



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

215 549 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 93 00928
(22) A bejelentés napja: 1992. 07. 31.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/738,633 1991. 07. 31. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 92/06523
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 93/02702

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 39/395
C 07 K 14/435
C 07 K 16/28
C 12 P 21/08

(40) A közzététel napja: 1995. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1999. 01. 28.

(72) Feltalálók:

Gundel, Robert H., Sandy Hook, Connecticut (US)
Letts, Lindsay Gordon, Newtown, Connecticut
(US)
Smith, C. Wayne, Sugarland, Texas (US)
Wegner, Craig D., New Milford, Connecticut (US)

(73) Szabadalmazók:

Baylor College of Medicine, Houston, Texas (US)
Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.,
Ridgefield, Connecticut (US)

(74) Képviselő:

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

(54) Eljárás asztma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás asztma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására, amely abban áll, hogy

- (a) egy ELAM-1-hez kötődni képes antitest,
- (b) egy (a) pont szerinti antitest ELAM-1-hez kötődni képes fragmense,
- (c) természetes szennyező anyagoktól lényegében mentes ELAM-1,
- (d) ELAM-1 valamely funkcionális származéka,
- (e) egy ELAM-1 receptorhoz kötődni képes antitest,

- (f) egy (e) pont szerinti antitest ELAM-1 receptorhoz kötődni képes fragmense,
- (g) egy, a természetes szennyező anyagoktól lényegében mentes ELAM-1 receptor, vagy
- (h) egy ELAM-1 receptor valamely funkcionális származékának terápiásan hatékony mennyiségét gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozó-, vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve, gyógyszerkészítménnyé alakítják.

A találmány tárgya eljárás asztma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására. A találmány szerint előállított gyógyszerkészítmények hatóanyagként

- (a) egy ELAM-1-hez kötődni képes antitestet,
- (b) egy (a) pont szerinti antitest ELAM-1-hez kötődni képes fragmensét,
- (c) ELAM-1-et, amely lényegében mentes a természetes szennyező anyagoktól,
- (d) ELAM-1 valamely funkcionális származékát,
- (e) egy ELAM-1 receptorhoz kötődni képes antitestet,
- (f) egy (e) pont szerinti antitest ELAM-1 receptorhoz kötődni képes fragmensét,
- (g) egy ELAM-1 receptort, amely lényegében mentes a természetes szennyező anyagoktól, vagy
- (h) egy ELAM-1 receptor valamely funkcionális származékát tartalmazza.

A találmány szerinti eljárás abban áll, hogy a fent megadott a–h hatóanyagok legalább egyikét terápiásan hatékony mennyiségben, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozó-, vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve, gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítményekben hatóanyagként előnyösen egy ELAM-1-hez kötődni képes antitestet, vagy ennek fragmensét, még előnyösebben egy ELAM-1 elleni monoklonális antitestet alkalmazunk.

Az ELAM-1 egy indukálható, endoteliális sejtfelületi glükoprotein. Az ELAM-1-et az endoteliális sejtek szintetizálják válaszul gyulladásra keltő kórokozók hatására, és az így módon keletkezett ELAM-1 elősegíti a neutrofil sejtek, a monociták és bizonyos limfocita-altípusok adhézióját. Az ELAM-1 elsődleges aminosav-szekvenciája egy olyan komplex domén struktúrára utal, amely tartalmaz egy lektinszerű aminoterminális részt, egy EGF-szerű domént és hat olyan konszenzus repeat szekvenciát (ismétlődő részt), amelyek hasonlóak a komplement szabályozó fehérjékben találhatóakhoz. Expressziója viszonylag korlátozott az aktivált ér-endotéliumban in vitro és in vivo körülmények között. Az ELAM-1 az adhéziós receptor glükoproteinek családjába tartozik, és fontos szerepe van az érrendszerben keringő sejtek interakciói (kölsönhatásai) során. Ezen családot szelektineknek vagy LEC-CAMS-nek szokták nevezni. Az egyéb szelektinek a LEC-CAM-1 és a CD62. [Springer és munkatársai, *Nature* 349 (17), 196 (1991) és Bevilacqua és munkatársai „Identification and Characterization of Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule-1” – „Az endoteliális-leukocita adhéziós molekula (ELAM-1) azonosítása és jellemzése”; „Leukocyte Adhesion Molecules”, Chapter 16 (Leukocita adhéziós molekulák, 16. fejezet); T. A. Springer, D. C. Anderson, A. S. Rosenthal és R. Rothlein, Eds. (Springer-Verlag New York Inc., 1990.).]

Az asztma egy heterogén betegségszámot jelent. Jellemzősége a légcső és a hörgők fokozott reakciókészsége (túlérzékenysége) ingerek hatására. [McFadden, E. R. et al. In: „Harrison's Principles of Internal Medicine”, 10th Ed.; Petersdorf, R. G. et al., Eds., McGraw-Hill, N.Y., 1512–1519, 1983; Kay, A. B.

„Allergy and Inflammation” Academic Press, N.Y., 1987; az említett referenciákat hivatkozásként közöljük.] Klinikai értelemben az asztma az alábbiakban nyilvánul meg: a légcső és a hörgők nagyfokú beszűkülése, sűrű, tapadós váladék képződése, nehéz légzéssel, köhögéssel és ziháló asztmás légzéssel járó rohamok jelentkezése. Bár pontosan nem tudjuk, hogy a fent említett tünetek milyen arányban járulnak hozzá a betegség kialakulásához, végül azonban mindig fokozódik a légutak ellenállása, a tüdő és a mellkas kitágul, kóros a légcsere megoszlása és a tüdő vérátáramlása. A betegség olyan, akut tünetekkel járó periódusok formájában jelentkezik, amelyeket tünetmentes időszakok választanak el egymástól. Az akut periódusokban kialakuló hipoxia bizonyos esetekben akár végzetes kimenetelű is lehet. A világ teljes népességének körülbelül 3%-a szenved ebben a betegségben.

