

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-2751**
(22) Přihlášeno: **29.01.1999**
(30) Právo přednosti: **30.01.1998 US 1998/073112**
02.02.1998 US 1998/73410
(40) Zveřejněno: **13.12.2000**
(Věstník č. 12/2000)
(47) Uděleno: **07.09.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.10.2009**
(Věstník č. 41/2009)
(86) PCT číslo: **PCT/US1999/001928**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/038525**

(11) Číslo dokumentu:

301 026

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61N 5/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 97/03687; WO 96/01121.

Browning J.L. et al.: „Signaling through the lymphotoxin beta receptor induces the death of some adenocarcinoma tumor lines“, Journal of Experimental Medicine, Vol 183, 867-878, 1996.

(73) Majitel patentu:

Biogen Idec MA Inc., Cambridge, MA, US
NEW YORK UNIVERSITY, New York, NY, US

(72) Původce:

Browning Jeffrey, Brookline, MA, US
Thorbecke Jeanette, Douglaston, NY, US
Tsiagbe Vincent, Mt. Vernon, NY, US

(74) Zástupce:

Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

Použití kompozice inhibující interakci LT- β a jeho receptoru pro výrobu přípravku k léčení folikulárního lymfomu

(57) Anotace:

Vynález se týká farmaceutických přípravků, obsahujících inhibitory lymfotoxinové signální dráhy. Tyto přípravky jsou užitečné k léčení folikulárních lymfomů.

CZ 301026 B6

Použití kompozice inhibující interakci LT- β a jeho receptoru pro výrobu přípravku k léčení folikulárního lymfomu

5 Oblast techniky

Vynález se týká farmaceutických přípravků, obsahujících inhibitory lymfotoxinové signální dráhy. Tyto přípravky jsou užitečné k léčení lymfomů, které pocházejí z germinálních center, tj. folikulárních lymfom.

10

Dosavadní stav techniky

15 Cytokiny příbuzné nádorovému nekrotickému faktoru (TNF, „Tumor Necrosis Factor“) jsou mediátory hostitelské obranné a imunitní regulace. Členy této proteinové rodiny se vyskytují ve formě ukotvené na buněčnou membránu, kdy působí lokálně prostřednictvím vzájemného kontaktu mezi buňkami, nebo se vyskytují jako vylučované proteiny, které jsou schopné difundovat ke vzdálenějším cílům. Paralelní rodina receptorů upozorňuje na výskyt těchto molekul vedoucí k iniciaci buněčné smrti nebo buněčné proliferace a diferenciaci v cílové tkáni. V současnosti 20 rodina TNF ligandů a receptorů obsahuje nejméně 11 známých párů receptor–ligand: TNF:TNF–R, LT- α :TNF–R, LT- α/β :LT- β –R, FasL:Fas, CD40L:CD40, CD30L:CD30, CD27L: CD27, OX40L:OX40 a 4–1BBL:4–1BB.

25 Členy rodiny TNF mohou být nejlépe popsány jako hlavní přepínače v imunitním systému pro řízení přežívání buněk a diferenciaci. V současnosti jsou známy pouze dva secernované cytokiny, a sice TNF a LT α , na rozdíl od většiny ostatních členů rodiny TNF zakotvených v membráně. Zatímco membránové formy TNF byly dobře charakterizovány a pravděpodobně mají jedinečnou biologickou funkci, funkcí secernovaných TNF je všeobecná signalizace „poplachu“ buňkám vzdáleným od místa události, která příslušnou událost vyvolala. Sekrece TNF může znásobit událost vedoucí k dobře známým změnám ve výstelce cév a v buňkách v místě zánětu. Naproti tomu 30 členy TNF rodiny vázané na membránu předávají signál prostřednictvím receptoru typu TNF pouze buňkám v přímém kontaktu. Tak např. pomocné T–buňky poskytují „pomoc“ zprostředkovanou CD40 pouze takovým B–buňkám, se kterými se dostanou do přímého kontaktu prostřednictvím interakcí TCR. Podobná omezení na bezprostřední buněčný kontakt se týkají 35 schopnosti indukovat buněčnou smrt u dobře prozkoumaného systému Fas.

Většina komplexů LT α/β asociovaných s membránou (povrchových LT) má stechiometrii LT α 1/ β 2 (Browning a kol., Cell 72: 847–856, 1993, Browning a kol., J. Immunol. 154: 3346, 1995). Povrchové LT ligandy se nevážou na TNF–R s vysokou afinitou a neaktivují signální 40 dráhu TNF–R. Avšak LT β receptor (LT β –R) váže tyto povrchové lymfotoxinové komplexy s vysokou afinitou (Crowe a kol., Science 264: 707–710, 1994).

Signalizace LT β –R, podobně jako signalizace TNF–R, má antiproliferativní účinek a může mít cytotoxický účinek na nádorové buňky. V současně projednávané patentové přihlášce původců 45 předkládaného vynálezu (přihláška US 08/378 968) jsou popsány přípravky a způsoby pro selektivní stimulaci LT β –R užitím činidla aktivujícího LT β –R. Agens aktivující LT β –R je užitečné pro inhibici růstu nádorových buněk, aniž by současně vedlo k aktivaci zánětlivé reakce nebo imunoregulační dráhy indukované TNF–R.

50 Současný výzkum genového zaměřování („gene targeting“) předpokládá úlohu LT α/β ve vývoji sekundárních lymfatických orgánů (Banks et al., J. Immunol. 155, 1685–1693, 1995, DeTogni et al., Science 264, 703–706, 1994) Skutečně myši s deficitem LT α postrádají lymfatické uzliny (LN) a Peyerovy ostrůvky (PP). Jejich sleziny mají narušenou architekturu a exprese funkčních markerů na buňkách marginální zóny sleziny je pozměněna (Banks et al., 1995, De Togni et al., 55 1994, Hatsumoto et al., Science 271, 1289–1291, 1996). Žádná z těchto vlastností nebyla popsá-

na u myš í s geneticky vyřazenou funkcí („knock out“) TNF receptoru (Erickson et al., Nature 372, 560–563, 1994, Pfeffer et al., Cell 73, 457–467, 1993, Rothe et al., Nature 364, 798–802, 1993). Původce vynálezu nedávno definoval roli membránových komplexů $LT\alpha/\beta$ ve vývoji sekundárních lymfatických orgánů tím, že ukázal, že potomstvo myši, kterým byla v průběhu gestace injikována rozpustná forma $LT\beta$ -R fúzovaného s úsekem Fc lidského IgG1 ($LT\beta$ -R-Ig) postrádá většinu lymfatických uzlin a vykazuje narušenou architekturu sleziny (Rennert et al., 5 Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs, J. Exp. Med. 184, 1999–2006). V jiné studii bylo ukázáno, že myši s podobným konstruktem $LT\beta$ -R-Ig, jehož exprese začala tři dny po narození, měly lymfatické uzliny. Ale měly narušenou architekturu sleziny a několik markerů slezinné marginální zóny nebylo expri- 10 mováno (Ettinger et al., Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble $LT\beta$ -R/IgG1 fusion protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13 102–7). Tyto údaje společně ukazují, že zde existuje dočasný požadavek na membránové funkce LT pro zprostředkování účinků na vývoj sekundárních lymfatických orgánů, ale bez účinku na architek- 15 turu sleziny.

