktort. Így egy további angiogenezis gátló szer lehet valamely VEGF aktivitás inhibitor, amely alkalmas az angiogén növekedés gátlására. Egy ilyen inhibitor lehet valamely versengő inhibitor vagy egy VEGF kötő/inaktiváló molekula, vagy egy VEGF

receptor antagonisták. Így például lehetséges inhibitorok lehetnek VEGF nem-angiogén kémiai utánzóik, hogy versengjenek a VEGF célhoz/receptorhoz való kötődésért, lehetnek módosított nem-angiogén VEGF származékok, lehetnek antitestek, amelyek fajlagosan kötődnek VEGF-hez olyan alkalmas módon, hogy gátolják az angiogén aktivitást, vagy lehetnek esetleg további fajlagos fehérjék, amelyek kötődnek VEGF-hez (például izolált VEGF receptor fehérje), vagy lehetnek antitestek, amelyek VEGF receptorhoz kötődnek és blokkolják a kölcsönhatást VEGF-fel.

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

B. Tumorelles immunterápia

A találmány célul tűzi ki legalább egy (anti-angiogenezis) angiogenezis gátló terápiás szer kombinált beadását legalább egy tumorelles immunterápiás szerrel együtt. A tumorelles immunterápiás szer kombinál egy tumor becélzó alkotórészt valamely sejt effektor alkotórészsel, amely citokin. A tumor becélzó alkotórész tartalmazza egy antitest legalább egy antigén kötő részét egy tumorral társult antigénre irányítva.

a) Tumorral társult antigének

A tumorral társult antigének azok a célpontok, amelyek révén az immunterápiás szer végül megcélozza a tumorsejteket. A tumorral társult antigénekről a szakterületen ismert, hogy korrelációban vannak bizonyos típusú rákokkal. Az összes eset legtöbbszörében a tumorral társult antigének

sejtfelületi antigének; ezek olyan módon expresszálódnak, amely normálisan nem található meg a rák tumorok eredete körüli társult normális sejteknél. Más tumorról társult antigének olyan molekulákat vagy extracelluláris mátrix-rokon alkotórészeket választanak ki, amelyek normálisan nem találhatók meg az érett normális szövetrel társulva.

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

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

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

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

Ahogy a későbbiekben megtárgyaljuk, a szakterületen ismeretesek eljárások azonosított antigének felhasználására megfelelő antitestek kialakítására, amelyek fajlagosan kötődnek ehhez az antigénhez. Ilyen módon tumor antigéneket lehet azonosítani és monoklonális antitesteket lehet készíteni, amelyek használhatók a jelen találmányban. Tumor antigének készítésének összefoglalását adja meg az alábbi szakkönyvben található kitanítás: *Human Cancer Markers*; kiadó: The Humana Press Inc.; szerkesztők: Sell és Wahren (1982). Antigének és/vagy citokinek és hasonló előállításához alkalmas standard biokémiai és molekulárbiológiai technikák találhatóak például Sambrook és munkatársai szakkönyvében: *Molecular Cloning*, 2. kiadás; kiadó: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, Amerikai Egyesült Államok (1989).

A tumorsejt felületi antigének fajlagosak lehetnek a tumor valamely osztályára vagy tumor egyedi típusára. Sok nukleinsav és/vagy aminosav szekvencia, amely tumorról társult antigénekre vonatkozik és kódolja azokat, áll rendelkezésre publikus számítógépes adatbázisokból, amelyek Internet révén is hozzáférhetők különböző szolgáltatók segítségével, elsősorban az NCBI-től (National Center for Biotechnology Information;

www3.ncbi.nlm.nih.gov), ezek az adatok általában névvel és hozzáférési számmal vannak azonosítva (néhány, nem korlátozó jellegű példában, a hozzáférhető szekvencia típusokról való információkban ezekre az alábbi formában utalunk: „hozzáférési szám”).

Az előnyös tumorról társult antigén célpontokként, a korlátozás szándéka nélkül, megemlíjtük az alábbiakat: AFP (hozzáférési szám: NP 001125), CA125 (hozzáférési szám: NP 005890), CEA (hozzáférési szám: AAA62835), CD19 (hozzáférési szám: P15391), CD20 (hozzáférési szám: P11836), CD44 (hozzáférési szám: P16070), CD45 (hozzáférési szám: P08575), EGF receptor (hozzáférési szám: P00533), GD₂, GD₃, GM1, GM2, Her-2/Neu (hozzáférési szám: AAA58637), Ep-CAM (KSA) (hozzáférési szám: P16422, AAA36151), IL-2 receptor (hozzáférési szám: P14784, NP 000197, P01589), Lewis-Y, Lewis-X (CD 15), MCSP melanómával társult proteoglikán (hozzáférési szám: NP 001888), PSA (hozzáférési szám: P07288), PMSA, transferrin átvivő receptor (hozzáférési szám: NP 003218, NP 003225, AAF04564), GA-733-1 hasnyálmirigy karcinóma jelző fehérje (Pancreatic Carcinoma Marker Protein) (hozzáférési szám: P09758), folát receptor (hozzáférési szám: NP 000793), L6 (hozzáférési szám: P30408), és CO-029 (hozzáférési szám: A36056, P19075).

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

Tumorról társult antigén fehérjék kereskedelmi forgalomban kaphatók vagy kialakíthatók standard rekombináns DNS, sejtenyésző, fehérje expresszási technikákkal, amelyek a szakterületen jól ismertek.

Így például a Sigma cég (St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) kereskedelmi listáján szerepelnek az alábbiak: GD2 diszialogangliozid (G 0776), GD3 diszialogangliozid (G 5904), GM1 monoszialogangliozid (G 7641), GM2 monoszialogangliozid (G 4651), Ca 19-9 gyomor- és bélrendszeri tumor antigén (Gastrointestinal Tumor Antigen) (G 8660, G 8535), CEA karcinoembrionális antigén (C4835), Lewis-X triszacharid (L 5152) és Lewis-Y (L 7401).

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

Még ha kereskedelmi forgalomban nem is kaphatók, a monoklonális antitestek készítésének ismert eljárásait alkalmazva kialakíthatók tumorra társult antigénekre fajlagos antitestek, immunogénként az antigént alkalmazva. Így például leírták az anti-Lewis-Y antigén rágcsáló antitest nehéz és könnyű lánc változó doméneket (hozzáférési szám: AAB25798 és AAB25799). Hasonlóképpen leírták az anti-aszialo GM1 gangliozid rágcsáló antitest nehéz és könnyű lánc változó doméneket (hozzáférési szám: AAD09194 és AAD09195). Megoldottak egy kristályszerkezetet egy anti-GD2 gangliozid monoklonális antitest nehéz és könnyű lánchoz (hozzáférési szám:

2554841, 2554842). Beszámoltak olyan antitestekről, amelyek megkötik a folát receptort (kötő fehérje), ezt markerként azonosították petefészek rákhoz (hozzáférési szám: NP 000793). Beszámoltak anti-CA125 monoklonális változó terület nehéz és könnyű lánc nukleinsav szekvenciáról, és ezt felhasználták beiktatásra egy kazetta vektorba (hozzáférési szám: AAB33454, 33455).

