

75.425/SZE

Kezelési eljárás ligand-immunogén konjugátumok
felhasználásával

KIVONAT

A találmány olyan eljárásra és gyógyszerészeti összetételre vonatkozik, mely a gazdaállatban a patogén sejtpopulációk eltávolítására az endogén immunválaszt fokozza, melyben a patogén elsődlegesen, egyedien vagy túlzott mértékben az adott ligandumot kifejezi. A találmány a gazdaállatba ligandhoz konjugált immunogén beadását tartalmazza, mely gazdaállat a patogén sejtek populációit hordozza. A gazdaállatban meglévő vagy beadott ellenanyagok, a passzív immunizáláshoz, az immunogén ellen irányulva a ligandum-immunogén konjugátumhoz kapcsolódnak, a gazda immunválaszának segítségével, a patogének eltávolítása érdekében. Legalább egy további terápiás faktort is beadnak, amit a következő csoportból választanak ki: sejtpusztító szerek, tumor hozzáférést fokozó anyagok, kemoterápiás szerek, antimikrobiális ágensek, citotoxikus immunsejt, és a vegyület az endogén immunválasz stimulálására képes, melyben a vegyület a ligandum-immunogén konjugátumhoz nem kötődik.

Jellemző a/bro: Ø
Zoltán Árkai

S. B. G. & K.
Szabadalmi Ügyvivői Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113
Telefon: 461-1000, Fax: 461-1099

75.425/SZE

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

Kezelési eljárás ligand-immunogén konjugátumok
felhasználásával

A jelen találmány tárgya eljárás és gyógyszerészeti összetétel a kórokozó sejtpopulációk létevel jellemezhető kórállapotok kezelésére. Részletesebben a sejtet megcélzó ligand-immunogén komplexeket beteg szervezetbe adjuk be, előnyösen az immunrendszert stimuláló anyaggal vagy más terápiás faktorral kombinálva a gazda kórokozó sejtekre adott immunválaszának fokozására és/vagy azok irányítására.

Az emlős immunrendszer rendelkezik eszközökkel a tumoros sejtek, vagy más patogén sejtek felismeréséhez és eltávolításához, és az idegen betolakodók inváziója ellen. Miközben normálisan az immunrendszer erős védelmi vonalat jelent, mégis számos esetben előfordul, hogy a rákos sejtek, vagy patogén sejtek, vagy fertőző ágensek a gazda immunválaszát kikerülik, és a gazda betegsége ellenére proliferálnak vagy tovább élnek. A replikálódó neoplazmák eltávolítására kemoterápiás szereket és a sugárterápiás eszközöket fejlesztettek ki. Viszont, legtöbbször, ha nem is mindig, a jelenleg rendelkezésre álló kemoterápiás szerek és sugárterápiás eszközök károsító mellékhatással rendelkeznek, mivel nem csak a rákos sejteken fejtik ki hatásukat, hanem a normál gazdasejteken is, mint például a hemopoietikus rendszer sejtjein. Továbbá, a kemoterápiás szerek



azokban az esetekben korlátozott hatékonyságúak, amikor a gazdaszervezet gyógyszerrel szemben ellenállást alakít ki.

A testidegen patogének a gazdában az immunrendszer komponenseinek kikerülésével proliferálhatnak is, vagy ahol az immunrendszer a gyógyszeres kezelés vagy más egészségügyi probléma révén sérült. Bár számos terápiás szert kifejlesztettek, mégis az ilyen terápiás szerekre számos patogén rezisztens, vagy később rezisztensé válik. A rákos sejtek és a fertőző szervezetek képesek a terápiás szerek ellen rezisztenciát kifejleszteni, és a jelenleg rendelkezésre álló daganatterápiás szerek káros mellékhatásai szükségessé teszik új terápiás eszközök kifejlesztését a patogén sejtpopulációk ellen, de úgy, hogy toxikusságuk a gazdával szemben kisebb legyen.

A kutatók a rákos sejtek elpusztítására terápiás protokollokat fejlesztettek ki, megcélozva az ilyen sejtekre specifikusan citotoxikus vegyületeket. Ezek a protokollok ligandhoz konjugált toxinok alkalmazását foglalják magukban, melyek a rákos sejteken egyediek vagy túlzott mértékben fejeződnek ki, megkísérelve minimalizálni a toxin szállítását a normális sejtekhez. Felhasználva ezt a megközelítési módot, kifejlesztettek bizonyos immuntoxinokat, melyek a patogén sejteken lévő specifikus receptorok ellen készített ellenanyagokat tartalmaznak, ahol az ellenanyagot toxinokhoz kötötték, mint például ricin, *Pseudomonas* exotoxin, *Diphtheria* toxin és tumornekrózis faktor. Ezek az immuntoxinok az ellenanyag által felismert, a tumoros sejteken található, specifikus receptorokhoz kötődnek [Olsnes: Immunol. Today, 10, 291-

295 (1989); Melby: Cancer Res., 53(8), 1755-1760 (1993); Better: WO 91/07418 számú szabadalmi bejelentés (1991)].

A rákos sejtek populációinak vagy a testidegen patogének másik szelektív megközelítési formája a gazdában a gazda immunválaszának fokozása a patogén sejtekkel szemben, elkerülve olyan vegyületek beadását, melyek független gazda-toxicitással is rendelkezhetnek. Az immunterápia egyik közzétett stratégiája az ellenanyagok, például a tumoros sejt felszínén a genetikailag módosított multimer ellenanyagok kötődésén alapul, mely sejtek felszínükön az ellenanyagok állandó régióját kifejezik, és ezek különböző immunrendszer közvetített folyamatokkal tumorsejt pusztítást indukálnak [De Vita: Biologic Therapy of Cancer, 2. kiadás, Philadelphia, Lippincott, (1995); Soullillou: 5,672,486 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Bár ez a megközelítési mód azokkal a nehézségekkel komplikálódik, melyek a tumorspecifikus antigének meghatározásában fellépnek. A gazda immunológiai kompetenciáján alapuló másik megközelítési mód lényege, hogy az anti-T sejt receptor ellenanyagot vagy az anti-Fc receptor ellenanyagot a tumoros sejtek felszínére irányítjuk, annak érdekében, hogy az immunsejtek a tumorokhoz közvetlenül kötődhessenek [Kranz: 5,547,668 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Egy vakcina alapú megközelítési módot is leírtak, ami az antigénhez fuzionált citokineket tartalmazó vakcinán alapul, a citokin a vakcina antigén immunitását módosítja, és így az immunválaszt a patogén szerre irányítva stimulálja [Pillai: WO 91/11146 számú

szabadalmi bejelentés (1991)). Ez az eljárás a tárgykörben szereplő immunválaszt közvetlenül módosítja. A nem kívánt sejtpopulációkhoz egy másik megközelítési forma az IL-2-t vagy az antitimocita globulin Fab fragmenseit használja fel, amit antigénekhez kötöttek a szükségtelen T-sejtek eltávolítása érdekében, bár a közölt kísérleti adatok alapján, az eljárás csak a megcélzott populáció 50 %-át távolítja el, és *in vivo* nem-specifikus sejtpusztítást eredményez (azaz a perifériás vér limfocitáinak 50 %-át elpusztítja, de ezek között nem csak T-sejtek szerepelnek [Pouletty: WO 97/37690 számú szabadalmi bejelentés (1997)]). Így jelentős igény maradt azoknak a kóros állapotoknak a kezelésére, melyek a megtámadott gazdában a patogén sejtek populációival jellemezhetők.

A jelen találmány a szervezetekben a patogén sejtek populációinak eltávolítására irányul, a gazda immunrendszeri felismerő funkciójának és az ilyen sejtpopulációkra adott válaszáinak növelésével. A celluláris patogének antigenitásának hatásos növelésére az endogén immunválasz által közvetített patogén sejtpopulációk eltávolítása szolgál. Az eljárás a citotoxikus vagy az antimikrobiális terápiás szerek használatát elkerüli vagy minimalizálja. Az eljárás a ligand-immunogén konjugátum beadását foglalja magában, ahol a ligand a patogén sejtek populációihoz képes *in vivo* specifikusan kötődni, melyek a ligandkötő csoportot egyedien, elsődlegesen vagy túlzott mértékben kifejezik, és a liganddal konjugált immunogén az ellenanyag termelés megindítására képes, vagy előnyösebben a gazdaszervezetben az en-

dogén vagy az együtt beadott exogén ellenanyagokat képes felismerni. A patogén sejtek eltávolítását megvalósító immunrendszer az immunogénnel konjugált ligandnak a receptorhoz, transzporterhez, vagy más a kórokozó sejtek felszínén egyedien kifejezett, túlzottan kifejezett vagy elsődlegesen kifejezett fehérjéhez történő közvetlen kapcsolódása irányítja. A patogén sejtek felszínén megjelenő egyedien kifejezett, túlzottan kifejezett vagy elsődlegesen kifejezett fehérje olyan receptor, ami a nem patogén sejteken nincs jelen vagy kisebb mennyiségben fordul elő, és így a patogén sejtek eltávolításához eszközt biztosít. A terápiás hatékonyság fokozására a gazdaszervezetbe legalább egy további terápiás szer is beadható, például immunrendszer stimuláló anyag, sejtpusztító szer, tumoros szövetbe penetrációt fokozó anyag, kemoterápiás szer, citotoxikus immunsejt, vagy antimikrobiális szer.

Az egyik megvalósítási formában a jelen eljárás a ligandum beadási lépését tartalmazza, mely *in vivo* a sejtfelszíni fehérjéhez nagy affinitással specifikusan képes kötődni, melyek a megcélzott patogén sejtek populációján a fehérjét egyedien, elsődlegesen vagy túlzott mértékben kifejezik, ahol a szóban forgó ligandumokat olyan immunogénhez konjugálták, amelyek a természetes vagy szerzett immunitásban már léteznek, vagy a gazdaállatban előhívható, és szabadon megválaszthatóan legalább egy terápiás szerrel együtt beadható, mely az endogén immunválasz aktivátora, vagy citotoxikus vegyület. Az egyik megvalósítási formában a jelen eljárás a ligandum-immunogén

konjugátum összetétel gazdába adási lépését magában foglalja, melyben a ligandum folsav vagy más folát receptorkötő ligand.

A ligandum egy olyan immunogénhez konjugált, például kovalens kötéssel, amely a gazdaállatban az ellenanyag választ képes kialakítani, vagy előnyösebben az immunogén képes a már meglévő endogén ellenanyagokhoz (a természetes vagy szerzett immunitásnak megfelelően), vagy a gazdaállatba beadott ellenanyaghoz kötődni (azaz passzív immunizáció eredményeként előforduló ellenanyaghoz). A legalább egy további terápiás faktor, mely a ligand-immunogén komplexhez nem képes specifikusan kötődni, de az endogén immunválasz stimulálására vagy fokozására képes, a következő lehet: sejtpusztító szer, tumoros szövetbe a penetrációt fokozó anyag, mint például gyulladás vagy gyulladás előtti állapotot előidéző szer, kemoterápiás szer, citotoxikus immunsejt vagy antimikrobiális szer, ezek a gazdaállatba beadhatók a ligandum-immunogén konjugátum beadásával együtt.

A jelen találmány másik megvalósítási formájával összhangban a biztosított eljárás azt az endogén immunválaszt fokozza, mely a szóban forgó populációt hordozó gazdaállatban a patogén sejtek populációit specifikusan megszünteti, ahol a szóban forgó populáció a ligandum részére hozzáférhető kötőhellyel rendelkezik. Az eljárás a szóban forgó gazdába a ligandum-immunogén konjugátum összetétel beadási lépését tartalmazza, mely összetétel a ligandum és az immunogén komplexét tartalmazza, melyben a szóban forgó immunogénről tudott, hogy a gazdában

az endogén vagy exogén ellenanyagok felismerik, vagy amelyről ismert, hogy a gazdában az immunsejtek közvetlenül felismerik, és legalább egy további terápiás faktort tartalmazó összetételből áll, ahol a szóban forgó faktort a következők közül választjuk ki: sejtpusztító szer, tumoros szövetbe penetrációt fokozó anyag, kemoterápiás szer, antimikrobiális szer, citotoxikus immunsejt, és a vegyület az endogén immunválasz stimulálására képes, amikor is a vegyület a ligandum-immunogén konjugátumhoz nem kötődik.

A jelen találmány egy alternatív megvalósítási formájával összhangban a biztosított eljárás azt az endogén immunválaszt fokozza, mely a szóban forgó populációt hordozó gazdaállatban a patogén sejtek populációit specifikusan megszünteti, ahol a szóban forgó populáció a ligand részére hozzáférhető kötőhelyet fejez ki. Az eljárás a következő lépéseket foglalja magában: a gazdába a szóban forgó ligandum és immunogén komplexét tartalmazó összetétel beadását, a gazdába az immunogén ellen kialakított ellenanyagok beadását, és a szóban forgó gazdába legalább egy további terápiás faktor beadását, ahol a szóban forgó faktort a következők közül választjuk ki: sejtpusztító szer, tumoros szövetbe penetrációt fokozó anyag, kemoterápiás szer, antimikrobiális szer, citotoxikus immunsejt, és az endogén immunválasz stimulálására képes vegyület, amikor is a vegyület a ligandum-immunogén konjugátumhoz nem kötődik.

Az egyik előnyben részesített megvalósítási formában biztosított eljárás a gazdaállatból a patogén sejtek eltávolítását a spe-

cifikus endogén immunválasz növelésével teszi lehetővé, ahol a szóban forgó állat a szóban forgó populációt hordozza, mely elsődlegesen, egyedi módon vagy túlzott mértékben folsav receptort fejez ki. Az eljárás a szóban forgó gazdába az immunogénhez kovalensen kapcsolt konjugátumot tartalmazó összetétel beadási lépését foglalja magában, amelyben az immunogénről tudjuk, hogy azt a gazda immunsejtjei közvetlenül felismerik, és a folsavat vagy folsav analógot tartalmazó ligandum glutamils csoportot tartalmaz, melyben az immunogén kovalensen csak a glutamils csoport γ -karboxilcsoportján keresztül kötött. Egy másik megvalósítási formában a gazdába legalább egy további összetételt adunk be, mely a terápiás faktort tartalmazza, ahol a szóban forgó terápiás faktort a következők közül választjuk ki: sejtpusztító szer, tumoros szövetbe penetrációt elősegítő szer, kemoterápiás szer, antimikrobiális szer, citotoxikus immunsejt, és az endogén immunválasz stimulálására képes vegyület a ligandum-immunogén konjugátumhoz nem kötődik.

A jelen találmány még egy további megvalósítási formájában a biztosított eljárás a gazdaállatból a patogén sejtek eltávolítását a specifikus endogén immunválasz növelésével teszi lehetővé, ahol a gazdaállat a szóban forgó populációt hordozza, amely elsődlegesen, egyedi módon vagy túlzott mértékben folsav receptort fejez ki. Az eljárás a szóban forgó gazdába az immunogénhez kovalensen kapcsolt konjugátumot tartalmazó összetétel beadási lépését foglalja magában, amelyben az immunogénről tudjuk, hogy azt a gazdában az endogén vagy exogén ellenanyagok isme-

rik fel, vagy amelyről tudjuk, hogy a gazda immunsejtjei közvetlenül felismerik, és a folsavat vagy folsav analógot tartalmazó ligandum glutamilcsoportot tartalmaz, melyben az immunogén kovalensen csak a glutamilcsoport α -karboxilcsoportján keresztül kötött. Egy további megvalósítási formában a gazdába legalább egy további összetételt adunk be, mely a terápiás faktort tartalmazza, ahol a szóban forgó terápiás faktort a következők közül választjuk ki: sejtpusztító szer, tumoros szövetbe penetrációt elősegítő szer, kemoterápiás szer, antimikrobiális szer, citotoxikus immunsejt, és ahol a vegyület ligandum-immunogén konjugátumhoz nem kötődik.