Systém TNF se také účastní ve vývoji sleziny. Buňky marginální zóny sleziny myši deficitních na TNF neexprimují makrofágové markery nebo MAdCAM-1 (Alexopoulou et al., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 228, 1996, Pasparakis et al., 60th Int. TNF Congress, Eur. 20 Cytokine Network, 239, 1996). Myši deficitní v TNF-R55 také postrádají (ale nikoliv MOMA-1) v marginální zóně sleziny (Neumann et al., J. Exp. MED. 184, 259–264, 1996, Matsumoto et al., Science 271, 1289–1291, 1996).

Lymfatická tkáň nebo tkáň podobného typu nevzniká jen v průběhu vývoje, ale také při určitých patologických stavech, jako jsou např. chronické záněty, v procesu zvaném neolymfoorgano- 25 geneze (Picker a Butcher, Annu. Rev. Immunol. 10, 561–591, 1992, Kratz et al., J. Exp. Med. 183, 1461–1471, 1996). Tyto procesy jsou zjevně ovlivňovány členy rodiny TNF. U transgenních myši s genem $LT\alpha$ řízeným promotorem genu inzulinu potkana (RIP-LT) se vyvinuly chronické zánětlivé léze s charakterem organizované lymfatické tkáně (Kratz et J. Exp. Med. 1183, 1461– 30 1471, 1995, Picarella et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10 036–10 040, 1992).

Vyhodnocení funkce LT v průběhu imunitní odpovědi závislé na T buňkách pomocí myši deficit- ních v $LT\alpha$ ukázalo na nezbytnost LT pro vytváření GC, a zřejmě také pro udržování organiza- 35 né struktury folikulárních dendritických buněk (FDC) a pro imunitní humorální odpověď (Banks et al., J. Immunol. 155, 1685–1693, 1995, Matsumoto et al., Science 271, 1289–1291, 1996, Matsumoto et al., Nature 382, 462–466, 1996). Myši deficitní v TNF-R55 také postrádají FDC, nevyvíjí se u nich GC a nejsou schopny optimální imunitní odpovědi na ovčí červené krvinky (SRBC). To předpokládá, že TNF-R55 může být spouštěn rozpustným LT nebo TNF ve většině takových odpovědí (LeHir et al., J. Exp. Med. 183, 2367–2372, 1996, Alexopoulou et al., 60th 40 Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 228, 1996, Pasparakis et al., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 239, 1996).

Receptor $LT\beta$, člen rodiny receptorů TNF, specificky váže povrchové LT ligandy. $LT\beta$ -R váže heteromerní LT komplexy (převážně $LT\alpha1/\beta2$ a $LT\alpha2/\beta1$), ale neváže ani TNF ani $LT\alpha$ 45 (Crowe a kol., Science 264: 707–710, 1994) mRNA pro $LT\beta$ -R byla nalezena v lidské slezině, brzlíku i dalších orgánech spojených s imunitou. Ačkoliv výzkum exprese $LT\beta$ -R je teprve v počáteční fázi, profil exprese $LT\beta$ -R je podobný profilu p55-TNF-R, kromě toho, že $LT\beta$ -R chybí na T a B buňkách periferní krve a na liniích T a B buněk.

Komplexy povrchových lymfotoxinů (LT) byly charakterizovány v hybridomových T buňkách $CD4^+$ (II-23.D7), které exprimují vysokou hladinu LT (Browning et al., J. Immunol. 147: 1230– 1237, 1991, Androlewicz et al., J. Biol. Chem. 267: 2542–2547, 1992). Exprese a biologická funkce $LT\beta$ -R, LT podjednotek a povrchových LT komplexů jsou popsány v přehledu Ware, C. 50 F., „The ligands and receptors of the lymphotoxin systém“, v: Pathways for Cytolysis. Current Topics Microbiol. Immunol. Springer-Verlag, s.175–218, 1995, který je zahrnut formou odkazu.

Expresí LT α je indukována a LT α je primárně secernován aktivovanými T a B lymfocyty a cytotoxickými „zabíječskými“ buňkami (NK, „natural killer“). LT α je produkován v rámci pomocných T buněk podskupinou Th1, ale nikoliv podskupinou Th2 buněk. LT α byl také nalezen v melanocytech. Mikroglie a T buňky v lézích u pacientů s roztroušenou mozkomíš-
 5 ní sklerózou reagují pozitivně s antisétem anti-LT α (Selmaj et al., J. Clin. Invest. 87, 949–954, 1991).

Lymfotoxin β (zvaný také p33) je exprimován na povrchu myších i lidských T lymfocytů, linií T buněk, linií B buněk a „zabíječských“ buněk aktivovaných lymfokinem (LAK). LT β je předmětem současně projednávaných patentových přihlášek stejných původců, a sice PCT/US91/04588, publikované 9. ledna 1992 jako dokument WO 92/00329, a PCT/US93/11669, publikované 23. června 1994 jako WO 94/13808, které jsou zahrnuty formou odkazu.

Povrchové, LT komplexy jsou exprimovány primárně aktivovanými T lymfocyty (pomocnými, Th1 i zabíječskými buňkami) a B lymfocyty a zabíječskými buňkami, jak se dá ukázat analýzou pomocí FACS nebo imunohistologickou analýzou užitím protilátek anti-LT nebo rozpustných fúzních proteinů LT β -R-Fc. V projednávané přihlášce stejného původce US 08/505 606 podané 21. července 1995 jsou popsány přípravky a způsoby užívající rozpustné LT β receptory a protilátky specifické proti LT β receptoru a ligandu jako léčivo pro léčení imunitních chorob zprostředkovaných Th1 buňkami. Povrchové LT byly také nalezeny na klonech lidských cytotoxických T lymfocytů (CTL), v aktivovaných periferních mononukleárních lymfocytech (PML), lymfocytech periferní krve aktivovaných IL-2 periferních B lymfocytech aktivovaných buď mitogenem z *Phytolacca americana* nebo anti-CD40 (PBL), a různých T a B buněk pocházejících z lymfoidních nádorů. Zapojení cílových buněk nesoucích alloantigen specificky indukuje expresi povrchových LT u klonů CD4T a CD8⁺ CTL.

Původce vynálezu popsal několik imunologických funkcí povrchového LT a ukázal vliv LT α / β vazebného činidla na vyvolání a charakter imunoglobulinové odpovědi, udržování buněčné organizace sekundární lymfatické tkáně včetně účinku na diferenciací stav folikulárních dendritických buněk a vytváření germinálních center, a také úroveň exprese adresinů, která ovlivňuje buněčný transport. Původce tak definoval terapeutické využití vazebných činidel povrchových LT α / β a LT α receptorů.