Az asztma két típusát különböztetjük meg: az allergiás eredetű asztmát és az idioszinkráziás eredetű asztmát. Az allergiás asztma általában valamilyen öröklődő allergiás jellegű megbetegedéshez, például (széna) náthához, csalánkiütéshez, ekcémához stb. csatlakozik. Ezt az állapotot a levegő által szállított antigének (például virágpor, környezetből származó vagy a foglalkozással összefüggő szennyező anyagok stb.) bőrbe adott injekcióira kialakuló, pozitív, göbös jellegű bőrreakció jellemzi, emellett pedig a szérum IgE-szintjének emelkedett értékei figyelhetők meg. Az allergiás asztma kialakulása sok beteg esetében ok-okozati összefüggésben állnak a tüdő és az IgE-antitestek jelenlétével. Azon asztmás betegek, akiknél a fent ismertetett jellegzetességek hiányoznak, idioszinkráziás asztmában szenvedőnek tekinthetők.

A tudomány mai állása szerint az allergiás jellegű asztma egy olyan IgE-válaszreakció függvénye, melyet a T- és B-limfociták szabályoznak, és amelynek aktiválása oly módon jön létre, hogy a levegő által szállított antigén kölcsönhatásba lép a sejthez kötött, már előzetesen létrejött IgE-molekulákkal. Az antigénnel való találkozásnak olyan koncentrációban kell történnie, amely eléggé magas ahhoz, hogy hosszabb időn keresztül biztosítsa az IgE-termelődését, és ez által érzékennyé tegye az adott egyént az antigénnel szemben. Amikor az asztmás beteg érzékennyé vált, már rendkívül alacsony antigénszintek is kiválthatnak válaszreakcióképpen klinikai tüneteket.

Az asztmás tüneteket a kiváltó antigén jelenléte és szintje, környezeti és foglalkozással összefüggő tényezők, fizikai erőfeszítés és érzelmi stresszhatások is kiválthatják.

A találmány célja asztmában szenvedő betegek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítása.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy az ELAM-1 adhéziós molekula lényegesen hozzájárul az antigén által kiváltott (indukált) légúti gyulladás kifejlődéséhez. Az ELAM-1 egy olyan, az endoteliális sejtek felületén megjelenő molekula, amely a leukocitáknak az endoteliális sejtekhez történő adhézióját közvetíti [lásd Bevilacqua et al., *Science* 243, 1160–1165 (1989); a találmány leírásához hivatkozásként szolgál].

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy mindazok a molekulák, amelyek megakadályozzák, illetve gátolják a neutrofil sejtek beáramlását, illetve kötődését az érepitegium ELAM-1 receptoraihoz, sikeresen alkalmazhatók az asztma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények hatóanyagaiként.

A fentiek alapján a találmány tárgya eljárás asztma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására, amely abban áll, hogy hatóanyagként

- a egy ELAM-1-hez kötődni képes antitest,
- b egy a pont szerinti antitest ELAM-1-hez kötődni képes fragmense,
- c természetes szennyező anyagoktól lényegében mentes ELAM-1,
- d ELAM-1 valamely funkcionális származéka,
- e egy ELAM-1 receptorhoz kötődni képes antitest,
- f egy e pont szerinti antitest ELAM-1 receptorhoz kötődni képes fragmense,
- g egy, a természetes szennyező anyagoktól lényegében mentes ELAM-1 receptor, vagy
- h egy ELAM-1 receptor valamely funkcionális származékának terápiásan hatékony mennyiségét, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozó-, vívó és/vagy segédanyagokkal összekeverve, gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

A leírásban az „asztma” kifejezést mind az allergiás, mind pedig az idioszinkráziás asztma esetében használjuk. Egy hatóanyag terápiásan hatékony mennyisége alatt azt értjük, hogy csökkenteni (azaz gyengíteni) képes az asztmás tünetek súlyosságát, mértékét, illetve tartamát.

Az „ELAM-1 receptor” kifejezést a találmányi leírásban olyan molekulára alkalmazzuk, amely a leukociták felületén jelenik meg és az ELAM-1-hez kötődik, továbbá részt vesz az ELAM-1 által közvetített (mediált) kötődésben az endoteliális sejtekhez. Ide tartoznak az ELAM-1 szénhidrátligandjai.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítményekben alkalmazhatjuk az ELAM-1-et és annak funkcionális származékait. Mivel az ELAM-1 közvetítésével történik a neutrofil sejtek adhéziója az érepitegiumhoz oly módon, hogy az ELAM-1 a neutrofil sejt felületén elhelyezkedő receptor molekulához kötődik, az ELAM-1 funkcionális származékai – melyek képesek a neutrofil sejteken lévő ELAM-1 receptorhoz való kötődésre – vetélkedni fognak a receptorokért az ELAM-1-gyel a tüdő endoteliális sejtjein, ily módon gyengítve a neutrofil sejtek adhézióját, és biztosítva ezáltal az asztma kezelését.

Az ELAM-1 „funkcionális származéka” kifejezés olyan vegyületet jelent, melynek biológiai (funkcionális vagy strukturális) aktivitása lényegében megegyezik az ELAM-1 biológiai aktivitásával. A „funkcionális származék” kifejezésbe beleértendők az alpmolekula „fragmensei”, „variánsai”, illetve „kémiai származékai”. Valamely molekula – például ELAM-1 – „fragmense” a molekula valamely polipeptid, illetve szénhidrát jellegű alegységét jelenti. Különösen előnyösek az ELAM-1 aktivitással rendelkező, illetve az oldható (azaz nem membránhoz kötött) ELAM-1 fragmensek.

Valamely molekula – például ELAM-1 – „variánsa” azt jelenti, hogy a szóban forgó (variáns) molekula lényegében azonos szerkezetű és funkciója a teljes molekulával, vagy annak valamely fragmensével. Egy molekulát akkor nevezünk „lényegében azonosnak” egy másik molekulával, ha mindkét molekula lényegében azonos szerkezetű, illetve ha mindkét molekula hasonló biológiai aktivitású. Valamely molekuláról akkor mondjuk, hogy egy másik molekula „kémiai származéka”, ha tartalmaz olyan kiegészítő kémiai részeket is, melyek normálisan nem részei a molekulának. Az ilyenfajta részek javíthatják a molekula oldékonyságát, felszívódását, biológiai felezési idejét stb.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítményekben alkalmazhatjuk az ELAM-1 receptorokat, illetve azok funkcionális származékait is. Az ilyen molekulák és funkcionális származékaik oly módon hatnak, hogy képesek az endoteliális sejteken az ELAM-1-hez kötődni, és ily módon gátolni ezeknek a sejteknek azt a képességét, hogy közvetítsék a leukociták kötődését és adhézióját. A találmány szempontjából különösen előnyösek az olyan funkcionális ELAM-1 receptorszármazékok, amelyek oldható molekulák. Az ELAM-1 receptorokra példaként megemlíthetjük az ELAM-1 szénhidrátligandjait a neutrofil sejteken, például a szialsavval acilezett laktozil-ceramidokat [lásd például Tiemeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1138 (1991)], vagy pedig a szialil-Lewis X antigént hordozó glükolipideket vagy glükoproteineket [lásd például Lowe et al., Cell 63, 475 (1990)].

