Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

SPECIFIČNE OSOBINE LEKOVA DOBIVENE REKOMBINANTNOM DNA TEHNOLOGIJOM

ANTON ŠTALC
LEK, Razvoj in raziskave, Ljubljana

UDC 615.01

Apstrakt. Razvoj rekombinantne i hibridne tehnologije uslovljava razvoj lekova i bioloških produkata koje do sada nismo mogli proizvoditi. Pomoću ovih lekova mogu se lečiti bolesti za koje do sada nismo imali odgovarajućih lekova, a neki od njih predstavljaju dopunu. Od 1985. do 1989. godine uvedeni su sledeći lekovi: ljudski insulin, hormon rasta, interferon alfa 2a i 2b, interleukin 2, alteplase, monoklonska protitela CD 3, eritropoetin i hepatitis B vakcina. Oko 90 produkata je u fazi pretkliničkih ili kliničkih ispitivanja.

Za poboljšanje lečenja razvijaju se specifični galenski oblici, koji produžavaju vreme delovanja i poboljšavaju terapiju a istovremeno smanjuju nuspojave. Za uspešno lečenje u mnogim slučajevima se predlažu selektivniji načini primene umesto intravenske aplikacije. Zbog visoke cene ovih lekova, nailazimo na etičke dileme: pod kojim uslovima i za koje bolesnike obezbediti lek. Kod ovakvih dilema može se poslužiti poznatim kriterijumima za upotrebu.

Ključne reči: rekombinantna DNA tehnologija, peptidni lekovi, novi galenski oblici.

UVOD

Razvoj rekombinantne i hibridne tehnologije uslovljava razvoj lekova i bioloških produkata koje do sada nismo mogli proizvoditi. Pomoću tih lekova čak može da dođe do pomaka ravnoteže od »anti« terapije, koja je osobito tipična za 20. vek (antiinfekcijska, antitumorska terapija itd.), ka »pro« terapiji, tj. ka poboljšavanju funkcije tela i njegove veće otpornosti.

Food and Drug Administration do kraja 1988. godine registrovala je ljudski insulin (Humulin), hormon rasta (somatrem — Protropin i somatropin — Humatrope), interferon (IFN) alfa 2a (Roferon 1A), IFN alfta 2b (Intron A), monoklonska protitela CD3 (Orthoclone OKT3), hepatitis B vakcinu (Recombivax HB) i tkivni plazminogeni aktivator (alteplase — Activase) (1).

U Japanu su od 1985. do 1988. godine registrovali rekombinantni ljudski insulin, hormon rasta, IFN alfa 2a i 2b, IFN gama i hepatitis vakcinu (2).

Osim pomenutih derivata, u Evropi su u terapiju uvedeni takođe produkti eritropoetina (Eprex, Erypo) i interleukin (IL) 2 (Proleukin).

Ocenjuje se da je danas ukupno oko 90 produkata u fazi predkliničkih ili kliničkihi ispitivanja. Svi ti produkti su potencijalni lekovi. Peptidi dobijeni rekombinantnom tehnologijom ili niže molekularni peptidi koji se mogu proizvoditi klasičnom sintezom ili izolacijom iz prirodnih materijala donose specifičnosti koje traže posebna rešenja na različitim nivoima, a istovremeno donose nove značajne mogućnosti u lečenju. Od brojnih pitanja i specifičnosti u toj publikaciji obrađena su ona koja bi mogla biti od velikog značaja za terapiju.

PRODUKCIJA ANALOGA

Zbog peptidnog karaktera eliminaciono vreme t 1/2 svih tih supstancija veoma je kratko. Za tumor nekrosis faktor (TNF) on iznosi oko 0,5 h (3), međutim za mnogobrojne supstancije još je kraći. S druge strane, mnoge supstancije pokazuju veoma širok spektar aktivnosti. Za IL 1 kao primer poznato je da utiče na različite ćelije regulišući proliferaciju, maturaciju i funkciju aktivnosti (4). Osim citotoksičnih osobina i mnogih drugih efekata, TNF također pokazuje plejotropične učinke na više ćelija koje su aktivne u inflamaciji, hematopoezi i imunosti (5).