Studie ukázaly, že B buňky jsou aktivovány v lymfatických uzlinách (LN) a slezině po setkání s různými antigeny. Ve specializovaných strukturách LN a sleziny, které se nazývají germinální centra, kde se tvoří oblasti bohaté na B buňky, B buňky dozrávají a tvoří se paměťové B buňky (¹). B buňky jsou schopné nádorové transformace po většinu svého vývoje (²). Transformace B buněk vede k lymfomům, a lymfomy pocházející z B buněk germinálních center se nazývají folikulární lymfomy. Přesné vymezení různých druhů lymfomů se stále provádí a zpřesňuje, neboť se nachází stále více povrchových markerů, které umožňují přesněji stanovit původ buněk. Folikulární lymfomy lze rozdělit do mnoha podskupin na základě stádia nebo typu B buněk, které proliferují, a také prognóza je velmi odlišná v závislosti na typu buněk. Konvenční chemoterapeutické režimy jsou schopné pomoci a léčit pacienty s buňkami nízkého stupně. Nicméně někteří z těchto pacientů jsou rezistentní k chemoterapii a mají špatnou prognózu.

Tudíž i přes pokroky v léčení nádorů stále přetrvává potřeba nových přístupů v léčbě nádorů, zejména rezistentních k chemoterapii, a také potřeba nových léčebných režimů s menšími vedlejšími účinky, než mají současné terapie.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití sloučeniny, která inhibuje interakci LT β s receptorem pro výrobu léku k léčení nádorů. Předkládaný vynález poskytuje přípravky k léčení nádorů jako jsou folikulární lymfomy: Tyto nové léky mají značné výhody ve srovnání s dosud známými a nabízejí možnost alternativní terapie v případě nádorů rezistentních k současné chemoterapii.

Výhodné provedení předkládaného vynálezu se týká léčení subjektu, který trpí folikulárním lymfomem, kdy se subjektu podává účinné množství přípravku, který blokuje interakci heteromeru $LT\alpha/\beta$ s receptorem. Podle výhodných provedení vynálezu přípravky obsahují, přičemž výčet není omezující, rozpustné receptory lymfotoxinu β , protilátky namířené proti $LT\beta$ receptorům a protilátky namířené proti povrchovým LT ligandům. Výhodnější jsou rozpustné receptory lymfotoxinu β , které mají vazebnou doménu ligandu, která může selektivně vázat povrchový LT ligand, jako je např. rozpustná forma $LT\beta$ -R fúzovaná s Fc doménou humánního imunoglobulinu. Kromě toho k výhodným přípravkům patří monoklonální protilátky, které jsou namířeny proti $LT\beta$ receptorům, včetně humanizovaných a chimérických protilátek nebo jinak modifikovaných protilátek.

V jiném provedení se předkládaný vynález týká léčení subjektu trpícího folikulárním lymfomem, kdy se podává blokující činidlo, dokud nedojde k regresi nebo zastavení růstu nádoru. Činidla blokující LT dráhu se mohou podávat v kombinaci s jinými činidly, která jsou užitečná při léčení nádorů, jako jsou např. chemoterapeutika. Kromě toho je možné podávat přípravky podle předkládaného vynálezu společně s ozařováním nebo transplantací kostní dřene.

V ještě dalším provedení předkládaného vynálezu se činidlo blokující $LT\beta$ -R podává společně s činidlem blokujícím dráhu jiných členů rodiny TNF. Např. činidlo blokující TNF se může podávat současně nebo střídavě s činidlem podle předkládaného vynálezu.

Podrobný popis vynálezu

V této části je vynález ještě podrobněji popsán, aby mohl být zcela vysvětlen a pochopen, a jsou zde definovány použité termíny.

Termín „imunoglobulinová odpověď“ nebo „humorální odpověď“ se v tomto textu užívá k označení imunitní odpovědi zvířete na cizorodý antigen, při které zvíře produkuje protilátky proti uvedenému antigenu. Třída $Th2$ pomocných T buněk je důležitá pro produkci protilátek s vysokou afinitou.

Termín „zárodečné centrum“ (nebo „germinální centrum“) označuje folikul B buněk, které se vytvářejí po imunizaci antigenem. Objevení se takového histologického místa souvisí s optimálním vytvářením paměti, přepínáním isotypů, somatickou hypermutací a tedy afinitním zráním imunitní odpovědi.

Termín „marginální zóna“ nebo „oblast typu marginální zóny“ se týká histologicky popsaného kompartmentu sekundární lymfatické tkáně obsahující především makrofágy marginální zóny (MZM), metalofilní makrofágy (MM), B buňky marginální zóny a retikulocyty, a také T buňky a dendritické buňky. Vyústění arteriálního krevního řečiště do oblastí marginálních sinusů umožňuje přímý přístup antigenů k buňkám a podporuje buněčné reakce na antigen v těchto místech.

Termín „pomocná T buňka (Th buňka)“ označuje funkční podtřídou T buněk, které pomáhají generovat cytotoxické T buňky a které spolupracují s B buňkami a stimulují tak tvorbu protilátek. Pomocné T buňky rozpoznávají antigen ve spojení s molekulami MHC II. třídy a poskytují kontaktně závislé a kontaktně nezávislé (cytokiny) pro efektorové buňky.

Termín „doména Fc,“ protilátky označuje část molekuly obsahující kloubovou oblast, doménu $CH2$ a $CH3$, ale neobsahuje místo vázící antigen. Termín je také použit k označení odpovídající oblasti IgM nebo protilátky jiného isotypu.

Termín „protilátka anti- $LT\beta$ -receptor“ popisuje jakoukoliv protilátku, která se specificky váže k alespoň jednomu epitopu na receptoru $LT\beta$.

Termín „protilátka anti-LT“ popisuje jakoukoliv protilátku, která se specificky váže k alespoň jednomu epitopu na $LT\alpha$, $LT\beta$, nebo komplexu $LT\alpha/\beta$.

5 Termín „signální dráha $LT\beta$ -R“ („signalizace $LT\beta$ -R“) označuje molekulární reakce spojené s celou metabolickou cestou přenosu signálu $LT\beta$ -R a další molekulární reakce, které k ní vedou.

10 Termín „činidlo blokující $LT\beta$ -R“ označuje takové činidlo, které naruší vazbu ligandu na $LT\beta$ -R, shlukování $LT\beta$ -R na buněčném povrchu nebo signalizaci $LT\beta$ -R, nebo které způsobí změnu v tom, jak je signál dráhy $LT\beta$ -R interpretován v buňce. Činidlo blokující $LT\beta$ -R, které působí v kroku vazby ligand-receptor, inhibuje vazbu LT ligandu na $LT\beta$ -R alespoň o 20 %. Příklady činidla blokujícího $LT\beta$ -R zahrnují rozpustné molekuly $LT\beta$ -R-Fc a protilátky anti- $LT\alpha$, anti- $LT\beta$, anti- $LT\alpha/\beta$ a anti- $LT\beta$ -R. Výhodně protilátky nereagují křížově se secernovanou formou $LT\alpha$.

15 Termín „biologická aktivita $LT\beta$ -R“ znamená 1) schopnost molekuly $LT\beta$ -R nebo jejích derivátů soutěžit o rozpustný nebo povrchový LT ligand vážící se k rozpustné nebo povrchové molekule $LT\beta$ -R, nebo 2) nativní aktivitu $LT\beta$ jako je schopnost stimulovat regulační imunitní odpověď nebo obecně cytotoxickou aktivitu.