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

b) Monoklonális antitestek és antigén kötő részeik és hasonlók

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

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

Az egyik gát a rágcsáló monoklonális antitestekkel történő ismételt kezeléshez humán betegeken a HAMA [humán anti-egér antitestek

(human anti-mouse antibodies)], amelyet a beteg alakít ki a kezelésre adott válaszként. Azok között az eljárások között, amelyekkel megkísérlik leküzdeni ezt a gátat, található a rágcsáló antitest fehérjék humanizálása az egér fehérje antigén aminosavak helyettesítésével emberi fehérje szekvenciákkal, amelyekről feltételezhető, hogy kevésbé antigének. További eljárás lehet a kötő fajlagosságot meghatározó aminosav gyökök vagy területek beültetése humán fehérje keretekbe.

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

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

között lehetnek a Fab, F(ab)₂, F(ab)₃, Fv vagy egyedi láncos Fv [egyedi láncos antitest (single chain antibody, SCA)] konstrukciók.

Fel kell idéznünk, hogy gyógyászati szerek minden monoklonális antitesten alapuló alkotórésze a találmánnyal összhangban történő felhasználása emberek kezelésére, előnyt szerezhethet a módosítás lehetőségéből az immunogenicitás és a lehetséges HAMA csökkentésére, amint ezt az előzőekben leírtuk.

c) Citokinek

A tumorellenes immunterápiás konstrukciók, amelyeket a találmány szerint használunk, magukba építenek egy sejt effektor részt, amely valamely citokin.

A találmány szerint alkalmazott tumorellenes terápiás szerek effektor alkotórésze tartalmazhatja sokféle citokin bármelyikét citokin-fajlagos biológiai válasz indukálására olyan sejtek által, amelyek a citokin receptorát hordozzák. A citokinek jól jellemzett anyagok, ennél fogva a találmányt nem kívánjuk egy-egy citokinre korlátozni. A citokinek magukba foglalják a kemokineként ismert molekulákat egyik alosztályként. A jelen találmány összefüggésében a kemokinek a citokin szupercsalád egyik tagjának tekintjük. Ennél fogva a citokin kifejezés, ahogyan itt használjuk, általában utal mind a citokinekre, mind a kemokinekre. A citokinek szakterületének egy leírása megtalálható az alábbi szakkönyvben: Callard és Gearing: The Cytokine Facts Book, kiadó: Academic Press, Inc. (1994). A kemokinek szakterületének egy leírása megtalálható az alábbi szakkönyvben: Vaddi és munkatársai: The Chemokine Facts Book, kiadó: Academic Press, Inc. (1997). Több, a

citokinekkel kapcsolatos nukleinsav és/vagy aminosav szekvencia áll rendelkezésre a publikus adatbázisokban, amelyek Internet révén is hozzáférhetők különböző szolgáltatók segítségével, elsősorban az NCBI-től (National Center for Biotechnology Information; www3.ncbi.nlm.nih.gov), ezek az adatok általában névvel és hozzáférési számmal azonosíthatók (néhány, nem korlátozó jellegű példában az itt idézett szekvencia információk hozzáférhetőségére úgy utalunk a későbbiekben, mint azonosítható „hozzáférési szám”-ra).

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

A jelen találmányban történő felhasználáshoz alkalmas citokinek, a korlátozás szándéka nélkül, az alábbiak lehetnek: IL-2, IL-12 és IL-15 (hozzáférési számok: P01585, P29459, P46658, P40933) A találmányban való felhasználáshoz előnyös citokinek az IL-2 és IL-12, vagy biológiailag aktív fragmentumaik, amelyek megőrzik a teljes, ép molekula effektor aktivitásának legalább egy részét.

A találmányban való felhasználásra előnyös citokin az IL-2.

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

d) Tumorelles/citokin immunterápiás szerek

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

1) Antitest fúziós fehérjék

Immunterápiás rákellenes reagenseket írtak már le, amelyek citokin funkciót céloznak be egy olyan sejthez vagy szövethez, amely tumor antigéneket visel, a citokin alkalmazásával így felerősítve egy immunválaszt olyan sejtek ellen, amelyek tumor antigént hordoznak vagy társultak a tumor antigénnel. Ezekre az immunterápiás szerekre úgy utalunk, mint tumorelles antigén/citokin fúziós fehérjékre, mivel a fúziós fehérje tartalmazza a citokin fúziós terméket egy rekombináns immunglobulin (Ig) polipeptid láncsal, amely immun-reagál egy előre kiválasztott, tumoral társult antigénnel.

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

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

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

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

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

2. Terápia

A találmány szerinti terápia tumor sejtek kezelésére tumorokban és tumor áttételekben az angiogenezis gátló (anti-angiogén) terápia és a tumorelles immunterápia kombinált alkalmazásán alapul. Több, mint egy típusú angiogenezis gátló szer alkalmazható több, mint egy típusú tumorelles immunterápiás szerrel kombinálva. A kombinált alkalmazás történhet egyidejűleg vagy egymás után, vagy egy időköz beiktatásával a kezelések között. Bármelyik fajlagos terápiás szer beadható egynél többször a kezelés folyamán. A találmány szolgáltatja az angiogenezis gátló terápiás szerek és tumorelles immunterápiás szerek kombinált alkalmazását, amely a tumorsejt burjánzást gátló hatás szinergetikus potencírozását eredményezheti az egyedi terápiás szerekhez viszonyítva, hatékonyabb kezelést alakítva ki, mint amely az egyedi alkotórészek önmagukban történő beadásánál észlelhető. Így egyik aspektusban a találmány magában foglalja egy angiogenezis gátló szer és egy tumorelles immunterápiás szer olyan mennyiségeinek beadását kombinációban egy betegbe, amely mennyiségek nem eredményeznének hatékony angiogenezis gátlást vagy tumorsejt elleni aktivitást, ha ebben a mennyiségben egyedül adnánk be ezeket.

A találmány magában foglalja módosulatok sokféleségét a találmány gyakorlati kivitelezésében, ami a lépéseket illeti. Így például az antagonista és a tumorelles immunterápiás szer beadható az összekeverést követően, vagyis egyidejűleg, vagy be lehet adni egymás után, vagyis külön-külön. Ezen kívül az antagonista és a fúziós fehérje

külön-külön beadható mintegy 3 hét időintervallumon belül a beadások között, vagyis lényegében az első aktív szer beadása után lényegében azonnal vagy attól számítva mintegy 3 héten belül beadható a második szer. Ezen kívül elképzelhető az is, hogy a sorrend változtatható, vagyis hogy az $\alpha\beta_3$ antagonistát adjuk be a fúziós fehérje beadása előtt, vagy a beadás végrehajtható fordított sorrendben.