A jelen találmány még egy további megvalósítási formájában a megcélzott patogén sejtek populációi a rákos sejtek populációja. Egy másik megvalósítási formában a megcélzott populáció vírussal fertőzött endogén sejtek. Egy további megvalósítási formában a megcélzott sejtpopuláció exogén szervezet, mint például baktérium, mikoplazma, élesztő, gomba. A ligandum-immunogén konjugátum a tumoros sejtek vagy a patogén szervezetek felszínén kötődik, és a megcélzott sejtpopulációt az immunogéneken keresztül "megjelöli", ezzel beindítva a jelölt sejtpopulációban az irányított immunválaszt. A passzív immunizációkor a gazdában juttatott ellenanyagok vagy a gazdában a természetes vagy a szerzett immunitás révén már létező ellenanyagok az immunogénhez kötődnek, és az endogén immunválaszt beindítják. A sejtekhez kapcsolódó ligandum-immunogén konjugátumokhoz kötődő ellenanyag komplementtel közvetített

immunválaszt, ellenanyag-függő sejtközvetített citotoxicitást, ellenanyag opszonizációt és fagocitózist, ellenanyag indukált receptor csoportosulást, a sejthalál vagy a sejtek nyugalmi állapotának jelzését vagy bármely más humorális vagy celluláris immunválaszt eredményez, az ellenanyagnak a sejtekhez kötődő ligandum-immunogén konjugátumokhoz kapcsolása révén. Abban az esetben, ahol az immunsejtekkel az antigén felismerése közvetlen, előzetes ellenanyag opszonizáció nélkül, a patogén sejtek közvetlen pusztítása is előfordulhat.

Az idegen patogén, vagy fertőzött, vagy neoplasztikus endogén sejtek eltávolítása tovább fokozható terápiás faktor beadásával, mely az endogén immunválasz stimulálására képes sejtpusztító szer, tumoros szövetbe penetrációt elősegítő szer, kemoterápiás szer, antimikrobiális szer, citotoxikus immunsejt. Az egyik megvalósítási formában a citotoxikus immunsejt *ex vivo* növesztett és elkülönített citotoxikus immunsejtpopuláció, amelyet a gazdaállatba beoltunk. A jelen találmány egy másik megvalósítási formájában immunstimuláló szert használunk, ami lehet: interleukin, mint például IL-2, IL-12 vagy IL-15, vagy IFN, mint például IFN- α , IFN- β vagy IFN- γ , vagy GM-CSF. Egy másik megvalósítási formában a stimuláló szer citokin összetétel lehet, mely a következő citokinek kombinációit tartalmazhatja: IL-2, IL-12 vagy IL-15 kombinálva IFN- α , IFN- β , vagy IFN- γ interferonokkal, vagy GM-CSF-sel, vagy ezek bármely hatásos kombinációja vagy bármely más hatásos citokinnel kombinálhatjuk.

A jelen találmány még egy másik megvalósítási formájában a biztosított gyógyszerészeti összetétel terápiásan hatásos mennyiségben ligandum-immunogén konjugátumot tartalmaz, mely a gazdaállatban a patogén sejtek populációinak specifikus kötéseire képes a szerzett vagy természetes immunválasz, az együtt beadott ellenanyag, vagy a gazdában immunsejtekkel közvetlenül termelt ellenanyag segítségével a szóban forgó sejtek specifikus eltávolításának elősegítése érdekében, ahol a terápiás faktort a következők közül választjuk ki: sejtpusztító szer, tumoros szövetbe penetrációt elősegítő szer, kemoterápiás szer, antimikrobiális szer, citotoxikus immunsejt, és a vegyület a ligandum-immunogén konjugátumhoz nem kötődik, valamint az összetétel gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaz. Az egyik megvalósítási formában a gyógyszerészeti összetétel parenterális, időben elnyújtott felszabadulású dózisforma. Egy másik megvalósítási formában a terápiás faktor immunológiai stimuláló szer, melyet a következők közül választunk ki: interleukinek, mint például IL-2, IL-12, IL-15, IFN-ek mint például IFN- α , IFN- β vagy IFN- γ és GM-CSF, vagy ezek kombinációi.

A rákos vagy patogén szervezetekkel fertőzött gazdák terápiás kezeléséhez eljárásokat biztosítunk. Az eljárások a patogén sejtpopulációk immunválasz közvetített eltávolításának fokozását eredményezik az antigén természetű sejtek bemutatásával/jelölésével, ami a gazda immunrendszere által közvetített felismerést és eltávolítást eredményez. Az eljárás ligandum-immunogén konjugátumot alkalmaz, mely a rákos sejtekhez vagy más patogén

ágensekhez képest nagy affinitással kötődik. A nagy affinitású kötődés a ligand sajátja lehet, és a kémiaailag módosítható liganddal vagy a konjugátumban lévő ligand és immunogén közötti adott kémiai kötéssel módosítható (fokozható). Az eljárás kombinációs terápiára is kiterjedhet, a ligand-immunogén konjugátumot és további terápiás faktort alkalmazva, mely képes az endogén immunválasz stimulálásra, sejtpusztító szer, kemoterápiás szer, tumoros szövetbe penetrációt fokozó anyag, citotoxikus immunsejt vagy antimikrobiális szer a patogén sejtpopulációk immunválasz közvetítette eltávolításának fokozása érdekében.

A jelen találmány eljárását a gazdaállatban előforduló patogén sejtek endogén immunválasszal közvetített eltávolításának fokozására alkalmazzuk. A jelen találmány azoknál a patogén sejtpopulációknál alkalmazható, melyek számos betegség előidézői, mint például daganatok, fertőző betegségek. Így a patogén sejtek populációi azok a rákos sejtpopulációk lehetnek, melyek tumort okoznak, beleértve a jóindulatú és rosszindulatú tumorokat, vagy akár nem-tumort okozók is lehetnek. A rákos sejtpopulációk spontán módon vagy a gazdaállat csíravonalának mutációja, szomatikus mutációja révén alakulnak ki, ahol a mutáció kémiaailag, virálisan vagy sugárzással indukált. A találmány az ilyen rákok kezelésére alkalmazható, így a következők esetében: karcinómák, szarkómák, limfómák, Hodgekin-féle kór, melanómák, mesotheliomák, Burkitt-féle limfóma, nazofarengiális karcinómák, leukémiák és mielómák. A rákos sejtpopuláció, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következő típusú daganatot

okozhat, orális, tiroid, endokrin, bőr, bél, nyelőcső, garat, hasnyálmirigy, vastagbél, hólyag, csont, ovariális, cervikális, uterin, emlő, testiculáris, prosztatata, rektális, vese, máj és tüdő.

A patogén sejtek populációi exogén patogének vagy sejtpopulációk lehetnek, melyek exogén patogént hordoznak, mint például vírust. A jelen találmány az olyan exogén patogénekre is alkalmazható, mint például baktériumok, gombák, vírusok, mikoplazmák és paraziták. A jelen találmány eljárásával kezelhető fertőző ágen bármely szakirodalomban felismert fertőző szervezet lehet, amely az állatban betegséget okoz, beleértve azokat a szervezeteket, mint a baktériumok, melyek gram-negatívak vagy gram-pozitívak, kokkuszok vagy bacillusok; DNS és RNS vírusokat, mint például, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következőket, DNS vírusok, mint például papilloma vírusok, parvovírusok, adenovírusok, herpeszvírusok és vakcina vírusok, és RNS vírusok, mint például arenavírusok, coronavírusok, rhinovírusok, légzési szincitiális vírusok, influenza vírusok, picornavírusok, paramyxovírusok, reovírusok, retrovírusok és rhabdovírusok. Különösen nagyjelentőségűek az antibiotikumokkal szemben ellenálló baktériumok, mint például az antibiotikum rezisztens *Streptococcus* fajok és *Staphylococcus* fajok, vagy azok a baktériumok, melyek az antibiotikumokra érzékenyek, de antibiotikum kezelésre visszatérő fertőzéseket okoznak, és így végeredményben rezisztens szervezetet alakítanak ki. Az ilyen szervezetek a jelen találmány ligandum-immunogén konjugátumaival és alacsony dózisú antibiotikumokkal kombinációban kezelhetők, melyekkel

a betegben normális esetben az ilyen antibiotikummal szemben rezisztens bakteriális törzs kifejlődése elkerülhető. A jelen találmány gomba, mikoplazma fajok, paraziták vagy az állatokban betegségek okozó egyéb fertőző szervezetek esetében is alkalmazható. A jelen találmány eljárásával kezelhető gombák példái a következők: gombák, melyek penészgomba-szerűen vagy élesztő-szerűen nőnek, beleértve azokat a gombákat, melyek a következő betegségeket okozzák: ótvar, histoplasmosis, blastomycosis, aspergillosis, cryptococcosis, sporotrichosis, coccidioidomycosis, paracoccidio-idomycosis és candidiasis. A jelen találmány a paraziták fertőzések kezelésre alkalmazható, mint például, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következőknél: szomatikus galandféreg, vér mótelyek, szöveti kerekférgek, amoeba és *Plasmodium*, *Typanosoma*, *Leishmania* és *Toxoplasma* fajok okozta fertőzések. A különösen jelentős paraziták azok, melyek folát receptorokat fejeznek ki és folátot kötnek; bár a szakirodalom tele van a fertőző szervezetekre nagy affinitást mutató ligandumokkal. Például a penicillinek, a cephalosporinok antibiotikus aktivitásukról ismertek, és a jelen találmánnyal összhangban a ligandum-immunogén konjugátumok kialakításához a bakteriális sejtfalhoz specifikusan kötődve hasonlóan használhatók mint a ligandumok. A jelen találmány ligandum-immunogén konjugátumok azokra a sejtpopulációkra is irányulhatnak, melyek endogén patogént hordoznak, ahol a patogénre specifikus antigének előnyösen a patogént hordozó sejtek

felszínén fejeződnek ki, és a ligandummal specifikusan kötődő antigén receptoraként szerepelnek.

A jelen találmány eljárása mind a humán klinikumban, mind az állatgyógyászatban alkalmazható. Így a patogén szervezetek populációit hordozó és a ligand-immunogén konjugátumokkal kezelhető gazdaállat lehet humán, vagy az állatgyógyászatban használt laboratóriumi, házasított vagy vadállat lehet. A jelen találmány a következő állatok esetében alkalmazható, tehát nem csak ember esetében: laboratóriumi állatok, mint például rágcsálók (például egér, patkány, hörcsög, stb.), nyulak, majmok, csimpánzok, háziállatok, mint például kutya, macska és nyúl, mezőgazdasági állatok, mint például tehenek, lovak, disznók, juhok, kecskék, és fogságban élő vadállatok, mint például medvék, pandák, oroszlánok, tigrisek, leopárdok, elefántok, zebrák, zsiráfok, gorillák, delfinek és bálnák.

Előnyösen a ligand-immunogén konjugátumot a gazdaállatba parenterálisan adjuk be, például intradermálisan, szubkután, intramuszkulárisan, intraperitoneálisan vagy intravénásan. Alternatívaként a konjugátum a gazdaállatba más orvosilag hasznos folyamattal is beadható, és bármely hatásos dózis és terápiás dózisforma alkalmazható, beleértve a megnyújtott kibocsátású dózisformákat. A jelen találmány eljárása a tumor műtéti eltávolításával, sugárterápiával, kemoterápiával vagy biológiai terápiákkal, mint például más immunterápiákkal használható, beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a monoklonális ellenanyag terápiát, az immunmódosító szerekkel történő kezelést, az

immunológiai effektor sejtek adoptív szállítását, a hemopoietikus növekedési faktorról, citokinekkal végzett kezelést, és a vakcinálást.

A jelen találmánnyal összhangban a ligandum-immunogén konjugátumokat számos különböző ligandum és immunogén közül választhatjuk. A ligandumtól elvárjuk, hogy a gazdaállatból a patogén sejteket specifikusan eltávolítsa, a ligand receptorának elsődleges kifejeződése miatt, melyek a patogén sejteken a ligandumkötéshez rendelkezésre állnak. Az elfogadható ligandumok közé tartozik a folsav, a folsav analógok és más folát-receptorkötő molekulák, egyéb vitaminok, a könyvtárak szűréséből azonosított peptid ligandok, tumor-specifikus peptidek, tumor-specifikus aptamerek, tumor-specifikus szénhidrátok, tumor-specifikus monoklonális vagy poliklonális ellenanyagok, az ellenanyag Fab vagy scFv (azaz egyláncú variábilis régiók) fragmensei, mint például az EphA2-ra irányuló ellenanyag Fab fragmense, vagy más, a metasztatikus ráksejteken specifikusan kifejeződő vagy egyedileg hozzáférhető fragmens, a kombinatorikai könyvtárakból származó kis szerves molekulák, mint például EGF, FGF, inzulin, és inzulinszerű növekedési faktorok, és homológ polipeptidek, szomatosztatin és analógjai, transferrin, lipoprotein komplexek, epesavak sói, szelektinek, szteroid hormonok, Arg-Gly-Asp-t tartalmazó peptidek, retinoidok, különböző galektinek, δ -opioid receptor ligandok, kolecisztokinin A receptor ligandok, az angiotenzin AT1 vagy az AT2 receptorokra specifikus ligandok, peroxiszóma proliferációval aktivált receptor

γ ligandok, β -laktám antibiotikumok, kis szerves molekulák, beleértve az antimikrobiális gyógyszereket, és más molekulákat, melyek elsődlegesen a tumoros sejtek vagy a fertőző szervezetek felszínén kifejeződő receptorhoz kötődnek, és ezek bármely kombinációi. A fertőző szervezetekhez kötődő ligandok közül különösen fontosak azok a molekulák, melyek antibiotikumok, vagy elsődlegesen a mikroorganizmusokhoz kötődő, a szakirodalomban ismert egyéb gyógyszerek közé tartoznak. A jelen találmány molekula-ligandumokat is alkalmaz, mint például antimikrobiális gyógyszereket, ezek az adott receptor kötőzsebébe tervezett molekulák, amelyet a receptor kristályfelépítése alapján alakítottak ki, vagy más sejtfelszíni fehérjék, amikor is az ilyen receptorok elsődlegesen a tumorok, baktériumok, vírusok, mikoplazmák, gombák, paraziták vagy más patogének felszínén fejeződnek ki. A jelen találmány előnyben részesített megvalósítási formáiban azokat a ligandokat is figyelembe vehetjük és alkalmazhatjuk, melyek tumor antigénhez vagy más molekulához kötődnek és elsődlegesen a tumorsejtek felszínén fejeződnek ki.

A ligandum kötőhelye bármely a receptorhoz specifikusan kötődő molekula receptora lehet, amikor is a receptor vagy bármely más fehérje elsődlegesen a patogén populációk sejtjeinek felszínén fejeződik ki, beleértve például a növekedési faktorok, a vitaminok, a peptidek, úgy mint opioid peptidek, hormonok, ellenanyagok, szénhidrátok és kis szerves molekulák receptorait. A kötőhely bármely molekula kötőhelye is lehet, mint például antibiotikumoké vagy más gyógyszereké, amikor is a kötőhelyről

a szakirodalomból tudjuk, hogy elsődlegesen mikroorganizmusokon fordul elő. Például a kötőhely lehet a bakteriális sejt falban, a β -laktám antibiotikumok, mint például penicillin esetében, vagy a vírus felszínén az antivirális szer kötőhelye. A találmány azoknak a ligandoknak a kötőhelyeit is alkalmazza, mint például antimikrobiális gyógyszerek, melyeket a receptor struktúrája alapján úgy terveztek, hogy a receptor kötőhelyébe illeszkedjenek, és ahol a receptor elsődlegesen a patogén sejtek vagy szervezetek felszínén fejeződik ki. Azt is figyelembe vesszük, hogy a tumor-specifikus antigének a jelen találmány eljárásában a ligandum kötőhelyeként funkcionálhatnak. A tumor-specifikus antigén egyik példája, mely ligandum-immunogén konjugátumok kötőhelyeként funkcionálhat, az ephrin fehérjecsald extracelluláris epitópjai, mint például EphA2. Az EphA2 kifejeződés normál sejtekben a sejt-sejt kapcsolatokra korlátozódik, de az EphA2 a metasztatizáló tumorsejtek teljes felszínén eloszlik. Így az EphA2 a metasztatizáló sejteken a kötéshez rendelkezésre áll, mely lehet például az immunogénhez konjugált ellenanyag Fab fragmense, míg a normál sejteken a fehérjének az Fab fragmenshez kötődése nem hozzáférhető, így eredményül a metasztatikus rákos sejtekre specifikus ligand-immunogén konjugátumot kapunk. Továbbá, a jelen találmány a ligandum-immunogén konjugátumok kombinációs használatát is figyelembe veszi, a patogén sejtek eltávolításának maximális megcélzásához, a szerzet és a természetes immunválasz vagy az együttesen alkalmazott ellenanyagok segítségével.