20 Termín „LT ligand“ znamená heteromerický komplex $LT\alpha/\beta$ nebo jeho derivát, který se specificky váže na receptor $LT\beta$.

Termín „vazebná doména $LT\beta$ -R ligandu“ popisuje část nebo části $LT\beta$ -R, které se účastní specifického rozpoznání a interakce s ligandem LT.

25 Termíny „povrchový LT“ a „povrchový LT komplex“ označují komplex, skládající se z podjednotky $LT\alpha$ a podjednotky $LT\beta$ vázané na membránu, mutovaných, pozměněných a chimérických forem jedné nebo více podjednotek, kterýž to komplex je prezentován na povrchu buňky. „Povrchový ligand LT“ znamená povrchový LT komplex nebo jeho derivát, který se specificky váže na receptor $LT\beta$.

35 Termín „subjekt“ zde znamená zvíře nebo jednu či několik buněk pocházejících ze zvířete. Výhodně je zvíře savcem. Buňky jsou v jakékoliv formě, včetně, ale ne výlučně, buněk obsažených ve tkáni, shluku buněk, immortalizovaných, transfekovaných nebo transformovaných buněk, a také buněk pocházejících ze zvířete, které bylo fyzikálně nebo fenotypově změněno.

40 Jak již bylo zmíněno výše, transformace B buněk vede ke vzniku lymfomů, a transformace B buněk pocházejících z germinálních center, specializovaných struktur vyskytujících se v lymfatických uzlinách a ve slezině v oblastech bohatých na B buňky, vede ke vzniku lymfomů nazývaných folikulární lymfomy. Germinální centra B buněk vyžadují specifické prostředí pro dozrávání a proliferaci dendritické buňky poskytují jak antigen tak i většinou specifické signály pro B buňky germinálních center, které spouštějí dozrávání, přežívání a proliferaci buněk. Studie na SJL myších, které spontánně vytvářejí sarkomy retikulárních buněk (RCS, původní název tohoto druhu nádorů) poskytly transplantovatelné buněčné a také *in vitro* linie buněk RCS (CRCS), které

45 jsou vhodné jako model pro zkoumání interakce mezi hostitelem a nádorem^(3,4). Tyto RCS vznikají často v LN myši SJL, jsou heterogenní a obsahují různé typy hematopoetických buněk. Významné důkazy ukazují na to, že tyto lymfomy pocházejí z germinálních center a pro své přežívání a proliferaci vyžadují různé signály nebo faktory poskytované hostitelem^(5,6). Možnost měnit tyto signály nezbytné k přežívání poskytuje prostředek, jak kontrolovat růst těchto nádorů.

50 Jeden typ buněk, které se nazývají folikulární dendritické buňky (FDC), má rozhodující význam pro vytváření a funkci germinálních center. Má se za to, že na přežívání a udržování germinálních center B buněk se podílejí mnohé faktory. Zejména členy rodiny TMF cytokinů, které jsou signálními ligandy na buněčném povrchu, se na tom podílejí jak ze strany B buněk, např. CD40, tak ze strany FDC, např. receptory TNF a lymfotoxinu (LT). Myši s deficitní LT nebo TNF osou

mají také defektní FDC a tudíž postrádají germinální centra (⁷). Osa TNF je kritická pro vývoj FDC, i když zřejmě existují i „downstream“ funkce. Osa LT se zdá být více kritická pro udržování FDC ve funkčním stavu. Systém LT zahrnuje signalizaci z různých lymfocytů pozitivních na ligandy na buňky pozitivní na receptory, které jsou pravděpodobně deriváty jiných buněk než kostní dřeň, např. deriváty FDC, aby se FDC udržely v plně funkčním stavu. Původce vynálezu zjistil, že zablokování této signální dráhy, buďto např. protilátkami k LT ligandům nebo rozpustným fúzním proteinem receptor–imunoglobulin, vede ke ztrátě zralých FDC (Mackay a Browning, 1998, Nature V. 395, 26–27). Kromě toho inhibice LT dráhy vede ke ztrátě tvorby germinálních center a k určité desorganizaci sleziny (⁸).

Původce předkládaného vynálezu poprvé publikoval v této přihlášce, že inhibitory LT dráhy ruší interakci mezi B buňkami folikulárního lymfomu a jejich okolím, tj. FDC, a vedou ke zpomalení nebo zastavení růstu nádorů. Tudíž takové inhibitory jsou užitečné k léčení těchto úporných nádorů v primární terapii nebo k doplnění konvenční chemoterapie. Specificky, i když v oboru byla známa domněnka, že aktivace LT dráhy by se mohla využít v nádorové terapii, původce překvapivě zjistil, že přechodné zablokování LT dráhy vede ke zpomalení nebo zastavení růstu nádorů jako jsou např. folikulární lymfomy.

V širším smyslu se předkládaný vynález týká přípravků k léčení nádorů nebo lymfomů, konkrétně folikulárního lymfomu, tím, že se subjektu podává účinné množství přípravku, který inhibuje LT dráhu. Takový přípravek může obsahovat rozpustný LT β receptor, fúzní protein obsahující LT β -R, protilátky proti LT β -R a protilátky proti LT ligandům. Takové inhibující přípravky výhodně obsahují farmaceuticky přijatelný nosič.

Subjektem je výhodně savec, nejvýhodněji člověk.

Přípravek podle vynálezu se podává subjektu, dokud není patrný ústup nebo zastavení růstu nádoru. Doba léčení je tedy velmi proměnlivá a může být od několika týdnů po několik měsíců, v některých případech i značně delší. Odborník je schopen určit, kdy došlo k ústupu nebo zastavení růstu nádoru, a lze k tomu užít jakoukoli v oboru známou metodu. Použití markerů FACS k rozdělení B lymfomů se značně zlepšilo a lze očekávat, že lymfomy jistých subtypů bude možné zvládat terapií pomocí přípravků podle předkládaného vynálezu.

Je pravděpodobné, že také další regulační molekuly imunitního systému, jako jsou např. ostatní členy rodiny TNF, se podílejí na udržování architektury orgánů imunitního systému a tudíž přispívají k vytváření prostředí vhodného k proliferaci lymfomů. Tudíž kombinování inhibice LT dráhy s dalšími drahami může být účinným prostředkem k léčení některých subjektů. Tak např. je možné užít inhibitorů LT dráhy v kombinaci např. s činidlem blokujícím CD40/ligand CD40 dráhu. Může to být jakékoliv činidlo blokující tuto dráhu, tedy např. protilátky, rozpustné ligandy nebo receptory. Je výhodné podávat protilátky proti ligandu CD40 v kombinaci s inhibitory LT dráhy. Pokud se podává více než jedno činidlo blokující dráhu členů TNF rodiny, přípravky je možné podávat v podstatě současně, nebo střídavě, jedno činidlo po druhém. Odborník snadno určí nejúčinnější způsob pro léčení konkrétního pacienta v závislosti na nádoru, jaký je léčen a stavu pacienta.