Az egyik kiviteli módban a találmány magában foglalja egy angiogenezis gátló szer angiogenezist gátló mennyiségének és egy tumorelles immunterápiás szer biológiai válasz kiváltására alkalmas mennyiségének beadását is tumorok vagy áttételek kezelését igénylő betegbe. Így például elegendő kiváltani egy citokin-fajlagos biológiai választ, ahol egy citokinnel és egy rekombináns immunglobulin (Ig) polipeptid láncsal bíró kétfunkciós fúziós fehérjéről van szó, ahol az Ig lánc tartalmaz egy, tumoral társult sejtfelületi antigént hordozó tumorsejtre fajlagos változó területet, és ahol az Ig lánc egy peptid kötésen keresztül van csatlakoztatva a citokinhez.

Egy másik kiviteli módban a találmány gyakorlatba vehető sebészeti beavatkozásokkal együtt, ahol a tumor tömeg egy részét vagy egészét eltávolítjuk. Ebből a szempontból a találmány egy sebészeti munkamenetet követően vehető gyakorlatba. Egy másik megoldás szerint a sebészeti munkamenetet az első aktív szer és a második aktív szer beadása közti időszak során végezhetjük el. Erre példa a jelen találmány sebészeti tumor eltávolítással történő kombinálása, amelyet a későbbiekben írunk le.

A találmány szerinti kezelés tipikusan a terápiás kompozíciók beadását tartalmazza a beadás egy vagy több ciklusában. Így például ahol az egyidejű beadást gyakoroljuk, olyan terápiás kompozíciót adunk be, amely tartalmaz mind $\alpha\beta_3$ antagonistát, mind tumorellenes immunterápiás szert, mintegy 2 naptól mintegy 3 hétig terjedő időköz során egyetlen ciklusban. Ezután a kezelési ciklus megismételhető, ahogyan a kezelő orvos elbírálása szerint szükséges. Hasonlóképpen, amikor az egymás utáni alkalmazást tartjuk célszerűnek, a beadási időt az egyes egyedi gyógyászati szerek között úgy állítjuk be, hogy az tipikusan azonos időtartamot fedjen le. Az időköz a ciklusok között változhat zérótól 2 hónapig.

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

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

A tumorellenes immunterápiás szer adagja tipikusan 0,01 mg és 10 mg közti mennyiség, előnyösen mintegy 0,1 és 1 mg közti mennyiség, és még előnyösebben mintegy 0,6 mg/testtömeg kg/nap.

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

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

Ezen kívül ismeretes, hogy igen nagy számú különböző tumor létezik, amely növekedéséhez érképzést (vaszkularizációt) igényel, ennél fogva jelölt a jelen eljárások kombinált terápiás módosulataira. Azok között a tumorok között, amelyek növekedésükben angiogenezist indukálnak, található a neuro-ektodermális, epiteliális és hasonló szövetekből kialakuló tumorok. A tumorokra és tumor áttételekre példák lehetnek az adenóma, angioszarkóma, asztrocitóma, epiteliális karcinóma, germinóma, glioblasztóma, glióma, hamartóma, hemangioendotelióma, hemangio-szarkóma, hematóma, hepatoblasztóma, leukémia, limfóma, medullo-blasztóma, melanóma, neuroblasztóma, oszteoszarkóma, retino-blasztóma, rabdomioszarkóma, szarkóma, teratóma és hasonló tumorok.

3. Terápiás rendszerek

Az egyik kiviteli formában a találmány olyan rendszereket céloz meg, amelyek csomagolásokat és/vagy készleteket tartalmaznak; ezek

szolgáltatják a jelen találmány gyakorlati kivitelezéséhez szükséges reagenseket. Egy készlet tumorsejtek kezelésére tumorokban vagy tumor áttételekben egy csomagot tartalmaz az alábbiakból:

- a) valamely angiogenezis gátló szer, amint azt a jelen leírásban ismertettük, amely angiogenezis gátlására képes a tumorban vagy tumor áttételekben;
- b) valamely tumorelleses immunterápiás szer, amint azt a jelen leírásban ismertettük, például egy kétfunkciós fúziós fehérje reagens, amely egy citokinnel és egy rekombináns immunglobulin (Ig) polipeptid láncsal bír, ahol az Ig lánc tartalmaz egy, valamely tumorról társult sejtfelületi antigént hordozó tumorsejtre fajlagos változó területet, ahol az Ig lánc egy peptid kötéssel csatlakozik a citokinhez; és
- c) útmutatások a reagensek alkalmazásához tumorok és tumor áttételek kezelésére.

Egy reagens a találmány szerinti készletben tipikusan terápiás kompozícióként van kiszerve, ahogyan itt leírjuk, ennél fogva a sokféle lehetséges forma bármelyike lehet, amely alkalmas egy készletbe való elosztáshoz. Az ilyen formák között található a folyadékok, porok, tabletták, szuszpenziók és hasonló kiszervek a találmány szerint alkalmazott antagonisták és/vagy fúziós fehérjék szolgáltatására. A reagenseket szolgáltathatjuk elkülönült tartályokban, amelyek alkalmasak a külön-külön beadáshoz, vagy egy másik megoldás szerint szolgáltathatjuk kombinált kompozícióként egyetlen tartályban a csomagban.

Hasonlóképpen egy ilyen csomag tartalmazhat az előzőekben leírt alkotórészeken kívül bármely más tumorelleses terápiás szert.

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

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

Hasonlóképpen a reagensek magukban foglalhatnak tumorelleses immunterápiás citotoxikus szereket, például tumor antigén kötő antitesteket radioaktívan jelzett izotópokkal vagy citotoxikus szerekkel, például citotoxikus peptidokkal vagy citotoxikus gyógyszerekkel és hasonlókkal összekapcsolva.

4. Szintetikus peptidek előállítása

a) Szintézis munkamenet

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

2 gramm (g) BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OMe-t (SEQ ID NO: 1) először feloldunk 60 milliliter (ml) metanolban, amelyhez hozzáadunk 1,5 ml 2 n nátrium-hidroxid oldatot, hogy keveréket kapjunk. A keveréket azután 3 órán át kevertetjük 20°C hőmérsékleten (20°C). Bepárlás után a maradékot vízben felvesszük, pH 3 értékre savanyítjuk hígított HCl oldattal, majd extraháljuk etil-acetáttal. Az extraktumot Na₂SO₄-en víztelenítjük, ismét bepároljuk, és a létrejövő BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH-t (SEQ ID NO: 2) 20°C hőmérsékleten kevertetjük 2 órán át 20 ml 2 n dioxános HCl oldattal. A létrejövő keveréket bepároljuk, így kapjuk meg a H-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH-t (SEQ ID NO: 3), amelyet azután feloldunk 1800 ml diklórmetán és 200 ml dimetil-formamid keverékében, majd lehűtjük 0°C

hőmérsékletre. Ezután egymás után 0,5 g diciklohexil-karbodiimidet (DCCI), 0,3 g 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) és 0,23 ml N-metil-morfolint adunk hozzá kevertetés közben.

