

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

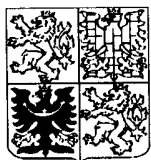
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2361-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26. 01. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.01.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/378968**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/01386**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/22788**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

A 61 K 38/19
A 61 K 39/395
A 61 K 38/21
G 01 N 33/53

// (A 61 K 39/395,
A 61 K 38:21), (A 61 K 38/21,
A 61 K 38:19)

(71) Přihlášovatel:

BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Původce:

Browning Jeffrey L., Brookline, MA, US;

Meier Werner, Burlington, MA, US;

Benjamin Christopher D., Beverly, MA, US;

(74) Zástupce:

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

ceptor aktivujících činidel za účelem po-
tencování cytotoxicity buněk.

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Komplexy alfa/beta-lymfotoxinu a proti-
látky anti-lymfotoxin-beta-receptoru jako
protinádorová činidla**

(57) Anotace:

Jsou popsány prostředky a způsoby použitelné pro aktivaci signalizace receptoru lymfotoksinu-beta, který pak vyvolává silné antiproliferativní účinky na nádorové buňky. Zejména se vynález týká heteromerních lymfotoksinových komplexů vytvořených mezi lymfotoksinem-alfa a četnými podjednotkami lymfotoksinu-beta, které indukují cytotoxické účinky na nádorové buňky za přítomnosti činidla aktivujících receptor lymfotoksinu-beta. Do rozsahu vynálezu spadají též protilátky zaměřené proti receptoru lymfotoksinu-beta, které působí jako činidla aktivující receptor lymfotoksinu-beta samotná nebo v kombinaci s jinými činidly aktivujícími receptor lymfotoksinu-beta buď v přítomnosti nebo v nepřítomnosti komplexů lymfotoksinu-alfa/beta. Předmětem vynálezu je též screeningová metoda pro selekci těchto protilátek. Vynález se také týká prostředků a způsobů používajících zesílených protilátek anti-lymfotoksin-beta receptoru za přítomnosti jiných lymfotoksin-beta re-

CZ 2361-97 A3

25

CURRENT TEXT

2001-97

175 288/HK

Způsob léčby nebo omezení pokračování, závažnosti nebo účinků neoplazie, jakož i způsob volby LT-beta-R aktivujícího činidla, farmaceutický prostředek a LT-beta-R aktivující činidlo

Oblast techniky

Vynález se týká prostředků a způsobů použitelných pro aktivaci signalizace receptoru lymfotoxinu-beta, která pak vyvolává silné antiproliferativní účinky na nádorové buňky. Zejména se vynález týká heteromerních lymfotoxinových komplexů vytvořených mezi lymfotoxinem-alfa a více podjednotkami lymfotoxinu-beta, které indukují cytotoxické účinky na nádorové buňky za přítomnosti lymfotoxin-beta receptor aktiváčnických činidel. Do rozsahu vynálezu spadají též protilátky zaměřené proti lymfotoxin-beta receptoru, které působí jako lymfotoxin-beta receptor aktivující činidla samotná nebo v kombinaci s jinými lymfotoxin-beta receptor aktivujícími činidly buď v přítomnosti nebo v nepřítomnosti komplexů lymfotoxinu-alfa/beta. Předmětem vynálezu je též screeningová metoda pro selekci těchto protilátek. Vynález se také týká prostředků a způsobů používajících zesíťovaných protilátek anti-lymfotoxin-beta receptoru za přítomnosti jiných lymfotoxin-beta receptor aktivujících činidel za účelem potencionování cytotoxicity buněk.

Dosavadní stav techniky

Rodina receptoru faktoru nekrotizujícího nádory (TNF) má několik členů, jejichž signalizace může vyvolat smrt buňky nekrózou nebo apoptózou (programovaná smrt buňky). Ligandy TNF a lymfotoxinu-alfa (LT-alfa, dříve nazývaný TNF-beta) se váží na a aktivují TNF receptory (p60 a p80, zde nazývané "TNF-R"). Signalizace TNF-R iniciuje obecné imunitní odpovědi na infekce nebo stres v normálních buňkách, je ale cytotoxická vůči buňkám s transformovanými fenotypy nebo vůči nádorovým buňkám. TNF-R signalizace může způsobit selektivní lyzi

nádorových buněk a buněk infikovaných viry. Cytotoxické účinky signalizace TNF-R na nádorové buňky se zvětší interferonem-gama (IFN-gama) a různými obvyklými chemoterapeutickými prostředky.

Bylo by užitečné využít antiproliferativní nebo cytotoxické aktivity indukované TNF-R signalizací v nádorových buňkách pro terapeutické účely. Aktivace TNF-R však má pleiotropní účinky na řadu imunoregulačních odpovědí včetně iniciace prozánětlivých kaskád. Nebylo tedy možné zaměřit cytotoxické účinky signalizace TNF-R na nádorové buňky bez současné stimulace zánětlivých odpovědí, které vedou u lidí k celkové toxicitě.

Podobně může stimulace jiného s TNF příbuzného receptoru nazvaného Fas receptor (FasR) aktivovat cytotoxicitu programovaným úmrtím buněk u různých typů jak nádorových tak nenádorových buněk. Bylo však prokázáno, že aktivace FasR způsobuje rychlou nekrózu jater, čímž znemožňuje jeho terapeutickou aplikaci u lidí.

Nedávno byl identifikován jiný receptor v rodině TNF, nazývaný LT-beta receptor (LT-beta-R) (Crowe a spol., Science, 264, str. 707 až 710 (1994)). LT-beta-R váže heteromerní lymfotoxinové komplexy (LT-alfa/beta), které obsahují LT-alfa podjednotky v kombinaci s jiným s TNF příbuzným polypeptidem zvaným lymfotoxin-beta (LT-beta). Tyto LT-alfa/beta komplexy jsou spojeny membránou a většinou mají stechiometrii LT-alfa/beta₂ (Browning a spol., Cell, 72, str. 847 až 856 (1993), Browning a spol., J. Immunol., 154, str. 33 až 46 (1995)).

Má se za to, že analogicky s TNF-R a jinými receptory podobnými TNF dochází k aktivaci signalizace LT-beta-R, když je přivedeno více receptorů na povrchu buňky do těsné blízkosti (Crowe a spol., Science, 264, str. 707 až 710 (1994)). Tento proces je nazýván kumulace receptorů. Ligandy TNF a LT jsou multivalentní komplexy, které mohou současně vázat a tak

tvořit agregát více než s jedním receptorem. Kumulace receptorů jako prostředek pro aktivaci receptorů v jiných systémech byla dobře dokumentována, zejména pro receptor tyrosin kinasy (Ullrich a Schlesinger, Cell, 61, str. 203 až 212 (1990), Kolanus a spol., Cell, 74, str. 171 až 183 (1993)). Aplikace ligandů LT-alfa1/beta2 nebo/a LT-beta-R aktivujících činidel, která může indukovat na povrchu cílových nádorových buněk kumulaci a signalizaci molekul LT-beta-R ve směru exprese genu, by tedy byla užitečná pro přímou stimulaci cesty LT-beta-R v těchto buňkách.

Signalizace pomocí LT-beta-R, podobně jako TNF-R, může aktivovat cesty, které vedou k cytotoxicitě a smrti buňky u nádorových buněk. Důležité je, že ligandy LT-alfa1/beta2 se nevážou na TNF-R žádnou významnou afinitou. Z toho důvodu řízená aktivace LT-beta-R v nádorových buňkách by vyvolala cytotoxicitu v těchto buňkách bez stimulace zánětlivých cest spojené s aktivací TNF-R. Léčba s LT-alfa1/beta2 nebo/a s jinými LT-beta-R aktivujícími činidly by tedy byla užitečná pro léčení nebo omezení pokračování, závažnosti nebo účinků nádorových buněk (neoplazie) za současného překonání problémů se závažnými vedlejšími účinky, které se vyskytovaly, když byla zkoušena aktivace TNF-R nebo FasR jako protinádorová léčba.

Podstata vynálezu

Vynález řeší shora uvedené problémy tím, že poskytuje farmaceutické prostředky a způsoby pro léčbu nádorových buněk stimulací signalizace LT-beta-R bez současné stimulace zánětlivých odpovědí spojených s TNF-R. Podle jednoho provedení jsou poskytnuty komplexy lymfotoxinu vytvořené mezi LT-alfa a více podjednotkami LT-beta (LT-alfa/beta heteromerní komplexy), které indukují cytotoxické účinky na buňky, které nesou LT-beta-R v přítomnosti LT-beta-R aktivujícího činidla. Výhodnými prostředky a způsoby podle tohoto provedení jsou komplexy LT-alfa1/beta2 v přítomnosti LT-beta-R aktivač-činidla. Výhodněji jsou LT-alfa1/beta2 komplexy v rozpustné formě spíše než ve formě vázané na membránu a LT-beta-R akti-

vačným činidlem je IFN-gama.

Podle jiného provedení vynálezu je nejméně jedna protilátka, zaměřená proti LT-beta-R (anti-LT-beta-R protilátka), použita jako druhé LT-beta-R aktivující činidlo ve spojení s heteromerním komplexem LT-alfa/beta. Výhodné prostředky a způsoby podle tohoto provedení se vyznačují LT-alfal/beta2 v přítomnosti IFN-gama jako prvního aktivujícího činidla a nejméně jedné anti-LT-beta-R protilátky jako druhého LT-beta-R aktivujícího činidla. Výhodněji jsou LT-alfal/beta2 komplexy rozpustné a protilátka je monoklonální protilátka (anti-LT-beta-R mAb).

Podle jiného provedení je použita nejméně jedna anti-LT-beta-R protilátka v přítomnosti nebo nepřítomnosti druhého LT-beta-R aktivujícího činidla bez exogenního LT-alfa/beta heteromerního komplexu. Výhodné prostředky a způsoby podle tohoto provedení obsahují nejméně dvě anti-LT-beta-R monoklonální protilátky (anti-LT-beta-R mAbs), které rozpoznávají nepřekrývající se epitopy LT-beta-R v kombinaci s IFN-gama.

Předmětem dalšího provedení vynálezu jsou farmaceutické prostředky a způsoby pro potencování cytotoxicity pro nádorové buňky, které se vyznačují tím, že se používají zesítené anti-LT-beta-R protilátky ve spojení s druhým LT-beta-R aktivujícím činidlem. Podle výhodného provedení jsou jednotlivé anti-LT-beta-R protilátky imobilizovány zesítením na povrch. Podle jiného výhodného provedení jsou anti-LT-beta-R protilátky zesíteny v roztoku. Výhodněji jsou anti-LT-beta-R protilátky monoklonální protilátky a druhým LT-beta-R aktivujícím činidlem je IFN-gama.

Předmětem vynálezu je dále nový screeningový proces pro selekci LT-beta-R aktivujících činidel, jako například anti-LT-beta-R protilátek, které působí v kombinaci s LT-alfa/beta heteromerními komplexy k urychlení smrti nádorových buněk. Test využívá zvýšené senzitivity humánních ade-

nokarcinomatózních buněk vůči LT-alfa/beta heteromerním komplexům v přítomnosti LT-beta-R aktivujících činidel v testu na cytotoxicitu. Postup použitý k testování předpokládaných LT-beta-R aktivujících činidel je popsán na příkladu protilátek anti-LT-beta-R a sestává z následujících operací:

1) Nádorové buňky (například lidské adenokarcinomatózní buňky HT29) se kultivují několik dní v médiu obsahujícím IFN-gama a purifikovaný LT-alfa1/beta2 v přítomnosti nebo nepřítomnosti příslušné testované anti-LT-beta-R protilátky.

2) Na buňky se působí barvivem, které obarví živé buňky.

3) Spočítají se obarvené buňky, aby se stanovil podíl nádorových buněk usmrčených za přítomnosti LT-alfa1/beta2, IFN-gama a testované anti-LT-beta-R protilátky v každém vzorku. Alternativně se může stanovit počet přežívajících buněk libovolným z řady dobře známých testů, kterými se měří životaschopnost buněk, jako například inkorporací ^3H -thimidinu do DNA.