Konvenční chemoterapeutické protokoly se mohou užít k eliminaci zbytků nádoru po přípravky podle předkládaného vynálezu, nebo je lze v některých případech použít současně nebo také před přípravky podle vynálezu. Inhibitory LT dráhy lze užít k zastavení růstu lymfomů před tím, než se nastoupí konvenční chemoterapeutický režim. Je pravděpodobné, že ztráta signálů podporujících růst a/nebo přežívání způsobí, že lymfom se stane citlivější k chemoterapeutickým činidlům, a tudíž je výhodné podávat inhibitory LT dráhy před podáváním tradičních chemoterapeutických činidel.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

5

Léčení nádorů SJL RCS inhibitory LT dráhy redukuje LN/velikost nádoru

Myši SJL byly léčeny buďto 3 dny před transplantací nádoru (D-3), nebo v době transplantace (D0) a nebo 3 dny po transplantaci (D3) podáním 0,3 až 0,4 mg fúzního proteinu myši LTBR-hlgG1 intraperitoneálním způsobem. Transplantace nádoru byla provedena v podstatě jak bylo popsáno v (9). 5×10^6 buněk RCS zbavených T buněk bylo *iv* injikováno a ponecháno, aby se usadilo v orgánech a začalo růst. Po 5 až 7 dnech mesenterální, brachiální a axilární LN byly vyjmuty a byla stanovena jejich hmotnost a vyjádřena jako procento celkové tělesné hmotnosti. Tabulka 1 ukazuje, že velikost uzlin byla snížena ve všech pokusech. Velikost sleziny byla také snížena v jednom ze 3 pokusů, ale toto snížení nebylo velké. Snížení hmotnosti LN bylo 50% s jediným podáním a 80 až 90 % při několikanásobném podání.

10

V jiném provedení vynálezu je potřeba podávat inhibitory LT dráhy současně s radiční terapií, nebo před a nebo po této terapii. Odborníkovi je přitom zřejmé, že výhodná terapie je založena na posouzení individuálních charakteristik jako je stav pacienta a typ nádoru, který je léčen.

20

Inhibující protilátky anti-LTβ-R a jiná činidla blokující LTβ-R lze identifikovat způsobem, který byl již dříve popsán (v současně projednávané přihlášce USA č. 08/378 968).

25

Tabulka 1

Inhibiční účinek LTBR-Ig na růst RCS u normálních myši SJL

Injektivání myši (den:dávka v mg)	Hmotnost LN ^a (n)	p	Hmotnost sleziny ^a	p
Experiment 1				
kontrolní huIgG (utráceny D5)	2,70±0,37 (7)		3,18±0,37 (7)	
mLTβR-Ig ² (D0,+3:0,4, 0,3)	1,42±0,15 (4)	< 0,001	3,29±0,18 (4)	NS ^c
Experiment 2				
kontrolní huIgG (utráceny D7)	3,35±0,21 (3)		4,04±0,34 (3)	
mLTβR-Ig (D0,+3:0,3, 0,2)	2,37±0,24 (4)	0,0024	3,04±0,19 (4)	0,004↓
Experiment 3				
kontrolní huIgG (utráceny D6)	2,34±0,11 (5)		2,93±0,57 (5)	
mLTβR-Ig (D-3:0,4)	1,10±0,38 (3)	0,0024	2,27±1,39 (3)	NS
mLTβR-Ig (D-3,0:0,4, 0,3)	0,78±0,02 (3)	<0,0001	3,95±0,53 (3)	0,046↑
mLTβR-Ig (D0:0,3)	0,92±0,10 (3)	<0,0001	3,25±0,1 (3)	NS

30

^a Hmotnost orgánu je vyjádřena v procentech celkové tělesné hmotnosti. Hmotnost LN bez léčení je typicky 0,5 % tělesné hmotnosti.

^b NS = není významný

^c mLTβR-Ig je fúzní protein extracelulární domény LTβR a úseků CH2 a CH3 hIgG1

5

Činidlo blokující LTβ-R podle jednoho provedení tohoto vynálezu obsahuje rozpustnou molekulu LTβ receptoru. Sekvence extracelulárního úseku lidského LT-β-R, uvedená zde jako sekvence id. č. 1, kóduje doménu vázící ligand. Na základě znalosti sekvence id. č. 1 a využitím postupů rekombinantní DNA v oboru dobře známých, je možné klonovat funkční fragment domény vázající ligand do vektoru a pak exprimovat ve vhodné hostitelské buňce, a tak připravit rozpustnou molekulu LTβ-R.

10

Rozpustné LTβ receptory obsahující sekvenci aminokyselin uvedenou v sekvenci id. č. 1 se mohou připojit k jedné nebo více heterologní proteinové doméně („fúzní doméně“), aby se zvýšila *in vivo* stabilita receptorového fúzního proteinu, nebo aby se modulovala jeho biologická aktivita nebo lokalizace.

15

Výhodně jsou použity k vytvoření receptorových fúzních proteinů stabilní plazmatické proteiny, které mají typicky poločas oběhu větší než 20 hodin. Takové plazmatické proteiny jsou např. (ale výčet není omezující) imunoglobuliny, sérový albumin, lipoproteiny, apolipoproteiny a transferrin. Sekvence, které zaměří rozpustnou LTβ-R molekulu do určitého buněčného nebo tkáňového typu, se mohou také připojit k doméně vázající ligand, aby se vytvořil specificky lokalizovaný rozpustný fúzní protein LTβ-R.

20

Buď celý, nebo funkční úsek z extracelulární oblasti LTβ-R (sekvence id. č. 1) obsahující doménu vázající ligand, se může fúzovat s konstantním úsekem imunoglobulinu, např. s Fc doménou těžkého řetězce lidského IgG1 (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Rozpustné fúzní proteiny receptor-IgG jsou výhodné, jsou obecně užívaným imunologickým reagens a způsoby jejich přípravy jsou v oboru dobře známy (viz např. patent USA 5 225 538, který je zahrnut formou odkazu).

25

Funkční doména vázající ligand LTβ-R se může fúzovat s Fc doménou imunoglobulinu (Ig) odvozeného z imunoglobulinu jiné třídy či podtřídy než IgG1. Fc domény protilátek patřících do odlišných tříd nebo podtříd mohou aktivovat odlišné druhotné efektorové funkce. K aktivaci dojde, když se Fc doména naváže na vhodný receptor. Druhotné efektorové funkce zahrnují např. schopnost aktivovat komplement, křížově reagovat s placentou nebo vázat různé proteiny mikroorganismů.

35

Pokud by bylo výhodné poškodit nebo usmrtit cílové buňky nesoucí LT ligand, lze vybrat zvláště aktivní Fc doménu (IgG1) pro fúzní receptorový protein. Pokud by bylo žádoucí zacílit fúzní protein LTβ-R-Fc na buňku, aniž by se aktivoval komplement, vybere se neaktivní Fc doména IgG4.