A jelen találmány gyakorlatában elfogadható immunogének azok, melyek a gazdaállatban az ellenanyagtermelés beindítására képesek, vagy azok, melyek a gazdaállatban az előzőleg beindított ellenanyag-termeléssel rendelkeznek, melynek eredményeként előzetes immunitás alakul ki, vagy azok, melyek a természetes immunrendszer alkotórészei. Alternatívaként, passzív immunizáláskor az immunogén ellen kialakított ellenanyagokat beadhatjuk a gazdaállatba. A jelen találmány gyakorlatában megfelelő immunogének közé azok az antigének vagy antigén peptidek tartoznak, melyek az előzetes immunizációkor, a normális időbeosztású vakcinációkban, vagy a természetes expozíció előtt kialakulhatnak, mely például a következő ágensektől származhat: poliovírus, tetanusz, tifusz, rubella, kanyaró, mumpsz, pertussis, tuberculosis, és influenza antigének, és α -galaktozil csoportok. Ezekben az esetekben a ligandum-immunogén konjugátumokat az előzetesen, a gazdaállatban a patogén sejtpopulációk ellen szerzett humorális vagy celluláris immunitás irányának felújítására használjuk, az idegen sejtek vagy patogén szervezetek eltávolítása érdekében. A további alkalmas immunogének közé azok az antigének vagy antigén természetű peptidek tartoznak, melyek a gazdaállatban új immunitást fejlesztenek ki, a nem természetes antigén vagy haptén (például fluoreszcein-izotiocianát vagy dinitrofenil) ellen, és azok ellen, melyekre természetes immunitás létezik (például szuper-antigének és muramil dipeptidek).

A jelen találmány ligandumai és immunogénjei a szakirodalomban ismert bármely komplexképző eljárás felhasználásával

konjugálhatók. Ezek közé a ligandum immunogénhez kötésének kovalens, ionos vagy a hidrogénkötéses módszerei tartoznak, akár közvetlenül, akár kötőcsoporton keresztül, mint például kétértékű kötőszerral. A konjugátum tipikusan a ligandum és immunogén között kovalens kötéson keresztül alakul ki, amid, észter vagy imino kötéssel a komplex megfelelő sav, aldehid, hidroxil, imino vagy hidrazo csoportján keresztül. A jelen találmány egyik előnyben részesített megvalósítási formájában a ligandum folsav, folsavanalóg vagy más folát-receptor kötőmolekula, és a folát ligandot az immunogénhez trifluorecetsav-anhidridet alkalmazó eljárással konjugáljuk, a folsav γ -észtereinek teriol-azil közti terméken keresztül megvalósított elkészítésével. Ez az előnyben részesített folyamat folát-ligandum szintéziséhez vezet, mely az immunogénhez csak a glutaminsav γ -karboxilcsoportján keresztül konjugált, ahol a γ -konjugátum a folát-receptorhoz nagy affinitással kötődik, elkerülve az α - és a γ -konjugátum elegyének kialakulását. Alternatívaként a tiszta α -konjugátumok a közti termékekből előállíthatók, amikor is a γ -karboxilcsoportot szelektíven blokkoljuk, az α -konjugátum kialakul, és ezek után a γ -karboxilcsoport blokkolását a szakirodalomban ismert szerves kémiai eljárással megszüntethetjük. Megjegyezzük, hogy a jelen találmány szerinti konjugátumok elkészítésében ligandként más vitaminok is alkalmazhatók. Például a ligandum-immunogén konjugátumok biotinnal és riboflavinnal, valamint foláttal is kialakíthatók [5,108,921, 5,416,016 és 5,635,382 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi

bejelentések, amelyeket itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be].

A jelen találmány ligandum-immunogén konjugátumai a patogén sejtek populációinak eltávolítására irányuló endogén immunválaszt fokozzák. Az endogén immunválasz a következőket foglalhatja magában: humorális válasz, sejtközvetített immunválasz, és más immunválasz, mely a gazdaállatra nézve endogén, beleértve a komplementtel közvetített sejtlyizist, az ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxicitást (ADCC), a fagocitózishoz vezető opszonizációt, ellenanyagkötődéssel a receptorok összeállását, ami apoptotikus jelhez vezet, az antiproliferációt vagy differenciálódást és az antigént/haptént szállító immunsejtek közvetlen felismerését. Az is figyelembe vesszük, hogy az endogén immunválasz citokin szekrécióval jár, mely olyan folyamatokat szabályoz mint az immunsejtek sokszorozódása és vándorlása. Az endogén immunválasz a B-sejtek és a T-sejtek részvételét is jelentheti, beleértve a segítő és a citotoxikus T-sejteket, a makrofágokat, a természetes ölósejteket, a neutrofileket, a LAK sejteket és hasonlókat.

A humorális válasz a következőket foglalhatja magában: normálisan időzített vakcináció, természetes vagy nem természetes antigénnel vagy hapténnel (például fluoreszcein-izotiocianáttal) végzett aktív immunizálást, nem természetes antigénnel új immunitás kialakítását. Az aktív immunizáció felöleli a nem természetes antigén vagy haptén többszörös injektálását, amit az új immunitás kialakítására a normális vakcinációs menetrenden

kívül végzünk. A humorális válasz a természetes immunitás eredménye is lehet, amikor is a gazdaállatot már előzetesen immunizáltuk, például α -galaktozil csoportokkal szemben. Alternatívaként a passzív immunitás a gazdaállatba ellenanyagok beadásával alakítható ki, mint például a szérumból vagy a monoklonális ellenanyagokból gyűjtött ellenanyagok, melyek lehetnek genetikailag módosítottak, vagy nem, beleértve a humanizált ellenanyagokat. A passzív immunitás kialakításához és a ligand-immunogén konjugátum használatához az ellenanyag reagens adott mennyiségét adjuk, amikor is a passzívan beadott ellenanyagok az immunogén ellen irányulnak, így a reagensek standard készletének előnyét biztosíthatjuk, felhasználva azokban az esetekben, ahol a beteg aktuális ellenanyag titere az egyéb potenciális antigénekre nézve terápiásan nem kielégítő. A passzívan beadott ellenanyagok a ligand-immunogén konjugátummal együtt beadhatók, és ezt az "együttes beadást" a ligand-immunogén konjugátum beadása előtt, azzal egy időben, vagy az után végezhetjük.

Figyelembe vesszük, hogy a már meglévő ellenanyagok, indukált ellenanyagok vagy a passzívan beadott ellenanyagok a tumorsejtek vagy a fertőző szervezetek ellen újrairányíthatók, előnyösen úgy, hogy a ligand-immunogén konjugátumot ezekhez az előzőnlést végző sejtekhez vagy szervezetekhez kapcsoljuk, és hogy a patogén sejtek a komplementtel közvetített lizissel, az ADCC-vel, az ellenanyagfüggő fagocitózissal vagy a receptorok összegyűlésével elpusztíthatók. A citotoxikus folyamat más

immunválasz típusokat is felölelhet, mint például a sejtekkel közvetített immunitást, valamint a másodlagos válaszokat, melyek akkor alakulnak ki, ha a nem kívánatos sejteket az antigént bemutató sejtek megtámadják, és amelyek a természetes tumor-antigéneket vagy az idegen patogén antigéneket az immunrendszernek bemutatják az antigéneket hordozó sejtek vagy szervezetek eltávolítására.

A patogén sejtpopulációk endogén immunválasz közvetített eltávolításának fokozása érdekében a terápiás faktort tartalmazó legalább egy további összetétel a gazdába kombinációban vagy adjuvánsként a fentiekben részletezett módszerrel beadható, vagy több mint egy további terápiás faktor is használható. A terápiás faktor azon vegyületek közül választható ki, melyek az endogén immunválaszt, a kemoterápiás szert, az antimikrobiális szert, vagy a beadott ligand-immunogén komplex hatásosságát kiegészíteni képes terápiás faktort, képesek stimulálni. A jelen találmány eljárása a gazdába adással úgy hajtható végre, hogy a fentiekben leírt az endogén immunválasz stimulálására képes konjugátumokon, vegyületeken vagy összetételeken kívül, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következőket is beadjuk, citokinek, vagy immunsejt növekedési faktorok, mint például interleukin 1-18, őssejt faktor, bázikus FGF, EGF, G-CSF, GM-CSF, FLK-2 ligand, HILDA, MLP-1 α , TGF α , TGF β , M-CSF, IFN α , IFN β , IFN γ , oldható CD23, LIF és ezek kombinációi.

A fenti citokinek terápiásan hatásos kombinációi szintén felhasználhatók. Egy előnyben részesített megvalósítási formában

az ilyen sejtpopulációkat hordozó gazdaállatokban a patogén sejtek eliminálására, például az IL-2 terápiásan hatásos mennyiség a foláttal kapcsolt fluoreszcens-izotiocianát használatkor körülbelül 5000-500000 nemzetközi egység/dózis/nap, naponta több dózisban, az IFN- α esetében körülbelül 7500-150000 nemzetközi egység/dózis/nap, szintén napi több dózisban. Egy másik előnyben részesített megvalósítási formában az IL-12-t és az IFN- α -t terápiásan hatásos mennyiségben használjuk, és még egy további előnyben részesített megvalósítási formában az IL-15-t és az IFN- α -t terápiásan hatásos mennyiségben használjuk. Egy alternatív előnyben részesített megvalósítási formában az IL-2-t, a IFN- α -t vagy az IFN- γ -t és a GM-CSF-t kombinációban használjuk. Előnyösen a használt terápiás faktor(ok), mint például IL-2, IL-12, IL-15, IFN- α , IFN- γ és GM-CSF, beleértve kombinációikat, a természetes ölösejteket és/vagy T-sejteket aktiválja/aktiválják. Alternatívaként a terápiás faktor vagy kombinációi, beleértve egy interleukin, interferon és GM-CSF kombinációkat, más immunológiai végrehajtó sejteket aktiválhatnak, mint például makrofágot, B-sejteket, neutrofileket, LAK sejteket és hasonlókat. A találmány szem előtt tartja bármely citokin hatásos kombinációját is, beleértve egyéb interleukin, és interferon és kolónia stimuláló faktor kombinációkat.

A jelen találmány használatában megfelelő kemoterápiás szerek, melyek citotoxikusak és a tumor permeabilitást elősegíthetik, a következők: adrenokortikoidok, alkiláló szerek, antiandrogének, antiösztrogének, androgének, ösztrogének, antimetabo-

litok, mint például citozin-arabinozid, purinanalógok, pirimidinanalógok, és methotrexate, busulfan, carboplatin, chlorambucil, cisplatin és más platinavegyületek, tamoxiphen, taxol, cyclophosphamide, növényi alkaloidok, prednisone, hidroxikarbamid, teniposide, antibiotikumok, mint például mitomycin C és bleomycin, nitrogénmustárok, nitrokarbamidok, vincristine, vinblastine, gyulladás és előgyulladás elleni szerek, és bármely, a szakirodalomban ismert kemoterápiás szer. A jelen találmány konjugátumaival beadható további adjuváns terápiás szerek a következők: penicillinek, cephalosporinok, vancomycin, erythromycin, clindamycin, rifampin, chloramphenicol, aminoglükozidok, gentamicin, amphotericin, acyclovir, trifluridine, ganciclovir, zidovudine, amantadine, ribavirin, és bármely a szakirodalomban ismert antimikrobiális szer.

A patogén sejtek populációinak eltávolítása, a tumor tömegének vagy a patogén szervezet mennyiségének csökkentésével vagy eltávolításával, terápiás hatást eredményez. Tumoroknál az eltávolítás az elsődleges tumor vagy azon sejtek eltávolítása lehet, melyek metasztatizáltak, vagy amelyek a primer tumorból disszociáltak. A megelőző kezelést, a tumor visszatérésének megakadályozására bármely terápiával történt eltávolítása után, mint például a tumor műtéti eltávolítása, sugárterápia, kemoterápia vagy biológia terápia, a jelen találmánnyal összhangban szintén figyelembe vettük. A megelőző kezelés lehet kezdő-kezelés a ligand-immunogén konjugátummal, például naponta több dózisban,

és/vagy kiegészítő vagy sorozat kezelés a kezdeti kezelés(ek) után napi vagy havi időközönként.

A jelen találmány olyan gyógyszerészeti összetételekre is irányul, melyek a gazdában a patogén sejtpopuláció "jelölésére" a ligand-immunogén konjugátum hatásos mennyiségét tartalmazzák az endogén immunválasszal vagy az együttesen beadott ellenanyaggal biztosított specifikus eltávolításhoz. Az összetétel továbbá kiegészítő faktort is tartalmaz, mely a patogén sejtek eltávolítását hatékonyan fokozza, és amelyet a következő csoportból választunk ki: sejtpusztító szer, tumoros szövetbe penetrációt fokozó anyag, kemoterápiás szer, antimikrobiális szer, citotoxikus immunsejt, és az endogén immunválasz stimulálására képes vegyület, mely vegyület a ligand-immunogén konjugátumhoz nem kötődik. A gyógyszerészeti összetétel a ligand-immunogén konjugátum terápiásan hatásos mennyiségét és terápiás faktort tartalmaz, ahol a faktor lehet: citokin, mint például IL-2, IL-12 vagy IL-15, vagy a citokinek kombinációi, beleértve IL-2-t, IL-12-t vagy IL-15-t és az interferonokat, mint például IFN- α vagy IFN- γ és az interferonok, interleukinok és kolónia stimuláló faktorok, mint például GM-CSF, kombinációit.

A ligandum-immunogén konjugátum egységes napi dózisa jelentősen függhet a gazdaszervezet állapotától, a kezelt betegségtől, a konjugátum molekulatömegétől, a beadási úttól és a szöveti megoszlástól, és az egyéb terápiás kezelések, mint például sugárterápia együttes alkalmazásának lehetőségétől. A betegbe beadott hatásos mennyiség a beteg testfelszínétől,

tömegétől és az orvos által meghatározott fiziológiai állapotától függ. A hatásos dózis körülbelül 1 ng/kg - 1 mg/kg tartományban lehet, előnyösen körülbelül 1 µg/kg - 500 µg/kg, és legelőnyösebben körülbelül 1 µg/kg - 100 µg/kg.

A ligandum-immunogén konjugátum és a terápiás faktor beadásának bármely hatásos tartománya beadható a már meglévő ellenanyagokra, a tumorsejtekre vagy a fertőző szervezetekre történő irányításához vagy az immunogénre adandó humorális immunválasz indukálásához. Például a ligand-immunogén konjugátum és a terápiás faktor egy dózisban beadható, vagy dózisokra osztható, és így naponta többször alkalmazható. Továbbá a napi kezelés alternatívájaként az ingadozó tartomány használható, például 1-3 nap hetente, és a jelen találmány céljára az ilyen váltakozó vagy ingadozó napi tartományokat a minden napos kezeléssel egyenértékűnek tartjuk, és ez a jelen találmány oltalmi körébe tartozik. A jelen találmány előnyben részesített megvalósítási formájában a patogén sejt-populációk eltávolítására a gazdaszervezetet a ligandum-immunogén konjugátum és a terápiás faktor több injekciójával kezeljük. Egy másik megvalósítási formában a gazdaszervezetet a ligandum-immunogén konjugátummal többször injektáljuk (előnyösen körülbelül 2-50 alkalommal) például 12-72 órás időközönként vagy 48-72 órás időközönként. A ligandum-immunogén konjugátum további injekciói a kezdő injektálás(ok) után napi vagy havi időközönként beadhatók a betegbe, mivel a további injekciók a betegség visszatérésének megakadályozására szolgálnak. Alter-

natívaként a ligandum-immunogén konjugátum kezdő injekciója/injekciói a betegség visszatérését megakadályozhatják.

A terápiás faktor beadása a gazdaállatba a ligandum-immunogén konjugátum beadása előtt, azzal egy időben, vagy az után elvégezhető, és a terápiás szer a konjugátumot tartalmazó vagy a ligandum-immunogén konjugátumtól eltérő összetétel részeként is beadható. A jelent találmány szerint a terápiás faktor terápiásan hatásos dózisban bármely ilyen terápiás összetételben beadható. Továbbá, több mint egy típusú ligandum-immunogén konjugátum használható. Például a gazdaállat mind fluoreszcein-izotiocianáttal, mind dinitrofenillel, majd ezt követően fluoreszcein-izocianáttal és dinitrofenollal előimmunizálható, összekapcsolva azonos vagy eltérő ligandokkal az együttes dozírozási protokollban. A gazdaállatban a kemoterápiás vagy antimikrobiális szer rezisztenciájának elkerülésére kombinációs terápiában a kemoterápiás és antimikrobiális szereknél a terápiás faktor szuboptimális dózisban beadható a ligandum-immunogén konjugátummal.