Jednou z anti-LT-beta-R protilátek (nebo kombinace protilátek), která zvyšuje významně procento nádorových buněk usmrčených v tomto testu, je LT-beta-R aktivující činidlo v rámci rozsahu tohoto vynálezu. Tento cytolytický test může být přizpůsoben pro identifikaci nových LT-beta-R aktivujících činidel, která fungují v kombinaci s LT-alfa/beta heteromerními komplexy.

Vynález je ilustrován na přiložených výkresech takto:

Obrázek 1A

Třídící analýzy purifikovaných forem LT-alfa/beta heteromerního komplexu rozdělených pomocí TNF-R a LT-beta-R imunoafinitní chromatografie

20.11.97

Purifikované proteiny byly analyzovány na pryskyřici TSK 3000 HPLC ve fyziologickém roztoku, pufovaném fosfátem. Je znázorněna poloha různých ukazatelů velikosti.

Obrázek 1B

Iontoměničové analýzy purifikovaných LT forem za použití karboxymethylové kolony Poros (4,6 mm x 100 mm) na přístroji Biocad (Perceptive Biosystems)

27 µg každého vzorku proteinu se vneslo na kolonu a eluovalo se v gradientu 0 až 1 M NaCl přes 20 objemů kolony při 5 ml/minuta v pufru obsahujícím 16,66 µM Hepes, 16,66 µM octanu sodného a 16,66 µM pufru Mes (pH 6,5).

Obrázek 2A

Srovnání cytotoxické aktivity Anti-Fas receptoru mAb CH-11 (-●-), TNF (-○-), LT-alfa (-□-), LT-alfal/beta2 (-■-) a LT-alfa2/betal (-◆-) na humánní adenokarcinomatózní buňky HT29 jak v přítomnosti tak v nepřítomnosti 80 U/ml IFN-gama.

Obrázek 2B

Srovnání schopnosti 5 µg/ml humánního IgG (-●-), rozpustného p60TNF-R-Fc (-○-) a rozpustných LT-beta-R-Fc receptor-imunoglobulinových chimér (-□-) inhibovat cytotoxické účinky v obr. 2A za přítomnosti 80 U/ml IFN-gama.

Obrázek 3

Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky potencují cytotoxický účinek LT-alfal/beta2 na humánní adenokarcinomatózní buňky HT29.

(A) Cytolytické účinky LT-alfal/beta2 na buňky HT29 jsou potencovány přítomností anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek CDH10.

Účinky LT-alfa1/beta2 byly změřeny bez monoklonální protilátky (-●-) a v přítomnosti 0,5 µg/ml kontrolního IgG1 (-■-), 0,05 µg/ml CDH10 (-○-) a 0,5 µg/ml (-□-) CDH10.

(B) Cytolytické účinky LT-alfa1/beta2 na buňky HT29 jsou inhibovány přítomností anti-LT-beta-R monoklonální protilátky BDA8.

Účinky LT-alfa1/beta2 byly změřeny za přítomnosti 2 µg/ml kontrolního IgG1 (-■-) nebo anti-LT-beta-R monoklonální protilátky BDA8 (-□-). Rozdíl mezi chováním CDH10 a BDA8 anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek v tomto testu je jednou z indikací, že jsou zaměřeny na rozdílné epitopy LT-beta-R.

Obrázek 4

Imobilizované anti-LT-beta-R protilátky jsou cytotoxické vůči humánním adenokarcinomatózním buňkám HT29.

(A) Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky mají přímý cytotoxický účinek na buňky HT29, když jsou imobilizovány na povrchu.

Destičky byly pokryty IgG1 (-●-), monoklonální protilátkou zaměřenou proti nepříbuznému hojnému antigenu buněčného povrchu HT29/26 (-■-), BDA8 (-○-) a CDH10 (-□-).

(B) Účinky rozpustných anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek samotných na růst buněk HT29.

Symbyly jako v (A). Tyto anti-LT-beta-R monoklonální protilátky v své rozpustné formě nemají významné cytotoxické účinky na buňky HT29, když jsou aplikovány individuálně.

Obrázek 5

Reprezentativní kvantifikace zvýšené cytotoxicity vůči nádorovým buňkám působením dvojic rozpustných anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek.

(A) Cytotoxické účinky kontrolního IgG1 (100 ng/ml), anti-LT-beta-R mAb BHA10 (100 ng/ml), anti-LT-beta-R monoklonální protilátky CBE11 (50 ng/ml), BHA10 (100 ng/ml) + IgG1 (100 ng/ml) a BHA10 (100 ng/ml) + CBE11 (50 ng/ml) na buňky HT29. IFN-gama byl přítomen s 80 U/ml.

(B) Cytotoxické účinky kontrolního IgG1 (100 ng/ml), anti-LT-beta-R monoklonální protilátky CDH10 (100 ng/ml), anti-LT-beta-R monoklonální protilátky CBE11 (50 ng/ml), CDH10 (100 ng/ml) + IgG1 (100 ng/ml) a CDH10 (100 ng/ml + CBE11 (50 ng/ml) na buňky HT29. IFN-gama byl přítomen s 80 U/ml.

(C) Cytotoxické účinky kontrolního IgG1 (100 ng/ml), anti-LT-beta-R monoklonální protilátky CDH10 (33 ng/ml), anti-LT-beta-R monoklonální protilátky AGH1 (50 ng/ml) a CDH10 (33 ng/ml) + AGH1 (50 ng/ml) na buňky HT29. IFN-gama byl přítomen s 80 U/ml.

(D) Jako u (C) s tím rozdílem, že v cytolytickém testu byly použity humánní adenokarcinomatózní WiDr buňky (Raitano a Korc, J. Biol. Chem., 265, str. 10466 až 10472 (1990)).

Obrázek 6

Velikost nádoru u myší SCID léčených protilátkou anti-LT-beta-R

(A) Velikost humánního adenokarcinomu WiDr u myší SCID 30 dní po inokulaci se současnou léčbou protilátkou

Myším byl aplikován 1. a 2. den fyziologický roztok,

samotný IFN-gama, anti-LT-beta-R monoklonální protilátka (CBE11) s a bez IFN-gama a kontrolní anti-humánní LFA-3 monoklonální protilátka (1E6) s IFN-gama. Průměr z každé skupiny je naznačen příčnou čarou. Průměry, standardní odchylky a počet zvířat (v závorkách) pro pět skupin (odleva doprava) byly: 0,88 +/- 0,59 (14), 1,21 +/- 0,7 (21), 0,041 +/- 0,052 (16), 0,11 +/- 0,1 (12) a 0,98 +/- 1,16 (12).

(B) Velikost humánního adenokarcinomu WiDr u myši SCID od 14. do 49. dne po inokulaci nádorových buněk s 15-tidenní postinokulační léčbou protilátkou

Nádory se nechaly narůst do středního průměru 0,53 cm (0,076 cm³) bez jakékoliv léčby a s i.p. injekcemi se započalo 15. den a pokračovalo se, jak naznačeno šipkami. Průměry a standardní odchylky jsou naznačeny pro skupinu 12 zvířat léčených buď samotným IFN-gama (1 x 10⁶ U/injekce) (- -), IFN-gama s 50 µg 1E6 anti-LFA-3 monoklonální protilátky (- -), IFN-gama s 50 µg CBE11 anti-LT-beta-R monoklonální protilátky (- -) nebo 50 µg CBE11 anti-LT-beta-R monoklonální protilátky samotné (neznázorněno).

Aby byl zde popsán vynález zcela srozumitelný, je dále uveden následující detailní popis.

Výraz "protinádorová aktivita" se týká schopnosti substance nebo prostředku blokovat proliferaci nádorových buněk nebo indukovat smrt nádorových buněk, u nichž dochází k interakci s uvedenou substancí nebo prostředkem.

Výraz "apoptóza" se týká procesu naprogramované smrti buněk.

Výraz "cytotoxická aktivita" se týká schopnosti substance nebo prostředku vyvolat smrt buněk, u nichž dochází k interakci s touto substancí nebo prostředkem.

Výraz "epitop" (nebo antigenní determinanta) znamená

část molekuly, která se spojuje s jediným místem na molekule protilátky pro vázání antigenu. Jediný epitop se rozpoznává monoklonální protilátkou (mAb). Více epitopů se normálně rozpoznává polyklonálními protilátkami (Ab).

"Fc doména" protilátky se týká části molekuly obsahující CH_2 , CH_3 a pantové oblasti, ale postrádající vazebná místa pro antigen.

Výraz "činitlo indukující interferon" se týká kteréhokoliv činitla, které je schopno přímo nebo nepřímo stimulovat endogenní produkci libovolného interferonu typu I (IFN-alfa, IFN-beta) nebo typu II (IFN-gama). Příklady činitel indukujících interferon zahrnují molekuly s dvouřetězcovou RNA a řadu sloučenin odvozených od rostlin nebo sloučenin připravených farmaceuticky.

Výrazy "LT-alfa mutein" a "LT-beta mutein" se týkají LT-alfa nebo LT-beta polypeptidů, které mají jednu nebo více změn aminokyselin ve srovnání se sekvencí aminokyselin odpovídajícího nativního polypeptidu.

Výraz "LT-beta-R aktivující činitlo" se týká libovolného činitla, které může zvýšit vazbu ligandů na LT-beta-R, kumulaci LT-beta-R na povrchu buněk nebo signalizaci LT-beta-R nebo které může ovlivnit, jak je signál LT-beta-R interpretován uvnitř buňky. Příklady LT-beta-R aktivujících činitel zahrnují IFN-alfa, IFN-gama, TNF, interferon indukující činitla, rozpustné anti-LT-beta-R protilátky, zesíťené anti-LT-beta-R protilátky a multivalentní anti-LT-beta-R protilátky.

Výraz "LT-beta-R signalizace" se týká všech molekulárních reakcí spojených s LT-beta-R cestou a následujících molekulárních reakcí, které z ní vyplývají.

Výraz "protilátka anti-LT-beta-receptoru" ("anti-LT-beta-R Ab") se týká libovolné protilátky, která rozpoznává

a váže se nejméně na jeden epitop LT-beta receptoru.

Výraz "monoklonální protilátka anti-LT-beta receptoru" ("anti-LT-beta-R mAb") se týká libovolné monoklonální protilátky, která rozpoznává a váže se na jediný epitop LT-beta-R.

Výraz "zesítěné anti-LT-beta-R (m)Abs" se týká protilátek zaměřených proti LT-beta-R, které buď byly zesítěny vzájemně na aglomeráty protilátek v roztoku za použití zesítovacího činidla anti-LT-beta-R protilátky (Ab) nebo (mAb) nebo které byly imobilizovány ve vzájemné těsné blízkosti na povrchu nebo na matrici.

Výraz "zesítovací činidlo anti-LT-beta-R protilátky (nebo monoklonální protilátky)" se týká libovolného činidla, které je schopno kovalentně nebo nekovalentně agregovat anti-LT-beta-R protilátky v roztoku, takže se protilátky mohou vázat na a potencovat kumulaci LT-beta receptorů na cílovém buněčném povrchu. Taková zesítovací činidla zahrnují, aniž by se na ně omezovala, chemická zesítovací činidla, sekundární protilátky, které reagují s částmi anti-LT-beta-R protilátek nebo monoklonálních protilátek, a rozpustné nebo na povrch vázané Fc receptory -- buď endogenní nebo přidané exogenně -- které jsou schopny se vázat na anti-LT-beta-R protilátky.

Výrazy "LT-alfa biologická aktivita, "LT-beta biologická aktivita" a "LT-alfa/beta biologická aktivita" jsou definovány jako: 1) imunologická křížová reaktivita s protilátkou zaměřenou proti nejméně jednomu epitopu odpovídající nativní podjednotky nebo komplexu podjednotek nebo 2) schopnost LT podjednotky nebo komplexu podjednotek soutěžit o vazebná místa pro ligandy na LT-specifickém receptoru jako je TNF-R nebo LT-beta-R nebo 3) že jsou schopny stimulovat imunní regulační odpověď nebo cytotoxickou aktivitu kvalitativně společnou s nativní LT podjednotkou nebo komplexem.