40

Mutace v Fc doméně, které redukují nebo zcela eliminují vazbu na Fc receptor a aktivaci komplementu, byly popsány (Morrison, S., Annu. Rev. Immunol. 10: 239-265, 1992). Těchto mutací, ať už samotných nebo v kombinaci, lze využít k optimalizaci aktivity Fc domén užitých pro vytvoření fúzního proteinu LTβ-R-Fc.

45

Různé aminokyselinové zbytky tvořící spojovací bod ve fúzním proteinu receptor-Ig ovlivňují strukturu, stabilitu a tedy i konečnou biologickou aktivitu rozpustného LTβ receptorového fúzního proteinu. Jedna nebo více aminokyselin se může přidat k C-konci vybraného fragmentu LTβ-R, a tak lze modifikovat spojovací bod ve vybrané fúzní doméně.

50

Také N-konec fúzního proteinu LT β -R se může pozměnit tím, že se mění poloha, ve které je vybraný DNA fragment LT β -R štěpen na svém 5'-konci, aby mohl být vložen do rekombinantního expresního vektoru. Stabilita a aktivita každého fúzního proteinu LT β -R se testuje a optimalizuje užitím rutinních testů a také pomocí testu pro výběr činidla blokujících LT β -R, tak jak je popsán v této přihlášce.

Na základě sekvence LT β -R domény vázající ligand uvnitř extracelulární domény (sekvence id. č. 1) lze vytvářet různé sekvenční varianty, aby se modifikovala afinita rozpustného LT β receptoru nebo fúzního proteinu pro LT ligand. Rozpustné molekuly LT β -R podle vynálezu mohou soutěžit o navázání povrchového LT ligandu s endogenními receptory LT β -R na povrchu buněk. Dá se předpokládat, že jakákoliv rozpustná molekula obsahující doménu LT β -R vázající ligand, která soutěží s povrchovými buněčnými receptory LT β o navázání LT ligandů, je blokující činidlo ve smyslu předkládaného vynálezu.

V jiném provedení tohoto vynálezu protilátky namířené proti lidskému LT β receptoru (protilátka anti-LT β -R) působí jako činidlo blokující LT β -R. Protilátky anti-LT β -R podle předkládaného vynálezu jsou buďto polyklonální nebo monoklonální protilátky a lze je modifikovat tak, aby bylo dosaženo optimální schopnosti blokovat signální dráhu LT β -R, jejich *in vivo* biologickou dostupnost, stabilitu nebo jiné potřebné znaky.

Polyklonální protilátkové sérum proti lidskému LT β receptoru se připraví konvenčním způsobem tak, že se zvíře jako např. koza, králík, potkan, křeček nebo myš subkutánně injikuje lidským fúzním proteinem „LT β receptor-Ig“ (viz příklad 1) v kompletním Freundově adjuvans, a poté následuje druhá (spouštěcí) intraperitoneální nebo subkutánní injekce s neúplným Freundovým adjuvans. Polyklonální sérum obsahující požadované protilátky se testuje obvyklým imunochemickým způsobem.

Myší monoklonální protilátky proti lidskému fúznímu proteinu LT β receptor-Fc se připraví tak, jak bylo popsáno v přihlášce USA 08/378968. Hybridomová buněčná linie BD.A8.AB9, která produkuje myší monoklonální protilátku BDA8 namířenou proti lidskému LT β -R byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v souladu s Budapešťskou dohodou dne 12. ledna 1995 pod přístupovým číslem CRL11964. Všechna omezení dostupnosti pro veřejnost takto uloženého vzorku budou zrušena, jakmile bude udělen patent.

Různé formy protilátek anti-LT β -R mohou být připraveny standardními technikami rekombinantní DNA (Winter a Milstein, Nature 349: 293-299, 1991). Například lze vytvořit „chimérické“ protilátky, ve kterých jsou domény vázající antigen ze zvířecí protilátky spojeny s lidskou konstantní doménou (Cabillya kol., US 4,816,567, Morrison a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851-6855, 1984). Při klinickém použití bylo pozorováno, chimérické protilátky redukuje imunitní reakci vyvolanou zvířecími protilátkami použitými u člověka.

Kromě toho se mohou syntetizovat i rekombinantní „humanizované protilátky“ rozpoznávající LT β -R. Humanizované protilátky jsou chimérické molekuly obsahující většinou sekvence lidského IgG, do nichž byly vloženy úseky, odpovídající za specifickou vazbu s antigenem (např. WO 94/04679). Zvířata se imunizují požadovaným antigenem, odpovídající protilátka se pak izoluje a odstraní se variabilní úsek zodpovědný za specifickou vazbu s antigenem. Úsek, odvozený ze zvířecí molekuly, zodpovědný za specifickou vazbu s antigenem, se potom klonuje do vhodného místa v genu lidské protilátky, ze kterého byla odstraněna oblast specificky vázící antigen. Humanizované protilátky minimalizují užití heterologních (mezidruhových) sekvencí v lidských protilátkách, a tudíž s mnohem menší pravděpodobností vyvolávají nežádoucí imunitní odpověď ošetřovaného.

Různé třídy rekombinantních protilátek proti LT β -R se mohou konstruovat jako chimérické nebo humanizované protilátky obsahující variabilní domény protilátek anti-LT β -R a lidských konstantních domén (CH1, CH2, CH3) izolovaných z různých tříd imunoglobulinů. Tak např. proti-

látky anti-LT β -R-IgM se zvýšenou valencí míst vázajících antigen lze připravit metodami rekombinantní DNA tak, že se klonuje místo vázající antigen do vektoru, který obsahuje konstantní oblast lidského T-řetězce (Arulanandam a kol., J. Exp. Med. 177: 1439-1450, 1993, Lane a kol., Eur. J. Immunol. 22: 2573-78, 1993, Traunecker a kol., Nature 339: 68-70, 1989).

5

Navíc lze užít standardní techniky rekombinantní DNA, aby se změnila afinita vazby rekombinantních protilátek s antigenem, a to tím, že se změní aminokyseliny sousedící s vazebným místem. Afinitu k antigenu u humanizovaných protilátek lze zvýšit mutagenezí založenou na molekulárním modelování (Queen a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10 029-10 033, 1989, WO 94/04679).

10

Může být také třeba zvýšit nebo snížit afinitu protilátek anti-LT β -R k LT β -R podle typu cílové tkáně nebo v závislosti na předpokládaném léčebném postupu. Tak např. z profylaktických důvodů může být výhodné ošetřovat pacienta tak, že se použije konstantní hladina anti-LT β -R se sníženou schopností přenášet signál v signální dráze LT β -R. Inhibiční anti-LT β -R se zvýšenou afinitou k LT β -R mohou být zase výhodné pro krátkodobé ošetřování.

15

Protilátky anti-LT β -R jako činidlo blokující LT β -R

Protilátky anti-LT β -R, které působí jako činidlo blokující LT β -R, se mohou selektovat testováním jejich schopnosti inhibovat LT β -R indukovanou cytotoxicitu pro nádorové buňky. Testování jiných protilátek namířených proti lidskému LT β receptoru rutinními metodami nebo testy zde popsanými lze identifikovat další anti-LT β -R protilátky, které působí jako činidlo blokující LT β -R u člověka.