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

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

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

b) Alternatív szintézis eljárás

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

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

A ciklizáláshoz 0,6 g Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-NMeVal-OH (amelyet az előzőekben szintetizáltunk) (SEQ ID NO: 16) 15 ml DMF-fel (dimetil-formamid; Aldrich) képzett oldatát hígítjuk 85 ml diklór-metánnal (Aldrich), majd 50 mg NaHCO₃-at adunk hozzá. A keveréket szárazjég/aceton keverékben lehűtjük, és 40 µl difenil-foszfóril-azidot (Aldrich) adunk hozzá. Szobahőmérsékleten állni hagyjuk 16 órán át, majd az oldatot koncentráljuk. A koncentrátumot gélszűrésnek vesszük alá (Sephadex G10 oszlop izopropanol/víz 8:2-ben), majd HPLC-vel tisztítjuk szokásos módon. A kezelés TFA-val [trifluor-ecetsav/víz (98:2)] szolgáltatja a ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal), (amelyre itt

„ciklo(RGDfN-MeV)”-ként is utalunk SEQ ID NO: 11) x TFA terméket, amelyet HPLC-vel tisztítunk szokásos módon; RT = 19,5; FAB-MS (M+H): 589.

ii) „Belső só” szintézise

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

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

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

a ciklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (SEQ ID NO: 11) x HCl-t; FAB-MS (M+H): 589.

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

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

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

1. TÁBLÁZAT

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

* A csillaggal megjelölt peptideket HCl-ben készítjük el, és ezek szekvenciájukban azonosak azokkal a peptidekkel, amelyek ugyanabban a sorban vannak megjelölve; a csillag nélküli peptidek TFA-ban vannak elkészítve. A kisbetűk D-aminosavakat jelölnek; a nagybetűk L-aminosavakat jelölnek.

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

a) Fehérjék és érrendszer-fajlagos α_v integrin antagonisták

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

6. Sejtvonalak és állati modellek

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

Az összes sebészeti munkamenetnél egereket érzéstelenítünk ketamin injekcióval [100 mg/kg intraperitoneálisan (i.p.)] és egyidejűleg metofán inhalálással (Pitman-Moore, Mundelein, Illinois, Amerikai Egyesült Államok). Ozmotikus szivattyúkat (Alzet®, 2001 modell, Palo Alto, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) alkalmazunk az α_v integrin antagonistá és a kontroll peptid bevezetéséhez, 17,5 $\mu\text{g}/\text{óra}$ szolgáltatási sebességnél. Ezeket a szivattyúkat a gyártó cég útmutatásai szerint kezeljük, és beültetjük a dorzális szubkután szövetbe steril körülmények

között. Minden szivattyút kicserélünk a 7. napon a beültetés után, és eltávolítunk a antivaszkuláris kezelés 10. napján. Minden állatkísérletet az NIH „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Irányvonal a laboratóriumi állatok felügyeletéről és alkalmazásáról) című irányvonala szerint hajtunk végre.

7. Hisztológia és immunhisztokémia

Primer tumorok acetonnal rögzített, fagyasztott metszeteit inkubáljuk 4% kecske szérummal, hogy blokkoljuk a nem-fajlagos kötést. Az inkubálást anti-egér CD31 és anti-egér CD45 monoklonális antitestekkel (Pharmingen; La Jolla, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) (1:100) végezzük, és az ezt követő festést rodaminnal jelzett kecske-anti-patkány antitesttel (1:300), nedvesített kamrában hajtjuk végre szobahőmérsékleten. Minden inkubálást mosás követ háromszor PBS-sel (foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldat). A véredény- és fehérvérsejtszámot nagy erejű területenként [„high power field (HPF)] mikroszkóposan határozzuk meg 200-szoros nagyításban [Brooks P. C. és munkatársai: Anti- α β 3 integrin blokkolja a humán mellrák növekedést és az angiogenezist emberi bőrben (Anti-integrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin), J. Clin. Inves. 96, 1815-1822 (1995)]. A reprezentatív területek 200-szoros nagyításban (véredények), illetve 800-szoros nagyításban (fehérvérsejtek) vannak lefényképezve.

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

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

Az 1. ábra grafikusán ábrázolja a kombinált terápia hatását anti-angiogén α_v integrin antagonistával, és antitest-IL-2 fúziós fehérjékkel együtti tumorelles immunterápiás terület-fajlagos immunterápiával primer tumorokon. Az 1A. ábra mutatja be az eredményeket az NXS2 neuroblasztóma szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból. Az 1B. ábra eredményeket mutat be CT26-KSA vastagbél karcinóma szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból. Az 1C. ábra eredményeket mutat be a B78-D14 melanóma sejtek szubkután injekciójával (2×10^6) indukált primer tumorokból. A megállapított tumorok (110-130 mm^3) kezelését a huKS1/4-IL-2 (10 μ g; vastagbél karcinóma) és ch14.18-IL-2 (5 μ g; neuroblasztóma; 10 μ g; melanóma) (x5) tumorfajlagos antitest-IL-2 fúziós fehérjék napi intravénás injekciójával indítjuk be, és az érrendszer-fajlagos α_v integrin antagonistá vagy a kontroll peptid folyamatos szubkután infúziójával ozmotikus szivattyúval 7 napon át 17,5 μ g/óránál (felső határ). A kezelés beindulásának időpontját fekete nyíl jelzi. Az egerek primer tumorjainak méretét minden kísérleti csoportban (n=6) mikrokaliber méréssel (szélesség x hosszúság x szélesség/2) (átlag \pm standard hiba) határozzuk meg. A visszafejlődés a kombinációs kezelést kapott egerek primer tumor

méretében összehasonlítva a megállapított tumorok méretével a kezelés kiindulásának időpontjában szignifikáns mindhárom különböző szingenikus tumor modellben ($P < 0,001$; Wilcoxon rangsor-összesítő vizsgálat) ellentétben az összes kontrollal ($P > 0,05$).