Sa ciljem da se od prirodnih peptida dobiju supstancije koje bi duže vreme bile aktive i imale selektivnije delovanje pripremaju se različiti analozi. Pristupi su veoma različiti; broj karakterističnih primera će ipak moći da približi strategiju tog razvoja:

1. Promena pojedinih aminokiselina u molekuli peptida:

— zamena jedne aminokiseline s ekvifunkcionalnom aminokiselinom: kao primer navodim IFN alfa 2a i 2b, koji se međusobno razlikuju po aminokiselini na mestu 23 (6);
— zamena kisele aminokiseline s baznom ili obrnuto, kao što je primer TNF (Asn), kod kojeg je Arg zamenjen s Asn (7);
— zamena Cys aminokiselinom koja ne može tvoriti S-S veze, npr. promena Cys 69 kod TNF sa Ser (7);
— uvođenje aminokiseline koja se može glikozilirati, npr. uvođenje Thr mesto Arg na mestu 32: TNF (Asn) (7);
— promena aminokiselina na području koje je specifično za vezivanje ili specifične osobine molekula kao što je primer hidrofobni dio molekule.

2. Skraćenje ili produženje lanca:

Kao primer za skraćenje navodimo analoge TNF, kod kojih se bez značajne promene u aktivnosti može otcepiti do 10 aminokiselina na N-kraju molekule, npr. TNF6 (7), dalje desAlaSer 125-IL 2, koji je po delovanju identičan IL 2 (8) i analog IL 3 (7 — 140), koji je skraćen za šest aminokiselina, a po delovanju je identičan IL 3 (9).

Kao primer za produženje lanca navodimo TNF 14 kod kojeg je molekula produžena na C-kraju za 8 aminokiselina, a promena prouzrokuje razliku u hidrofobnosti (10).

3. U mnogim primerima utvrđeno je da je za biološku aktivnost dovoljan samo jedan fragmenat biomakromolekule. Kod timopoetina, koji je polipeptidni hormon timusa i sastoji se od 49 aminokiselina, Goldstein i suradnici (11) pronašli su da je pentapeptid timopentin s područja aminokiselina od 32 do 36 nosilac biološke aktivnosti. Kod gama-globulina poznati su ovakvi fragmenti sa četiri aminokiseline, kao što su tuftsin i rigin (12). Naravno, u takvim primerima se peptidi sintetišu po klasičnom postupku, a ne proizvode biotehnologijom.

4. Značajna modifikacija biomakromolekula je glikozilacija. U tom primeru se sastav aminokiselina ne menja ili se uvodi aminokiselina kao što je Thr, koji omogućava glikozilaciju. Takvi derivati su IL 2-(Thr) i IFN beta Yeda.

5. S aspekta korišćenja peptida u terapiji, značajna su i istraživanja produkcije peptidomimetika. Kao primer navodimo analoge holecistohinina (CCK). U tim slučajevima pokušava se sintetizovati stabilnije supstance pomoću promena pojedinih aminokiselina u lancu peptida, promenom peptidne CONH veze sa nepeptidnom, kao što su: $CONH_2$, CH_2NH, CH_2CH_2, CH=CH, $CHOHCH_2$ ili retroinverzna NHCO (promena redosleda); poznati su i brojni primeri ciklizacije spojeva (13). U tim primerima supstancije se sintetišu klasičnim putem.

Pomenute promene u strukturi peptida ne znače uvek poboljšanje aktivnosti. Kao primer navodimo analoge TNF; specifična aktivnost TNF s primarnom strukturom je 3,2 uU/mg, kod analoga N6 (skraćen za 6 aminokiselina na N-kraju molekule) povećava se na 4,8, međutim kod TNF(Asn) i TNF(Ser) smanjuje se na 0,053 ili 2,0. Osim aktivnosti, menja se i osetljivost pojedinih ćelija na različite analoge TNF. Tako je npr. moguće očekivati da se dobije analog TNF koji bi sačuvao aktivnosti »nekrotizirajućeg faktora« bez kahektinske aktivnosti, koju uslovljava primarna struktura TNF (7).