Výraz "LT-alfa/beta heteromerní komplex" se týká

stabilního spojení mezi nejméně jednou podjednotkou LT-alfa a více než jednou podjednotkou LT-beta. Podjednotky se mohou spojovat elektrostatickými, van der Waalsovými nebo kovalentními vazbami. Heteromerní komplex LT-alfa/beta má s výhodou nejméně dvě sousední podjednotky LT-beta a neobsahuje žádné sousední podjednotky LT-alfa. Nejvýhodněji má komplex stechiometrii LT-alfa₁/beta₂.

Výraz "multivalentní ligand" se týká molekuly nebo komplexu, který má více než jedno vazebné místo pro receptory a je schopen současně vázat a přivést do těsné blízkosti nejméně dvě receptorové molekuly.

"Vedoucí sekvence typu I" je amino-terminální část eukaryotického proteinu, která slouží jako signál k řízení proteinu k endoplazmatické retikulární (ER) membráně a často celou sekreční cestou. Vedoucí sekvence se obvykle odštěpuje signální peptidázou v ER membráně.

"Signální sekvence" je funkční ekvivalent eukaryotického typu I vedoucí sekvence v prokaryotických hostitelích a řídí translokaci proteinů do nebo přes lipidové dvouvrstvé membrány bakterie.

"Rozpustný LT-alfa/beta heteromerní komplex" je LT-alfa/beta heteromerní komplex obsahující rozpustné podjednotky LT-beta, ve kterých byly sekvence aminokyselin, které lokalizují polypeptid k membráně, vypuštěny nebo inaktivovány, čímž se LT-beta jednotka stane rozpustnou. Rozpustné LT-alfa/beta heteromerní komplexy mohou být sekretovány vhodnou hostitelskou buňkou, která byla sestrojena pro expresi obou podjednotek.

"Povrchový LT-alfa/beta komplex" je komplex obsahující podjednotky LT-alfa a LT-beta, vázané na membránu, která je upravena na povrchu buněk.

Produkce LT-alfa/beta komplexů, vázaných na membránu

Lymfotoxinové komplexy buněčného povrchu byly charakterizovány v CD4⁺ T celulórních hybridomových buňkách (II-23.D7), které exprimují vysoké hladiny LT (Browning a spol., J.Immunol., 147, str. 1230 až 1237 (1991), Androlewicz a spol., J. Biol. Chem., 267, str. 2542 až 2547 (1992)). Zralý LT-alfa postrádá transmembrální doménu a je umístěn k povrchu buňky interakcí nejméně s jednou k membráně vázanou LT-beta podjednotkou. S membránou vázané (povrchově) heteromerní komplexy mají převážně LT-alfa1/beta2 stechiometrii.

LT-beta jako buněčný membránový protein váže LT-alfa během syntézy, tedy "zaměřuje" LT-alfa k buněčné membráně. V nepřítomnosti LT-beta je LT-alfa sekretován do extracelulárního média. LT podjednotky se normálně spojují do komplexů uvnitř buňky před exportem proteinu do membrány. Jakmile jsou LT-beta podjednotky vneseny do membrány, vytvoří stabilní komplexy se sekretovaným LT-alfa. Je-li tedy požadována forma LT-alfa/beta heteromerního komplexu vázaná na membránu, je výhodné společně exprimovat žádoucí LT-alfa a LT-beta podjednotky uvnitř téže buňky.

Povrchový LT-alfa/beta heteromerní komplex může být rekonstruován kotransfekcí hostitelských buněk s oběma LT-alfa a LT-beta geny. Povrchové LT komplexy nemohou být pozorovány na stabilních buněčných liniích, které exprimují jeden nebo druhý LT gen samotný. Když však hostitelská buňka produkuje normálně velká množství LT-alfa (například buňky RPMI 1788, viz níže), pak by transfekce LT-beta genem, který kóduje požadovaný LT-beta polypeptid, měla být dostatečná k vytvoření LT-alfa/beta komplexů, obsahujících LT-alfa podjednotky plné délky.

Společná exprese LT-alfa a LT-beta polypeptidů v řadě eukaryotických expresních systémů vede k jejich spojení a exportu jako aktivního ligandu (Crowe a spol., J. Immunol.

Methods, 168, 79 až 89 (1994)). K použitelným hostitelským systémům patří, aniž by na ně byly omezeny, CHO buňky, COS buňky, B buňky zahrnující myelomy, bakulovirem infikované hmizí buňky a kvasinky.

LT-alfa podjednotka heteromerních komplexů LT-alfa/beta podle vynálezu může být selektována z lymfotoxinu-alfa, humánního nebo zvířecího lymfotoxinu-alfa, rekombinantního lymfotoxinu-alfa, rozpustného lymfotoxinu-alfa, sekretovaného lymfotoxinu-alfa, muteinů lymfotoxinu-alfa, které mají LT-alfa biologickou aktivitu, nebo fragmentů lymfotoxinu-alfa kteréhokoliv ze shora uvedených s biologickou aktivitou LT-alfa.

LT-alfa polypeptid může být kterákoliv rozpustná forma molekuly včetně jejích aktivních fragmentů, která může být vytvořena v eukaryotických expresních systémech, kde bude přírodní LT-alfa vedoucí sekvence odštěpena. Alternativně mohou být použity k maximalizaci sekrece LT-alfa v jiných hostitelských systémech fúze zralé LT-alfa sekvence s heterologickou signální sekvencí. Signály jsou zvoleny na bázi předpokládané hostitelské buňky a mohou zahrnovat bakteriální, kvasinkové, savčí a virové sekvence. Nativní signál nebo vasikulární buněčná molekulární-1 (VCAM-1) signální sekvence jsou vhodné k použití v savčích expresních systémech.

LT-alfa polypeptidy mohou být též fúzovány s polypeptidy s prodlouženým plazmatickým poločasem životnosti, jako jsou imunoglobulinové řetězce nebo jejich fragmenty. Plazmatické proteiny, které mohou být použity ke zvýšení poločasu životnosti plazmy, zahrnují sérový albumin, imunoglobuliny, apolipoproteiny a transferrin. Připojení polyethylenglykolu (PEG) může stabilizovat polypeptid a snížit jeho imunogenecitu. S výhodou není LT-alfa fúzní protein významně imunogenní v jedinci, který má být léčen, a plazmatický protein nezpůsobuje u jedinců v důsledku své normální biologické aktivity nežádoucí vedlejší účinky.



Humánní LT-alfa je glykozylován na N a O zbytcích a v závislosti na zdroji se vyznačuje značnou mikroheterogenitou založenou na cukru. Oligosacharidový prostředek příslušného LT-alfa zvolený k vytvoření LT komplexu může ovlivnit in vivo rychlosti clearance (Fukushima a spol., Arch. Biochem. Biophys., 304, str. 144 až 153 (1993)). Protože varianty glykozylace mohou být vytvořeny expresí v různých hostitelských buňkách, je to jeden faktor, který má být zvážen při selekci zdroje LT-alfa.

LT-alfa může být purifikován od B lymfoblastoidní linie RMPI 1788, která konstitutivně sekretuje LT-alfa a může být indukována k sekreci vyšších hladin působením forbolesteru PMA (Aggarwal a spol., J. Biol. Chem., 259, str. 686 až 691 (1984)). Alternativně může být použit klonovaný humánní LT-alfa gen, aby produkoval rekombinantně LT-alfa polypeptidy v různých hostitelských systémech včetně bakterií (Schoenfeld a spol., J. Biol. Chem., 266, str. 3863 až 3869 (1991)), baktériem infikovaných hmyzích buněk (Crowe a spol., J. Immunol. Methods, 168, str. 70 až 89 (1994)) a savčích buněk (Browning a Ribolini, J. Immunol., 143, str. 1859 až 1867 (1989), Fukushima a spol., Arch. Biochem. Biophys., 304, str. 144 až 153 (1993)).

Části LT-alfa genu, které kódují polypeptidové fragmenty s biologickou aktivitou LT-alfa, mohou být vyhodnoceny za použití rutinních screeningových testů. K užitečným screeningovým testům na LT-alfa biologickou aktivitu patří kompetitivní inhibiční testy s nativním LT-alfa vázaným na TNF-R nebo měření přímé nebo nepřímé inhibiční schopnosti LT-alfa indukovat cytotoxicitu nádorových buněk v testech o sobě známých v oboru. LT-alfa fragmenty se s výhodou spojí do heteromerních komplexů s LT-beta a komplexy se testují na LT-alfa/beta biologickou aktivitu kompetitivní inhibiční s LT-alfa/beta vázaným na LT-beta-R nebo na jejich schopnost indukovat cytotoxicitu nádorových buněk v zde popsanych testech.

Lymfotoxin-beta, označovaný též jako p33, byl identifikován na povrchu T lymfocytů, T buněčných linií, B buněčných linií a lymfokiny aktivovaných smrtících buněk. LT-beta je předmětem souběžné mezinárodní přihlášky PCT/US91/04588 přihlašovatelů této patentové přihlášky, zveřejněné 9. ledna 1992 jako WO92/00329 a mezinárodní přihlášky PCT/US93/11669, zveřejněné 23. června 1994 jako WO 94/13808.

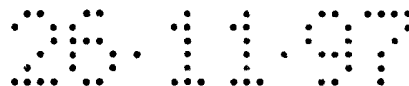
LT-beta gen kóduje polypeptid o 240 až 244 aminokyselinách (Browning a spol., Cell, 72, str. 847 až 856 (1993)). LT-beta je membránový protein typu II s krátkou N-terminální cytoplazmatickou doménou, následovanou doménou zakotvující membránu s 30 hydrofóbními aminokyselinami. Má jediné glykozylační místo vázané na N a má pouze jeden cysteinový zbytek, který, jak se zdá, se nezúčastňuje tvorby disulfidové vazby mezi podjednotkami.

LT-beta podjednotky obsahující LT-alfa/beta heteromerní komplexy podle vynálezu mohou být zvoleny z lymfotoxinu-beta, nativního humánního nebo zvířecího lymfotoxinu-beta, rekombinantního lymfotoxinu-beta, rozpustného lymfotoxinu-beta, sekretovaného lymfotoxinu-beta, muteinů lymfotoxinu-beta s biologickou aktivitou LT-beta nebo fragmentů lymfotoxinu-beta kteréhokoliv ze shora uvedených s biologickou aktivitou LT-beta.

Jak shora uvedeno pro LT-alfa polypeptid, mohou být též LT-beta polypeptidy modifikovány ke zvýšení jejich rozpustnosti nebo poločasu životnosti plazmy za použití stejných metod. Podobně mohou být části LT-beta genu, které kódují polypeptidové fragmenty s biologickou aktivitou LT-beta, vyhodnoceny za použití rutinních screeningových testů, jak uvedeno pro LT-alfa.

Produkce rozpustných komplexů

Rozpustné (nevázané na membránu) LT-alfa/beta hetero-

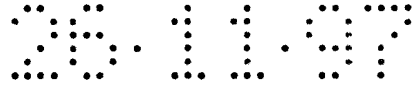


merní komplexy obsahují LT-beta podjednotky, které byly změněny z formy vázané na membránu na rozpustnou formu. Tyto komplexy jsou popsány detailně v souběžné mezinárodní přihlášce přihlašovatelů (PCT/US93/11669, zveřejněné 9. ledna 1992 jako WO 94/13808). Rozpustné LT-beta peptidy jsou definovány sekvencí aminokyselin lymfotoxinu-beta, přičemž sekvence je rozštěpena v libovolném bodě mezi koncem transmembrální oblasti (tj. asi u aminokyseliny č. 44) a první homologní oblasti TNF (tj. u aminokyseliny č. 88) podle číslovacího systému Browninga a spol., Cell, 72, str. 847 až 856 (1993)).