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

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

A 2. ábra grafikusán ábrázolja az anti-vaszkuláris terápia és tumorelles immunterápia kombinációjának hatását az érképzésre és

tumorelles immunválaszokra. Egerek (n=6) megállapított primer neuroblasztóma tumorokkal kombinált kezelést kapnak érrendszer-fajlagos α_v integrin antagonistával, egy nem-fajlagos peptid kontrollal és egy tumorfajlagos ch14.18-IL-2 fúziós fehérjével, ahogyan az 1. ábrában bemutatjuk, ide értve olyan kontrollokat, amelyek csak egyetlen terápiát kapnak. A kezelés végén a szubkután (s.c.) tumorokat sebészileg eltávolítjuk. Az egyes tumorok fagyasztott metszeteit immunhisztokémiai úton elemezzük, véredény endoteliális sejtek (CD-31)-re, illetve leukocita beszűrődésre (CD45) fajlagos antitestek alkalmazásával. Az utóbbi jól meghatározott markere a ch14.18-IL-2 fúziós fehérje által indukált, a tumor területre fajlagos immunválasznak [Becker J. C. és munkatársai (1996); Xiang és munkatársai (1996); Lode H. N. és munkatársai (1998); korábban idézett munkák].

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

Az α_v integrin antagonistát kapott egerek 50%-os csökkenést mutatnak a vaszkularizálásban (2. ábra), ez egybevág a primer tumorok növekedésének késleltetésével, ez pedig a vaszkuláris terület hatékony becélzását demonstrálja. Ebben az esetben a tumor területre közvetlenül nincs hatás (1. ábra). Ezzel ellentétben azok az egerek, amelyek csak az

anti-GD2-IL-2 fúziós fehérjével vannak kezelve, elkülönült leukocitás beszűrődést tárnak fel, amely ennek az anti-tumor-területre irányuló terápiának jól meghatározott jellemzője [Becker J. C. és munkatársai (1996); Xiang R. és munkatársai (1996); Lode H. N. és munkatársai (1998), korábban idézett munkák], amely az s.c. tumor növekedés jelentős csökkenéséhez vezet (1. ábra).

Csak azok az egerek tárnak fel azonban ötszörös növekedést a fehérvérsejt beszűrődésben a tumorba a csak anti-GD2-IL-2-vel kezelt egerekkel összehasonlítva, amelyek az α_v integrin antagonistá és anti-GD2-IL-2 fúziós fehérje kombinációjával vannak kezelve, és csak ezek mutatnak hasonló csökkenést a vaszkularizálásban is. A növekedést a gyulladt sejtek számában hisztológiával és immunhisztokémiával demonstráljuk, és ezt makrofágok benyomulásának tulajdonítjuk; ez olyan séma, amely gyakran látható nekrotikus szövetekben sejttörmelék eltávolítása során. Valójában az ilyen nekrotikus területek csak olyan tumorokban vannak jelen, amelyek kombinációs kezelést kaptak, ellentétben a kontrollokkal, amelyek az egyes alkotórészekkel külön-külön kezelték.

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

A primer tumorok sikeres kezelésén kívül még inkább releváns kérdés az, vajon az elkülönült áttételekre is hat-e az ilyen kombinált anti-vaszkuláris és anti-tumor-fajlagos kezelési stratégia. Ezt a neuroblasztóma modellre értelmezzük, amelyet spontán májáttételek

jellemeznek. Ebből a célból a primer tumorok kezelését az anti-angiogén α_v integrin antagonistával egymás utáni formában kombináljuk az antitest-IL-2 fúziós fehérjével végzett tumorellenes immunterápiával.

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

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

A 4. ábra grafikusan ábrázolja az anti-angiogén α_v integrin antagonistá terápia és az antitest-IL-2 fúziós fehérjével együtti anti-tumor terület-fajlagos immunterápia szimultán kombinációjának hatását

spontán máj neuroblasztóma áttételekre. A spontán áttételek primer tumorok indukcióját követően indukálódnak a 2×10^6 NXS2 neuroblasztóma sejtekkel s.c. A kezelés integrinnel vagy antagonistával (17,5 µg/óra) és tumor-fajlagos ch14.18-IL-2 fúziós fehérjével (5 µg x 5) a primer tumor eltávolítása előtt (4A. ábra) vagy után (4B. ábra) indul be. A spontán máj áttételeket a máj gócok (n=8) makroszkópos számlálásával határozzuk meg (*P<0,01; Wilcoxon rangsor-összesítő teszt).

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

10. A szinergetikus kombináció és a hatékony terápia

A véredények szétzúzása rosszindulatú tumorok vaszkuláris területében erőteljes stratégia a rák elleni harcban. A tumor érrendszerének endoteliális sejtjeit megcélözva a tumort sikerrel lehet kezelni. Egy peptid antagonist, amely megcélozza az érrendszert az angiogén véredényeken expresszált α_v integrinekkel való kölcsönhatás révén [Brooks P. C. és munkatársai (Science, 1994); Friedlander M. és munkatársai (1995), az előzőekben idézett munkák)] visszaszorítja a véredények képződését és drámai módon visszafejleszti az ezt követő tumor növekedést. Ezt három agresszíven növekvő primer tumor és egy spontánul áttételeket képző tumor kezelésével demonstráljuk. Miközben

az alkalmazott α_v integrin antagonista elsődlegesen az $\alpha_v\beta_3$ -ra irányul, ez kötődik a közeli rokon $\alpha_v\beta_5$ integrinre is. A vizsgált vastagbél karcinóma és neuroblasztóma tumorokból világosan hiányzik az $\alpha_v\beta_3$, de valószínűleg expresszálnak valamennyi $\alpha_v\beta_5$ -öt. A melanóma modell expresszál $\alpha_v\beta_3$ -at is. Ennek az integrin antagonistának a hatása határozottan a tumor érrendszerre korlátozódik mindhárom állat modellben, amint ezt a neuroblasztóma modellben demonstráljuk (2. ábra). Nagyon fontos, hogy a tumor érrendszer becélzásának tumorelles hatását megsokszorozza az egyidejű támadás a tumor terület ellen, amely hatásos mind a primer tumorokra, mind a spontán áttételekre. Ez különösen idevág, mivel a primer tumor eltávolítása a kezelés előtt megnöveli a neuroblasztóma áttételek növekedését és szétszóródását; ez az észlelés jól dokumentált más tumor modellekben a csökkenés miatt az angiogenezis inhibitorok keringő szintjében a primer tumor kimetszését követően [Holmgren L. és munkatársai (1995); Folkman J. (1995), korábban idézett munkák)]. A vaszkuláris terület és a tumor terület szimultán becélzása nagyon hatékonynak bizonyul, mivel ez kombinálja a csökkenést a tumorsejt táplálásában a tumorsejtek aktív rombolásával, és ez a primer tumorok sorvadásához és az elkülönült áttételek kiirtásához vezet. Ez ellentétben van az egyedi vaszkuláris területre irányuló megközelítéssel, amely két különböző anti-angiogén kezelési stratégiát alkalmaz, amelyek csak a s.c. tumor növekedés visszaszorítását eredményezik egy szingenikus modellben [Mauceri H. J. és munkatársai: Az angiosztatin és az ionizáló sugárzás kombinált hatásai

a tumorelleses terápiában (Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy), *Nature* 394, 287-291 (1998)].