A ligandum-immunogén konjugátumot és a terápiás faktort előnyösen parenterálisan injektáljuk, és az ilyen injekciók a következők lehetnek: intraperitoneális injekciók, szubkután injekciók, intramuszkuláris injekciók, intravénás injekciók vagy intrathecális injekciók. A ligandum-immunogén konjugátum és a terápiás faktor lassú pumpával is szállítható. A parenterális dózisok példái a következők: az aktív szer vizes oldatai, izotóniás sóoldat, 5 % glükóz vagy más jól ismert gyógyszerészetileg elfogadható fo-

lyékony hordozó, mint például folyékony alkoholok, glikolok, észterek és amidok. A jelen találmánnyal összhangban a parenterális dózis helyreállítható liofilezett formában lehet, mely a ligandum-immunogén konjugátumot és a terápiás faktort tartalmazza. A jelen találmány egy előnyben részesített megvalósítási formájában a megnyújtott kibocsátású formák szakirodalomban ismert bármelyike felhasználható, mint például a biológiailag lebomló szénhidrát mátrixok [4,713,249, 5,266,333, és 5,417,982 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentések, amelyeket itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be].

1. Példa

A folát-fluoreszcein-izotiocianát konjugátumok hatása a tumorral implantált egerek túlélésére

Hat nyolchetes (~20-22 grammos) nőtény Balb/c egeret szubkután több helyen fluoreszcein-izotiocianáttal - (FITC)-jelölt borjú szérumalbuminnal (BSA) – immunizáltunk, kereskedelem-ben vásárolható adjuvánssal (például Freund-féle adjuváns vagy Titer Max™-Gold). Miután az összes állatban biztosítottuk, hogy az anti-FITC ellenanyag titerek megfelelőek legyenek (amit az egerek szérum mintáinak ELISA mérése bizonyított), mindegyik állatnak intraperitoneálisan 5×10^5 M109 sejtet adtunk, ez egy szingenikus tüdőrák sejtvonala, mely folát-receptort nagy mennyiségben kifejez. A daganatos kolóniákat hagytuk letapadni és növekedni. A rákos sejtek implantációja után a 4. és 7. napon az

összes állatot vagy foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) vagy specifikus mennyiségű FITC-folsav konjugátummal injektáltuk, melyekben a kapcsolódást gamma-karboxillal kapcsolt etilén-diamin híd biztosítja. Az injektált folát-FITC koncentrációk a következők: 0 (PBS kontroll), 4,5, 45, 450 és 4500 nmol/kg, és mindegyik folát-FITC koncentrációval összesen 40 egeret oltottunk. Az összes állatnak az immunrendszerük stimulálására 5 napig 5 sorozat (8-12. napokon) 5000 nemzetközi egység rekombináns humán IL-2-t adtunk be. Az immunterápia hatékonyságát időben a folát-FITC kezelt állatok és a kontroll állatok túlélésének követéses összehasonlításával állapítottuk meg. Ahogy azt az 1. ábrán bemutattuk, a folát-FITC kezelt állatok medián túlélése dóziszfüggő, így a tumorimplantáció után a kontroll állatok medián túlélése 23 nap, míg a folát-FITC kezeltnél a túlélés a konjugátum dóziséval arányosan hosszabb. Már 45 nmol/kg folát-FITC képes az egerek hosszúidejű túlélését elősegíteni, és ez a hatás a magasabb dózisoknál dóziszfüggően nő. Bár a folát-FITC-ről azt találták, hogy a tumorokban koncentrálnak, néhány folát-FITC jel a veseszövetben is előfordul (más normál szövetek szintjeivel ez nem összehasonlítható). Az erre szakosodott állatorvosok az autopsziás vizsgálatokban vese vagy szervtoxicitást nem tudtak kimutatni.

2. Példa

A foláttal konjugált fluoreszcein-izocianát megjelenési képe normál és tumoros szövetekben

Az eljárás az 1. példában leírttal megegyezett, azzal az eltéréssel, hogy ezeket az állatokat 24JK-FBP tumor sejtekkel injektáltuk, és az állatokat a folát-FITC injektálás után hamarosan feláldoztuk, és a szövetekből metszeteket készítettünk, majd konfokális fluoreszcens mikroszkóppal a FITC immunfluoreszcencia helyét az adott szövetben meghatároztuk, beleértve a tumort, a veséket, a májat és az izomszöveteket. A 2. ábra a különböző szövetekből készült metszetek fáziskontraszt mikroszkópos képeit mutatja (kontrollal együtt). A tumorszövetben és a vese proximális tubulusaiban specifikus folát-FITC jeleket kaptunk, ahol a folsav receptorok egységesen nagy mennyiségben fordulnak elő.

3. Példa

A tumoros szövet képe a foláttal konjugált fluoreszcein-izotiocianáttal vagy fikoeritrinnel jelölt kecske anti-egér IgG-vel

Az eljárás a 2. példában leírtaknak megfelel, azzal az eltéréssel, hogy M109 sejteket használtuk, és a szöveteket FITC fluoreszcenciás anyaggal (zöld) és fikoeritrin (PE) fluoreszcenciás anyaggal (vörös) vizsgáltuk. A tumoros sejteken felhalmozódó folát-FITC-hez kötődő endogén anti-egér-FITC ellenanyagok kötődésének kimutatásához a PE fluoreszcens jelet a kecske anti-egér IgG ellenanyagokhoz kötöttük. A folát-FITC kezelt és nem kezelt tumoros szöveteket összehasonlítottuk, és mindkét mintát a 2. példában leírtaknak megfelelően fáziskontraszt mikroszkóppal megvizsgáltuk. A FITC fluoreszcencia a tumor szövetben a folát-FITC helyzetét mutatja (3. ábra). A PE fluoreszcencia azt

mutatja, hogy az endogén egér anti-FITC ellenanyagok a tumoros sejteken lévő folát-FITC konjugátumokhoz kötődnek. Más tanulmányok (nem tüntettük fel) az mutatják, hogy a normál szöveteken, beleértve a vesét is, ilyen IgG kötődés nem fordul elő. A vese szövetekben az ellenanyag folát-FITC-hez kötésének hiánya abból a tényből származik, hogy a folát receptor a vese proximális tubulusának sejtjein az apikális membránon helyezkedik el, így az ellenanyagok a vese ezen részét nem képesek elérni. A fáziskontraszt képek (transzmissziós képek) a kezelt és a nem kezelt tumorszöveteket mutatják, felfedve a kezelt mintákban a sejtek pusztulását.

4. Példa

A folát-fluoreszcein-izotiocianát konjugátumok hatása a szolid tumorok növekedésére

Az eljárást az 1. példában leírtaknak megfelelően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy mindegyik állatot szubkután vállban 1×10^6 M109 sejttel injektáltunk (0. nap) a FITC immunizáció előtt. A tumorsejtek implantációja után a folát-FITC immunizálás 1500 nmol/kg folát-FITC-vel történt intraperitoneálisan 48 órás időközönként (7., 9., 11., 13., 15. és 17. napon). A vállban kialakuló szolid tumorokat megmértük és a tumorméret százalékos növekményét meghatároztuk. A tumor növekedési görbáját a 4. ábrán mutattuk be, ami azt mutatja, hogy a szolid tumorok növekedése a folát-FITC és IL-2 kombinációval kezelt állatoknál szignifikánsan gátolt.

5. Példa

A citokinekkal végzett kombinációs kezelések hatása

Az eljárást az 1. példában leírtaknak megfelelően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy az állatokat 5 napig naponta (8-12. napokon) 5000 nemzetközi egység rekombináns humán IL-2-vel, és kombinációban $2,5 \times 10^4$ egység/nap IFN- α -val (5 napig naponta), vagy IL-12-vel (5 napig naponta 0,5 $\mu\text{g}/\text{nap}$), vagy TNF- α -val (3 injekció a 8., 10. és 12. napokon 2 $\mu\text{g}/\text{nap}$) kezeltük, miután 2 dózis folát-FITC-t (1500 nmol/kg) vagy aminofluoreszceint injektáltunk a tumorimplantációt követő 4. és 7. napon. Tovább a hosszúidejű túlélési adatok megszerzési idejének csökkentésére a tumorsejteket intraperitoneálisan a máj közelébe implantáltuk. Ezért a tumort hordozó egerek élettartama az 1. példában bemutatotthoz képest általában csökkent. Az 5. ábrán bemutatott eredmények arra utalnak, hogy az IL-2 magában az állatok hosszúidejű túlélésében sokkal hatásosabb, mint az IL-2-vel és IL-12-vel vagy IL-2-vel és TNF- α -val végzett kombinációs kezelések. Ezzel szemben a hosszúidejű túlélés elősegítésében az együttes IL-2 és IFN- α kezelések az IL-2 kezeléssel szemben sokkal hatásosabb. Kontrollként az aminofluoreszceint különböző citokin kombinációkkal injektáltuk, mivel ez az anyag a foláthoz nem kötődik, és az anti-fluoreszcein ellenanyagokat a tumoros sejtekhez nem irányítja.

6. Példa

A folát-fluoreszcein-izotiocianát konjugátumok többszöri injektálásának hatása

Az eljárást az 1. példában leírtaknak megfelelően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy mindegyik állatot intraperitoneálisan 48 órás időközönként hatszor injektáltuk (a tumorsejtek implantációja után a 7., 9., 11., 13., 15. és 17. napokon 1500 nmol/kg folát-FITC-vel). A 6. ábrán az eredmények az mutatják, hogy a folát-FITC-vel végzett többszöri injektálás az állatok hosszúidejű túlélését a folát-FITC és IL-2 esetében javította, összevetve a tumorimplantáció utáni 4. és 7. napokon adott két folát-FITC-vel.

7. Példa

A folát-fluoreszcein-izotiocianát konjugátumok és az IL-2 szinergista hatása

Az eljárást az 1. példában leírtaknak megfelelően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy az állatokat 1500 nmol/kg folát-FITC-vel injektáltuk, és néhány állatot vagy csak folát-FITC-vel vagy csak IL-2-vel kezeltünk. Továbbá a tumorsejteket az 5. példában leírtaknak megfelelően intraperitonálisan implantáltuk. Ezt a kísérletet (lásd a 7. ábrát) arra használtuk fel, hogy a tumort hordozó egerek hosszúidejű túlélésében a folát-FITC és az IL-2 szinergista kölcsönhatását meghatározzuk. A kontroll csoport (n = 8) medián túlélése és az IL-2, folát-FITC, vagy folát-FITC + IL-2 kezelt csoportok (n = 8) medián túlélése 18, 19, 22 illetőleg 42 nap. A 7. ábrán bemutatott eredmények arra utalnak, hogy a folát-FITC és az IL-2 a tumort hordozó egerek hosszúidejű túlélését erőteljesen

szinergizálják, az alacsony dózis IL—2 magában az egerek túlélésére elhanyagolható hatással van, ha folát-FITC nincs jelen, és folát-FITC-vel csak kis mértékű.

8. Példa

Az NK-sejtek szerepe a folát-fluoreszcein-izotiocianát konjugátumok és az IL-2 szinergista hatásában

Az eljárás megközelítően azonos a 7. példában leírttal, azzal az eltéréssel, hogy a folát-FITC és IL-2 kombinációs kezeléskor az állatok egyik csoportját poliklonális nyúl anti-egér NK-sejt ellenanyagokkal oltottuk (anti-asialo GMI; Walco Pure Chemical Industries, Ltd., Richmond, Va.). Az NK-sejtek kimerítéséhez mindegyik egeret 0,2 ml 1:10 arányban hígított ellenanyag tözskészítménnyel injektáltuk a tumorimplantáció után 1, 4, 9 és 14 nappal. A kontroll medián túlélése és a folát-FITC + IL-2, vagy folát-FITC + IL-2 + α -NK Ab csoportok medián túlélése a következő: 18, 42 illetve 18,5 nap. Az eredmények azt mutatják (8. ábra), hogy az NK-sejtek a tumort hordozó egerek hosszúidejű túlélésének szinergista fokozását közvetítik a folát-FITC és IL-2 kombinációs kezeléskor.

9. Példa

Az M109 tumorsejtek ellen celluláris immunitás kialakítása

Ez az eljárás nagyon hasonlít az 1. példában leírtakhoz, azzal az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. példában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk, és az állatokat a következőkkel

injektáltuk: PBS (kontroll), vagy együttesen folát -FITC-vel (1500 nmol/kg), IL-2-vel (250000 nemzetközi egység/dózis) és IFN- α -val (25,000 egység/dózis), a tumorsejtek implantációja után a 7., 8., 9., 11. és 14. napokon. Továbbá az állatokat a tumorsejtek implantációja után a 62. napon 5×10^5 M109 sejteknek, a 96. napon $1,5 \times 10^6$ M109 sejteknek, vagy a 127. napon $2,5 \times 10^5$ 1. sejtvonallal (ez egy Balb/c spontán tüdőkarcinóma) kihívásnak tettük ki.

Ahogy azt a 9. ábrán bemutattuk a kontroll egerek medián túlélése, melyeket 5×10^5 M109 sejttel injektáltunk, 18,5 nap. A kontroll egerek medián túlélése, melyeket $1,5 \times 10^6$ M109 sejttel injektáltunk, 18 nap. A kontroll egerek medián túlélése, melyeket $2,5 \times 10^5$ 1. sejtvonallal injektáltunk, 23,5 nap. Az 5×10^5 M109 sejttel injektált és folát-FITC-vel és kombinációban IL-2-vel és IFN- α kezelt egerek túlélése, melyek kihívása a 62. napon 5×10^5 M109 sejttel, a 96 napon $1,5 \times 10^6$ M109 sejttel, és a 125. napon $2,5 \times 10^5$ 1. sejtvonallal történt, több mint 192 nap.

A 9. ábrán az eredmények azt mutatják, hogy egy hosszú ideig tartó, sejtspecifikus immunitás alakul ki az IL-2-vel és IFN- α -val kombinált folát-FITC-vel kezelt állatokban. Ez a hosszú ideig tartó immunitás az M109 sejtekkel implantált állatokat megvédte és a folát irányú immunterápia alapján kezelt állatok betegségének kiújulását megakadályozta a megadott időpontokban M109 sejtekkel végzett injektálás ellenére. Ezen állatok túlélési ideje az 1. sejtvonallal végzett utolsó kihívás után az 1. sejt-

vonásban lévő alacsonyabb M109 sejt tartalomnak köszönhető, de a M109 specifikus celluláris immunválasz az 1. sejtvonallra így is érvényesül.

10. Példa

Az IL-2 hatása a folát-fluoreszcein-izocianát konjugátumokkal kezelt erek túlélésére:

Ez az eljárás nagyon hasonlít az 1. példában leírtakhoz, azaz az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. példában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk, és az állatokat a következőkkel injektáltuk: PBS (kontroll), vagy együttesen folát-FITC-vel (1500 nmol/kg) és IL-2 következő dózisaival: 5×10^3 nemzetközi egység (1 X), $0,5 \times 10^5$ nemzetközi egység (10 X), $2,5 \times 10^5$ nemzetközi egység (50 X), vagy 5×10^5 nemzetközi egység (100 X), a tumorsejtek implantációját követő 7., 8., 9., 11. és 14. napokon. Továbbá az állatokat a FITC-jelölt BSA helyett FITC-jelölt tengeri kulcslyuk kagyló hemocianinnal (KLH) immunizáltuk. Ahogy az a 10. ábrán bemutattuk az egerek túlélési ideje, melyeket az M109 sejtekkel oltottunk, és folát-FITC-vel kezeltünk, az IL-2 növekvő dózisaival nőtt, 5×10^3 nemzetközi egység IL-2 dózistól. Ezzel szemben a kontroll egerek (melyeket M109 sejtekkel injektáltunk és PBS-sel kezeltünk) és a csak IL-2-vel kezelt egerek közt lényeges különbség nem mutatkozott.