NAČINI APLIKACIJE

Za uspešno lečenje u mnogim slučajevima je veoma značajan način aplikacije. Zato se umesto i.v. aplikacije, koja nepoželjno razređuje lek, a povećava njegovu toksičnost, predlažu selektivniji načini primene:

— intraarterijski putem hepatičke, hipogastričke, femoralne, lingvalne ili karotidne arterije;
— intratekalno i intraventrikularno;
— intraperitonealno, intrapleuralno i intraartikularno, intra- ili peritumoralno;
— topikalno u rektum ili cerviks, nazalno ili preko oralne sluzokože; kao i
— intrabronhijalno ili bronhoalveolarno (14).

Kao primer od čijeg je značaja odgovarajući način aplikacije navodimo rezultate dobijene TNF. Posle i.v. infuzije TNF koja se daje bolesnicima, dobije se potpuni ili delomični odgovor samo u dva slučaja od ukupno 22, međutim kod intratumoralne, intrapleuralne ili intraperitonealne primene povoljan efekat dobije se u 14 od ukupno 30 bolesnika (15). Uticaj aplikacije još je izrazitiji kod kombinovane terapije IL 2 s klasičnom hemioterapijom. Posle i.v. aplikacije IL 2, preživljavanje se povećava od 10% na 22%, međutim kod intrasplenične aplikacije IL 2 povećava se čak do 60% (16).

U mnogim slučajevima potrebno je obezbediti kontinuiranu aplikaciju izuzetno malih doza, na primer kod rekombinatnog humanog granulocita kolonija stimulirajućeg faktora (rhG-CSF), gde je za puni efekat potrebno obezbediti pikomolarne količine supstancije. U takvim slučajevima upotrebljavaju se osmotske pumpe. Osmotske pumpe se inače danas proučavaju kod primene mnogobrojnih peptida: antihipertenzivnih, imunopeptida, hormona, faktora rasta, neuropeptida itd. (17).

Specifični načini aplikacije mogu također smanjiti značajne nuspojave, koje mogu ograničavati primenu; kao primer navodimo intratumoralnu aplikaciju IL 2. Naravno, intratumoralna aplikacija moguća je samo u izuzetnim slučajevima (18).

POBOLJŠANJE LEČENJA POMOĆU SPECIFIČNIH GALENSKIH OBLIKA

Optimalni terapijski indeks (efekat/toksičnost) kod proteina i peptida dobili smo ukoliko bismo uspeli izazvati biološki odgovor na adekvatnim mestima, a izbeći delovanje na drugim sistemima. Naravno, potrebno je i obezbediti odgovarajuću dužinu delovanja. To uslovljava razvoj galenskih oblika u kojima su aktivne supstancije vezane na specifične materije ili ugrađene u liposome, mikropartikle s biodegradibilnom materijom itd. U nizu konkretnih primera osvetlićemo različite mogućnosti i rešenja.

Kod IFN alfa pripremljene su npr. minipelete s kolagenom. Kolagen je protein veziva, koji je biokompatibilan i biodegradibilan, pa se zato može koristiti za supkutanu aplikaciju. Time se postiže niža Cmax i za nekoliko puta produžava vreme delovanja. Iz matriksa kolagena s vremenom se otpušta INF alfa i tako u toku dužeg vremena održava konstantni nivo u serumu, što omogućava odgovarajuće delovanje. Ovakav oblik može se aplikovati i na mesto gde je bio eliminisan tumor. Ovakav oblik takođe bitno smanjuje broj nuspojava (19).

Na polimere kao što su PEG (metoksipolietilen glikol) i POG (polioksietilisani glicerol) biomakromolekule veže se kovalentnom vezom. Time se dobije npr. PEG-rIL 2, koji se lakše rastvara od samog rIL 2 i ima za nekoliko puta produženo t1/2. Ovakvim kompleksom poboljšava se i terapijski indeks koji je kod ekvitoksične doze oko pet puta bolji od samog rIL 2 primenjenog intravenski. Eksperimenti

pokazuju da je kod doze 12,5 mg/kg izlečenje tumora na modelima 20%, kod rIL 2, a 80%, kod PEG-rIL 2; poboljšanje delovanja uslovljavaju promene u farmakokinetici (20).