Az ELAM-1 és ELAM-1 receptorok immunogén molekulák. Ily módon lehetséges olyan antitestek előállítása, melyek kötődni képesek az ELAM-1-hez, illetve valamely ELAM-1 receptorhoz. Az ilyenfajta antitestek és biológiailag aktív fragmenseik is felhasználhatók a találmány értelmében az asztma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

Ilyen antitesteket úgy állíthatunk elő, ha a tisztított molekulákat (vagy olyan sejteket, melyek természetes körülmények között kifejezik ezeket a molekulákat) egy megfelelő állatba beviszük, például intraperitoneális injekció stb. formájában. Szükség esetén az említett állattól szérumot nyerhetünk, és az ilyenfajta molekulák megkötésére képes poliklonális antitestek forrásaként használhatjuk. Előnyös esetben azonban ezekből az állatokból szplenocitákat (lépsejteket) távolítunk el, melyeket ezután egy mielóma-sejtvonallal fuzionáltatunk, miáltal lehetővé tesszük, hogy az ilyenfajta fúziós sejtek olyan hibridómasejtet hozzanak létre, melyek az ELAM-1 megkötésére képes monoklonális antitesteket szekretálnak.

A fent ismertetett módon kapott hibridómasejteket a szintén fent ismertetett módon szűrhetjük olyan kívánt hibridómasejt azonosítása céljából, amelyek az ELAM-1-hez vagy az ELAM-1 receptorhoz kötődni képes antitestet szekretálnak.

Mivel az ilyenfajta antitesteknek megvan az a képességük, hogy az ELAM-1-hez vagy egy ELAM-1 receptorhoz kötődjenek, ezek [valamint azon fragmenseik, melyeknek antigénkötő képességük van, mint például a

Fab, F(ab)₂, stb.] a neutrofil sejtek adhéziónak gyengítésére használhatók, ily módon további példát adva a találmány értelmében az asztma kezelésére felhasználható gyógyszerkészítményekre.

A találmány értelmében mind a poliklonális, mind a monoklonális antitestek felhasználhatók. A találmány szempontjából különösen előnyösek az ELAM-1 antitestek, melyek az emberi szervezetben termelődnek, vagy rekombináns, illetve egyéb eljárásokkal „humanizálják” őket (azaz az ember számára nemimmunogénné teszik). Humanizált antitestek állíthatók elő például oly módon, hogy valamely antitest immunogén részét egy megfelelő, de nemimmunogén résszel (azaz kiméra antitestekkel) helyettesítjük [Taniguchi M., 171 496 számú európai közrebocsátási irat; Morrison S. L. és munkatársai, 173 494 számú európai közrebocsátási irat; Neuberger és munkatársai, WO 86/01533 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés; Cabilly és munkatársai, 125 023 számú európai közrebocsátási irat; Better és munkatársai, *Science* 240, 1041 (1988); Liu és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3439 (1987); Sun és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 214 (1987); Nishumara és munkatársai, *Canc. Res.* 47, 999 (1987); Wood és munkatársai, *Nature* 314, 446 (1985); Shaw és munkatársai, *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1553 (1988)].

A „humanizált” kiméra antitestekkel kapcsolatban átfogó tanulmányt készített Morrison, S. [*Science* 229, 1202 (1985)] és Oi és munkatársai [*BioTechniques* 4, 214 (1986)].

Szintén előnyös „humanizált” antitestek állíthatók elő CDR-, illetve CEA-szubsztitúcióval [Jones et al., *Nature* 321, 552 (1986); Verhoeyan et al., *Science* 239, 1534 (1988); Beidler et al., *J. Immunol.* 141, 4053 (1988)].

A találmány szerint előállított, asztmaellenes gyógyszerkészítmények hatóanyagai előállíthatók természetes eljárásokkal (például valamilyen állatban, növényben, gombában, baktériumban stb. nemimmunglobulin ELAM-1 antagonisták termelését indukálva, vagy pedig valamely állatban ELAM-1-hez kötődni képes poliklonális antitestek termelését indukálva); szintetikus eljárásokkal [például a Merrifield-féle módszer ELAM-1, funkcionális ELAM-1 származékok, illetve (immunglobulin vagy nemimmunglobulin jellegű) ELAM-1 protein antagonisták szintetizálására képes polipeptidek szintézisére való alkalmazásával]; hibridomatechnológiával (azaz például ELAM-1-hez kötődni képes monoklonális antitestek előállítására); rekombináns technológiával [például a találmány szerinti asztmaellenes szerek különböző gazdaszervezetekben (például élesztőgombában, baktériumokban, gombákban, tenyésztett emlőssejtekben, stb.), illetve rekombináns plazmidokban, illetve vírusvektorokban való termelésével]; vagy pedig proteolízis révén. Az alkalmazott eljárás kiválasztása olyan tényezők függvénye, mint a kényelmes alkalmazhatóság, az elérni kívánt teljesítmény stb. Nem feltétlenül szükséges a fent ismertetett módszerek, eljárások, illetve technológiák közül csupán egyet alkalmazni egy adott asztmaellenes

hatóanyag előállítása céljából – a fent ismertetett eljárásokat, módszereket és technológiákat kombinálhatjuk is valamely meghatározott asztmaellenes hatóanyag előállítása érdekében.

5 Az ELAM-1 funkcionális származékai – melyek legfeljebb körülbelül 100 aminosavmaradékot tartalmaznak – előnyösen állíthatók elő in vitro körülmények között végzett szintézis során. Szükség esetén az ilyenfajta fragmenseket úgy módosíthatjuk, hogy a tisztított vagy nyers fehérje meghatározott aminosavgyökeket egy olyan szerves származékképző (derivatizáló) szerrel reagáltatjuk, amely képes arra, hogy meghatározott oldalláncokkal, illetve végcsoportokkal reagáljon. Az ily módon létrejött kovalens származékok felhasználhatók a biológiai aktivitás szempontjából fontos csoportok azonosítására.