11. Példa

Az IFN- α hatása a folát-fluoreszcein-izotiacianáttal és IL-2-vel kezelt egerek túlélésének fokozására

Ez az eljárás nagyon hasonlít az 1. példában leírtakhoz, azaz az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. példában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk, és az állatokat a következőkkel injektáltuk: PBS (kontroll), vagy együttesen folát-FITC-vel (1500 nmol/kg) és IL-2-vel (5000 nemzetközi egység/dózis) vagy folát-FITC-vel (1500 nmol/kg), IL-2-vel (5000 nemzetközi egység/dózis) és IFN- α -val (25000 egység/dózis) a tumorsejtek implantációját követő 7., 8., 9., 11. és 14. napokon. Továbbá az állatokat együttesen folát-FITC-cel, IL-2-vel és IFN- α -val kezeltük, de az állatokat előzőleg BSA-FITC-vel nem immunizáltuk. A 11. ábra bemutatja, hogy a medián túlélési idő a PBS-sel kezelt kontroll állatoknál 18,5 nap, az együttesen folát-FITC-vel és IL-2-vel kezelt állatoknál 20,5 nap, az együttesen folát-FITC-vel, IL-2-vel és IFN- α -val kezelt állatoknál több mint 60 nap, és az együttesen folát-FITC-vel, IL-2-vel és IFN- α -val kezelt állatoknál, de melyek előimmunizálásban nem vettek részt, a túlélési idő 24,3 nap. A folát-FITC-vel és IL-2-vel injektált egerek medián túlélési ideje lényegesen nem különbözött a kontroll egerektől, mivel ezeket 5000 nemzetközi egység IL-2-vel injektáltuk, és ahogy azt a 10. példában leírtuk, a folát-FITC-vel kezelt állatoknál a 7., 8., 9., 11. és 14. napokon végzett kezeléseknél az IL-2 5000 nemzetközi egység feletti dózisa a medián túlélési időt növeli. Az 11. ábra bemutatja az eredményeket, melyek arra utalnak, hogy az IFN- α

a medián túlélési időt növekedést fokozza, mivel a tumorsejtekkel implantált egereket folát-FITC-vel és IL-2-vel kezeltük.

12. Példa

A CD81⁺ T-sejtek kimerítésének hatása a folát irányú immunoterápiában

Az eljárást az 1. példában leírtakkal lényegében megegyezően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. példában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk, és az állatokat a következőkkel injektáltuk: PBS (kontroll), vagy együttesen folát-FITC-vel (1500 nmol/kg) és IL-2-vel (5000 nemzetközi egység/dózis) és IFN- α -val (25000 egység/dózis) a tumorsejtek implantációját követő 7., 8., 9., 11. és 14. napokon. Az egerek további csoportjait a következő kombinációkkal oltottuk: aminoszínkeinnel (1500 nmol/kg), IL-2-vel, és IFN- α -val vagy folát-FITC-vel, IL-2-vel, IFN- α -val és anti-CD8⁺ T-sejt ellenanyaggal (aszites formába és a 2., 3., 7., 11. és 15. napokon). Ahogy azt a 12. ábra mutatja az anti-CD8⁺ T-sejt ellenanyag a folát-FITC, IL-2 és IFN- α kezelt állatok átlag túlélésének növekedését gátolja, ami arra utal, hogy CD8⁺ T sejtek a folát irányú immunoterápiában, a celluláris immunválasz aktiválásában, szerepet játszik. Az aminoszínkeint az IL-2, IFN- α citokin kombinációban kontrollként használtuk, mivel ez a vegyület a foláttal nem kötődik és a tumorsejtek irányába az aminoszínkeinnel ellenanyagokat nem tereli. A 12. ábra bemutatja, hogy az aminoszínkeinnel az M109 sejtekkel implantált egerek

medián túlélésében az IL-2-vel és az IFN- α -val kombinációban kevésbé hatásos mint a folát-FITC, IL-2 és IFN- α kombinált kezelése.

13. Példa

A GM-CSF fokozó hatása az IL-2-vel és IFN- α -val felerősített folát irányú immunterápiában

Az eljárást az 1. példában leírtakkal lényegében megegyezően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. példában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk. Továbbá, ahogy azt a 13. ábrán jeleztük, az állatokat több dózis citokinekkel oltottuk, beleértve IL-2-vel (5000 nemzetközi egység/dózis), IFN- α -val (25000 egység/dózis) és GM-CSF-fel (3000 egység/dózis). A citokineket 5 napig az M109 sejtek implantációját követő 8-12. napokon együttesen adtuk be, mely állatokat a 4. és a 7. napokon két dózis 1500 nmol/kg folát-FITC-vel oltottuk. A 13. ábrán feltüntetett eredmények azt mutatják, hogy a PBS-sel kezelt állatok medián túlélése 19 nap, az IL-2-vel, IFN- α -val, de folát-FITC-cel nem oltott állatok medián túlélése 22 nap, a folát-FITC-vel, IL-2-vel és IFN- α -val oltott állatok medián túlélése 38 nap, és a folát-FITC-vel, IL-2-vel, IFN- α -val és GM-CSF-fel oltott állatok medián túlélése 57,5 nap. Az eredmények azt mutatják, hogy a GM-CSF a folát irányú tumorsejt pusztítást tovább fokozza, az IL-2 és IFN- α -val kezelt egereknél. A PBS, IL-2, IFN- α és GM-CSF injektált egerek medián túlélése a kontroll egerek túlélésétől szignifikánsan nem különbözött, ami arra utal, hogy a

folát-FITC-t használatakor a tumorspecifikus immunválasz irányítása jelentős.

14. Példa

Az IFN- α dózishatása a folát-fluoreszcein-izocianát konjugátumokkal kezelt egerek túlélésére

Az eljárást az 1. példában leírtakkal lényegében megegyezően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. példában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk, és az állatokat a következőkkel injektáltuk: PBS (kontroll), vagy együttesen folát-FITC-vel (1500 nmol/kg) és IFN- α -val a következő dózisokkal: $1,5 \times 10^5$ nemzetközi egység/dózis (6X), $7,5 \times 10^4$ nemzetközi egység/dózis (3X), $2,5 \times 10^4$ nemzetközi egység/dózis (1X) és $7,5 \times 10^3$ nemzetközi egység/dózis (0,3X). Továbbá az állatokat FITC-jelölt BSA helyett tengeri kulcslyuk kagyló hemocianinnal (KLH) immunizáltuk, és az állatokat folát-FITC-vel és IFN- α -val a tumorsejtek implantációját követő 7., 8., 9., 11. és 14. napokon oltottuk. Ahogy azt a 14. ábrán bemutattuk az M109 sejtekkel implantált és folát-FITC-vel kezelt egerek medián túlélésének növekedését az IFN- α növekvő dózisaival, $0,8 \times 10^4$ nemzetközi egység/dózis felett, fokozzák.

15. Példa

A dinitrofenil immunogén hatása a folát irányú immunterápiában

Az eljárást az 1. példában leírtakkal lényegében megegyezően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. pél-

dában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk, és az állatokat a következőkkel injektáltuk: PBS (kontroll), vagy együttesen dinitrofenillel (DNP) (1500 nmol/kg), IL-2-vel (5000 nemzetközi egység/dózis), IFN- α -val (25000 egység/dózis), vagy folát-dinitrofenillel (1500 nmol/kg), IL-2-vel (5000 nemzetközi egység/dózis/nap) és IFN- α -val ($2,5 \times 10^4$ egység/nap) a tumorsejtek implantációját követő 7., 8., 9., 11. és 14. napokon. Továbbá az állatokat DNP-vel jelölt tengeri kulcslyuk kagyló hemocianinnal (KLH) immunizáltuk. Ahogy azt a 15. ábrán bemutattuk a folát-DNP-vel, IL-2-vel és IFN- α -val kezelt egerek medián túlélési ideje a kontroll egerekhez képest (PBS-sel kezelt egerek) vagy a DNP-vel, IL-2-vel és IFN- α -val kezelt egerekhez képes megnőtt. Így a DNP a folát irányú immunterápiában szintén hatásos immogén.

16. Példa

A folát-fluoreszcein-izocianát konjugátumok és az IFN- α szinergista hatása

Az eljárást az 1. példában leírtakkal lényegében megegyezően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. példában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk, és az állatokat a következőkkel injektáltuk: PBS (kontroll), IFN- α -val magában ($7,5 \times 10^4$ egység/nap), folát-FITC-vel magában (1500 nmol/kg) vagy együttesen folát-FITC-vel (1500 nmol/kg) és IFN- α -val ($7,5 \times 10^4$ egység/nap) a tumorsejtek implantációját követő 7., 8., 9., 11. és 14. napokon. Továbbá az állatokat (csoporton-

ként 5) FITC jelölt tengeri kulcslyuk kagyló hemocianinnal (KLH) immunizáltuk FITC jelölt BSA helyett. Ahogy azt a 16. ábrán bemutattuk a PBS-sel kezelt csoport (kontroll), a folát-FITC, vagy a folát-FITC + INF- α csoport medián túlélési ideje 17, 17, 23 illetve 33 nap. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az IFN- α , mint a IL-2, a folát-FITC-vel szinergikus hatást fejt ki, elősegítve a tumort hordozó egerek hosszúidejű túlélését.

17. Példa

A dinitrofenil immunogén és a citokinek magas dózisának hatása az egerek hosszúidejű túlélésére

Az eljárást az 1. példában leírtakkal lényegében megegyezően végeztük, azzal az eltéréssel, hogy a tumorsejteket az 5. példában leírt helyre intraperitoneálisan implantáltuk, és az állatokat a következőkkel injektáltuk: PBS (kontroll) vagy IL-2-vel ($2,5 \times 10^5$ nemzetközi egység/dózis), IFN- α -val ($7,5 \times 10^4$ egység/dózis) vagy folát-dinitrofenillel (DNP) (1500 nmol/kg), IL-2-vel ($2,5 \times 10^5$ egység/nap) és IFN- α -val ($7,5 \times 10^4$ egység/nap) a tumorsejtek implantációját követő 7., 8., 9., 11. és 14. napokon. Továbbá az állatokat DNP jelölt tengeri kulcslyuk kagyló hemocianinnal (KLH) immunizáltuk. Ahogy azt a 17. ábrán láthatjuk a folát-DNP, IL-2 és INF- α -val kezelt egerek medián túlélési ideje a kontrollhoz képest (az egereket PBS-sel kezeltük) vagy a PBS, IL-2 és IFN- α -val kezeltékhez képest megnőtt. A folát-DNP-vel, IL-2-vel és IFN- α -val (az IL-2 és az IFN- α kon-

centrációi $2,5 \times 10^5$ egység/nap, illetőleg $7,5 \times 10^4$ egység/nap)
kezelt egerek teljesen meggyógyultak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Ligandum immunogén konjugátum használata, mely ligandum és immunogén komplexet tartalmaz, amelyben a szóban forgó immunogént a gazdaállatban az endogén vagy exogén ellenanyag közvetlenül felismeri, vagy

terápiás faktor, ahol a szóban forgó terápiás faktort a következő csoportból választjuk ki: sejtpusztító szerek, tumorszövetekbe behatolást fokozó anyagok, kemoterápiás szerek, antimikrobiális ágensek, citotoxikus immunsejt, és a vegyület az endogén immunválaszt stimulálására képes, melyben a vegyület a ligand-immunogén konjugátumhoz nem kötődik,

gyógyszerek előállításában, melyeket a szóban forgó populációt hordozó gazdaállatban a patogén sejtpopulációk eltávolítására a specifikus endogén immunválasz fokozásán keresztül alkalmaznak, melyben a szóban forgó sejtpopuláció a ligand számára hozzáférhető hellyel rendelkezik, a szóban forgó eljárás a szóban forgó gazdába a ligand-immunogén konjugátum és a terápiás faktor beadási lépését foglalja magában.

2. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a patogén sejtpopuláció a rákos sejtek populációja.

3. A 2. igénypont szerinti használat, melyben a rákos sejtek populációja tumorigén.

4. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a patogén sejtek populációja exogén patogén vagy exogén patogéneket hordozó endogén sejtpopuláció.

5. A 4. igénypont szerinti használat, melyben az exogén patogént a következők közül választjuk ki: baktériumok, gombák, vírusok, mikoplazma és paraziták.

6. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a ligandum vitamin, mely a sejtmembránon lévő receptorokhoz képes specifikusan kapcsolódni.

7. A 6. igénypont szerinti használat, melyben a ligandumot a következők közül választjuk ki: folsav és egyéb folát-receptort kötő ligand.

8. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a ligandum és az immunogén kovalens kötésen, ionos kötésen vagy hidrogén-kötésen keresztül komplexben van.

9. A 8. igénypont szerinti használat, melyben a ligandum olyan folsav analóg, melynek glutamilcsoportja az immunogénhez kovalensen csak a ligandum γ -karboxilcsoportján keresztül kötődik.

10. A 8. igénypont szerinti használat, melyben a ligandum olyan folsav analóg, melynek glutamilcsoportja az immunogénhez csak a ligandum α -karboxilcsoportján keresztül kötődik kovalensen.

11. A 9. vagy a 10. igénypont szerinti használat, melyben a kovalens kapcsolat az immunogén és a ligandum között közvetlen kovalens kötődést jelent az immunogénhez, vagy egy kétértékű linkeren keresztül biztosított kovalens kötődést.

12. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a ligandum a receptorhoz kötődni képes kis szerves molekula, és amelyben a

receptor a szóban forgó patogén populáció sejtjeinek felszínén elsődlegesen, egyedien vagy túlzott mértékben kifejeződik.

13. A 12. igénypont szerinti használat, melyben a kis szerves molekula antimikrobiális gyógyszer.

14. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a ligand β -laktám antibiotikum.

15. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a ligand kötőhelye egy antigén, mely a metasztatizáló ráksejteken elsődlegesen, egyedien vagy túlzott mértékben kifejeződik.

16. A 15. igénypont szerinti használat, melyben a ligand kötőhelye az EphA2.

17. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben az immunogén szerves molekula, melynek molekulatömege kevesebb mint 20000 Dalton.

18. A 17. igénypont szerinti használat, melyben a szerves molekula fluoreszcein vagy dinitrofenil.

19. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben az immunogén egy α -galaktozil csoport.

20. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben az ellenanyag a szóban forgó gazdára nézve exogén, és amelyet a szóban forgó konjugátum összetétellel együtt adnak be.

21. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a terápiás faktor citokineket tartalmaz.

22. A 21. igénypont szerinti használat, melyben a terápiás faktor IL-2-t, IL-12-t, IL-15-t vagy ezek kombinációit tartalmazza.

23. A 21. igénypont szerinti használat, melyben a terápiás faktor IL-2-t, IL-12-t, IL-15-t vagy ezek kombinációit tartalmazza, amit IFN- α -val vagy IFN- γ -val kombinálnak.

24. A 21. igénypont szerinti használat, melyben a terápiás faktor IL-2-t, IL-12-t, IL-15-t vagy ezek kombinációit tartalmazza, amit IFN- α -val vagy IFN- γ -val, és ezek kombinációival és GM-CSF-fel kombinálnak.

25. A 21. igénypont szerinti használat, melyben a terápiás faktor legalább egy NK-sejtet vagy T-sejtet stimuláló anyagot tartalmaz.

26. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a ligandum-immunogén konjugátum összetételt több injekcióban adják be.

27. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a gazdaállat természetes körülmények között előzőleg immunogénnek lett kitéve, és így a gazdaállat előimmunizált a szóban forgó immunogénre, amit az immunogénre kialakult endogén ellenanyag jelenléte igazol.

28. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben a gazdaállat nem természetes körülmények között előzőleg immunogénnek lett kitéve, és így a gazdaállat előimmunizált a szóban forgó immunogénre.

29. A 28. igénypont szerinti használat, melyben a nem természetes folyamat a gazdaállat immunválaszának beindítását vakcinációval érte el.

30. A 28. igénypont szerinti használat, melyben a nem természetes folyamat a gazdaállat immunválaszának beindítását aktív immunizációval biztosította.

31. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben az endogén immunválasz humorális immunválaszt foglal magában.

32. A 31. igénypont szerinti használat, melyben a humorális válasz a szerzett immunitás válasza.

33. A 31. igénypont szerinti használat, melyben a humorális válasz a természetes immunitás válasza.

34. A 32. igénypont szerinti használat, melyben a szerzett választ a gazdaállatba beadott vakcina összetétel alakította ki.

35. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben az endogén immunválasz sejt-közvetített immunválaszt tartalmaz.

36. Az 1. igénypont szerinti használat, melyben az endogén immunválasz humorális és sejt-közvetített immunválaszt foglal magában.

37. A következők használata:

ligandumot tartalmazó komplex, mely ligandum a szóban forgó populációt és immunogént hordozó gazdaállatban lévő patogén sejtpopuláció által kifejezett kötőhelyhez kapcsolódik; vagy

immunogén ellen kialakított ellenanyagok; vagy

legalább egy további terápiás faktor, ahol a szóban forgó terápiás faktort a következő csoportból választjuk ki: sejtpusztító szerek, tumor hozzáférést fokozó anyagok, kemoterápiás szerek, antimikrobiális ágensek, citotoxikus immunsejt, és a stimuláló

anyag az endogén immunválaszt stimulálására képes, miközben a vegyület a ligand-immunogén konjugátumhoz nem kötődik,

gyógyszerek gyártásában, melyeket a szóban forgó populációt hordozó gazdaállatban a patogén sejtpopulációk eltávolítására a specifikus endogén immunválasz fokozásán keresztül alkalmaznak, ahol a szóban forgó eljárás a szóban forgó gazdába a szóban forgó komplex, a szóban forgó ellenanyagok és a szóban forgó legalább további egy terápiás faktor beadási lépését foglalja magában.