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

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

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

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

SZEKVENCIALISTA

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

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

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

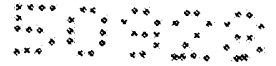
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> D-Arg

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

<400> 1
Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

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



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

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

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

<400> 2
Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

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

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

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

<400> 3
Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

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

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

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

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

<400> 4
Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

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

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

<220>
<223> Masterséges szekvencia Isfrász: ciklo (RGDFV)

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

<400> 5
Arg Gly Asp Phe Val

1 5

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

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

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

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

<400> 6
Arg Ala Asp Phe Val

1 5

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

<230>
<231> MOD_FES
<222> (5)
<223> D-Val

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

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

<400> 7
Arg Gly Asp Phe Val

1 5

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

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

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

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

<400> 8
Arg Ala Asp Phe Val

1 5

<310> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia



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

<230>
<231> LÁNC
<222> (1)..(6)
<223> ciklo

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

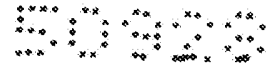
<400> 9
Ala Arg Gly Asp Phe Leu

1 5

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

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

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



<220>
 <223> Mesterséges szekvencia leírása: ciklo (GRGD/L)

<400> 10
 Gly Arg Gly Asp Phe Leu

1 5

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

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (4)⁻
 <223> D-Phe

<220>
 <221> MOD RES
 <222> (5)⁻
 <223> METILIZÉS, NMeVal

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

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

<400> 11
Arg Gly Asp Phe Val

1 5

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

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

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

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

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

<400> 13
Arg Gly Glu Phe Val

1 5

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

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

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

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

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

<400> 13
Arg Ala Asp Phe Val

1

5

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

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> FORMILÉZÉS, FMOC, Mtr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> OBut

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> D-Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

<223> METILÉZÉS, NMeVal, -ONa

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása: Alt Syn Start Prod

<400> 14

Arg Gly Asp Phe Val

1

5



<210> 15
<211> 5
<212> FRT
<213> Masterséges szekvencia

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

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

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

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

<220>
<223> Masterséges szekvencia leírás: Alt Syn Prod

<400> 15
Arg Gly Asp Phe Val

1

5

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

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

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

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

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

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

<400> 16
Arg Gly Asp Phe Val

1 5

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy $\alpha_v\beta_3$ antagonistá mint angiogenezis gátló szer, amelyet az RGD-tartalmú peptid, anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitest és anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest által alkotott csoportból választunk, és egy tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérje mint tumor-ellenes immunterápiás szer alkalmazása gyógyászati kompozíció előállítására tumor sejt kezelésére betegben, ahol az említett angiogenezis gátló szert és anti-tumor immunterápiás szert tumorsejt-burjánzást gátló mennyiségben adagoljuk a betegnek, ahol az említett tumorellenes antigén egy tumor antigénhez irányított antitestnek legalább az antigénkötő részletét tartalmazza.
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett angiogenezis gátló szert és az említett tumorellenes immunterápiás szert lényegében egyidejűleg vagy egymást követően adagoljuk mintegy 3 hét időintervallumon belül.
3. A 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett angiogenezis gátló szert az említett tumorellenes immunterápiás szer előtt adjuk be.
4. A 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett tumorellenes immunterápiás szert az említett angiogenezis gátló szer előtt adjuk be.
5. A 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett angiogenezis gátló szert és az említett tumorellenes immunterápiás szert akkor adjuk be,

- amikor a tumort vagy tumor áttételeket sebészeti úton eltávolítjuk az említett betegből az említett időintervallum alatt.
6. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett angiogenezis gátló szert és az említett tumorelleses immunterápiás szert azután adagoljuk, miután a tumort vagy tumor áttételeket sebészeti úton eltávolítottuk az említett betegből.
 7. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett angiogenezis gátló szert 10 mg és 1000 mg/testtömeg kg/nap közötti mennyiségben adagoljuk.
 8. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett tumorelleses immunterápiás szert 0,01 mg és 10 mg/testtömeg kg/nap közötti mennyiségben adagoljuk.
 9. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett tumorsejt neuroektodermális vagy epithelialis.
 10. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett tumorsejtet az adenóma, angioszarkóma, asztrocitóma, epithelialis karcinóma, germinóma, glioblasztóma, glióma, hamartóma, hemangioendotelióma, hemangioszarkóma, hematóma, hepatoblasztóma, leukémia, limfóma, medulloblasztóma, melanóma, neuroblasztóma, oszteoszarkóma, retinoblasztóma, rhabdomioszarkóma, szarkóma és teratóma által alkotott csoportból választjuk.
 11. Gyógyászati kompozíció tumor vagy tumor-áttételek kezelésére, amely tartalmaz legalább egy $\alpha_v\beta_3$ antagonistát mint angiogenezis gátló szert, amelyet az RGD-tartalmú peptid, anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális

antitest és anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest által alkotott csoportból választunk, és legalább egy tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérjét mint tumorellenes immunterápiás szert, ahol az említett tumorellenes antigén egy tumor antigénhez irányított antitestnek legalább az antigénkötő részletét tartalmazza.

12. A 11. igénypont szerinti gyógyászati kompozíció, ahol

- a) az említett legalább egy angiogenezis gátló szer a gyógyászati kompozícióban elegendő mennyiségben van jelen az angiogenezis gátlásához valamely tumorban vagy tumor áttételekben; és
- b) az említett legalább egy tumorellenes immunterápiás szer a gyógyászati kompozícióban elegendő mennyiségben van jelen citokin-specifikus biológiai válasz kiváltásához.

13. Készlet tumorsejt kezelésére tumorban vagy tumor-áttételekben, amely készlet csomagot tartalmaz, és ez a csomag tartalmaz:

- a) $\alpha_v\beta_3$ antagonistát mint angiogenezist gátló szert, amelyet az RGD-tartalmú peptid, anti- $\alpha_v\beta_3$ monoklonális antitest és anti- $\alpha_v\beta_3$ receptor monoklonális antitest által alkotott csoportból választunk, és amely képes angiogenezist gátlani az említett tumorban vagy az említett tumor áttételekben; és
- b) tumorellenes antigén/citokin fúziós fehérjét mint tumorellenes immunterápiás szert, ahol az említett tumorellenes antigén egy tumor antigénhez irányított antitestnek legalább az antigénkötő részét tartalmazza.

14. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, a 11. igénypont szerinti gyógyászati kompozíció, vagy a 13. igénypont szerinti készlet, ahol az

- említett RDG-tartalmú peptid olyan peptid, amelynek az aminosavmaradék szekvenciája ciklo(RGDfN-MeV) (SEQ ID NO: 11).
15. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, a 11. igénypont szerinti kompozíció vagy a 13. igénypont szerinti készlet, ahol az említett citokint az IL-2, IL-12 és az IL-15 által alkotott csoportból választjuk.
16. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, a 11. igénypont szerinti kompozíció vagy a 13. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorellenes immunterápiás szer tumorellenes antigénje immunglobulin (Ig) lánc, amely tartalmaz egy változó területet, amely a tumorra társult antigén célponthoz kötődik.
17. A 16. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett tumorra társult antigén célpontot az AFP, CA 125, CEA, CD19, CD20, CD44, CD45, EGF receptor, GD₂, GD₃, GM1, GM2, Her-2/Neu, Ep-CAM (KSA), IL-2 receptor, Lewis-Y, Lewis-X (CD 15), melanómával társult proteoglikán MCSP, PSA és a transferrin receptor által alkotott csoportból választjuk.
18. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, a 11. igénypont szerinti kompozíció vagy a 13. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorellenes immunterápiás szer valamely fúziós fehérje, amely IL-2 citokint és Ig nehéz láncot tartalmaz, amely immun-reagál a tumorra társult GD₂ antigénnel.
19. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, a 11. igénypont szerinti kompozíció vagy a 13. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumorellenes immunterápiás szer valamely fúziós fehérje, amely IL-2

citokint és Ig nehéz láncot tartalmaz, amely immun-reagál a tumorra társult KSA (Ep-CAM; KS1/4 antigén) antigénnel.

20. A 13. igénypont szerinti készlet, ahol az említett tumort vagy tumor áttételeket az adenóma, angioszarkóma, asztrocitóma, epiteliális karcinóma, germinóma, glioblasztóma, glióma, hamartóma, hemangioendotelióma, hemangioszarkóma, hematóma, hepatoblasztóma, leukémia, limfóma, medulloblasztóma, melanóma, neuroblasztóma, oszteoszarkóma, retinoblasztóma, rhabdomioszarkóma, szarkóma és a teratóma által alkotott csoportból választjuk.
21. A 13. igénypont szerinti készlet, ahol az említett angiogenezis gátló szert és a tumorelles immunterápiás szert külön tartályokban bocsátjuk rendelkezésre vagy egyetlen tartályban az említett csomagban.
22. A 16. igénypont szerinti alkalmazás, kompozíció vagy készlet, ahol az említett tumorra társult antigén célpont neuroektodermális vagy epiteliális tumorsejtéből való.
23. A 16. igénypont szerinti alkalmazás, kompozíció vagy készlet, ahol az említett tumorra társult antigén célpont olyan tumorsejtéből való, amelyet az adenóma, angioszarkóma, asztrocitóma, epiteliális karcinóma, germinóma, glioblasztóma, glióma, hamartóma, hemangioendotelióma, hemangioszarkóma, hematóma, hepatoblasztóma, leukémia, limfóma, medulloblasztóma, melanóma, neuroblasztóma, oszteoszarkóma, retinoblasztóma,

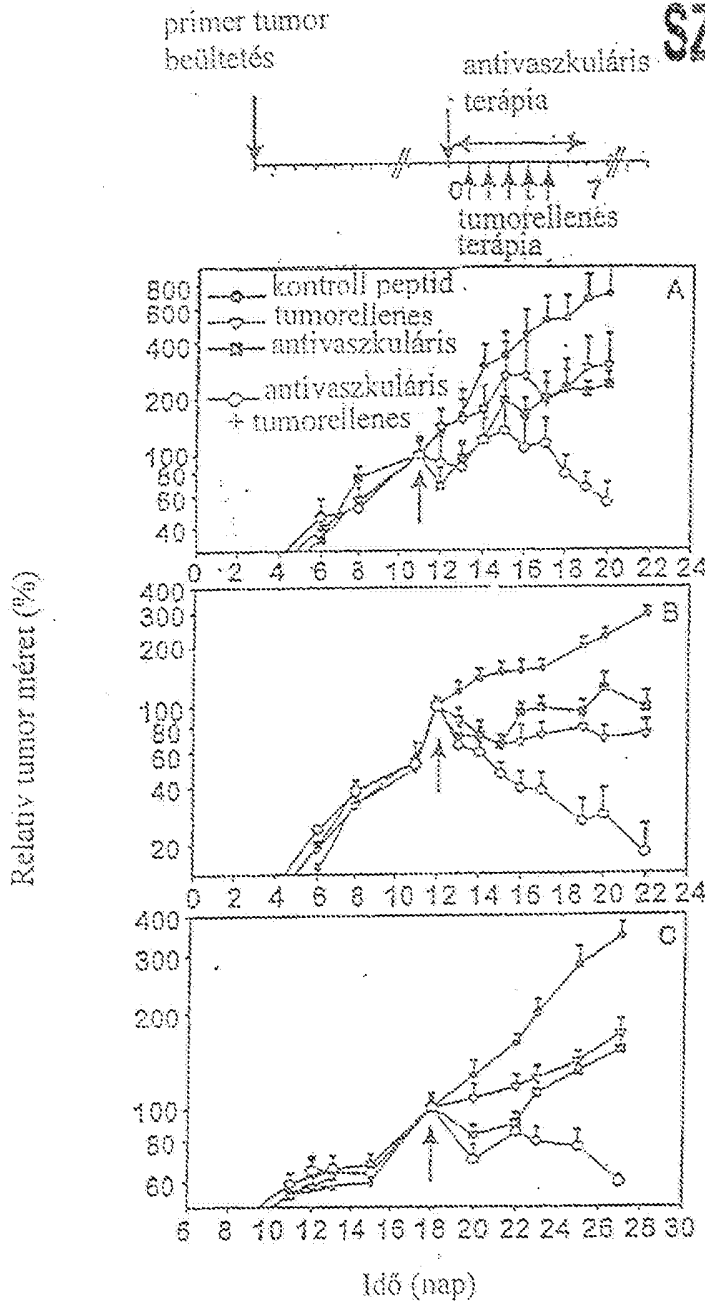
rabdomioszarkóma, szarkóma és a teratóma által alkotott csoportból választunk.

magyarul

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS PÉLDÉNYIRODA
KOVÁRIGYÓGY
1011 Budapest, 13. sz. 12.