Za terapiju nisko molekularnim peptidima postaju značajni i nazalni i dermalni preparati, međutim za visoko molekularne peptide, koji su i produkti rekombinantne tehnologije, značajni su samo nazalni preparati (21, 22). Za poboljšanje resorpcije upotrebljavaju se supstancije koje mogu poboljšati penetraciju (oleinska kiselina, žučne soli, fusidati itd.) na različite načine (22). Proučavanje transporta humanog metionil hormona rasta (m.m. 22 000) s Laureth S, koji verovatno poboljšava prelaz zbog uticaja na lipide u membrani, pokazala su da se prelaz kroz sluzokožu poboljšava od 10% na 60% (23). Druga mogućnost koja bitno povećava bioupotrebljivost visoko molekularnih peptida, npr. insulina, kroz nazalnu membranu je upotreba bioadhezivnih mikrosfera; lek je rasprostranjen po površini nosioca koji se sastoji od skroba i albumina (22).

U traženju selektivnog delovanja lekova danas se razvijaju mnogobrojni oblici lekova koji bi omogućili transport aktivne supstancije na određeno mesto u organizmu (24). Među brojnim mogućnostima liposomi su već onaj oblik koji se koristi za proučavanje rekombinantnih proteina. Liposomi su mehurići koji se sastoje od jednog ili više dvosloja lipida. Prema sastavu dele se na više tipova. Koji tip i kakav sastav liposoma koristimo, zavisi od osobina aktivne supstancije i cilja primene (25).

Kao primer navodimo pokuse sa TNF kod infekcija s Mycobacterium avium. Proučavan je efekat slobodnog TNF i TNF ugrađenog u liposome. U tom slučaju liposomi donose aktivnu supstanciju u makrofage jetre i slezine; zato se postavlja pitanje da li TNF može aktivisati makrofage da unište intracelularne patogene. Rezultati su pokazali da TNF ugrađen u liposome brže i snažnije smanjuje broj kolonija mikrobakterija u makrofagima kao slobodni TNF, samo da s vremenom ta razlika iščezava. Uprkos tome, činjenica da TNF u liposomima zadržava imunomodulatorske osobine, otvara mogućnosti primene ovakvog preparata u lečenju (26).

Ohrabrujući su i pokusi sa rINF gama ugrađenim u liposome. Kod infekcije s Leishmania donovani rINF gama u liposomima pokazuje oko četiri puta veće efekte u uništavanju parazita od slobodnog rIFN gama (27), međutim inkorporiran u liposome zajedno sa muramil dipeptidom pokazuje sinergističko delovanje kod aktivacije citotoksičnog delovanja makrofaga (28).

NOVE MOGUĆNOSTI LEČENJA

Pomoću ovih lekova mogu se lečiti bolesti za koje do sada nismo imali odgovarajućih lekova, a neki od njih predstavljaju dopunu kod do sada insuficijentnog lečenja različitih bolesti. Možemo reći da su lekovi dobijeni rekombinantnom tehnologijom velikog etičnog značaja. Osim lekova s usko definisanim područjem delovanja,

kao što su eritropoetin, insulin, hormon rasta, hepatitis vakcina, alteplase i drugi, poznajemo supstancije i već gotove lekove koji se mogu upotrebljavati u lečenju različitih bolesti: interferoni, monoklonska protitela, IL 2, različiti faktori koji stimulišu kolonije i TNF. Prema sadašnjem saznanju, možemo najaviti izuzetno veliki značaj tih lekova na području lečenja raka (29), kao i imunoloških i infektivnih oboljenja (30, 31).

Veoma značajna osobina rekombinatnih lekova, koja može bitno uticati na njihovu upotrebu, je visoka cena. Drugim rečima, kod primene ovih lekova nailazimo na etičke dileme: pod kojim uslovima i za koje bolesnike je potrebno obezbediti lek. Kao primer navodimo rekombinantni humani eritropoetin koji se upotrebljava za lečenje anemije kod hroničnog bubrežnog oboljenja. Cena jednogodišnje terapije je 4000 do 6000 GBP. Zato u SAD National Kidney Foundation kao kriterijum za upotrebu predlaže hematokrit <0.3. Međutim u Velikoj Britaniji u analognoj preporuci predlaže se: koncentracija hemoglobina <70 g/l, stanja kada je život bolesnika ugrožen zbog anemije, kada anemija pogoršava anginu pektoris i u primerima kada bi transfuzija mogla postati opasna (32).