38. Kovalensen kötött immunogént tartalmazó konjugátum használata, amelyben az immunogént a gazdaállatban az endogén vagy az exogén ellenanyag ismeri fel közvetlenül a gazda immunsejtein keresztül, és a ligandum olyan folsav vagy folsavanalóg, melyben a kovalens kötés az immunogénhez csak a glutamils csoport γ -karboxil csoportján keresztül történik,

gyógyszerek gyártásában, melyeket a szóban forgó populációt hordozó gazdaállatban a patogén sejtpopulációk eltávolítására a specifikus endogén immunválasz fokozásán keresztül alkalmaznak, ahol a szóban forgó populáció sejtjeinek felszínén elsődlegesen, egyedien vagy túlzott mértékben a folsav-receptort kifejezik, ahol a szóban forgó eljárás a szóban forgó gazdába a szóban forgó konjugátum beadási lépését foglalja magában.

39. Kovalensen kötött immunogént tartalmazó konjugátum használata, amelyben az immunogént a gazdaállatban az endogén vagy az exogén ellenanyag ismeri fel közvetlenül a gazda immunsejtein keresztül, és a ligandum olyan folsav vagy folsav-

analóg, melyben a kovalens kötés az immunogénhez csak a glutamils csoport α -karboxilcsoportján keresztül történik,

gyógyszerek gyártásában, melyeket a szóban forgó populációt hordozó gazdaállatban a patogén sejtpopulációk eltávolítására a specifikus endogén immunválasz fokozásán keresztül alkalmaznak, ahol a szóban forgó populáció sejtjeinek felszínén elsődlegesen, egyedien vagy túlzott mértékben a folsav-receptor kötőhelyét kifejezik, ahol a szóban forgó eljárás a szóban forgó gazdába a szóban forgó konjugátum beadási lépését foglalja magában.

40. Kovalensen kötött immunogént tartalmazó konjugátum használata, amelyben az immunogént a gazdaállatban az endogén vagy az exogén ellenanyag ismeri fel közvetlenül a gazda immunsejtjein keresztül, és a ligandum olyan folsav vagy folsavanalóg, melyben a kovalens kötés csak a glutamils csoport γ -karboxilcsoportján keresztül történik,

legalább egy további terápiás faktor, ahol a szóban forgó terápiás faktort a következő csoportból választjuk ki: sejtpusztító szerek, tumor hozzáférést fokozó anyagok, kemoterápiás szerek, antimikrobiális ágensek, citotoxikus immunsejt, és a vegyület az endogén immunválaszt stimulálására képes, melyben a vegyület a ligand-immunogén konjugátumhoz nem kötődik,

gyógyszerek gyártásában, melyeket a szóban forgó populációt hordozó gazdaállatban a patogén sejtpopulációk eltávolítására a specifikus endogén immunválasz fokozásán keresztül alkalmaznak, ahol a szóban forgó populáció sejtjeinek felszínén elsődlegesen, egyedien vagy túlzott mértékben a folsav-receptort

kifejezi, ahol a szóban forgó eljárás a szóban forgó gazdába a szóban forgó konjugátum és a szóban forgó terápiás faktor beadási lépését foglalja magában.

41. Kovalensen kötött immunogént tartalmazó konjugátum használata, amelyben az immunogént a gazdaállatban az endogén vagy az exogén ellenanyag ismeri fel közvetlenül a gazda immunsejtjein keresztül, és a ligandum olyan folsav vagy folsav-analóg, melyben a kovalens kötés csak a glutamilcsoport α -karboxilcsoportján keresztül történik,

legalább egy további terápiás faktor, ahol a szóban forgó terápiás faktort a következő csoportból választjuk ki: sejtpusztító szerek, tumor hozzáférést fokozó anyagok, kemoterápiás szerek, antimikrobiális ágensek, citotoxikus immunsejt, és a vegyület az endogén immunválasz stimulálására képes, melyben a vegyület a ligandum-immunogén konjugátumhoz nem kötődik,

gyógyszerek gyártásában, melyeket a szóban forgó populációt hordozó gazdaállatban a patogén sejtpopulációk eltávolítására a specifikus endogén immunválasz fokozásán keresztül alkalmaznak, ahol a szóban forgó populáció sejtjeinek felszínén elsődlegesen, egyedien vagy túlzott mértékben a folsav-receptort kifejezik, ahol a szóban forgó eljárás a szóban forgó gazdába a szóban forgó konjugátum és a szóban forgó terápiás faktor beadási lépését foglalja magában.

42. Gyógyszerészeti összetétel, mely a ligandum-immunogén konjugátum terápiásan hatásos mennyiséget tartalmazza, mely a gazdaállatban a patogén populációk sejtjeihez specifiku-

san képes kötődni, a szóban forgó sejtek specifikus eltávolítására a gazdában a szerzett vagy természetes immunválasz sejtjei segítségével, az együttesen adott ellenanyagokkal vagy a gazdában közvetlenül az immunsejteken keresztül, ahol a szóban forgó terápiás faktort a következő csoportból választjuk ki: sejtpusztító szerek, tumor hozzáférést fokozó anyagok, kemoterápiás szerek, antimikrobiális ágensek, citotoxikus immunsejt, és a vegyület az endogén immunválaszt stimulálására képes, melyben a vegyület a ligand-immunogén konjugátumhoz nem kötődik, és gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaz.

43. A 42. igénypont szerinti gyógyszerészeti összetétel, mely parenterális, megnyújtott kibocsátású dóziszformát jelent.

44. A 42. igénypont szerinti gyógyszerészeti összetétel, melyben a terápiás faktor immunstimuláló szer.

45. A 44. igénypont szerinti gyógyszerészeti összetétel, melyben az immunstimulálót a következő csoportból választjuk ki: IL-2, IL-12, IL-15, IFN- α , IFN- γ és GM-CSF, valamint ezek kombinációi.

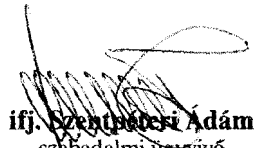
46. Gyógyszerészeti összetétel, mely a ligandum-immunogén konjugátum terápiásan hatásos mennyiséget tartalmazza a gazdaállatban a patogén populációk sejtjeinek jelzéséhez a szóban forgó sejtek specifikus eltávolítására az endogén immunválasz vagy az együttesen adott ellenanyagok segítségével, melyben a ligandum vitamin és az immunogén haptén, és gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaz.

47. A 46. igénypont szerinti gyógyszerészeti összetétel, melyben a vitamin folsav.

48. A 46. vagy a 47. igénypont szerinti gyógyszerészeti összetétel, melyben a haptén fluoreszcein vagy dinitrofenil.

49. A 48. igénypont szerinti gyógyszerészeti összetétel, melyben a ligandum-immunogén konjugátum a folsavval konjugált fluoreszcein-izotiocianát, ahol a gamma-karboxil etiléndiamin hídon keresztül kapcsolt (folát-FITC).

50. A folát-FITC használata gyógyszergyártásban a gazdaállatban a patogén sejtek populációinak jelölésére, és az endogén immunválasszal vagy az együttesen beadott ellenanyagokkal megvalósított specifikus eltávolításukhoz.


ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

54 oldal leírás

17 oldal rajz

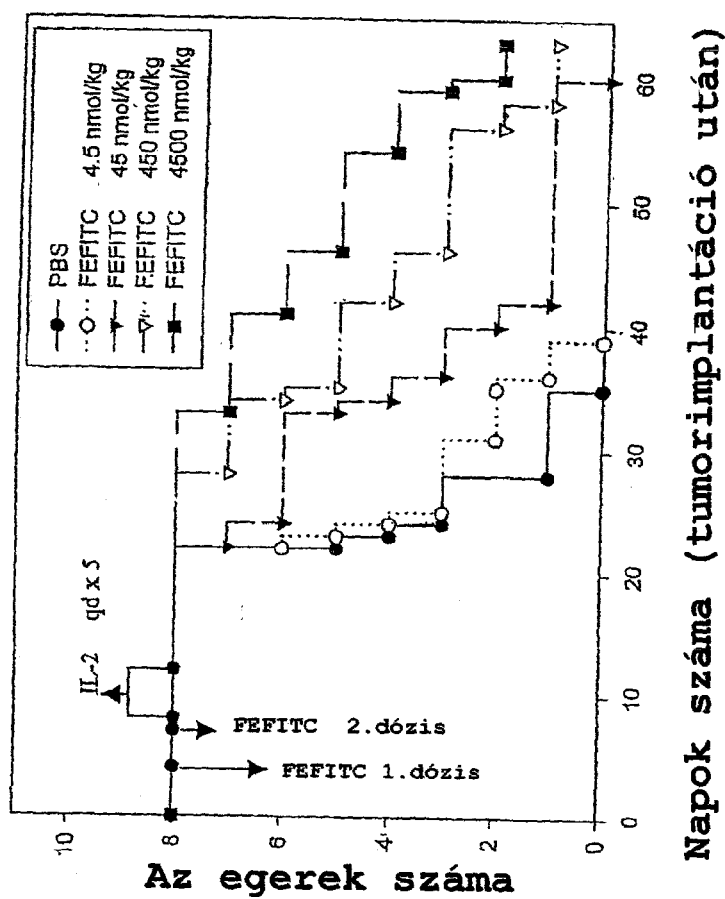
71 oldal

Zoltán Andor

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

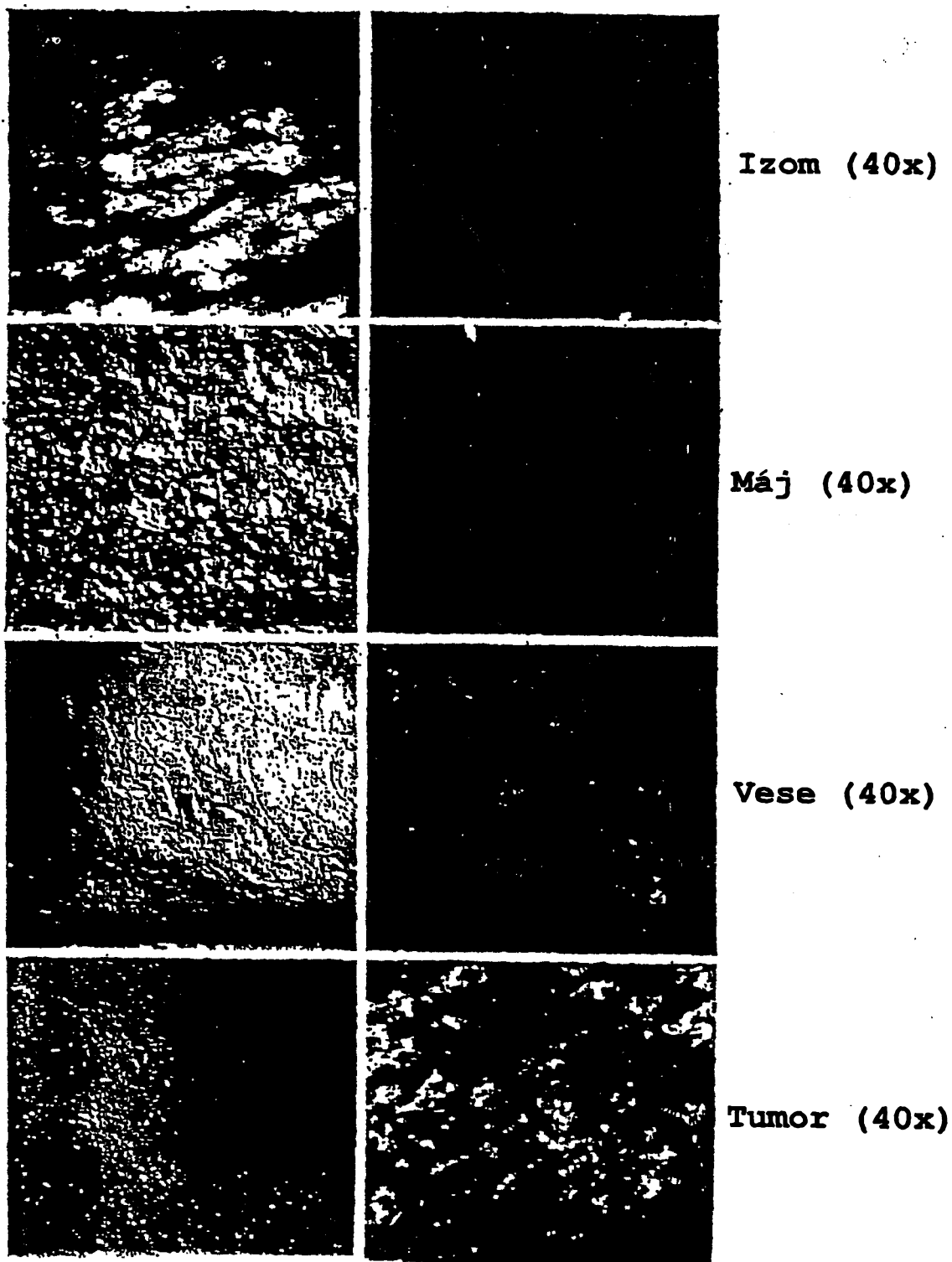
1. ÁBRA

A folát irányú immunterápia hatása a tüdő tumor
implantátumos egerek túlélésére



2. ÁBRA

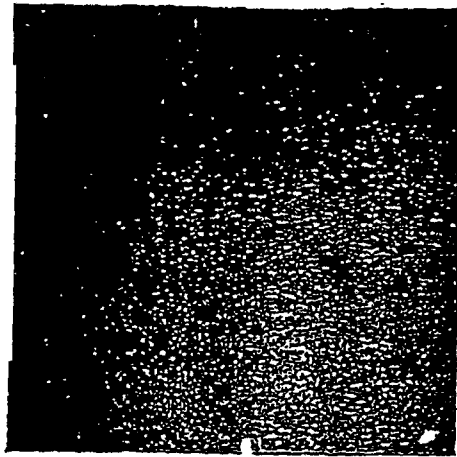
A 24JK-FBP tumor képei



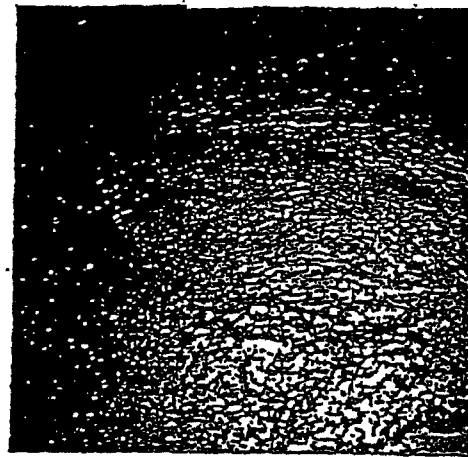
Fáziskontraszt kép

FITC fluoreszcencia

3. ÁBRA

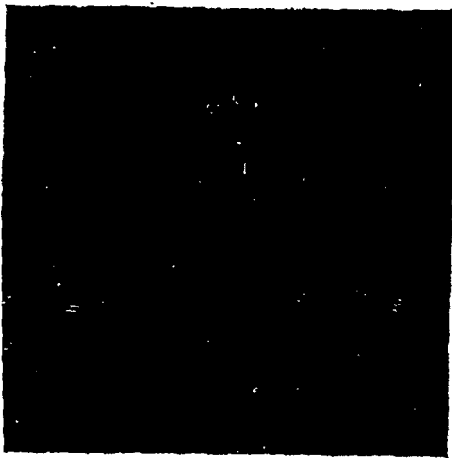


Con-pe-t.tif



Fic-pe-t.tif

transzmissziós kép

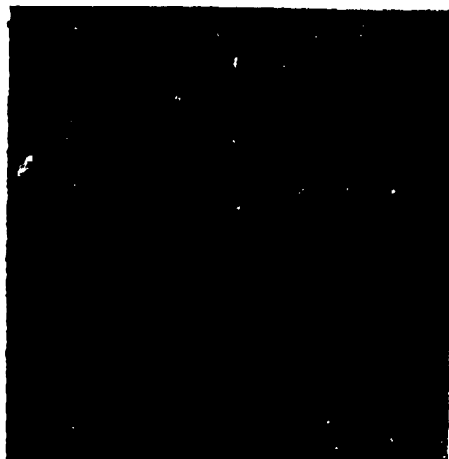


Con-pe-r.tif



Fic-pe-r.tif

PE kép



Con-pe-g.tif



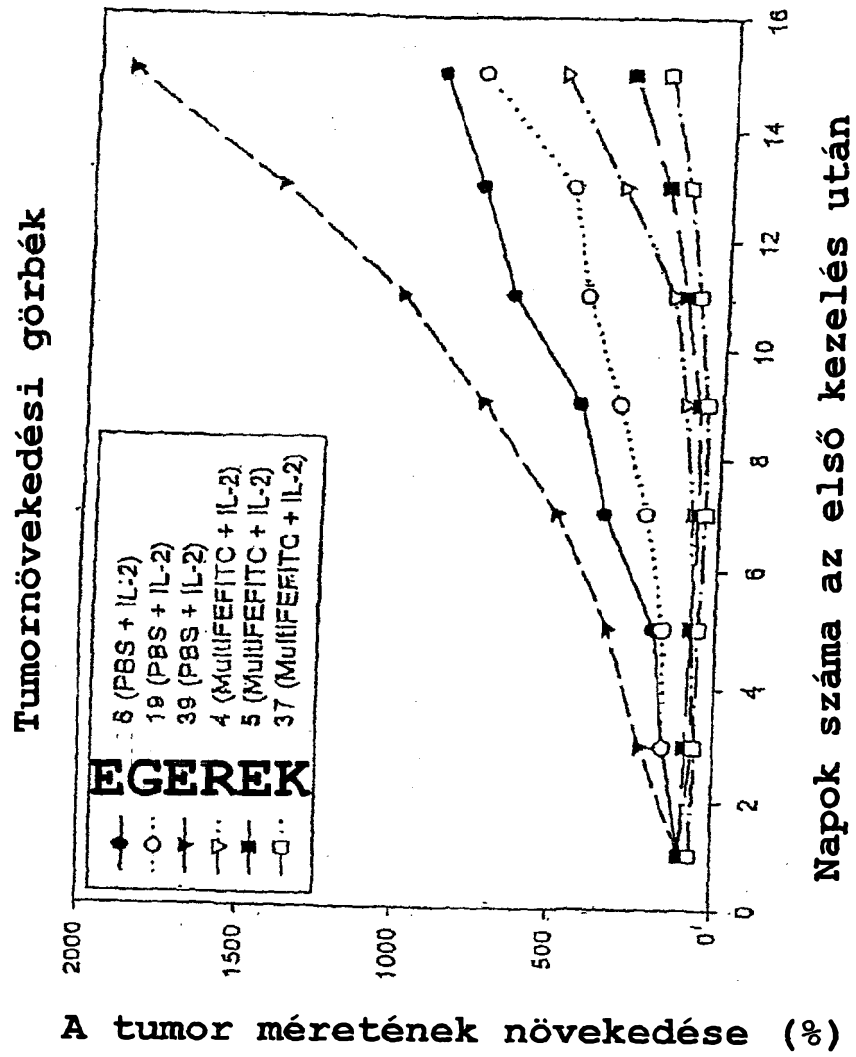
Fic-pe-g.tif

FITC kép

Kezeletlen

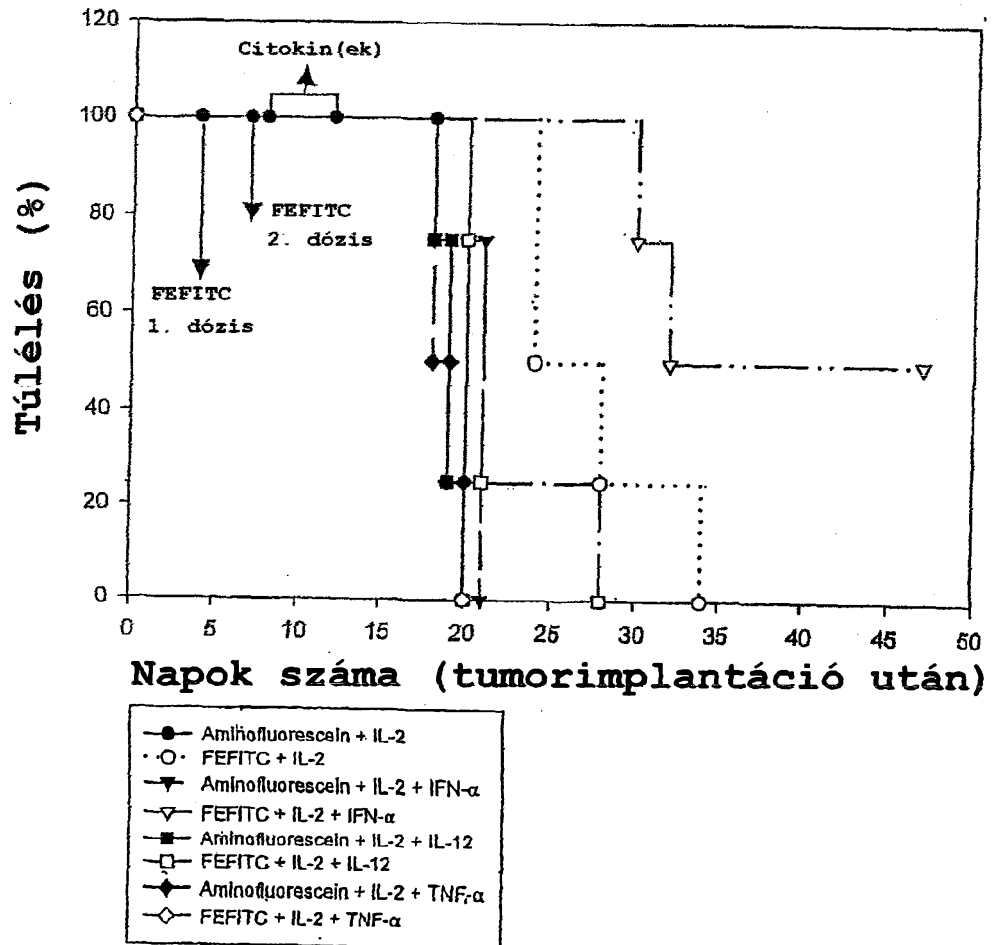
Folát-FITC kezelet

4. ÁBRA

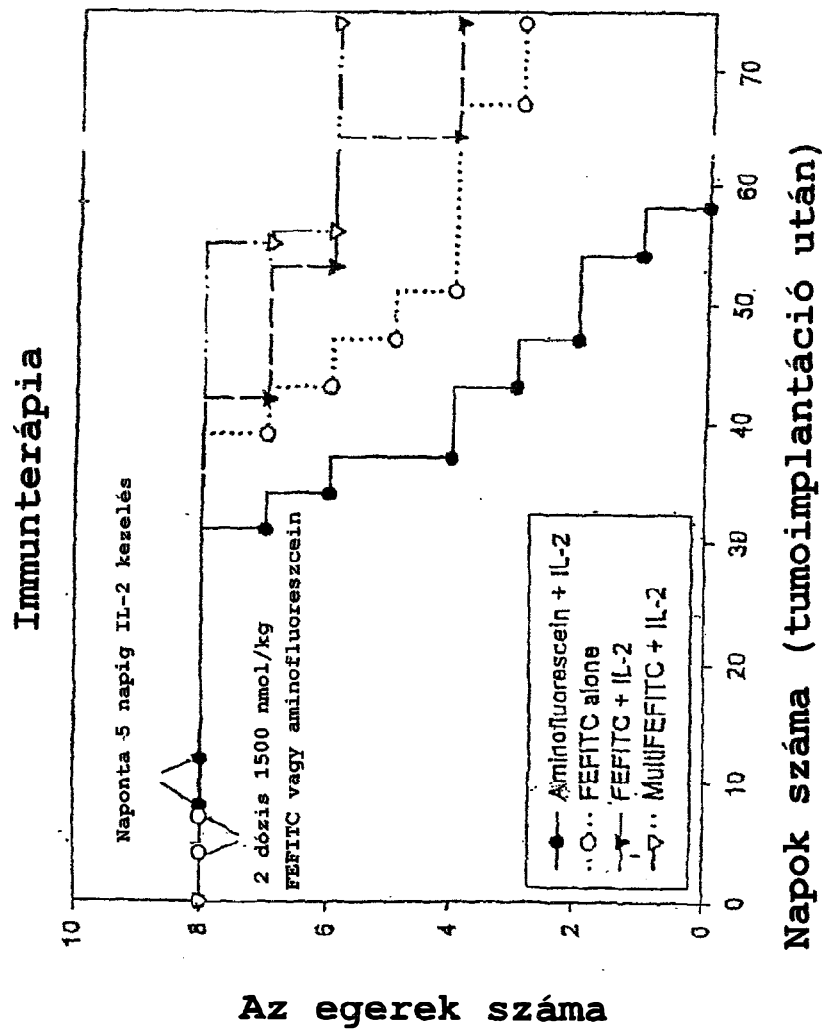


5. ÁBRA

A citokin kombinációk hatása a folát irányú immunterápiára

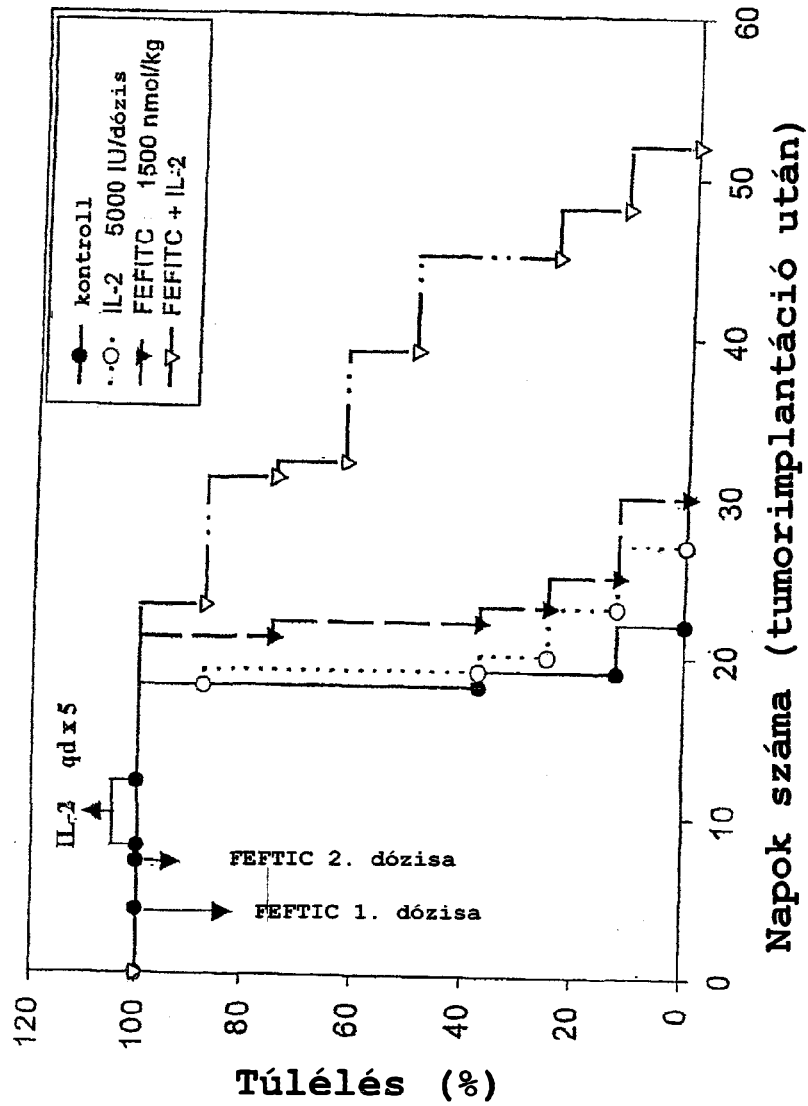


6. ÁBRA



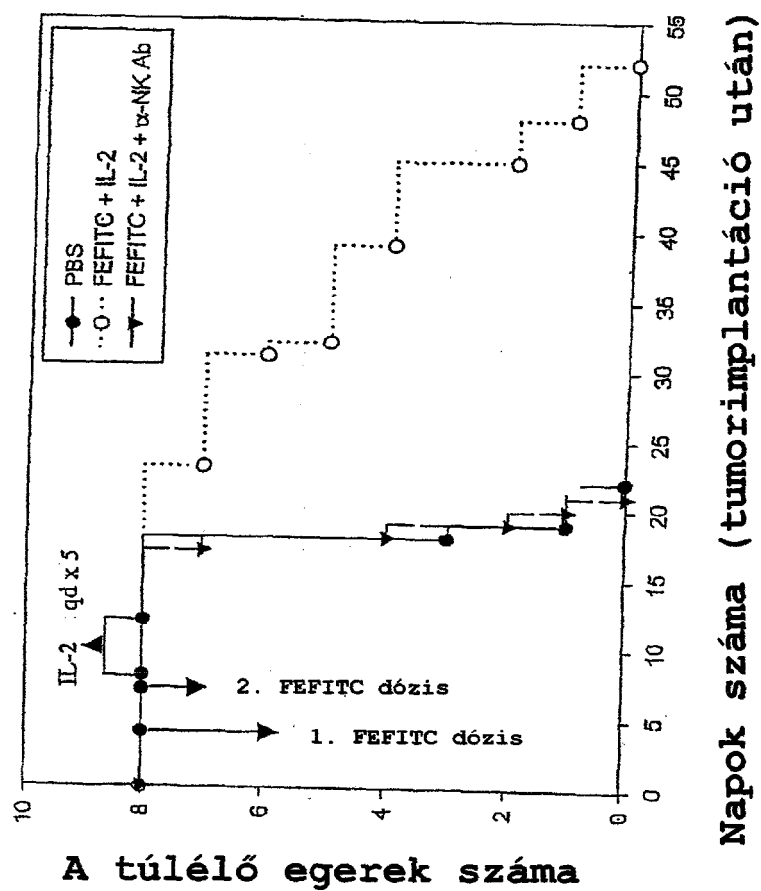
7. ÁBRA

A FEFITC és az IL-2 szinergizmusa
a folát irányú immunterápiában



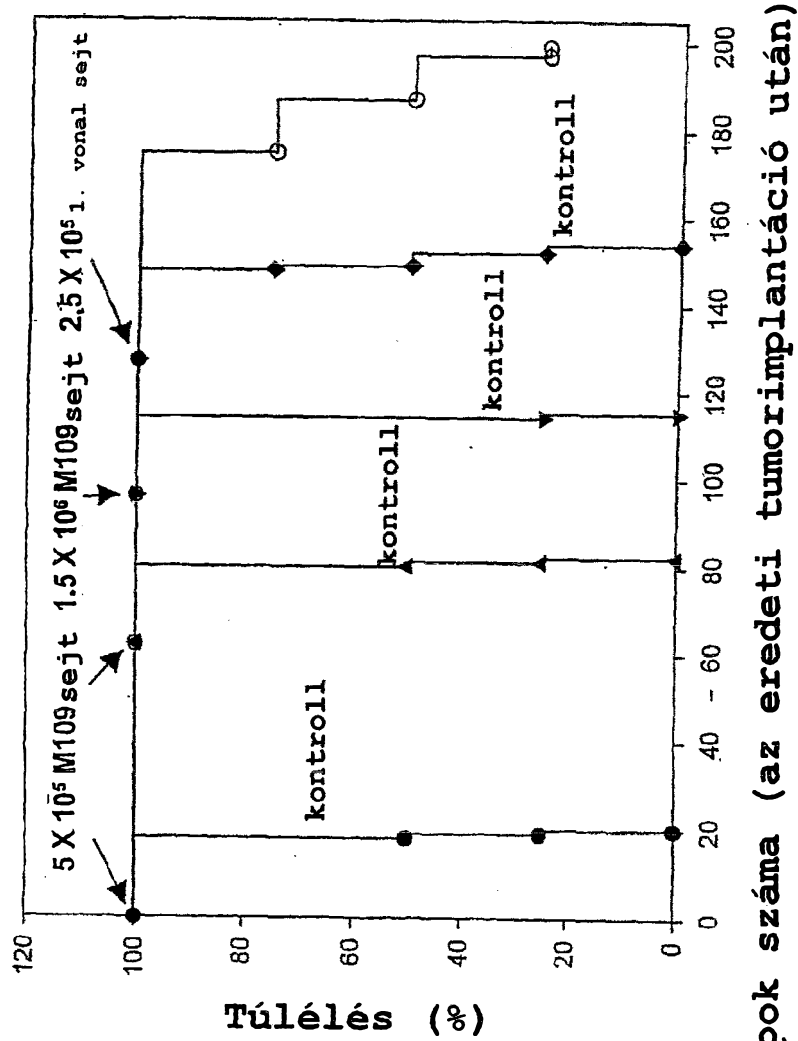
8. ÁBRA

A folát irányú immunterápiában az NK-sejtek kimerítésének hatása egérben