25

K dalšímu výhodnému provedení předkládaného vynálezu patří přípravky, které obsahují protilátky namířené proti LT ligand, které působí jako činidlo blokující LT β -R. Jak bylo již výše popsáno pro protilátky anti-LT β -R, protilátky anti-LT ligand, které působí jako činidlo blokující LT β -R, mohou být jak monoklonální tak polyklonální protilátky a mohou být rutinními postupy modifikovány, aby se modulovaly jejich vazebné vlastnosti pro antigen a jejich imungenicita.

30

Protilátky anti-LT podle předkládaného vynálezu mohou být namířeny individuálně proti jedné ze dvou podjednotek LT, a to včetně, rozpustných, mutovaných, změněných nebo chimérických forem LT podjednotek. Pokud se užije podjednotek LT, je výhodné, když jsou to LT β podjednotky. Pokud se užijí LT- α podjednotky, je výhodné, když se výsledné anti-LT α protilátky váží s povrchovým LT ligandem a nereagují křížově se secernovaným LT α ani nemodulují aktivitu TNF-R.

35

Alternativně se mohou připravit protilátky namířené proti homomerickým (LT β) nebo heteromerickým (LT α / β) komplexům, složeným z jedné nebo více LT podjednotek, a pak testovat na aktivitu blokující LT β -R. Výhodně je jako antigen užít komplex LT α 1/ β 2. Jak bylo již zmíněno výše, je výhodné, když se výsledné anti-LT α 1/ β 2 protilátky váží s povrchovým LT ligandem a nereagují křížově se secernovaným LT α ani nemodulují aktivitu TNF-R.

40

Produkce polyklonálních protilidských protilátek LT α je popsána v již podané patentové přihlášce původce WO 94/13808. Také monoklonální protilátky anti-LT α a anti-LT β byly publikovány (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995).

45

Přípravky podle vynálezu

50

Přípravky podle vynálezu obsahují jakékoliv sloučeniny, které blokují interakci LT β s receptorem LT β a tudíž inhibují signální dráhu LT. Ke sloučeninám anti-LT patří jak polyklonální protilátky tak monoklonální protilátky (mAb), a také deriváty protilátek jako jsou chimérické molekuly, humanizované molekuly, molekuly s redukovanou efektorovou funkcí, bispecifické molekuly a konjugáty protilátek.

55

Předkládaný vynález zahrnuje i molekuly anti-LT β a anti-LT β receptor jiných typů, jako jsou úplné protilátkové fragmenty Fab, F(ab')₂ fragmenty, úseky V_H nebo úseky F_V, jednořetězcové protilátky (viz např. WO 96/23071), polypeptidy, fúzní konstrukty polypeptidů, fúze receptoru, malé molekuly jako např. malé semi-peptidové sloučeniny nebo sloučeniny jiné než peptidy, které jsou schopné blokovat LT dráhu.

Různé formy protilátek je možné připravit standardními technikami rekombinantní DNA (Winter a Milstein, Nature 349: 293–299, 1991). Např. je možné konstruovat takové chimérické protilátky, kde vazebná doména pro antigen z protilátky zvířete je spojena s lidskou konstantní doménou (Cabilly et al., patentová přihláška USA 4 816 567). Chimérické protilátky redukuje pozorovanou imunitní odpověď vyvolanou zvířecím protilátkami, když jsou použity v klinických aplikacích pro lidské pacienty.

Kromě toho se mohou syntetizovat rekombinantní „humanizované“ protilátky. Takovéto humanizované protilátky jsou protilátky, původně získané ze savce jiného než člověka, kde byly metody genové inženýrství využity k nahrazení některých nebo všech aminokyselin, které nejsou nutné pro vazbu antigenu aminokyselinami z odpovídajících úseků lehkého nebo těžkého řetězce lidského imunoglobulinu (chiméry obsahují hlavně sekvence IgG, do nichž byly vloženy úseky zodpovědných za specifickou vazbu antigenu, viz např. mezinárodní patentová přihláška WO 94/04679). Zvířata se imunizují požadovaným antigenem, pak se izoluje příslušná protilátka a odstraní se z ní část variabilního úseku zodpovědná za specifickou vazbu antigenu. Úsek vázající antigen ze zvířete se pak klonuje do vhodného místa genu lidské protilátky, ze kterého byl odstraněn úsek vázající antigen. Humanizované protilátky minimalizují použití heterologních (tj. mezidruhových) sekvencí v lidských protilátkách, které pak s menší pravděpodobností vyvolají imunitní odpověď u léčeného pacienta.

Podle předkládaného vynálezu jsou také užitečné protilátky primátů nebo tzv. „primatizované“ protilátky.

V přípravných podle předkládaného vynálezu se mohou také užít protilátkové fragmenty nebo univalentní protilátky. Univalentní protilátky obsahují dimer „těžký řetězec/lehký řetězec“ vázaný k úseku Fc (tzv. stonku) druhého těžkého řetězce. Úseky Fab jsou takové úseky obou řetězců, které jsou přibližně shodné nebo analogické se sekvencemi obsahujícími většinou se úsek tvaru y těžkého řetězce a celé lehké řetězce, a které dohromady (jako agregáty) vykazují protilátkovou aktivitu. Protein Fab obsahuje agregáty jednoho těžkého a jednoho lehkého řetězce (všeobecně známé jako Fab') a také tetramery, které odpovídají dvouramenným segmentům protilátky tvaru Y (všeobecně známé jako F(ab)₂), ať už jsou kovalentně či nekovalentně agregovány, pokud jsou agregáty schopny selektivní reakce s konkrétním nebo rodinou antigenů.

Kromě toho lze použít standardní techniky rekombinantní DNA pro změnu vazebné afinity rekombinantních protilátek s jejich antigeny tím, že se změni zbytky aminokyselin v blízkosti vazebného místa pro antigen.

Subjekty

Subjekty, pro které je určen přípravek podle předkládaného vynálezu, trpí folikulárním lymfomem.

Způsoby podávání

Přípravky podle předkládaného vynálezu mohou být podávány jakýmkoliv způsobem, který je lékařsky přijatelný. K takovým způsobům podávání patří injekční parenterální podávání, a sice, intravenózní, intravaskulární, intraarteriální, subkutánní, intramuskulární, intraperitoneální, intratumorové, intreperitoneální, intraventrikulární, intraepidurální. Jsou také vhodné další způsoby jako je perorální, nazální, oftalmický, rektální nebo topický. Lékové formy s prodlouženým uvol-

ňováním léčiva jsou zvláště výhodné, např. depotní injekce. Některé formy činidel blokujících LT mohou být vhodné pro perorální podávání a mohou být formulovány do suspenzí nebo pilulek.

Dávkování a frekvence podávání

5

Velikost dávky a frekvence dávek konkrétní sloučeniny podávané pacientovi k léčení určité nemoci posoudí ošetřující lékař na základě celé řady faktorů. Obecné dávkování je stanoveno v klinických testech, které zahrnují extenzivní experimenty ke stanovení prospěšného účinku a vedlejších nežádoucích účinků při různých dávkách pacientovi. Ale i když takovéto doporučení existuje, ošetřující lékař často mění takové dávkování na základě úvahy týkající se pacientova věku, zdravotního stavu, hmotnosti, pohlaví a případné současné léčby jinými přípravky. Stanovení optimální dávky konkrétního přípravku blokujícího LT k léčení folikulárního lymfomu je tedy v kompetenci odborníka v oboru medicíny a farmacie.