A találmány szerint előállított asztmaellenes gyógyszerkészítményeket a betegnek valamilyen előnyös módszerrel, például intravénásan, intramuszkulárisan, szubkután módon, enterálisan, illetve parenterálisan adhatjuk be. A beadás előnyös esetben történhet intranazálisan (orron keresztül), például nazális spray, tampon stb. formájában is. Különösen előnyösnek tekinthető a találmány szerinti gyógyszerkészítmények szájon át történő inhalálása, illetve orális spray vagy orális aeroszol formájában való alkalmazása. Amennyiben a találmány szerinti gyógyszerkészítményt injekció formájában alkalmazzuk, ez történhet folyamatos infúzió, vagy pedig egyszeri vagy többszörös boluszinjekció formájában.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítmények terápiás hatását oly módon is fokozhatjuk, ha olyan funkciós származékokat alkalmazunk, amelyek további aminosavgyököket is tartalmaznak annak érdekében, hogy fokozzák a vívíányaghoz való kapcsolódást, illetve az adott szer aktivitását. A találmány oltalmi körébe tartozik továbbá az is, hogy olyan funkcionális ELAM-1 származékokat alkalmazzunk, amelyek nem tartalmaznak bizonyos aminosavgyököket, illetve amelyek megváltoztatott aminosavgyököket tartalmaznak, amennyiben az ilyenfajta származékoknak megvan az a képességük, hogy befolyásolják a celluláris adhéziót.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményekben alkalmazott antitestek, az ELAM-1 molekula és az ELAM-1 receptorok „lényegében mentesek a természetes szennyező anyagoktól” abban az esetben, ha azok a készítmények, amelyek ezen anyagokat tartalmaznak, lényegében mentesek azon anyagoktól, melyek normális és természetes esetekben ezen termékekben megtalálhatók.

Amikor a találmány szerint előállított asztmaellenes gyógyszerkészítményt a kezelésre szoruló betegnek adagoljuk, az alkalmazott készítmény dózisa számos tényező függvénye, ilyen tényezők a következők: a beteg életkora, testsúlya, magassága, neme, általános egészségi állapota, előzetes kórtörténete, stb.. Általában az tűnik előnyösnek, ha a betegnek körülbelül 1 pg/kg és 10 mg/kg (testtömeg-kilogrammonkénti) dózistartományba eső hatóanyag-mennyiséget adunk

be alkalmanként, bár a fent említettél alacsonyabb, illetve annál magasabb dózis is alkalmazható. A hatóanyag terápiásan hatékony adagja csökkenthető oly módon, ha a fent ismertetett hatóanyagok valamilyen kombinációját alkalmazzuk. A találmány értelmében egy vegyületről akkor mondjuk, hogy egy másik vegyülethez társítva adagoljuk, ha a fenti két vegyület alkalmazása időben annyira közel esik egymáshoz, hogy mindkét hatóanyag egyidejűleg kimutatható a beteg szérumában.

A találmány szerint előállított, az asztma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítményeket olyan mennyiségben kell a kezelésre szoruló betegnek adagolni, hogy az elegendően nagy legyen ahhoz, hogy csökkenteni, illetve gyengíteni tudja az asztmás tünetek súlyosságát, mértékét és tartamát.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítmények adagolhatók önmagukban, vagy pedig egy vagy több további asztmaellenes szerrel (például metilxantinokkal, például teofilinnel), béta-adrenerg agonista szerekkel (például katekolaminokkal, rezorcínolokkal, szaligeninokkal vagy efedrinnel), glükokortikoidokkal (például hidrokortizonnal), kromonokkal (például kromolin-nátriummal), illetve antikolinerg szerekkel (például atropinnal) kombinálva, annak érdekében, hogy ezáltal csökkenthető legyen az asztma tüneteinek kezeléséhez szükséges hatóanyag-mennyiség.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítményeket alkalmazhatjuk „profilaktikus” (megelőzést szolgáló) vagy „terápiás” célból. Amennyiben profilaktikus célból alkalmazzuk ezeket, alkalmazásukra még az asztmás tünetek fellépése előtt kerülhet sor. A profilaktikus alkalmazás az asztmás válaszreakciók fellépésének megakadályozására, illetve gyengítésére szolgál. Terápiás alkalmazás esetén a készítményeket az asztmás tünetek fellépésekor (vagy röviddel azt követően) alkalmazzuk. A találmány szerinti szerek terápiás alkalmazása az aktuális asztmás roham tüneteinek enyhítésére szolgál. A találmány szerinti szereket tehát vagy a feltételezett asztmás epizód fellépését megelőzően (az epizód feltételezett súlyosságának, tartamának és mértékének enyhítésére), vagy pedig a roham kezdete után alkalmazzuk.

Valamely gyógyszerkészítményt akkor nevezünk „gyógyszerészeti szempontból elfogadhatónak”, ha adagolását a kezelt személy jól tolerálja. A találmány szerinti szereket akkor adjuk „terápiásan hatékony mennyiségben”, ha a beadott mennyiség fiziológiás szempontból szignifikáns. Valamely szer akkor tekinthető fiziológiás szempontból szignifikáns hatásúnak, ha jelenléte kimutatható változást hoz létre a kezelt beteg fiziológiai paramétereiben.

A találmány szerinti szerek ismert eljárásokkal alakíthatók gyógyszerkészítményekké, mely eljárások során ezeket az anyagokat, illetve funkcionális származékaikat valamely gyógyszerészeti szempontból elfogadható vivőanyaggal keverjük össze, vagy kombináljuk. Előnyös vivőanyagokat és formázásukat, beleértve egyéb humán proteinek, például a humán szérumalbumint is, ismertet például az alábbi irodalmi hivatkozás:

„Remington's Pharmaceutical Sciences”, 16th ed., Osol, A., Ed., Mack, Easton PA, 1980. Annak érdekében, hogy hatékonyan alkalmazható, előnyös, gyógyszerészeti szempontból elfogadható gyógyszerkészítményeket hozzunk létre, az ilyenfajta készítményeknek hatékony mennyiségű anti-ELAM-1 antitestet vagy ELAM-1 molekulát, vagy pedig ezek funkcionális származékait kell tartalmazniuk, megfelelő mennyiségű vivőanyaggal együtt.