9. ÁBRA

A parenterális M109 tumoros sejtekre
kialakuló celluláris immunitás



-○-

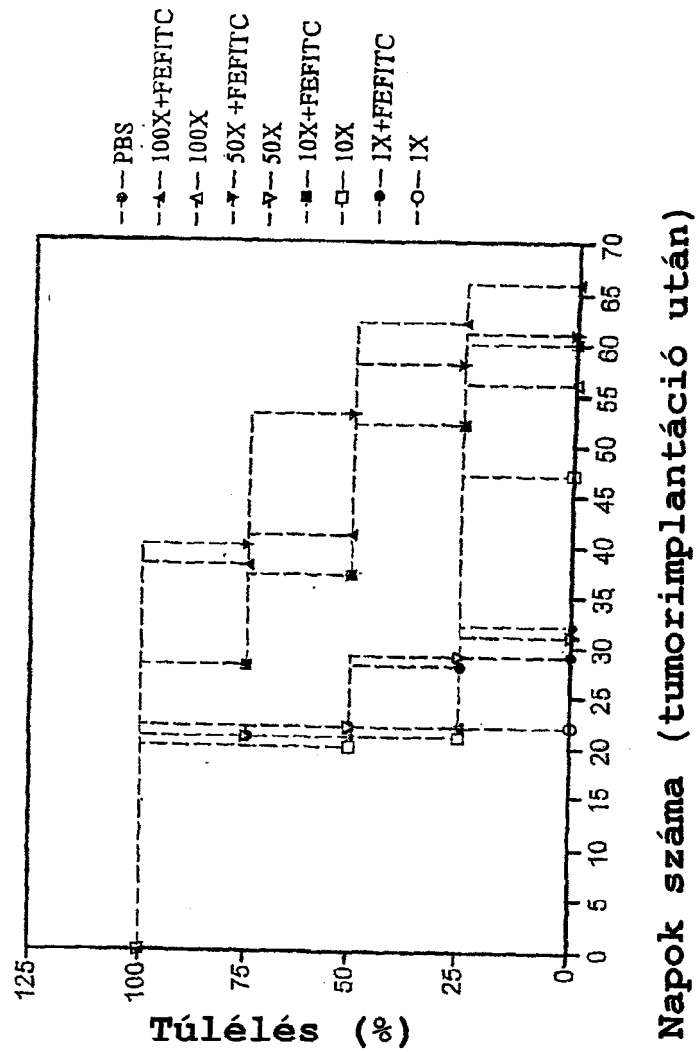
FEFITC (1500 nmol/kg), IL-2 (250000 IU/nap) és INF-alfa (25000 U/nap)

-●-▲-▼-◆-

PBS kontroll csoportok a megfelelő tumorimplantációs időpontokban

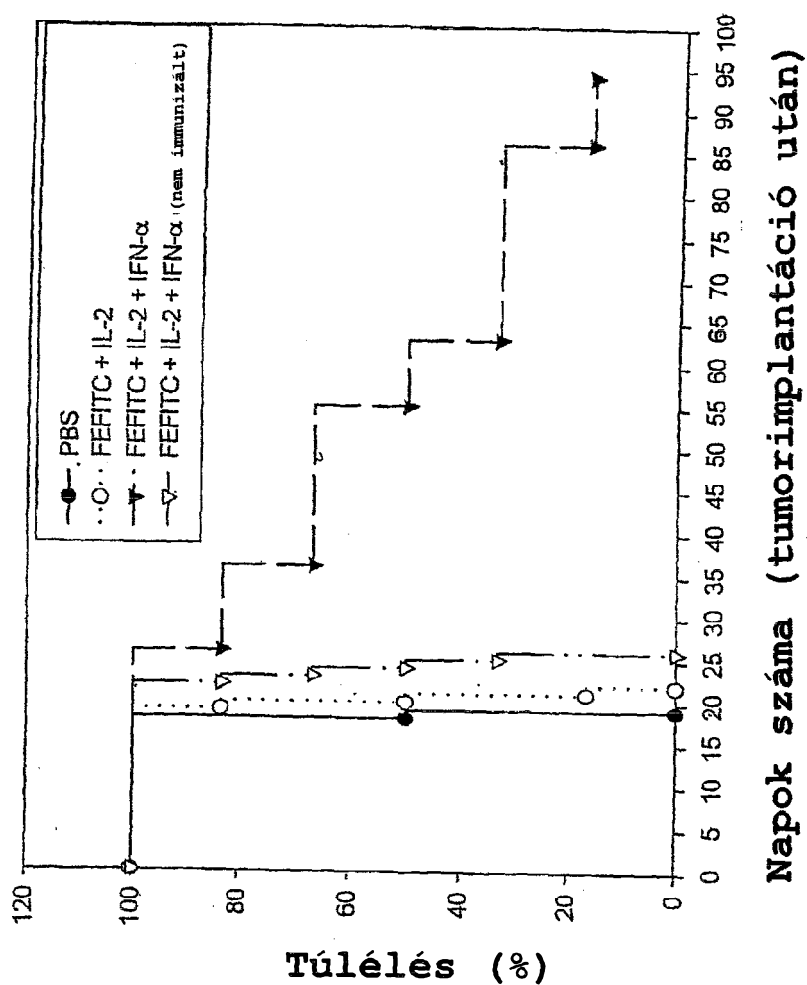
10. ÁBRA

**FEFITC irányú immunterápia:
az IL-2 dózisek hatása az ip. M109 tumoron**



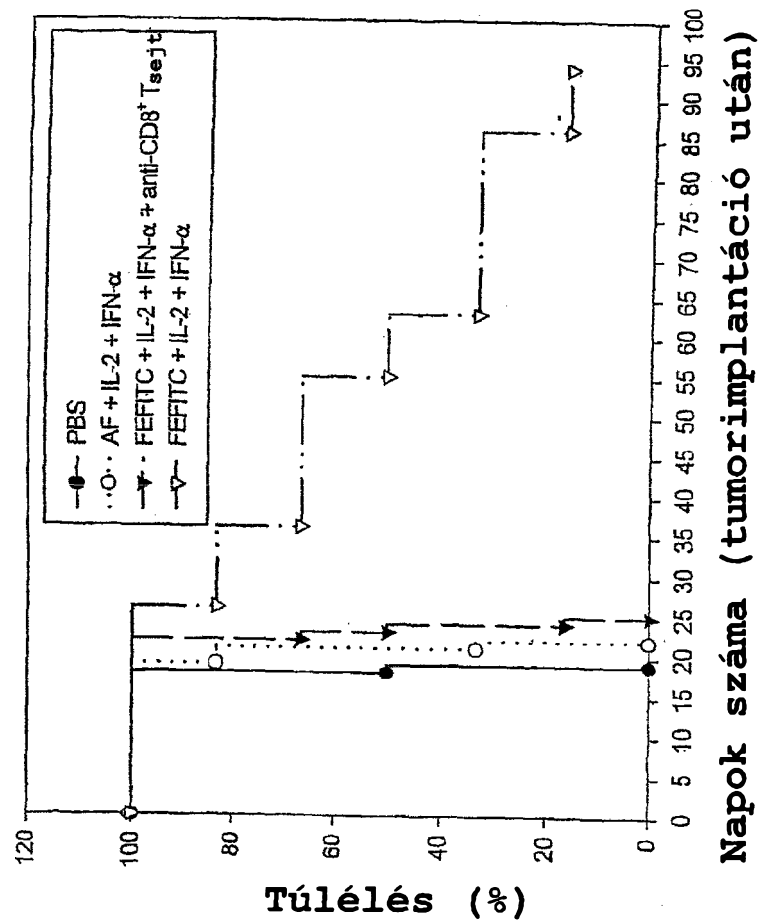
11. ÁBRA

Az INF-alfa a FEFITC IL-2-vel megemelt immunterápiás hatását tovább fokozza egerekben, melyek anti-FITC ellenanyagokkal már rendelkeztek



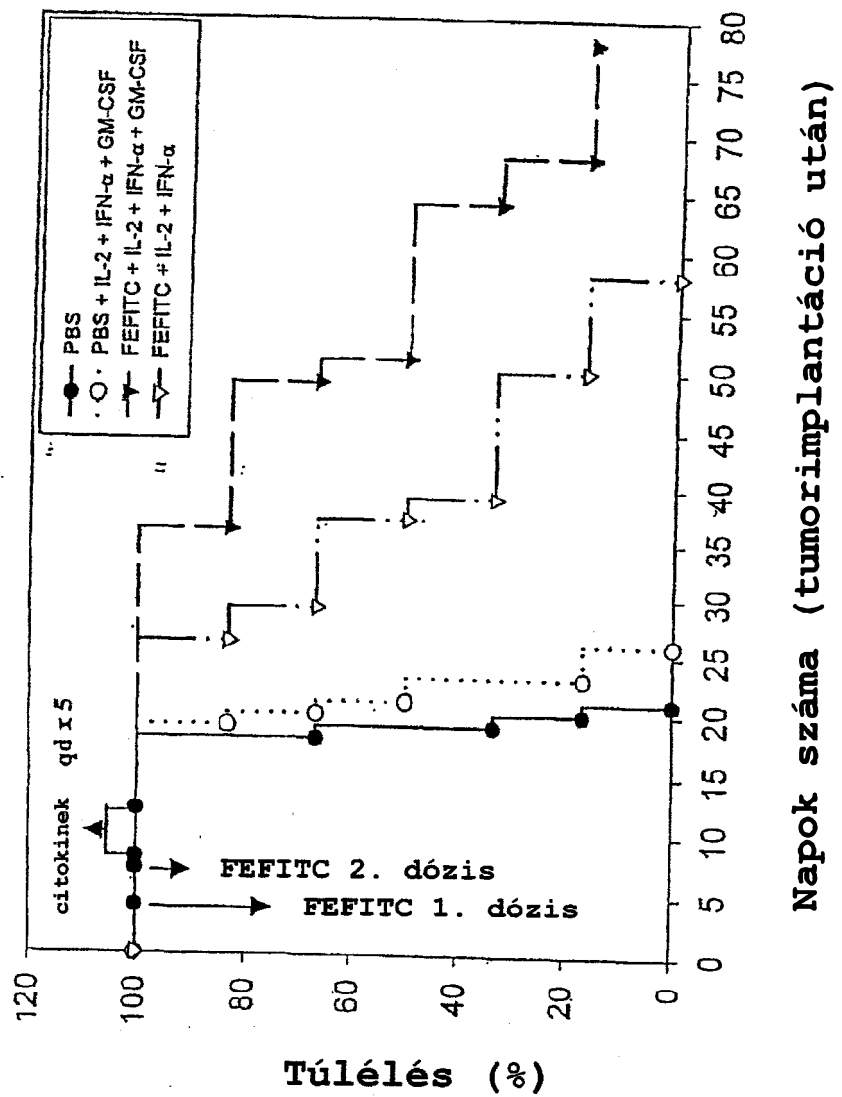
12. ÁBRA

A CD8 pozitív T-sejtek hatása a
folát irányú immunterápiára



13. ÁBRA

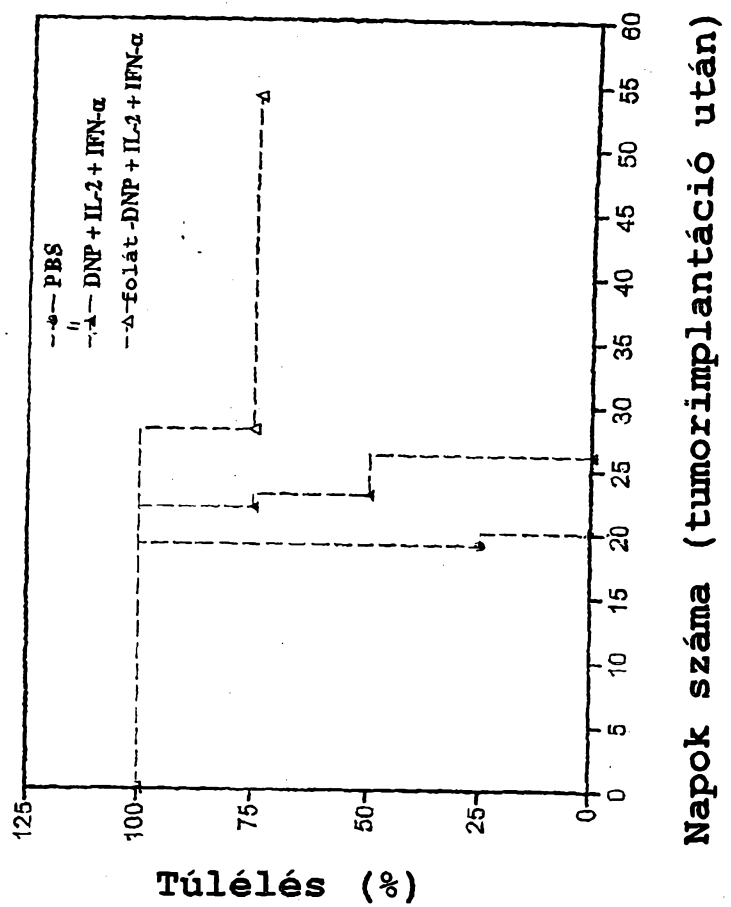
A harmadik citokin, a GM-CSF hatása a
folát irányú immunterápiára
(M109 tüdőkarcinóma)



15. ÁBRA

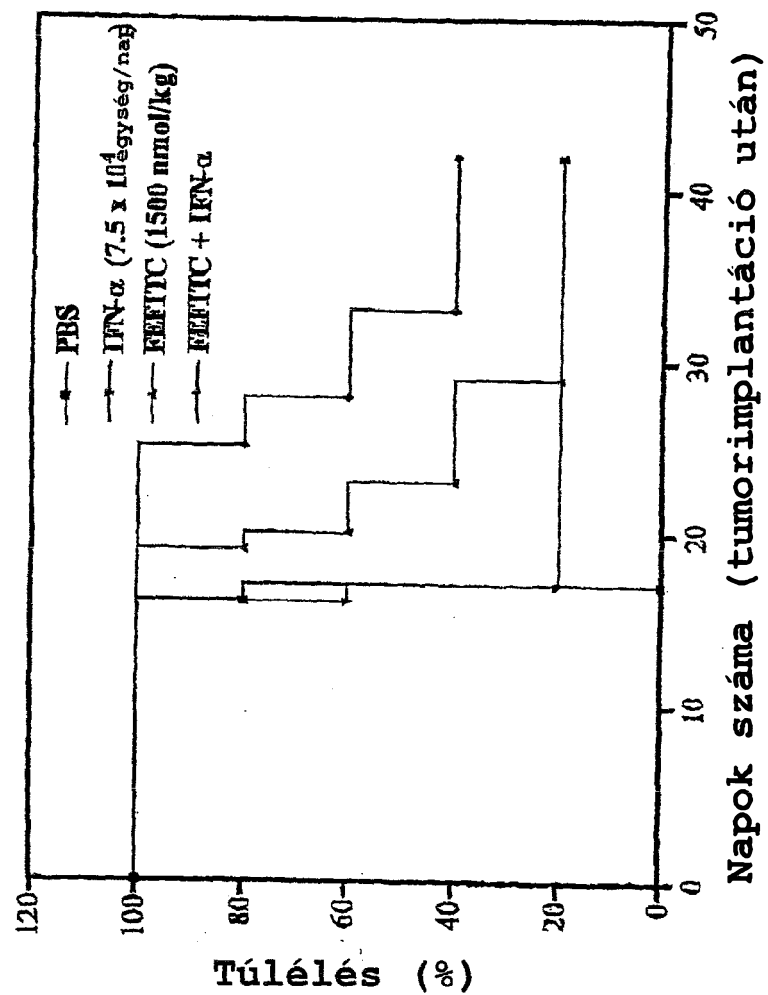
Folát irányú immunterápia:

A DNP hatása hapténként ip. M109 tumoron



16. ÁBRA

A FEFITC és az IFN-alfa szinergista hatása
az intraperitoneális M109 tumoron



17. ÁBRA

Egerekben a folát-DNP az IL-2 és az INF-alfa magas dózisú kombinációinak terápiás hatását tovább növeli a már meglévő anti-DNP ellenanyaggal