P02 00128

MEGADÁS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

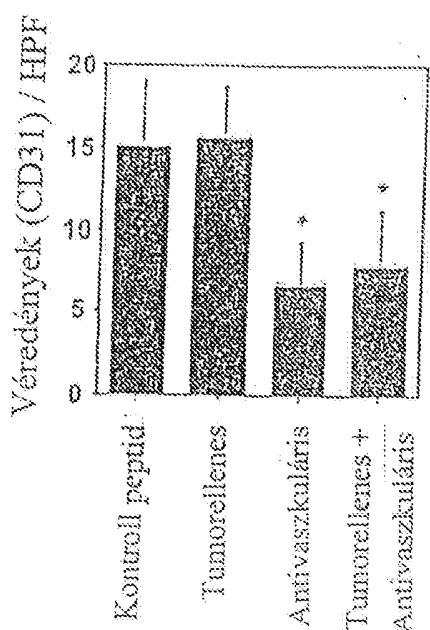


IA. ÁBRA

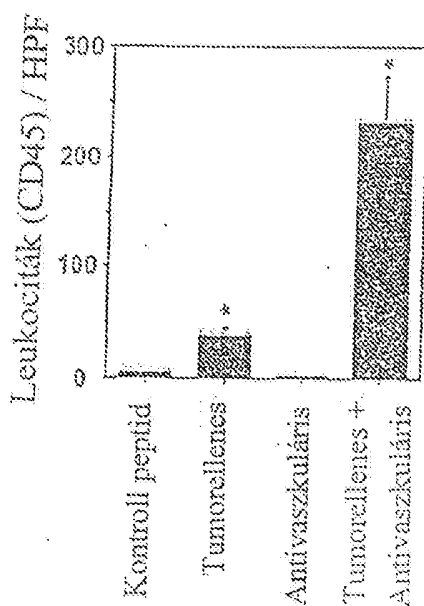
IB. ÁBRA

IC. ÁBRA

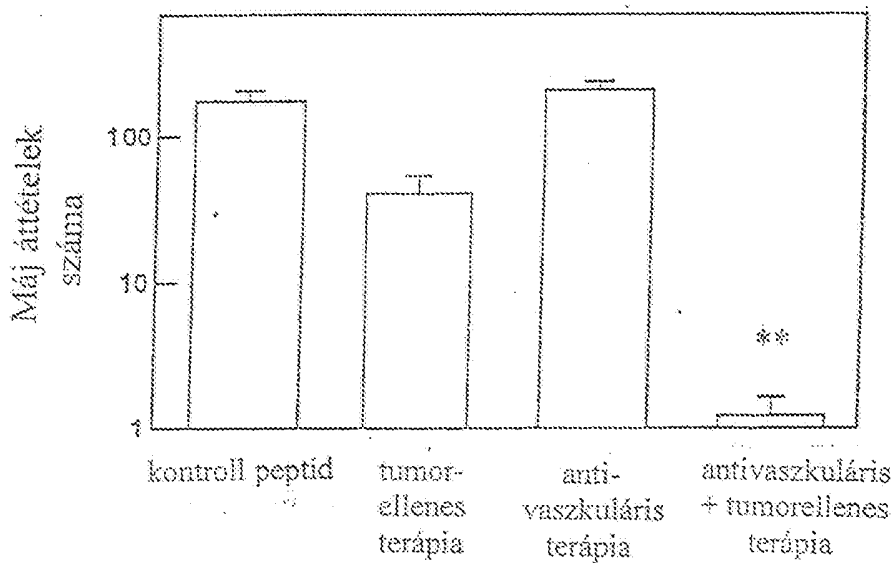
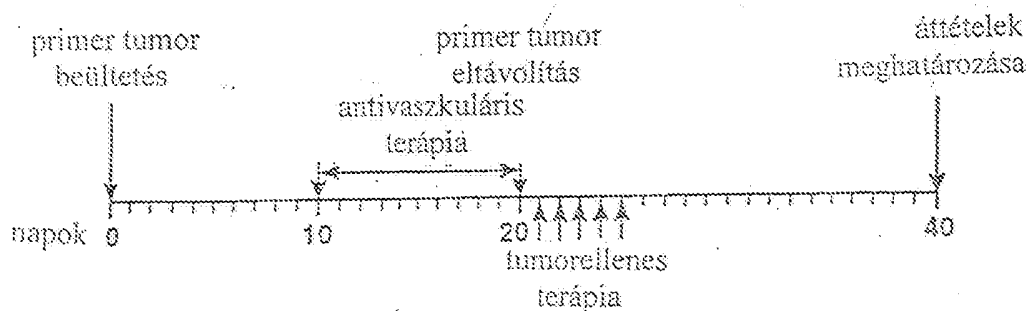
2A. ÁBRA

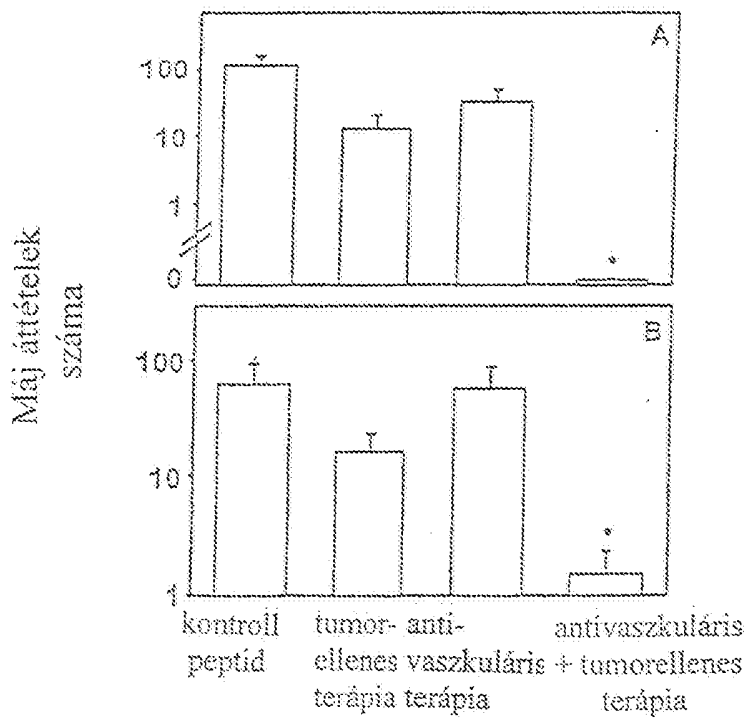
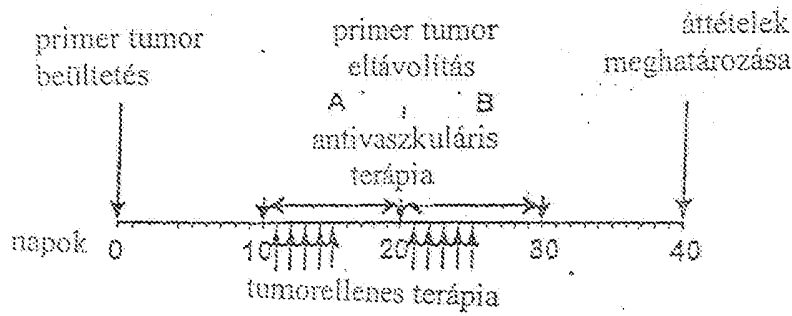


2B. ÁBRA



3. ÁBRA





4A. ÁBRA

4B. ÁBRA