Rozpustné LT-beta polypeptidy mohou být produkovány oddělením N-konce LT-beta k odstranění cytoplazmatického konce a transmembrální oblasti (Crowe a spol., Science, 264, str. 707 až 710 (1994)). Alternativně může být transmembrální doména inaktivována vypuštěním nebo nahrazením normálně hydrofóbních zbytků aminokyselin, které obsahují transmembrální doménu, hydrofilními zbytky aminokyselin. V každém případě se vytvoří značně hydrofilní hydrofobický profil, který snižuje afinitu lipidů a zlepšuje rozpustnost ve vodě. Přednost se dává odstranění transmembrální domény před náhradou hydrofilními zbytky aminokyselin, protože se tím zamezuje zavedení potenciálně imunogenních epitopů.

Odstraněná nebo inaktivovaná transmembrální doména může být nahrazena nebo připojena k vedoucí sekvenci typu I (tj. k vedoucí sekvenci VCAM-1) tak, že protein je sekretován počínaje kdekoliv od mezi val140 do pro88. Rozpustné LT-beta polypeptidy mohou obsahovat libovolný počet dobře známých vedoucích sekvencí na N-konci. Taková sekvence by dovolila, aby peptidy byly exprimovány a zacíleny k sekreční cestě v eukaryotickém systému. Viz např. Ernst a spol., US patent č. 5, 082.783 (1992).

Rozpustné LT-alfa/beta heteromerní komplexy mohou být produkovány kotransfekcí vhodné hostitelské buňky s DNA kódující LT-alfa a rozpustný LT-beta (Crowe a spol., J.Immunol.



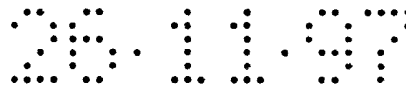
Methods, 168, str. 79 až 89 (1994)). Rozpustný LT-beta sekretovaný v nepřítomnosti LT-alfa je vysoce oligomerizován. Avšak když je exprimován společně s LT-alfa, vytvoří se 70 kD jakoby trimerní struktura, která obsahuje oba proteiny. Je též možno produkovat rozpustné LT alfa1/beta2 heteromerní komplexy transfekcí buněčné linie, která normálně exprimuje pouze LT-alfa (tak jako shora zmíněné buňky RPMI 1788) genetickým kodováním rozpustného LT-beta polypeptidu.

LT-alfa a LT-beta polypeptidy mohou být syntetizovány odděleně, denaturovány použitím mírných detergentů, vzájemně smíšeny a renaturovány odstraněním detergentu, čímž se vytvoří smíšené LT heteromerní komplexy, které mohou být rozděleny (viz níže).

Purifikace LT-alfa1/beta2 komplexů

Rozpustné LT-alfa1/beta2 heteromerní komplexy se oddělí od koexpresních komplexů, obsahujících různou podjednotkovou stechiometrii, chromatografií za použití TNF a LT-beta receptorů jako afinitních purifikačních činidel. TNF receptory se váží pouze v alfa/alfa rozštěpech LT komplexů. LT-beta receptor se váže s vysokou afinitou na beta/beta rozštěpy a s nižší afinitou na alfa/beta rozštěpy heteromerních LT-alfa/beta komplexů. LT-alfa3 a LT-alfa2/beta1 se tedy budou vázat na TNF-R. LT-beta-R může též vázat trimery LT-alfa2/beta1 (v rozštěpech alfa/beta), ale nemůže vázat LT-alfa3. Kromě toho LT-beta-R (ale ne TNF-R) váže LT-alfa1/beta2 a LT-beta(n) (přesné složení takového přípravku není známo, jsou to však velké agregáty).

Reagencie s afinitou k receptoru mohou být připraveny buď jako rozpustná extracelulární doména (viz například Loetscher a spol., J. Biol. Chem., 266, str. 18324 až 18329 (1991)) nebo jako chimérické proteiny s extracelulární doménou pro vazbu ligandů připojenou k doméně imunoglobulinu Fc (Loetscher e spol., J. Biol. Chem., 266, str. 18324 až 18329 (1991), Crowe a spol., Science, 264, str. 707 až 710



(1994)). Receptory se připojují k afinitním matricím chemickým zesíťením za použití rutinních postupů.

Existují dvě schémata, kterými LT-alfa1/beta2 ligand může být purifikován za použití receptorů a imunoafinitní chromatografie. V prvním schématu se vede supernatant z vhodného expresního systému, který exprimuje společně jak LT-alfa formu, tak seříznutou LT-beta formu, přes TNF-R kolonu. TNF-R bude vázat LT-alfa3 a LT-alfa2/beta1 trimery. Průtok TNF-R kolonou bude obsahovat LT-beta(n) a LT-alfa1/beta2.

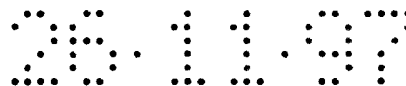
Ve druhém schématu všechny formy obsahující LT-beta (LT-beta(n), LT-alfa1/beta2 a LT-alfa2/beta1) jsou vázány na a eluovány z LT-beta-R kolony za použití klasických metod, jako chaotropu nebo změny pH. (LT-alfa3 protéká touto kolonou). Eluát je neutralizován nebo chaotrop odstraněn a eluát se pak vede přes TNF-R kolonu, která váže pouze LT-alfa2/beta1 trimery. Průtok touto kolonou bude obsahovat LT-beta(n) a LT-alfa1/beta2 trimery.

V obou případech mohou být čisté trimery odděleny od LT-beta následující gelovou filtrací nebo/a o sobě známými postupy iontoměničové chromatografie.

Alternativně mohou být různé formy LT-alfa/beta heteromerních komplexů odděleny a purifikovány řadou obvyklých chromatografických prostředků. Může být též výhodné kombinovat sérii obvyklých purifikačních schémat s některým z imunoafinitních purifikačních operací popsaných shora.

Zdroj anti-LT-beta-R protilátek

Polyklonální protilátková séra zaměřená proti lidskému LT-beta receptoru se připravují použitím konvenčních metod tím, že se zvířatům, jako kozám, králíkům nebo myším, aplikuje subkutánní injekcí humánní fúzní protein mezi LT-beta receptorem a Fc (příklad 2) v kompletním Freundově adjuvantu, následované druhou intraperitoneální nebo subkutánní injekcí

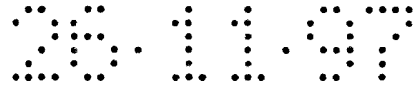


v kompletním Freundu. Polyklonální antiséra obsahující požadované protilátky, které jsou zaměřeny proti LT-beta receptoru se podrobí screeningu konvenčními postupy.

Myší monoklonální protilátky (mAbs) zaměřené proti humánnímu fúznímu proteinu mezi LT-beta receptorem a Fc se připravují intraperitoneální imunizací myší RBF opakovaně pomocí od CHO buňky odvozeného rekombinantního fúzního proteinu mezi LT-beta receptorem a Fc (LT-beta-R-Fc) vázaného na protein A sefaroúzu v nepřítomnosti adjuvantu. Nakonec se zvířatům aplikuje druhá injekce rozpustného LT-beta-R-Fc (jak i.p., tak i.v.), slezinné buňky se fúzují za použití klasických protokolů a hybridomy se podrobí screeningu za použití testu ELISA (Ling a spol., J. Interferon and Cytokine Res., 15, str. 53 až 59 (1995)). Hybridomy se dále podrobí screeningu ke zjištění jejich schopnosti blokovat vázání aktivovaných hybridomových buněk II-23 -- které exprimují povrchový LT-alfal/beta2 -- na destičky potažené LT-beta-R-Fc. Čisté monoklonální protilátky se připravují purifikací IgG ze supernatantů kultury hybridomu proteinem A sefarosou.

Je též možno připravit různé formy anti-LT-beta-R protilátek použitím standardních metod rekombinantní DNA (Winter a Milstein, Nature, 349, str. 293 až 299 (1991)). Mohou být například sestrojeny "chimérické" protilátky, ve kterých je doména vázající antigen ze zvířecí protilátky napojena na humánní konstantní doménu (např. Cabilly a spol., US 4, 816.567, Morrison a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, str. 6851 až 6855 (1984)). Chimérické protilátky redukuje pozorované imunogenní odpovědi vyvolané zvířecími protilátkami, když jsou použity při klinické léčbě lidí.

Kromě toho mohou být syntetizovány rekombinantní "humanizované protilátky", které rozpoznávají LT-beta-R. Humánní protilátky jsou chiméry obsahující většinou humánní IgG sekvence, do kterých byly vloženy oblasti odpovídající za specifické vázání antigenu (např. WO 94/04679). Zvířata se imunizují požadovaným antigenem, příslušné protilátky se izo-

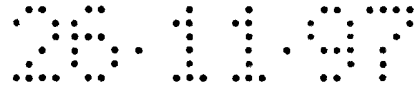


lují a část sekvencí variabilní oblasti odpovídající za specifické vázání antigenu se odstraní. Oblasti vázající antigen odvozené od zvířat se pak klonují do odpovídající pozice genů humánní protilátky, ve které byly odstraněny oblasti pro vazbu antigenu. Humanizované protilátky minimalizují použití heterologních (mezidruhových) sekvencí v humánních protilátkách a méně pravděpodobně vyvolají imunitní odpovědi v léčeném jedinci.

Konstrukce různých tříd rekombinantních anti-LT-beta-R protilátek může být též provedena vytvořením chimérických nebo humanizovaných protilátek obsahujících anti-LT-beta-R variabilní domény a humánní konstantní domény (CH1, CH2, CH3) izolované z různých tříd imunoglobulinů. Například anti-LT-beta-R IgM protilátky se zvýšenými valencemi místa pro vazbu antigenu mohou být rekombinantně produkovány klonováním místa pro vazbu antigenu do vektorů nesoucích konstantní oblasti humánního μ řetězce (Arulanandam a spol., *J. Exp. Med.*, 177, str. 1439 až 1450 (1993), Lane a spol., *Eur. J. Immunol.*, 22, str. 2573 až 2578 (1993), Traunecker a spol., *Nature*, 339, str. 68 až 70 (1989)),

Mimo to mohou být standardní techniky rekombinantní DNA použity ke změně vazebných afinit rekombinantních protilátek k jejich antigenům změnou zbytků aminokyselin v blízkosti vazebných míst pro antigen. Vazebná afinita humanizované protilátky k antigenu může být zvýšena mutagenezí založenou na molekulárním modelování (Queen a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, str. 10029 až 10033 (1989), WO 94/04679).

Může být žádoucí zvýšit nebo snížit afinitu anti-LT-beta-R protilátek k LT-beta-R v závislosti na cílovém typu tkáně nebo příslušném uvažovaném plánu léčby. Například může být výhodné pro semiprofylaktické léčby léčit pacienta konstantními hladinami anti-LT-beta-R protilátek se sníženou schopností signalizovat LT-beta cestou. Podobně mohou být anti-LT-beta-R protilátky se zvýšenou afinitou k LT-beta-R výhodné pro krátkodobé léčby cílené proti nádoru.



Screening anti-LT-beta-R protilátek na LT-beta-R aktivující činidla

Anti-LT-beta-R protilátky podle vynálezu mohou potencovat protinádorovou aktivitu LT-alfa/beta heteromerních komplexů (s výhodou LT-alfal/beta2) za přítomnosti LT-beta-R aktivujícího činidla jako je IFN-gama. Tyto anti-LT-beta-R protilátky jsou zde také uváděny jako LT-beta-R aktivující činidla. Protilátky, které působí jako aktivující činidla, jsou selektovány následovně:

1) Série jamek pro tkáňové kultury obsahující nádorové buňky jako buňky HT29 se kultivují tři až čtyři dny v médiu obsahujícím LT-beta-R aktivující činidlo, jako je IFN-gama a purifikovaný LT-alfa/beta heteromerní komplex -- s výhodou LT-alfal/beta2 -- v přítomnosti nebo nepřítomnosti postupných ředění testované anti-LT-beta-R protilátky.

2) Ke směsi buněk se přidá vitální barvivo, které měří mitochondriální funkci jako MTT, a nechá se reagovat několik hodin.

3) Kvantifikuje se optická hustota (OD) směsi v každé jamce při vlnové délce světla 550 nm (OD 550). OD 550 je nepřímo úměrná počtu nádorových buněk usmrcených v přítomnosti LT-alfa/beta heteromerního komplexu, LT-beta-R aktivujícího činidla a testované anti-LT-beta-R protilátky v každé jamce.