10

15

Obecně je frekvence dávek stanovena ošetřujícím lékařem, a může jít o jednotlivou dávku nebo opakované dávky, buďto denně nebo v intervalech 2 až 6 dnů, týdne, dvou týdnů nebo měsíce.

20

Při kombinované terapii podle předkládaného vynálezu se užívají k léčení folikulárního lymfomu jiné přípravky nebo prostředky zaměřené na takový lymfom, jako je ozařování, chemoterapie a jiné způsoby léčení odborníkům známé.

25

Sloučenina blokující LT podle předkládaného vynálezu se pacientovi podává jako farmaceutický přípravek, který obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič. Tento nosič je pro pacienta netoxický a inertní v koncentracích nutných pro účinek blokující sloučeniny nebo jiné účinné látky, takže vedlejší účinky nosiče nijak neoslabují působení účinné látky. Přípravek může obsahovat i další kompatibilní látky, což znamená takové složky, které jsou schopny mísení se sloučeninou blokující LT, aniž by došlo k podstatnému snížení terapeutickou účinností léčiva. Přípravky podle předkládaného vynálezu vhodné pro perorální podávání mohou být v podobě oddělených jednotek jako jsou tobolky, tablety, pilulky, pastilky a papírové sáčky, obsahující předem stanovené účinné látky v podobě prášku nebo granulátu, nebo jako liposomy, suspenze ve vodné nebo jiné kapalině jakožto sirup, nebo elixír, emulze nebo výtažek.

30

35

Přípravek podle předkládaného vynálezu může být v nádobce, která zajišťuje sterilitu a ochraňuje aktivitu účinné látky po dobu distribuce a skladování a současně umožňuje pohodlný a účinný způsob podání přípravku pacientovi. Sloučeniny blokující LT formulované pro injekční podávání mohou být dodávány v uzavřené lahvičce vhodné pro odebrání obsahu pomocí injekční stříkačky s jehlou. Taková lahvička je buďto pro jedno nebo pro opakované použití. Přípravek se může dodávat také ve formě předem naplněné injekční stříkačky. V některých případech je přípravek formulován jako kapalný, jindy v suchém nebo lyofilizovaném stavu a vyžaduje rekonstituci standardním nebo současně dodávaným ředidlem. Pokud se přípravek dodává jako kapalný přípravek pro intravenózní podávání, může být v sterilním vaku nebo kontejneru vhodném k napojení na soupravu pro intravenózní podávání nebo katetr. V případě, že se blokující sloučenina podává v perorální formě jako tablety nebo pilulky, je ve skleněné lahvi/kontejneru s odnímatelným uzávěrem. Kontejner je označen údaji jako je jméno sloučeniny, o kterou se jedná, jméno výrobce nebo distributora, indikace, dávkování a další instrukce pro vhodné skladování nebo podávání.

45

Citovaná literatura

50

1. Tsiagbe, V.K., Inghirami, G. & Thorbecke, G.J. The physiology of germinal centers. *Crit Rev Immunol* 16, 381–421 (1996).
2. Freedman, A.S. & Nadler, L.M. in *Cancer Medicine 3rd Ed.* (ed. Holland, J.F.e.a.), 2028–2068 (Lea&Febiger, London, 1994).
3. Lasky, J.L., Ponzio, N.M. & Thorbecke, G.J. Characterization and growth factor requirements of SJL lymphomas. I. Development of a B cell growth factor-dependent in vitro cell line,

- cRCS-X [published erratum appears in *J Immunol* 1988 Apr 1; 140(7): 2478]. *J Immunol* 140, 679-87 (1988).
4. Lasky, J.L. & Thorbecke, G.J. Characterization and growth factor requirements of SJL lymphomas. II. Interleukin 5 dependence of the in vitro cell line, cRCS-X, and influence of other cytokines. *Eur J Immunol* 19, 365-71 (1989).
 5. Ponzio, N.M., Brown, P.H. & Thorbecke, G.J. Host-tumor Interactions in the SJL lymphoma model. *Intern. Rev. immunol.* 1, 273-301 (1986).
 6. Tsiagbe, V.K., *et al.* Syngeneic response to SJL follicular center B cell lymphoma (reticulum cell sarcoma) cells is primarily in V beta 16+ CD4+ T cells. *J Immunol* 150, 5519-28 (1993).
 7. Matsumoto, M., *et al.* Distinct roles of lymphotoxin alpha and the type I tumor necrosis factor (TNF) receptor in the establishment of follicular dendritic cells from nonbone marrow-derived cells. *J Exp Med* 186, 1997-2004 (1997).
 8. Mackay, F., Majeau, G.R., Lawton, P., Hochman, P.S. & Browning, J.L. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. *Eur J Immunol* 27, 2033-42 (1997).
 9. Karz, I.R., Chapman-Alexander, J., Jacobson, E.B., Lennan, S.P. & Thorbecke, G.J. Growth of SJL/J derived transplantable reticulum cell sarcoma as related to its ability to induce T-cell proliferation in the host. III. Studies on thymectomized and congenitally athymic SJL mice. *Cellular Immunol.* 65, 84-92 (1981).

Seznam sekvencí

- (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:
 - (i) CHARAKTERISTIKA SKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 197 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyseliny
 - (C) TYP VLÁKNA:
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
 - (ii) TYP MOLEKULY: peptid
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 1:

3. Použití podle nároku 2, kdy pacient je léčen ozařováním nebo transplantací kostní dřeně.
- 5 4. Použití podle nároku 2 nebo 3, kdy se pacientovi podává v kombinaci alespoň jeden chemoterapeutický přípravek a/nebo inhibitor jiné TNF dráhy.
5. Použití podle nároku 4, kdy TNF dráha je CD40/ligand CD40 dráha.
6. Použití podle nároku 4 nebo 5, kdy inhibitor TNF dráhy je protilátka anti-CD40 ligand.
- 10 7. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kdy přípravek a/nebo inhibitor interakce mezi LT- β a jeho receptorem je vybrán ze skupiny, kterou tvoří rozpustný LT- β receptor, protilátka anti-LT- α , protilátka anti-LT- β a protilátka anti-LT- β -R.
- 15 8. Použití podle nároku 7, kdy sloučenina nebo inhibitor je rozpustný LT- β receptor, který obsahuje ligand vázající doménu, která se selektivně váže k povrchovému LT ligandu, a dále obsahuje Fc doménu humánního imunoglobulinu.
- 20 9. Použití podle nároku 7, kdy anti-LT- β -R protilátka je monoklonální protilátka, humanizovaná a/nebo chimérická protilátka.
10. Použití podle kteréhokoliv z nároků 2 až 9, kdy pacientem je savec.
- 25 11. Použití podle nároku 10, kdy pacientem je člověk.

30

Konec dokumentu