További gyógyszerészeti eljárások alkalmazhatók a hatástartam szabályozása céljából. Szabályozott hatóanyag-leadású készítmények állíthatók elő valamilyen polimer felhasználásával, amely komplexet alkot, vagy abszorbeálja az anti-ELAM-1 antitestet vagy az ELAM-1-et, vagy ezek funkcionális származékait. A szabályozott hatóanyag-leadás oly módon biztosítható, hogy megfelelően választjuk meg a makromolekulát (például poliészter, poliaminosavak, polivinil-pirrolidon, etilén-vinil-acetát, metil-cellulóz, karboxi-metil-cellulóz, illetve protamin-szulfát) és koncentrációjukat, valamint a szabályozott hatóanyagleadás biztosítása céljából alkalmazott inkorporációs módszereket. További előnyös lehetőség a hatástartam szabályozására a szabályozott hatóanyag-leadású készítmények esetében az anti-ELAM-1 antitestek, illetve ELAM-1 molekulák, vagy ezek funkcionális származékainak inkorporálása valamely polimer anyag részecskéibe, amilyenek például a poliészterek, a poliaminosavak, a hidrogélek, a poli(tejsav) vagy az etilén-vinil-acetát kopolimerek. Más esetben ezen szereknek polimer részecskébe történő inkorporációja helyett az is lehetséges, hogy ezeket az anyagokat olyan mikrokapszulákba helyezzük, amelyeket például koacervációs eljárásokkal vagy határfelületi polimerizációval állítunk elő; ilyenek lehetnek például a (hidroximetil)-cellulóz vagy a zselatin mikrokapszulák, illetve a poli(metil-metakrilát) -mikrokapszulák; az anyagok más esetben kolloidális hatóanyagleadási rendszerekbe is bevihetők, például liposzómákba, albuminmikrogömbökbe, mikroemulziókba, nano-részecskébe és nanokapszulákba vagy makroemulziókba. Ilyen eljárásokat közöl a „Remington's Pharmaceutical Sciences” (1980).

Az alábbiakban ismertetjük az ábrákat:

Az 1. ábra a légutak sejtösszetételét mutatja be a belélegzett antigénnel való találkozás előtt, és azt követően, különböző időpontokban. Az antigénnel való találkozás előtt nagy számban fordultak elő eozinofil sejtek, a találkozás után ez a szám lecsökkent, majd már az első napon visszatért az antigénhatást megelőző szintre, és a 7. illetve 14. napon is magas maradt. Erőteljes neutrofil-beáramlás volt megfigyelhető a késői fázisban jelentkező hörgőszűkülettel egyidőben.

A 2. ábra immun-hisztokémiai festést mutat be a) normális egérszérummal; b) ICAM-1 antitesttel; c) ELAM-1 antitesttel; olyan tüdőszövet esetében, melyet 6 órával az antitest hatását követően végzett biopsziával nyertünk. ICAM-1 festődés mind a légutak epitéliumában, mind pedig az erek endotéliumában megfigyelhető volt. Ezzel szemben az ELAM-1 festődés csak a légutak ereinek endotéliumában volt nyilvánvaló.

A 3. ábra az összes leukocita A és neutrofil B sejt visszanyerését mutatja be kontroll (vivőanyaggal kezelt) és anti-ELAM-1-gyel (CL2) kezelt állatokban. A CL2 (2 mg/kg i.v. dózisban) szignifikánsan csökkentette az antigén inhalációját követően 6 óra múlva a tüdőbe jutó összes leukocita, valamint a neutrofil sejtek számát.

A 4. ábra az anti-ELAM-1 (CL2) kezelés hatását szemlélteti az azonnali, illetve a késői fázisban megjelenő válaszreakciókra. A CL2 szignifikánsan csökkentette a késői fázis-válaszreakciót, nem gyakorolt azonban észrevehető hatást az antigénnel való találkozást követően azonnal fellépő légúti elzáródásra.

A találmányt, az általános ismertetést követően, az alábbi példák segítségével tesszük még könnyebben érthetővé. E példák célja a szemléltetés, és nem korlátozzák a találmány oltalmi körét, hacsak erre külön nem utalunk.

Az alábbi példában két vaszkuláris adhézions molekula, az ELAM-1 és összehasonlításként az ICAM-1 szerepét ismertetjük antigén által indukált akut légúti gyulladás és a késői fázisban fellépő légúti elzáródás kifejlődésében, főemlősök esetében.

1. példa

A. Anyagok és módszerek

Állatok: A vizsgálatban felhasznált állatok eredetileg vadon élt, felnőtt, hím cynomolgus majmok (*Macaca fascicularis*) voltak, melyek testtömege körülbelül 4–8 kg (Charles River Breeding Laboratories, Inc. Primate Imports, Port Washington, N.Y.). Minden egyes állat külön-külön került elhelyezésre egy-egy speciálisan tervezett, hálós ketrecben, és az állatok naponta kétszer kaptak élelmet, vizet azonban szabadon fogyaszthattak.

Vizsgálati terv: Minden állatot érzéstelenítettünk ketamin (4 mg/kg; Ketaset, Myoderm Medical Supply, Norristown, PA) és xilazin (1 mg/kg; Rompun, Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL) intramuszkuláris injekcióval, majd intubáltuk őket egy mandzsettás endotracheális (légcsőbe helyezett) cső segítségével, majd hanyatt fekvő helyzetbe hoztuk őket. Szükség esetén ketamint (4 mg/kg i.m.) használtunk kiegészítő érzéstelenítés céljából. Ezt követően valamennyi állatnak monoklonális antitestet vagy vivőanyagot/oldószert (sóoldatot) tartalmazó, intravénás boluszinjekciót adtunk. Ezután a légutak sejtjeinek összetételét vizsgáltuk oly módon, hogy bronchoalveoláris mosást (BAL-bronchoalveolar lavage) végeztünk, gyermekgyógyászatban használt száloptikás bronchoszkóp segítségével, majd ezt követően az állatokat – speciálisan tervezett tartó szék alkalmazásával – függőleges helyzetbe ültettük fel. A légzőrendszeri ellenállás (Rrs – respiratory system resistance) alapértékét körülbelül 15 percig regisztráltuk, majd antigén inhalálására került sor (1 órával az intravénás kezelés után – lásd antigéninhalációs vizsgálat). Az Rrs-t folyamatosan regisztráltuk 1 órával azutánig, hogy az állatok magukhoz tértek az érzéstelenítésből, és visszakerültek ketreceikbe. Az antigén belégzése után 4, 6, 8 és 10 órával 15 perces periódusok

folyamán regisztráltuk az Rrs-t a késői fázis válaszreakciójának vizsgálata céljából. A tüdőbe történő sejtbeáramlást a késői fázis alatt BAL-végzésével vizsgáltuk (az antigén alkalmazása előtt az ellentétes oldali tüdő átmosására került sor).