Výhodné protilátky podle vynálezu, které působí individuálně jako LT-beta-R aktivující činidla v přítomnosti LT-alfal/beta2 a IFN-gama, zahrnují BKA11, CDH10, BHA10 a BCG6 anti-LT-beta-R monoklonální protilátky (Tabulka 2, viz níže).



Zesítní anti-LT-beta-R protilátek

Zesítné anti-LT-beta-R protilátky podle vynálezu působí individuálně jako LT-beta-R aktivující činidla bez exogenních LT-alfa/beta heteromerních komplexů v přítomnosti druhého LT-beta-R aktivujícího činidla, jako je IFN-gama. Zesítné anti-LT-beta-R protilátky se zřejmě váží na a indukují kumulaci LT-beta receptorů buněčného povrchu, čímž aktivují LT-beta receptorem zprostředkovanou cílenou smrt buněk.

Podle jednoho provedení je jeden nebo více typů anti-beta-R protilátek zesítno imobilizací na ve vodě nerozpustné matrici nebo povrchu. Derivatizace s bifunkčním činidlem je užitečná pro zesítní protilátek na ve vodě nerozpustnou nosnou matrici nebo povrch. Činidla běžně používaná k provedení zesítní protilátek na vodou nerozpustnou nosnou matrici nebo povrch zahrnují 1,1-bis(diazoacetyl)-2-fenylethan, glutaraldehyd, estery N-hydroxysukcinamidu včetně esterů s 4-azidosalicilovou kyselinou, homobifunkční imidoestery včetně disukcinimidylesterů a bifunkční maleinimidy jako například bis-N-maleinimido-1,8-oktan. Derivatizační činidla jako methyl-3-((p-azidofenyl)dithio)propioimidát tvoří fotoaktivovatelné meziprodukty, které mohou být selektivně zesítněny, když jsou stimulovány světlem. Reaktivní, ve vodě nerozpustné matrice jako kyanogenbromidem aktivované sacharidy a substráty popsané v US patentech č. 3,959.080, 3,969.287, 3,691.016, 4,195.128, 4,247.642, 4,229.537, 4,055.635 a 4,330.440 mohou být též použity pro imobilizaci a zesítní proteinů.

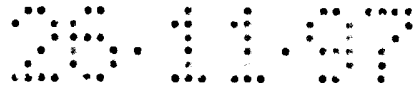
Povrchy, ke kterým jsou protilátky připojeny, mohou být neproteinový polymer, obvykle hydrofilní polymer buď přírodního nebo syntetického původu. Mohou být použity hydrofilní polyvinylové polymery jako polyvinylalkohol (PVA) a polyvinylpyrrolidon (PVP). Užitečné jsou též polyethylenethery, jako polyethylenglykol, polypropylenglykol, polyoxyethylenestery nebo methoxypolyethylenglykol, polyoxyalkyleny, jako polyoxyethylen a polyoxypropylen, a blokové kopolymery

polyoxyethylenu a polyoxypropylenu (Pluronic), polymethakryláty, karbomery, rozvětvené nebo nerozvětvené polysacharidy, které zahrnují sacharidové monomery D-mannosu, D- a L-galaktosu, fukosu, fruktosu, D-xylosu, L-arabinosu, D-glukuronovou kyselinu, sialovou kyselinu, D-galakturonovou kyselinu, D-mannuronovou kyselinu (např. polymannuronovou kyselinu nebo alginovou kyselinu), D-glukosamin, D-galaktosamin, D-glukosu a neuraminovou kyselinu včetně homopolysacharidů a heteropolysacharidů jako laktosy, amylopektinu, škrobu, hydroxyethylškrobu, amylosy, dextransulfátu, dextranu, dextrinů, glykogenu nebo polysacharidové podjednotky kyselých mukopolysacharidů, např. hyaluronové kyseliny, polymerů alkoholů cukrů, jako je polysorbitol a polymannitol, a heparin nebo heparon.

Před zesíťněním je polymer s výhodou rozpustný ve vodě a s výhodou obsahuje pouze jedinou reaktivní chemickou skupinu, aby se zabránilo vícenásobnému zesíťnění s protilátkou. V každém případě by měly být reakční podmínky optimalizovány, aby se omezilo zesíťnění a aby se izolovaly produkty -- buď přímo nebo následující gelovou filtrací nebo chromatografickou operací -- s v podstatě homogenním rozsahem molekulové hmotnosti. Optimální molekulová hmotnost zesíťněné protilátkové matrice bude stanovena rutinním experimentováním za použití zde popsaných testů na cytotoxicitu a na vázání receptoru.

Finální konjugát po zesíťnění je s výhodou rozpustný ve fyziologických kapalinách jako je krev. Polymer by neměl být vysoce imunogenní ve formě konjugátu a měl by mít viskozitu kompatibilní s intravenózní infuzí nebo injekcí, pokud některá z nich je uvažovanou cestou pro aplikaci.

Polymer může být též ve vodě nerozpustný. K materiálům, které mohou být použity, patří hydrofilní gely nebo tvarované předměty s povrchy, ke kterým mohou být protilátky imobilizovány, jako chirurgické hadice, katétrů nebo drény. S výhodou se používají pevné nosné materiály, které jsou biologicky kompatibilní a v podstatě inertní ve fyziologickém okolí.



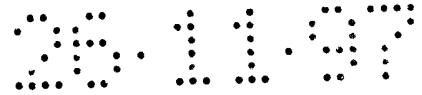
Materiál je biologicky kompatibilní, jestliže nestimuluje podstatně imunitní odpovědi včetně zánětu nebo nepřitahuje fibrotické buňky, když je umístěn uvnitř těla pacienta.

Anti-LT-beta-R protilátky mohou být též imobilizovány na povrchy, které byly kovalentně nebo nekovalentně potaženy sekundárními protilátkami, které se budou vázat na primární anti-LT-beta-R protilátky (např. kozí protimyšší IgG protilátky, viz příklad 7). Každá individuálně testovaná anti-LT-beta-R monoklonální protilátka, když byla imobilizovaná na povrch se sekundárními protilátkami, působí jako LT-beta-R aktivující činidlo v přítomnosti IFN-gama (obrázky 4 a 7).

V alternativním provedení mohou zesítěné protilátky anti-LT-beta-R v roztoku působit jako LT-beta-R aktivující činidla. Anti-LT-beta-R protilátky mohou být zesítěny pomocí anti-LT-beta-R Ab (nebo mAb) zesítujícího činidla. Anti-LT-beta-R Ab (nebo mAb) zesítující činidlo podle vynálezu je jakékoliv činidlo schopné buď kovalentní vazby nebo nekovalentní agregace anti-LT-beta-R protilátek (nebo monoklonálních protilátek) v roztoku, takže zesítěné anti-LT-beta-R protilátky (nebo monoklonální protilátky) se mohou vázat na a potencovat povrchovou kumulaci cílových buněk LT-beta-R. Taková činidla zesítující anti-LT-beta-R Ab (nebo mAb) zahrnují, avšak nejsou omezeny na chemická zesítovací činidla, která mohou reagovat s protilátkami kontrolovaným způsobem, jak shora popsáno. Alternativně mohou být použity k vytvoření aglomerátů anti-LT-beta-R protilátek v roztoku sekundární protilátky, Sefarosa A, Fc receptory nebo jiná činidla, která se váží na a spojují ve shluky řadu primárních anti-LT-beta-R protilátek, aniž blokují jejich aktivitu.

Četné anti-LT-beta-R protilátky působí v roztoku jako LT-beta-R aktivující činidla

Předmětem vynálezu jsou prostředky obsahující četné anti-LT-beta-R protilátky v roztoku, které působí jako



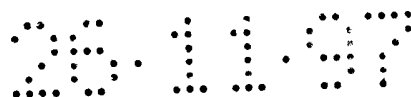
LT-beta-R aktivující činidla tím, že potencují povrchovou kumulaci LT-beta-R. Mohou být použity polyklonální anti-LT-beta-R protilátky zaměřené proti různým epitopům LT-beta-R. S výhodou jsou anti-LT-beta-R protilátky monoklonální protilátky zaměřené proti různým a nepřekrývajícím se epitopům LT-beta-R.

Kombinovaný přístup anti-LT-beta-R monoklonální protilátky k aktivaci LT-beta receptoru vyžaduje spojení dvou nepřekrývajících se epitopů. Mimo to je pravděpodobné, že produktivní agregace receptorů se dosáhne pouze s určitými epitopy. Byla identifikována přítomnost nejméně čtyř specifických LT-beta-R imunoreaktivních epitopů. Další epitopy (jak definováno novými monoklonálními protilátkami) mohou být identifikovány pokračováním ve fúzi imunizovaných buněk myší sleziny, imunizací různých druhů zvířat a použitím různých cest imunizace.

Epitopy mohou být také přímo zmapovány ohodnocením schopnosti různých monoklonálních protilátek konkurovat si vzájemně ve vazbě na LT-beta-R za použití chromatografických technik BIAcore (Pharmacia BIAtechnology Handbook, "Epitope Mapping", oddíl 6.3.2, (květen 1994), viz též Johne a spol., J. Immunol. Methods, 160, str. 191 až 198 (1993)).

Jednotlivé LT-beta-R monoklonální protilátky mohou být seskupeny nejméně do čtyř tříd podle jejich schopnosti spolupracovat v kombinaci s jinými LT-beta-R monoklonálními protilátkami při usmrcování nádorových buněk v cytolytických testech (příklad 8, tabulka 1). Například BDA8 monoklonální protilátka ve skupině I nepůsobí v kombinaci s AGH1 monoklonální protilátkou ve skupině I k podpoře cytotoxicity nádorových buněk. Podobně monoklonální protilátky BKAl1 a CDH10 ze skupiny III nespoluupracují v testu na cytotoxicitu nádorových buněk.

Obrázek 5A-C znázorňuje účinky aplikací typických anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek samotných a v párové



kombinaci na nádorové buňky v testech na cytotoxicitu za přítomnosti IFN-gama jako LT-beta-R aktivujícího činidla. Anti-LT-beta-R monoklonální protilátka CBE11 ze skupiny IV použitá samotná má malý cytotoxický účinek, který je zvýšen v kombinaci s monoklonální protilátkou BHA10 ze skupiny II (obrázek 5A). CBE11 vyvolává podobný účinek s monoklonální protilátkou CDH10 ze skupiny III (obrázek 5B).

Cytotoxicita způsobená aplikací kombinace monoklonálních protilátek anti-LT-beta-R v roztoku není vůči nádorové buněčné linii HT29 mimořádná. Obrázek 5C ukazuje, že monoklonální protilátka AGH1 ze skupiny I a monoklonální protilátka CDH10 ze skupiny III působí synergicky při usmrcování dvou různých nádorových buněčných linií (buněk HT29 a buněk WiDr) odvozených od humánních adenokarcinomů.

Souhrn vlastností monoklonálních protilátek anti-LT-beta-R

Všechny monoklonální protilátky anti-LT-beta-R podle vynálezu, když jsou zesíťeny imobilizací, působí jako LT-beta-R aktivující činidla v přítomnosti druhého LT-beta-R aktivujícího činidla, jako je IFN-gama. Schopnost anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek působit jako LT-beta-R aktivující činidla v přítomnosti nebo nepřítomnosti LT-alfal/beta2 v roztoku se často mění podle stavu buněk v době testu. Tabulka 2 (viz níže) shrnuje vlastnosti anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek podle vynálezu.

Monoklonální protilátky BDA8 a AGH1 ze skupiny I nepůsobí jako LT-beta-R aktivující činidla v roztoku s LT-alfal/beta2. Monoklonální protilátka BDA8 dokonce blokuje protinádorový účinek LT-alfal/beta2 (obrázek 3B a tabulka 2). Naproti tomu anti-LT-beta-R monoklonální protilátky BCG6 a BHA10 mají smíšené agonistické a antagonistické účinky, když jsou aplikovány s LT-alfal/beta2. Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky BKA11 a CDH10 ze skupiny III jsou jedinečné ve své schopnosti působit jako LT-beta-R aktivující činidla, která potencují protinádorové účinky v přítomnosti

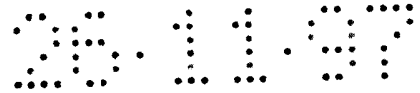
LT-alfal/beta2 a druhého LT-beta-R aktivujícího činidla jako je IFN-gama, aniž mají antagonistické účinky, jaké je možno často pozorovat u monoklonálních protilátek BCG6 a BHA10 ze skupiny II.