Peptidi dobijeni rekombinantnom DNA tehnologijom kao i peptidi — fragmenti biomakromolekula ili peptidomimetiki — dobijeni klasičnom sintezom znače unapređenje u lečenju mnogih bolesti. Razlike između njih i klasične terapije su obično, zbog selektivnijeg delovanja, veće nego što su one između dosadašnjih grupa lekova.

SPECIFIC PROPERTIES OF THE DRUGS PRODUCED BY DNA RECOMBINANT BIOTECHNOLOGY

Summary

Products produced by DNA recombinant biotechnology processes may be considered a new possibility in the field of therapy. In the period from 1985 to 1989 the following recombinant DNA drugs were approved: human insulin, human growth hormones, interferon alpha 2a and 2b, interleukin 2, alteplase, muromanab CD 3, erythropoietin and hepatitis B vaccine. Many new products are being developed. Since a number of peptides and proteins are rapidly destroyed in the body, new formulations and systems have been developed in order to increase the steady drug concentration in blood circulation or locally at the site of application, further, to increase the efficacy of drugs and to minimize the incidence and severity of adverse side effects. The proteins and peptides are unable to reach secluded organs or sites where the therapeutic effect is desirable, therefore more selective routes of administration than the venous one are beeing introduced. The cost of some biological drugs may result in their limited use, thus guidelines for a proper administration have been issued.

LITERATURA

(1) Esber, E. C.: *United States Perspectivies on the Evaluation of Therapeutic Biological Products.* V: Therapeutic Peptides and Proteins (Marshak, D. i Liu, D. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 201—206.

(2) Hayakawa, T.: *Current Regulaltory Situation in Japan with Respect to the Quality of Therapeutic Peptides and Proteins.* V: Therapeutic peptides and proteins (Marshak, D. i Liu, D. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 195—200.

(3) Taguchi, T.: *Phase I Study of Recombinat Human Tumor Necrosis Factor (rhTNF: PT-050).* Cancer Det Prev 12, 561—572, 1988.

(4) Van Brunt, J.: *Lymphokine Receptors as Therapeutics,* Biotechnology, 668—669, 1989.

(5) Wong, G. H. W. i Goeddel, D. V.: *Biological Activities and Production of TNF Alfa.* V: Monokine and other non-lymphocytic cytokines (MC Pawanda et al.). Alan R. Liss Inc., New York 1988, pp. 251—260.

(6) Reynolds, J. E. F.: *Interferons.* V: Martindale the Extra Pharmacopoja, 29. Edition. The Pharmaceutical Press, London 1989, pp. 696—699.

(7) Tsujimoto, M., Tanaka, S., Sakuragawa, Y. et al.: *Comparative Studies of the Biological Activities of Human Tumor Necrosis Factor and its Derivatives.* J. Biochem 101, 919—925, 1987.

(8) Doyle, M. V., DeGroat, S., Lowitz, R. et al.: *In Vivo Activation of Cytolitic Cell Activity During Recombinant IL 2—125 Clinical Trials in Cancer Patients.* V: Immune regulation by characterized polypeptides (Goldstein, G., Bach, J. F. i Wigzell, H. eds.), Alan R. Liss Inc., New York 1987, pp. 353—362.

(9) Clark-Lewis, I., Aebersold, R., Ziltener, H. et al.: *Structure-Function Studies of Interleukin 3 Using an Automated Peptide Synthesis Approach.* V: Immune regulation by characterized polypeptides (Goldstein, G., Bach, J. F. i Wiozell, H. eds.). Alan R. Liss Inc., New York, 1987, pp. 323—334.

(10) Sreekrishna, S., Potenz, R. H. B., Cruze, J. A. et al.: *High Level Expression of Heterologous Proteins in Methlotrophic Yeast Pichia Pastoris.* J Basic Microbiol 28, 265—278, 1988.

(11) Goldstein, G. M. P., Scheid, E. A., Boyse, M. P., Schlesinger, D. H. i Waurve, Van J.: *A Synthetic Bentapeptide with Biological Activity Characteristic of the Thymic Hormone Thymopoetin.* Science 204, 1309—1310, 1979.

(12) Chipens, G.: *New Biologically Active Fragments of Immunoglobulins.* Adv. Drug Delivery Rev 2, 167—206, 1988.

(13) Evans, B. E.: *Recent Development in Cholecystokinin Antagonist Research.* Drugs of the Future 14, 971—979, 1989.