A vizsgálatot oly módon végeztük, hogy minden egyes állat esetében kapcsolt kontrollkísérleteket (vivőanyaggal végzett kezelés) végeztünk oly módon, hogy minden egyes állat saját maga kontrolljául szolgált. Az egyes vizsgálatokat 14 napos időközönként végeztük.

Monoklonális CL2 antitest: Az ELAM-1-gyel (CL2) szembeni antitestek létrehozása a Picker és munkatársai által leírtak szerint történt [Nature 349, 796 (1991)]. A CL2 törzsoldatokat (2 mg/ml végső koncentrációjú) sóoldattal hígítottuk, közvetlenül azt megelőzően, hogy intravénás injekciót adtunk be a perifériás lábvenába. A CL2 kezelést 1 órával az antigéninhaláció előtt alkalmaztuk.

Rrs-mérések: A légzőrendszer ellenállását (Rrs) meghatározott frekvenciájú (4–40 Hz 11 azonos logaritmikus lépésben), szinuszos csillapítatlan rezgések segítségével határoztuk meg, melyeket a Wagner és munkatársai által leírt módszer alapján [Respir. Physiol. 55, 47 (1984)] a normál ki- és belégzésre vittünk rá. Az Rrs valóságos vagy azonos fázisú komponensének a teljes frekvenciatartományban számolt átlagértékét határoztuk meg, és ezáltal az Rrs-t egyetlen értékkel jellemezzük.

Bronchoalveoláris átmosás (BAL): A BAL-t oly módon határoztuk meg, hogy egy száloptikás bronchoszkópot (Olympus Optical, model 3C-10, Lake Success, N.Y.) az 5–7. generációs bronchusokba vezetünk be. Ezután 15 ml-nyi hidrokarbonáttal pufferolt sóoldatot (pH=7,4; 23 °C) infundáltunk az állatoknak, és egy csövön keresztül óvatosan vizsgálati mintákat aspiráltunk (szívtunk be) a bronchoszkópba. Az ily módon nyert mintákat 2000 fordulat/perc fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk, majd az így kapott sejtüledéket Ca^{++} - és Mg^{++} -mentes Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldatban reszuszpendáltuk. Korábban azt tapasztaltuk, hogy a BAL-eljárás enyhe gyulladásos válaszreakciót vált ki. Ezért – annak érdekében, hogy elkerüljük a BAL esetleges hatásait a tüdő sejtösszetételére – felváltva a jobb és a bal tüdőfélben végeztük el a BAL-eljárást az antigénnel való találkozás előtt, illetve utána. A vizsgálat folyamán rendkívül állandónak bizonyult az infundált puffer visszanyert mennyisége, és az eljárást az állatok jól tolerálták. A teljes fehérvérsejtszám meghatározása Coulter-féle számláló berendezéssel történt (Coulter Electronics, model No. 10, Hialeah, FL).

Antigéninhalációs vizsgálat: Az antigéninhalációs vizsgálatokat oly módon végeztük, hogy intermittáló pozitív nyomású légzést hoztunk létre egy lélegeztető készülék (Bird Mard 7A) és egy mikroporlasztó berendezés (Bird Corporation, model No. 8158) segítségével. Az antigénnel való minden egyes találkozáskor 2 percen keresztül percnként 15 légvétel történt [a maximális belégzési nyomás 2 kPa (=20 vízoszlop-cm) volt]. Ezt követően „Ascaris summ” kivonatot (Greer Laboratories, Lenoir, NC) megfelelő koncentrációjúra hígítottunk foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS,

pH=7,4; minden, az egyes állatok számára szükséges dózisnak 200–500%-os növekedést kellett előidéznie az Rrs-ben az azonnali válaszreakció folyamán). Az antigénnel való találkozás minden esetben 14 naponként történt. A vizsgálat előtti napon valamennyi állat 18 órán keresztül éhezett.

Hisztokémia: a BAL-sejtek vizsgálata Diff-Quick festékekkel (Fischer Scientific, St. Louis, MO) megfestett, centrifugált sejtpreparátumokban történt. A minőségi vérképet 200 sejt megszámlálása után határoztuk meg, és feljegyeztük az egyes sejttípusok százalékos arányát.

Hisztológia (szövettan): Tüdőbiopsziás mintákat vettünk az antigénnel való találkozást megelőzően, valamint a késői fázis-válaszreakció csúcspontján biopsziás fogó és száloptikás bronchoszkóp segítségével. Az ELAM-1-nek a tüdő érendotéliumában és a légutak epitéliumában történő azonosítása céljából immunohisztokémiai festést végeztünk a Wegner és munkatársai által leírt módszernek megfelelően [Science 247, 456 (1990)].

Statisztikai analízis: Az adatok statisztikai elemzése kétszemponyos, varianciaanalízissel és Friedman-féle teszttel (Friedman's multiple range test) történt.