Je důležité mít na paměti, že klasifikace anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek založená na jejich schopnosti kooperovat v cytolytických testech na nádorových buňkách odráží skutečnost, že spolupůsobí s určitými epitopy LT-beta-R. Monoklonální protilátky obsahující jedinou skupinu však nemají nutně stejné vazebné afinity ke svým příslušným epitopům. Variabilní výsledky, pozorované při srovnávání účinků různých monoklonálních protilátek náležejících ke stejné skupině nebo k různým skupinám, mohou tedy představovat rozdíly ve vazebných afinitách. Je tedy možné, že by mohla být izolována monoklonální protilátka ze skupiny I nebo ze skupiny IV s vyšší vazebnou afinitou pro LT-beta-R, která by fungovala podobně jako monoklonální protilátky ze skupiny III jako LT-beta-R aktivující činidlo za přítomnosti LT-alfal/beta2.

Hybridomové buněčné linie nebo jejich subklony, které produkují anti-LT-beta-R monoklonální protilátky, popsané shora, byly uloženy 12. ledna 1995 v American Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) ve smyslu ustanovení Budapeštské úmluvy a byla jim přidělena následující čísla přírůstku ATCC:

	buněčná linie	název mAb	číslo přírůstku ATCC
a)	AG.H1.5.1	AGH1	HB 11796
b)	BD.A8.AB.9	BDA8	HB 11798
c)	BC.G6.AF5	BCG6	HB 11794
d)	BH.A10	BHA10	HB 11795
e)	BK.A11.AC10	BKA11	HB 11799
f)	CB.E11.1	CBE11	HB 11793
g)	CD.H10.1	CDH10	HB 11797

Všechna omezení týkající se dostupnosti shora uvedených



depozit ATCC budou neodvolatelně odstraněna po udělení patentu na tuto přihlášku.

Funkce anti-LT-beta-R IgM monoklonálních protilátek jako LT-beta-R aktivujících činidel

Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky, které obsahují více než dvě vazebná místa pro antigen s IgG, budou také působit v roztoku jako LT-beta-R zesilující činidla na buněčném povrchu a budou proto spadat pod definici LT-beta-R aktivujícího činidla podle vynálezu. Vazebná místa monoklonální protilátky anti-LT-beta-R pro antigen mohou být vybudována do IgM molekul -- které mají deset vazebných míst pro antigen -- za použití standardních technik rekombinantní DNA a hybridomu (příklad 12).

Alternativně je možno sebrat a obohatit kompletní IgM molekuly myši (nebo jiného zvířete) izolované metodou fúze hybridomu po jediné imunizaci antigenem. Jednou cestou obohacení IgM molekul by byla imunizace myši CD40 s chybějící signalizací (Kawabe a spol., *Immunity*, 1, str. 167 až 178 (1994), Xu a spol., *Immunity*, 1, str. 423 až 431 (1994)). Tyto myši nemohou efektivně produkovat imunoglobuliny IgG a proto jejich reakce na stimulaci antigenem je zvýšena pro IgM isotypy.

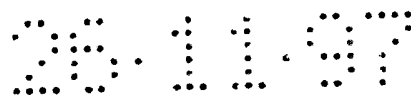
Anti-LT-beta-R IgM protilátky mohou v důsledku své zvýšené valence účinně agregovat LT-beta-R molekuly v rovině membrány, čímž zvyšují LT-beta-R signalizaci ve srovnání s jejich IgG protějšky, které mají dvě vazebná místa pro antigen. Dramatický příklad zvýšené účinnosti multivalentních protilátek při kumulaci receptorů je patrný u protilátek vůči Fas receptoru, kde je IgM forma velmi účinná a normální bivalentní imunoglobuliny IgG nejsou účinné v roztoku (Yonihara a Yonihara, *J. Exp. Med.*, 169, str. 1747 až 1756 (1989), Alderson a spol., *Int. Immunol.*, 6, str. 1799 až 1806 (1994)).

Podobně apo-1 monoklonální protilátka proti Fas recep-

toru je typu IgG3. Tato monoklonální protilátka je silné cytotoxické činidlo, které závisí na Fc interakcích výhradně k IgG3 subtypům za účelem agregace na větší polyvalentní formy. Odstranění Fc oblasti vytváří F(ab)₂ formu, která se nemůže spojit do větších agregátů a která je inaktivní (Dhein a spol., J. Immunol., 149, str. 3166 až 3173 (1992)). Analogicky se tedy předpokládá, že IgM verze anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek budou účinné protinádorové prostředky.

Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky inhibují růst nádorů u myší

Schopnost LT-beta-R aktivujícího činidla, jako je anti-LT-beta-R monoklonální protilátka, inhibovat růst humánních nádorových buněk in vitro (příklady 6 až 8 a 13) může svědčit o protinádorové účinnosti in vivo. Pokusy provedené na imunodeficitních myších (SCID) ukazují, že anti-beta-R monoklonální protilátka (CBE11) může účinně blokovat tvorbu nádoru humánními adenokarcinomatózními buňkami WiDr (příklad 14, obrázek 6). U myší inokulovaných subkutánně (s.c.) WiDr buňkami se vytvoří během dvou týdnů měřitelné nádory. Když se myším aplikovala i.p. CBE11 monoklonální protilátka ve stejnou dobu, kdy byly inokulovány buňky WiDr s.c., nádorový růst byl dramaticky blokován (obrázek 6A). Protinádorový účinek CBE11 anti-LT-beta-R monoklonální protilátky se zvýšil přidáním IFN-gama. CBE11 byl však účinný i bez exogenního IFN-gama. Ve skupině CBE11 + IFN-gama bylo 7 ze 16 zvířat zcela bez nádorů, zatímco zbývající zvířata měla malé uzlíky, které se během 2 měsíců nezvětšily. Myši, kterým byl aplikován samotný CBE11, byly 30. den podobné jako skupina, které bylo aplikováno CBE11 + IFN-gama. U myší, kterým byl aplikován samotný CBE11, se však nakonec vyvinuly pomalu rostoucí nádory. Mezi skupinami CBE11 (+/- IFN-gama) a kontrolními skupinami (fyziologický roztok, IFN-gama samotný a kontrolní antihumánní LFA-3 monoklonální protilátka (1E6) + IFN-gama) byly statisticky významné rozdíly, ale mezi kontrolními skupinami žádné významné rozdíly nebyly. Jak 1E6, tak CBE11 monoklonální protilátky jsou protilátky typu IgG1. 1E6 monoklo-



nální protilátka účinně pokrývá nádorové buňky, ale neblokuje růst nádorů. Komplementární nebo NK (natural killer) buňkami ovlivněné události tedy nejsou jediným podkladem pro protinádorovou aktivitu CBE11 anti-LT-beta-R monoklonální protilátky.

Účinnost CB11 monoklonální protilátky v inhibici růstu nádorů in vivo v nepřítomnosti exogenního IFN-gama je neočekávána, protože existovala závislost na IFN-gama pro měřitelné cytotoxické účinky na bázi LT-beta-R in vivo. Buď dochází k určitému crossing-over myšího IFN-gama na lidské IFN-gama receptory nebo mohou probíhat in vivo jiné mechanismy .

CBE11 anti-LT-beta-R monoklonální protilátka může také inhibovat růst rozvinutého nádoru u myší (obrázek 6B). Myši byly inokulovány s.c. 1. den humánními WiDr buňkami adenokarcinomu a nádory se ponechaly vyvíjet 15 dní (příklad 14). Nádory u zvířat, kterým byl aplikován IFN-gama samotný nebo s kontrolní antihumánní LFA-3 monoklonální protilátkou (1E6) + IFN-gama, pokračovaly ve zvětšování velikosti v průběhu 7-týdenního pokusu. Naproti tomu se růst nádorů, na které se působilo CBE11 anti-LT-beta-R protilátkou (+ IFN-gama nebo samotnou) zastavil a po následujících třech injekcích CBE11 protilátky během tří týdnů se růst nádorů zastavil do 49 dnů po inokulaci, kdy byl pokus ukončen (obrázek 6B).

Tyto pokusy prokazují, že anti-LT-beta-R monoklonální protilátka, která aktivuje LT-beta-R signalizaci, je schopna účinně inhibovat tvorbu nádoru v ranných stádiích a může též blokovat pokračující růst nádorových buněk v pozdějších stádiích tumorigeneze in vivo. Tyto pokusy též prokazují, že aplikace jediného LT-beta-R aktivujícího činidla může být účinná pro léčbu nebo omezení pokračování, závažnosti nebo účinků neoplazie u postiženého živočicha.

Postupy popsané v příkladu 14 mohou být použity k identifikaci LT-beta-R aktivujících činidel podle vynálezu, které

působí inhibičně samostatně nebo v kombinaci na růst nádorových buněk in vivo. Je předpokládáno, že jiná LT-beta-R aktivující činidla -- zahrnující, ale neomezující se na ta, která byla identifikována v in vitro testech na cytotoxicitu nádorových buněk -- mohou mít podobné protinádorové účinky in vivo, kdyby byly aplikovány buď samotné nebo v kombinaci zvířatům nebo lidem.

Použití IFN-gama a jiných LT-beta-R aktivujících činidel

Cytotoxické účinky LT-alfa/beta heteromerních komplexů a zesíťených nebo vícenásobných anti-LT-beta-R protilátek na nádorové buňky se zvyšuje přítomností LT-beta-R aktivujícího činidla, zejména IFN-gama. O humánních adenokarcinomatózních buňkách střevního původu (HT29 buňkách) bylo v minulosti prokázáno, že jsou senzitivní vůči FasR signalizaci (Yonehara a Yonehara, J. Exp. Med., 169, str. 1747 až 1756 (1989)), a vůči TNF a LT-alfa za přítomnosti IFN-gama (Browning a spol., J. Immunol., 143, str. 1856 až 1867 (1989)).

Množství LT-beta-R aktivujícího činidla, potřebného ke zvýšení protinádorové účinnosti LT-alfa/beta heteromerních komplexů, anti-LT-beta-R protilátek nebo jiných LT-beta-R aktivujících činidel podle vynálezu bude záviset na typu buňky nebo tkáni, na které se působí, a také na způsobu léčby a může být stanoveno empiricky použitím rutinních metod. LT-beta-R aktivující činidlo může být dodáno v koncentraci nebo aplikováno rychlostí zjištěnou, že je účinná ve spojení s jinými LT-beta-R aktivujícími činidly, přičemž se berou v úvahu shora uvedené faktory.

Alternativně je možno se zaměřit na endogenní LT-beta-R aktivující činidla, například na interferony jako je IFN-gama, které mohou být vytvořeny buňkami nebo tkáněmi obklopujícími cílové nádorové buňky. Endogenní IFN-gama je normálně produkován po virové infekci a je též nalézán v blízkosti nádorů (Dinge a spol., Immunity, 1, str. 447 až 456 (1994)).

Do rozsahu skupiny LT-beta-R aktivujících činidel podle vynálezu spadá kterékoliv činidlo, které je schopné indukovat interferony, s výhodou INF-gama, a které potencuje cytotoxické účinky LT-alfa/beta heteromerních komplexů a anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek na nádorové buňky. Zatímco virová infekce normálně indukuje tvorbu IFN-gama, hladiny endogenního IFN-gama mohou být zvýšeny jinými činidly (příklad 10). Například klinické pokusy prokázaly indukci interferonu účinkem dvouřetězcové RNA (dsRNA). Účinné jako induktory interferonu jsou tedy v tomto ohledu polyriboguanyllová kyselina/polyribocytidylová kyselina (poly-rG/rC) a jiné formy dsRNA (Juraskova a spol., Eur. J. Pharmacol., 221, str. 107 až 111 (1992)).