(14) Bocci, V.: *Catabolism of Therapeutic Proteins and Peptides with implications for Drug Delivery.* Adv Drug Rev 4, 149—169, 1990.

(15) Taguchi, T. Kimoto, Y. i Tanji, Y.: *Clinical Studies of Recombinant human Tumor Mecrosis Factor.* V: Tumor Necrosis factor/Cachectin and Related Cytokines (B. Bonavida, G. E. Gifford, H. Kirchner, L. J. Old eds.). Karger, Basel 1988, pp. 196—204.

(16) Naito, K., Pellis, N. R. i Kahan, B. D.: *Effect of Continuous Administration of Inerleukin 2 on Active Specific Chemoimmunotherapy with Extracted Tumor-Specific Transplantation Antigen and Cyclophospamide.* Cancer Res 48, 101—108, 1988.

(17) Amkraut, A., Eckenhoff, J. B. i Nichols, K.: *Osmotic Delivary of Peptides and Macromolecules.* Adv Drug Rev 4, 255—276, 1990.

(18) Bubenik, J.: *Local Immunotherapy of Cancer with Interleukin 2.* Immunol Lett 21, 267—276, 1989.

(19) Takenaka, H., Fujioka, K. i Takada, Y.: *New Formulations of interferon.* V: Therapeutic peptides and protein (D. Marshak i D. Liu eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 37—40.

(20) Katre, N. V., Young, S. D. i Zimmerman, R.: *Chemical Modification of Interleukin 2 with Polymers: a Potent Drug Delivery System.* V: Therapeutic Peptides and Proteins (D. Marshak i D. Liu eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 173—177.

(21) Muranishi, S. i Takada, K.: *Biopharmaceutical Aspects on Enhanced Transmembrane Delivery of Peptides and Proteins.* V: Therapeutic peptides and proteins (D. Marshak i D. Liu eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp 47—50.

(22) Illum, L.: *Nasal Delivery of peptide and Protein Drugs.* V: Therapeutic Peptides and Proteins (D. Marshak i D. Liu eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989, pp. 51—57.

(23) Daugherty, A. L., Liggitt, D., McCabe, J. C., Moor, J. A. i Paton, J. S.: *Absorption of Recombinant Methionyl-Human Growth Hormone (Meth-GH) From Rat Nesal Mucosa.* Int J Pharm 45, 197—202, 1988.

(24) Štalc, A.: *Razvoj novih oblik zdravil.* Proteus 50, 184—187, 1988.

(25) Štalc, A.: *Liposomi — nova potencialna oblika zdravil.* Farm vestnik 31, 197—202, 1980.

(26) Duezguenes, N., Perumal, V. K., Brunett, E. N., Gangadhuram, P. R. J. i Debs, R. J.: *Treatment of Mycobacterium Avium Complex Infections by free and Liposome-Encapsulated Tumor Necrosis Factor Alpha (cachectin): Studies on Peritoneal Macrophages and the Beige Mouse Model.* V: Liposomes in the therapy of infectious diseases and cancer (G. Lopez-Bernstein, I. J. Fidler eds.). Alan R. Liss Inc., New York 1989, pp. 287—294.

(27) Reed, S. G.: *Liposome-Encapsulated Lymphokine for the Treatment of Experimental Visceral Lishmaniasis.* V: Liposomes as drug carriers (G. Gregoriadis ed.). John Wiley & Sons, Chichester 1988, pp. 337—344.

(28) Sajki, I. i Fidler, L. J.: *Synergistic Activation by Recombinant Mouse Interferon Gama and Muramyl Dipeptide of Tumoricidal Properties in Mouse Macrophages.* J Immunol 135, 684—688, 1985.

(29) Orr, D. W., Lewis, M. i Oldham, R. K.: *Cancer Biotherapy: 1987 Disease-Related Activity.* V: Principies of cancer biotherapy (R. K. Oldham ed.). Raven Press, New York 1987, pp. 469—487.

(30) Chien, Y. W. i Wearley, L. L.: *Aids and Chemotherapy.* Drugs of Today 25, 19—25, 1989.

(31) Anon: *Interleukin Futures.* Biotechnology 7, 661—667, 1989.

(32) Anon.: *Erythropoetin Reaches the Pharmacy.* Lancet 2, 1252—1254, 1989.