B. Eredmények

Az első vizsgálatsorozatban a tüdő sejtösszetételének vizsgálata BAL segítségével történt, egyetlen, antigénnel való találkozás előtt, és különböző időpontokban azt követően (1. ábra). Az antigénnel való találkozást megelőzően igen nagy számban nyertünk vissza eozinofil sejteket a BAL során. Hat órával az antigénhatás után (a késői fázisban jelentkező hörgőszűkület csúcspontján) jelentősen csökkent az eozinofil sejtek száma, majd az 1. napon visszatért az antigénnel való találkozás előtti értékre. Az eozinofil sejtszám tartósan emelkedett maradt a 7. és a 14. napon is. A neutrofil sejtek azonban másképp viselkedtek: az antigénnel való találkozás előtti BAL során a sejteknek csak igen kis százalékat tették ki, és számuk drámai módon megemelkedett a késői fázis folyamán tapasztalható bronchokonstrikció (hörgőszűkület) folyamán (6 óra). Az 1. napra a neutrofil sejtszám visszatért az alapértékre, majd a 7. és a 14. napon is alacsony szinten maradt. A neutrofil sejtek beáramlása szignifikáns korrelációt mutatott a késői fázisban észlelhető válaszreakció nagyságával ($r = -0,61$; $p \leq 0,01$).

A tüdőszövet immun-hisztokémiai festése azt mutatta, hogy mind a tüdő vaszkuláris endotéliumában, mind pedig a légutak epitéliumában pozitív ICAM-1 festődés figyelhető meg az antigén inhalációját megelőzően, valamint 6 órával a belégzést követően (1. 2. ábra). Ezzel ellentétben az ELAM-1 festődés nem volt nyilvánvaló az antigénhatás előtt, de drámai módon emelkedett a tüdő-érendotéliumban, 6 órával az antigénnel való találkozás után. Nem volt ELAM-1 festődés észlelhető a légutak epitéliumában az antigénnel való találkozás előtt és 6 órával azt követően.

1 órával az antigéninhalációt megelőzően végzett anti-ELAM-1 (CL2) előkezelés szignifikánsan csökkentette mind az összes leukocita infiltrációt, mind pedig

a bejutó neutrofil sejtek számát valamennyi állatban, 3 állat esetében pedig különösen jelentős mértékben (3. ábra). A CL2 kezelés hatására szignifikánsan csökkent a késői fázisra jellemző hörgőszűkület (bronchokonstrikció), a fenti kezelés azonban nem befolyásolta nyilvánvaló módon az akut válaszreakciót (4. ábra).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

10

1. Eljárás asztma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként

- (a) egy ELAM-1-hez kötődni képes antitest,
15 (b) egy (a) pont szerinti antitest ELAM-1-hez kötődni képes fragmense,
(c) természetes szennyező anyagoktól lényegében mentes ELAM-1,
(d) ELAM-1 valamely funkcionális származéka,
20 (e) egy ELAM-1 receptorhoz kötődni képes antitest,
(f) egy (e) pont szerinti antitest ELAM-1 receptorhoz kötődni képes fragmense,
(g) egy, a természetes szennyező anyagoktól lényegében mentes ELAM-1 receptor, vagy
25 (h) egy ELAM-1 receptor valamely funkcionális származékának terápiásan hatékony mennyiségét, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozó-, vivő- és/vagy segédanyagokkal összekeverve, gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

30 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként (a) egy ELAM-1-hez kötődni képes antitestet vagy (b) ennek egy ELAM-1-hez kötődni képes fragmensét alkalmazunk.

35 3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (a) antitestként monoklonális antitestet alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként (c) természetes szennyező anyagoktól mentes ELAM-1-et alkalmazunk.

40 5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként (d) az ELAM-1 valamely funkcionális származékát alkalmazunk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy funkcionális származékként az ELAM-1 valamely fragmensét alkalmazunk.

45 7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy funkcionális ELAM-1 származékként egy oldható ELAM-1 származékot alkalmazunk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként (e) egy ELAM-1 receptorhoz kötődni képes antitestet, vagy (f) ennek egy, ELAM-1 receptorhoz kötődni képes fragmensét alkalmazunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ELAM-1 receptorként az ELAM-1 valamely szénhidrátligandját alkalmazunk.

55 10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szénhidrátligandként egy szialsavval acilezett laktozil-ceramidot alkalmazunk.

60 11. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ELAM-1 receptorként szialil-Lewis X anti-

gént tartalmazó glükolipidet vagy glükoproteint alkalmazunk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként (g) egy, a természetes szennyező anyagoktól lényegében mentes ELAM-1 receptort alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ELAM-1 receptorként az ELAM-1 valamely szénhidrátligandját alkalmazzuk.

14. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szénhidrátligandként egy szíálsavval acilezett laktozil-ceramidot alkalmazunk.

15. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ELAM-1 receptorként szialil-Lewis X anti-