Stimulátor interferonů z Glycyrrhiza glabra (Acharya a spol., Indian J. Med. Res., 98, str. 69 až 74 (1993)) a farmaceutické prostředky, z nichž mnohé je možno aplikovat orálně, mohou být též použity ke zvýšení hladin interferonu. K takovým induktorům interferonů patří: imikvimod (Bernstein a spol., Antiviral Res., 20, str. 45 až 55 (1994), saparal (Paramononova a spol., Vopr. Virusol., 39, str. 131 až 134 (1994)), arylpyrimidony jako například bropirimin (Onishi a Machida, Hinyokika Kivo, 40, str. 195 až 200 (1994)), Ridostin (Cheknev a spol., Vopr. Virusol., 39, str. 125 až 128 (1994)).

Řada těchto činidel indukujících interferony byla charakterizována jako induktury interferonů typu I jako IFN-alfa. Typ I interferonů může též působit jako LT-beta-R aktivující činidla, ale méně účinná než IFN-gama.

Léčení za použití LT-alfa/beta komplexů a LT-beta-R aktivujících činidel

Prostředky podle vynálezu budou aplikovány v účinné dávce pro léčbu příslušného klinického stavu. Určení výhodného farmaceutického přípravku a terapeuticky účinného dávková-

ní pro danou aplikaci spadá do působnosti odborníků, přičemž se bere v úvahu například stav a hmotnost pacienta, rozsah požadované léčby a tolerance pacienta na léčbu.

Obvykle lidé mohou snášet až do 100 až 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ TNF, dříve než se projeví závažná toxicita (Schiller a spol., Cancer Res., 51, str. 1651 až 1658 (1991)). U myši způsobily dávky v rozsahu 1 až 5 $\mu\text{g}/\text{myš}/\text{den}$ podávané v 5×10^4 jednotkách rekombinantního lidského IFN-gama regresi primárního nádoru (Balkwill a spol., CIBA Foundation Symposium (1987), Havell a spol., J. Exp. Med., 167, str. 1067 až 1085 (1988)). Na základě relativní účinnosti TNF a LT-alfal/beta2 v HT29 cytolytických testech poskytne přibližně 5 až 25 $\mu\text{g}/\text{myš}/\text{den}$ LT-alfal/beta2 terapeutické rozmezí dávky. Extrapolací na člověka se očekává, že bude zapotřebí dávkování nejméně 1 mg/m^2 LT-alfal/beta2 v kombinaci s LT-beta-R aktivujícím činidlem, například IFN-gama.

Historicky byla léčba pomocí IFN-gama prováděna buď s maximálními tolerovanými dávkami v rozmezí 100 až 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ nebo v "imunomodulačních" hladinách v rozmezí 10 až 25 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (viz například Kopp a spol., J. Immunother., 13, str. 181 až 190 (1993)). Kombinační terapie se dvěma interferony použily 4×10^6 jednotek/ m^2 IFN-alfa a přibližně 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ IFN-gama (Niederle a spol., Leuk. Lymphoma, 9, str. 111 až 119 (1993)). Očekává se, že střední dávky asi 25 až 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ IFN-gama v kombinaci s LT-alfa/beta heteromerními komplexy nebo purifikovanými anti-LT-beta-R protilátkami zde popsanými budou vhodnými startovacími body pro optimalizaci léčebných dávek.

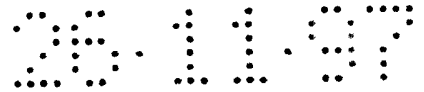
Aplikace LT-alfa/beta heteromerních komplexů a zesíťovaných anti-LT-beta-R protilátek podle vynálezu včetně izolovaných a purifikovaných forem protilátek nebo komplexů, jejich solí nebo jejich farmaceuticky přijatelných derivátů může být provedena za použití libovolných obvykle používaných metod aplikace prostředků, které se vyznačují protinádorovou účinností.

Farmaceutické prostředky používané při těchto terapiích mohou mít též nejružnější formy. K těm patří například pevné, polopevné a kapalně dávkovací formy, jako tablety, pilulky, prášky, kapalně roztoky nebo suspenze, čípky a roztoky, které je možno aplikovat injekčně nebo infuzí. Výhodná forma závisí na předpokládaném způsobu podání a terapeutické aplikace. Způsoby podání mohou zahrnovat orální, parenterální, subkutánní, intravenózní nebo topické aplikace nebo aplikaci přímo do leze.

LT-alfa/beta heteromerní komplexy, IFN-gama a anti-LT-beta-R protilátky mohou být například uloženy do sterilních, izotonických přípravků s nebo bez kofaktorů, které stimulují absorpci nebo stabilitu. Přípravek je s výhodou kapalně nebo to může být lyofilizovaný prášek. Například LT komplexy nebo/a anti-LT-beta-R protilátky a IFN-gama mohou být zředěny puřem přípravku sestávajícím z 5,0 mg/ml monohydrátu kyseliny citronové, 2,7 mg/ml citrátu trojsodného, 41 mg/ml mannitolu, 1 mg/ml glycinu a 1 mg/ml polysorbátu 20. Tento roztok může být lyofilizován, uskladněn za chlazení a rekonstituován před aplikací sterilní vodou pro injekce.

Prostředky budou s výhodou též obsahovat obvyklé farmaceuticky přijatelné nosiče dobře známé v oboru (viz například Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. vydání, 1980, Mac Publishing Company). Takové farmaceuticky přijatelné nosiče mohou obsahovat jiné medicínální prostředky, nosiče, genetické nosiče, adjuvanty, pomocné látky atd., jako humánní sérový albumin nebo plazmatické přípravky. Prostředky jsou s výhodou ve formě dávkovací jednotky a obvykle se budou aplikovat jednou nebo několikrát za den.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu se mohou aplikovat též za použití mikrokuliček, liposomů, jiných aplikačních systémů za použití mikročástic nebo prostředků s retardovaným uvolňováním, umístěných v, blízko nebo jinak v kontaktu s postiženými tkáněmi nebo krevním řečištěm. Vhodné



příklady nosičů s retardovaným uvolňováním zahrnují semipermeabilní polymerní matrice ve formě tvarovaných předmětů jako jsou čípky nebo mikrotobolky. Implantovatelné nebo mikrotobkové matrice s retardovaným uvolňováním zahrnují polyaktidy (US. patent č. 3,773.319, EP 58.481), kopolymery L-glutamové kyseliny a gama-ethyl-L-glutamátu (Sidman a spol., Biopolymers, 22, str. 547 až 556 (1985)), poly(2-hydroxyethylmethakrylát) nebo ethylenvinylacetát (Langer a spol., J. Biomed. Mater. Res., 15, str. 167 až 277 (1981), Langer, Chem. Tech., 12, str. 98 až 105 (1982)).

Liposomy obsahující LT-beta-R heteromerní komplexy nebo/a anti-LT-beta-R protilátky a IFN-gama mohou být připraveny dobře známými metodami (viz např. DE 3,218.121, Epstein a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, str. 3688 až 3692 (1985), Hwang a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, str. 4030 až 4034 (1980), US patenty č. 4,485,045 a č. 4,544.545). Obvykle se jedná o liposomy malého (kolem 20 až 80 nm) unilamelárního typu, ve kterém, je obsah lipidů větší než asi 30 mol. % cholesterolu. Podíl cholesterolu je zvolen tak, aby reguloval optimální rychlost uvolňování LT komplexu nebo/a anti-LT-beta-R protilátek a IFN-gama.

LT-alfa/beta heteromerní komplexy a anti-beta-R protilátky podle vynálezu mohou být také připojeny k liposomům obsahujícím jiná LT-beta-R aktivující činidla, chemoterapeutické prostředky nebo IFN-gama k doplnění IFN-gama, který se obvykle nalézá v oblasti nádorů. Připojení LT komplexů a anti-LT-beta-R protilátek k liposomům může být dosaženo libovolným známým zesítujícím činidlem, jako například heterobifunkčními zesítujícími činidly, která byla v širokém rozsahu používána ke spojení toxinů nebo chemoterapeutických prostředků s protilátkami pro cílenou aplikaci. Konjugace na liposomy může být též provedena použitím lipidem řízeného síťujícího činidla, hydrazidu 4-(4-maleimidofenyl)máselné kyseliny (MPBH) (Duzgunes a spol., J. Cell. Biochem. Abst. Suppl. 16E 77 (1992)).

Výhody terapeutických prostředků na bázi aktivace anti-LT-beta-R

Protinádorová terapie na bázi LT-beta-R aktivace by měla řadu výhod. LT-beta-R se váže na LT-alfa/beta heteromerní komplexy s vysokou afinitou v beta/beta rozštěpech a s nižší afinitou v alfa/beta rozštěpech, vytvořených na rozhraních mezi sousedními LT-alfa a LT-beta podjednotkami. Naproti tomu TNF receptory se váží na LT-alfa/beta heteromerní komplexy s vyšší afinitou pouze v alfa/alfa rozštěpech. Purifikované LT-alfal/beta2 komplexy se tedy váží s vysokou afinitou na LT-beta-R mezi sousedními LT-beta podjednotkami, ale postrádají alfa/alfa rozštěpy a tedy neaktivují křížově signalizaci prostřednictvím TNF receptorů. LT-alfa/beta heteromerní komplexy podle vynálezu tedy nebudou stimulovat zánětlivé odpovědi spojené s TNF.

Aplikace LT-alfal/beta2 neaktivuje změny endotheliálních buněk spojené se zánětlivou reakcí i při poměrně vysokých hladinách. Z tohoto důvodu by vedlejší účinky způsobené aktivací zánětlivých kaskád, pozorované u TNF, nemělo způsobovat problém při použití farmaceutických prostředků a léčebných metod pro aktivaci LT-beta-R.

Lidský LT-alfal/beta2 se váže na myší LT-beta-R v podstatě stejně dobře jako na humánní LT-beta-R. Injekce 100 µg humánního LT-alfal/beta2 na myš není letální (příklad 11), což ukazuje na to, že stimulace LT-beta-R v celém zvířeti nemá zřetelnou toxicitu patrnou, když byly provedeny podobné pokusy s FasR nebo p60 TNF-R aktivací.

Použití specifických monoklonálních protilátek anti-LT-beta-R nebo kombinací protilátek k vyvolání této cesty u lidí může mít řadu výhod oproti léčbě s LT-alfa/beta heteromerními komplexy. Léčba antireceptorovými protilátkami bude selektivnější než léčba ligandem. Kromě toho bude jednodušší připravit a vyrobit ve velkém rekombinantní formy anti-LT-LT-beta-R monoklonálních protilátek než rozpustné

LT-alfa/beta heteromerní komplexy.

Uvažuje se o tom, že monoklonální protilátky nebo LT-alfa/beta heteromerní komplexy se budou aplikovat lidem s nádorem společně s obvyklou protinádorovou terapií (tj ozařováním a chemoterapií). Kombinovaná léčba LT-beta-R aktivací s obvyklými chemoterapiemi může poskytnout další faktor protinádorové aktivity, který by pravděpodobněji zbavil pacienta nádorových buněk, než když se použije protinádorová terapie samotná.

Dále je možné, že by tento přístup měl poměrně málo vedlejších účinků a proto by mohl být aplikován v semiprofylaktickém smyslu v případech rakovin, které ještě nemusely metastazovat, nebo u pacientů z rodin, u kterých je genetická predispozice pro určitý typ rakoviny.

Příklady provedení vynálezu

Následují příklady, které ilustrují LT-alfa/beta heteromerní komplexy a anti-LT-beta-R monoklonální protilátky podle vynálezu a metody použité k jejich charakterizaci. Tyto příklady nemají za účel omezovat rozsah vynálezu. Příklady jsou uvedeny za účelem ilustrace a vynález je omezen pouze patentovými nároky.