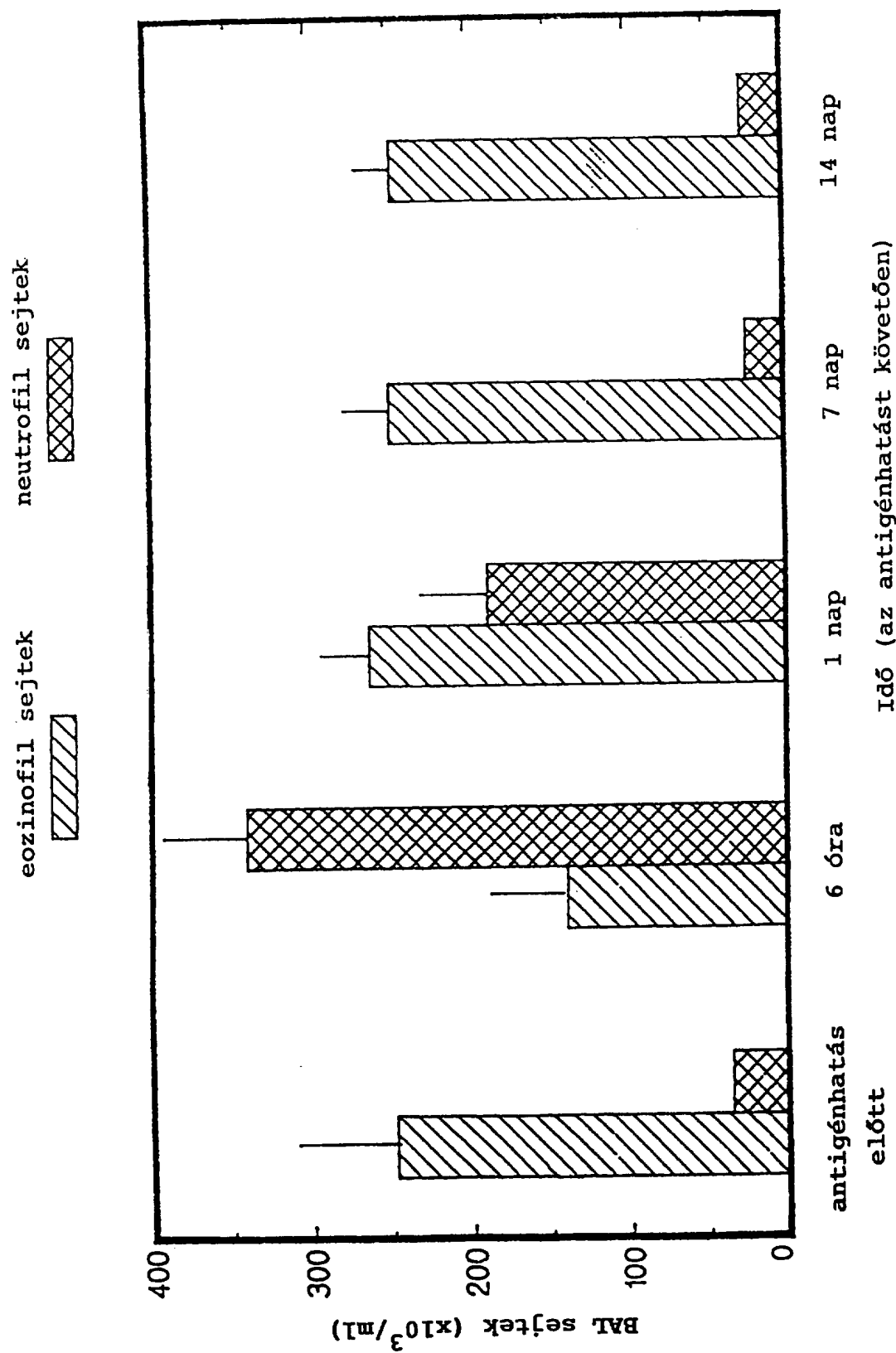
gént tartalmazó glükolipidet vagy glükoproteint alkalmazunk.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként (h) egy ELAM-1 receptor funkcionális származékát alkalmazzuk.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ELAM-1 valamely szénhidrátligandjának funkcionális származékát alkalmazzuk.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szénhidrátligandként egy szíálsavval acilezett laktozil-ceramidot alkalmazunk.

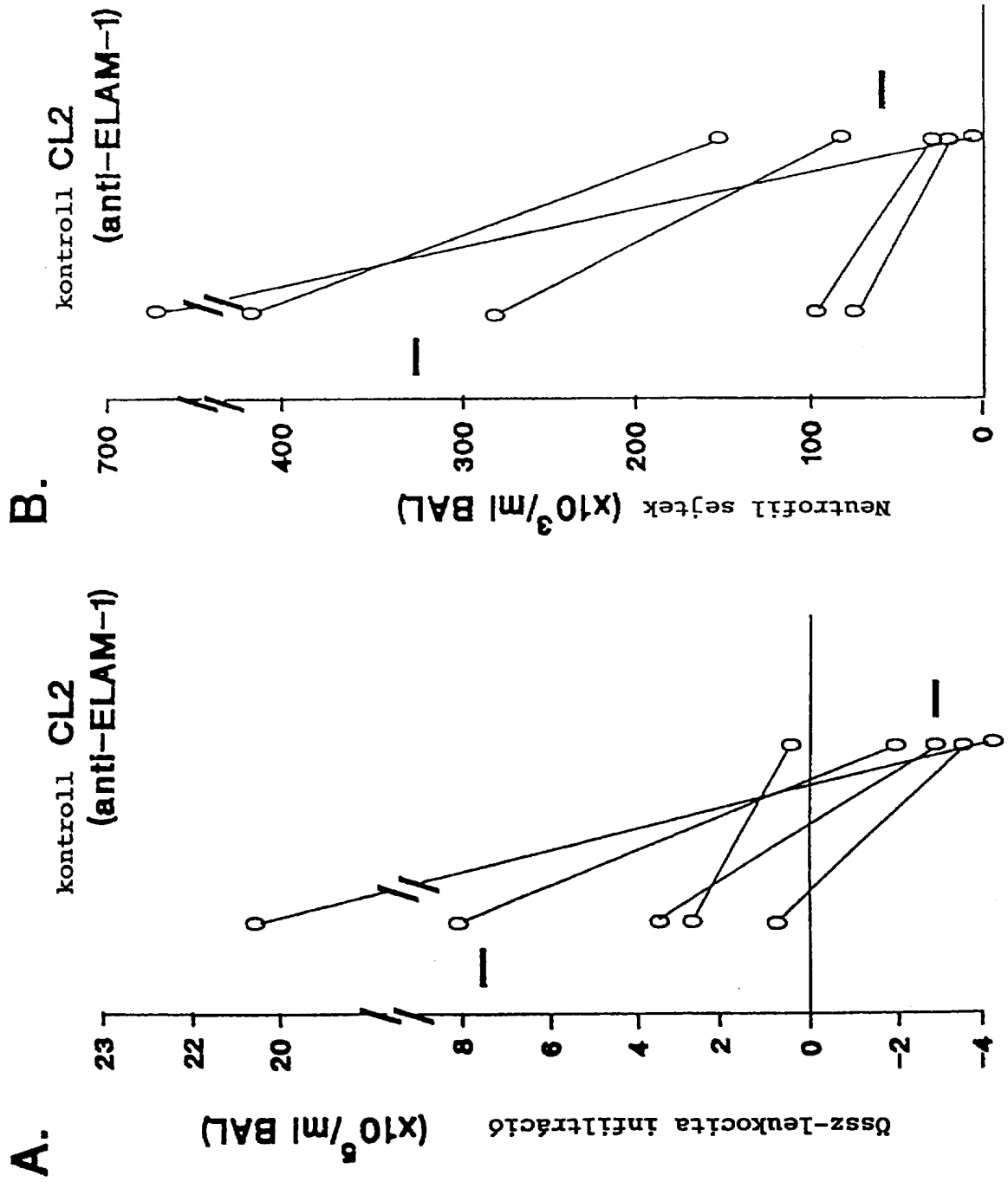
19. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy orálisan beadható spray vagy aeroszol formájú gyógyszerkészítményt állítunk elő.



1. ábra

2. ábra





3. ábra 3. ábra

4. ábra