Příklad 1

Vytvoření supernatantů baculovirem infikovaných hmyzích buněk obsahujících LT-alfa/beta formy

Rekombinantní baculoviry, kódující buď LT-alfa o plné délce nebo sekretovanou formu LT-beta, byly připraveny, jak popsáno (Crowe a spol., Science, 264, str. 707 až 710 (1994)). Hmyzí buňky (Invitrogen, San Diego, CA.) byly inokulovány o hustotě 2×10^5 buněk/ml do 7,2 litrů média SF 900-II (Gibco) bez séra. Po 48 hodinách dosáhla kultura $1,8 \times 10^6$ buněk/ml a byla infikována 150 ml (3×10^8 PFU/ml) LT-beta

a 300 ml LT-alfa bacilovirových kultur. Po dvou dnech se kultura odebrala a zbytky buněk byly odstraněny odstředěním. Po přidání kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) a fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) (1 mM EDTA a 150 μ M PMSF konečné koncentrace) se vyčeřený supernatant zkoncentroval 10ti násobnou ultrafiltrací za použití spirální vložky SLYM10 (Amicon). Koncentrát se rozdělil na šest 120 ml podílů a alikvótní podíly se skladovaly před purifikací při -70 °C.

Příklad 2

Příprava rozpustných LT-beta receptorů jako chiméry Fc a imunoglobulinu

Extracelulární doména LT-beta-R byla amplifikována až do transmembránní oblasti polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) z cDNA klonu použitím primérů, které inkorporovaly NotI a SallI restriční enzymová místa na 5' a 3' koncích (Browning a spol., J. Immunol., 154, str. 33 až 46 (1995)). Amplifikovaný produkt byl natráven enzymy NotI a SallI, purifikován a ligován do vektoru pMDR901 linearizovaného enzymem NotI společně s fragmentem enzymů SallI-NotI kódujícím Fc oblast humánního IgG1. Výsledný vektor obsahoval gen reduktázy dihydrofolátu a LT-beta-R-Fc chiméru ovládané oddělenými promotory. Vektor byl elektroporátován do CHO dhfr⁻ buněk a methotrexát rezistentní klony byly izolovány standardními postupy. LT-beta-R-Fc je sekretován do média a test ELISA byl použit k selekci buněčných linií produkujících nejvyšší hladinu chimérického proteinu. Vysokoprodukční buněčná linie se nechala narůst do vysokých počtů a kondicionované médium se odebralo. Čistý protein se izoloval pomocí na rychle protékající afinitní chromatografie s Protein A sefarosou.

Příklad 3

Afinitní purifikace LT-alfa1/beta2 za použití TNF-R a LT-beta-R

Pro přípravu pryskyřic k afinitní purifikaci receptorů LT forem byly imobilizovány purifikované přípravky LT-beta-R-Fc (jak popsáno zde v příkladu 2) a TNF-R p60-Fc (Crowe a spol., Science, 264, str. 707 až 710 (1994)) na CNBr-sefaroze (Pharmacia) při 5 mg/ml pryskyřice v podstatě podle návodu výrobce. Pyskyřice prošly před použitím jedním elučním cyklem. Část (120 ml) S1Y10 koncentrátu prošla přes dvě sekvenční p60 TNF-R-Fc kolony, které váží LT-alfa a LT-alfa2/beta1. Průtok, který obsahoval LT-alfa1/beta2 a LT-beta, byl veden přes LT-beta-R-Fc kolonu. Kolona se promyla vždy 5 objemy PBS, PBS s 0,5 M NaCl a PBS a pak se LT-alfa a LT-alfa2/beta1 komplexy promyly 25 mM fosforečnanem sodným, 100 mM NaCl, pH 3,5. Eluční frakce se ihned zneutralizovaly 1/20 objemu 0,5 M fosforečnanu sodného, pH 8,6 a uložily se na led. Frakce obsahující protein se identifikovaly absorbcí při 280 nm, píkove frakce se spojily a spojené eluce z kolon se zanalyzovaly pomocí SDS-PAGE obarvené jasnou modří coomassie. Shora popsaná eluce poskytla více než 95 % čistého LT-alfa1/beta2.

Příklad 4

Charakterizace purifikovaných LT-alfa1/beta2 ligandů

Frakce z příkladu 3 byly rozděleny gelovou vylučovací chromatografií ke zjištění, zda se vytvořily trimery a zda jsou přítomny agregáty. Byla použita kolona TSK G3000 sw x2 při průtokové rychlosti 0,5 ml/minuta, aby se oddělil proteinový standard BioRad z gelové filtrace a tři různé LT trimery, LT-alfa3, LT-alfa2/beta1 a LT-alfa1/beta2.

Obrázek 1A ukazuje, že velmi málo, pokud vůbec někte-

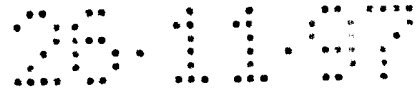
rý, z LT-alfa1/beta2 trimerů se ukazuje být agregátem o vysoké molekulové hmotnosti. Srovnání s velikostními standardy ukazuje, že všechny tři formy jsou trimerní, tj. asi o 50 až 60 kDa. Stechiometrie LT-alfa k LT-beta obsažených v purifikovaných frakcích LT-alfa1/beta2 a LT-alfa2/beta1 byla vyhodnocena buď denzitimetrií gelů zbarvených pomocí coomassie nebo píkovou výškovou analýzou dvou píků následujících po rozštěpení C4 vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s obrácenými fázemi. Obě měření potvrdila identitu frakcí eluovaných z afinitních chromatografických kolon, popsanych shora.

Čistota přípravků byla dále vyhodnocena ionexovou chromatografií za použití přístrojového vybavení BioCAD k vytvoření charakteristických chromatogramů LT-alfa1/beta2 a LT-alfa2/beta1 na slabé katexové pryskyřici při několika různých pufrových systémech. Metoda, která se vyznačovala největší schopností čistě zadržet a oddělit ty uvedené tři trimery, obsahovala POROS CM (karboxymethylovou) kolonu provozovanou při 5 ml/min s 16,6 mM MES, 16,66 mM HEPES, 16,66 mM octanu sodného pH 6,5 pufru a promývání s 1 M NaCl gradientem přes 20 objemů kolony. BioCAD chromatogramy LT-alfa1/beta2 a LT-alfa2/beta1 komplexů jsou znázorněny na obrázku 1B. Každý trimer, LT-alfa3, LT-alfa2/beta1 a LT-alfa1/beta2 byl eluován při různých koncentracích solí a nebyla prokázána u různých přípravků křížová kontaminace větší než 1 až 2 %.

Příklad 5

Usmrcování humánních adenokarcinomatózních buněk HT29 rozpustnými LT-alfa1/beta2 komplexy

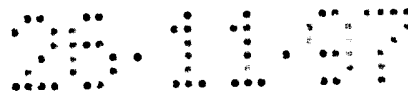
Cytolytický test s buňkami HT29 byl dříve popsán (Browning and Ribolini, J. Immunol., 143, str. 1859 až 1867 (1989)). V typickém testu byla připravena série ředění LT-alfa1/beta2 (a jiných cytokinů, kde jsou aplikovatelné) v 0,05 ml v destičkách s 96 jamkami a přidalo se 5000 trypsini-



zovaných buněk HT29-14 v 0,05 ml média obsahujícího 0 nebo 80 U/ml (protivirových jednotek) humánního IFN-gama. Buňky HT29-14 jsou ze subklonu původní, od ATCC odvozené HT29 linie, která je homogennější. V testech byly použity buňky HT29-14. Všechny tyto výsledky mohou být též pozorovány při použití původní HT29 linie odvozené od ATCC. Po 3 až 4 dnech byla změřena mitochondriální redukce barviva MTT následovně: přidalo se 10 l MTT a po 3 hodinách se redukované barvivo rozpustilo pomocí 0,09 ml isopropanolu s 10 mM HCl a změřila se optická hustota při 550 nm. K buňkám se předem přidaly rozpustné receptorové formy, připravené, jak zde bylo popsáno, nebo čistý humánní IgG, aby se dosáhlo konečné koncentrace 5 µg/ml.

Obrázek 2A ukazuje usmrcování buněk HT29 působením anti-Fas receptoru mAb CH-11 (který stimuluje FasR signalizaci), TNF, LT-alfa3, LT-alfa1/beta2 a LT-alfa2/beta1 ligandů ve spojení s IFN-gama. Vizualní prohlídka buněk, na které bylo působeno LT-alfa1/beta2, ukazuje, že toto činidlo buňky spíše usmrcuje než aby pouze blokovalo jejich proliferaci. V nepřítomnosti IFN-gama nejsou pozorovány žádné účinky, což odráží neobvyklou schopnost IFN-gama ovlivnit, jak buňky interpretují signalizaci od TNF rodiny receptorů. Interferony alfa a beta byly 100-krát méně účinné než interferony gama, jak bylo kvantifikováno na bázi jednotek protivirové aktivity.

Obrázek 2B ukazuje inhibici LT-alfa1/beta2 usmrcování rozpustným LT-beta-R-Fc ale ne p60-TNF-R-Fc, čímž demonstruje, že cytotoxicita je specifická pro LT-alfa1/beta2. Nedostatek inhibice u p60-TNF-R-Fc naznačuje, že kontaminace LT-alfa (o níž je známo, že činí méně než 1 %) nemůže být zodpovědná za cytotoxickou aktivitu LT-alfa1/beta2.



Příklad 6

Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky potencují usmrcování buněk HT29 pomocí LT-alfalbeta2 komplexů

Byly provedeny cytolytické testy, jak popsáno v příkladu 5 s tím rozdílem, že interferony gama a anti-LT-beta-R monoklonální protilátky (série 0,01 až 1000 ng/ml) byly přidány k buňkám při 2x finální koncentraci a pak se přidalo 50 μ l roztoku buněk do jamek obsahujících zředěný LT-alfal/beta2. Růst byl vyhodnocen, jak popsáno v příkladu 5. Obrázek 3 ukazuje rozdílné účinky dvou různých anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek v jejich schopnosti potencovat LT-alfal/beta2 cytotoxickou aktivitu. Obrázek 3A ukazuje, že anti-LT-beta-R monoklonální protilátka CDH10 potencuje cytotoxickou aktivitu LT-alfal/beta2 způsobem závislým na dávkování. Obrázek 3B ukazuje účinky jiné anti-LT-beta-R monoklonální protilátky, BDA8, ve stejném testu. Protilátka BDA8 inhibuje cytotoxickou aktivitu LT-alfal/beta2 spíše než by potencovala usmrcování nádorových buněk.

Příklad 7

Imobilizované anti-LT-beta-R monoklonální protilátky mohou usmrcovat nádorové buňky HT29

Za účelem imobilizace anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek na plastický povrch byly destičky s 96 jamkami pro tkáňové kultury pokryty 50 μ l 10 μ g/ml kozí protimýšší Fc polyklonální protilátky (Jackson ImmunoResearch), promyty a zablokovány 5% fetálním telecím sérem (FCS) v PBS, po čemž následovalo zachycení uvedené monoklonální anti-LT-beta-R protilátky a další promytí. Do monoklonální protilátkou povlečených jamek byly naočkovány buňky HT29 a byly provedeny cytolytické testy jako v příkladu 5. Obrázek 4A ilustruje cytotoxické účinky imobilizovaných anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek BDA8 a CDH10 na buňky HT29. Každá monoklonál-

ní protilátka vyvolává individuálně cytotoxicitu na nádorové buňky, když je imobilizována na povrch. Obrázek 4B ukazuje, že tytéž monoklonální protilátky BDA8 a CDH10, pokud jsou testovány individuálně v roztoku, nejsou cytotoxické, takže cytolytická aktivita jednotlivé anti-LT-beta-R monoklonální protilátky in vitro se jeví být funkcí její imobilizace.

Příklad 8

Kombinace anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek v roztoku, zaměřená proti určitým epitopům, usmrcuje buňky HT29

Růst buněk HT29 byl vyhodnocen, jak popsáno v příkladu 5, s tím rozdílem, že v růstovém médiu byla obsažena jedna nebo dvě anti-LT-beta-R monoklonální protilátky. Tabulka 1 ukazuje účinky na buňky HT29, které byly pozorované, když byly do roztoku přidány různé anti-LT-beta-R monoklonální protilátky (tj. neimobilizované na plastu). Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky mohou být uspořádány do skupin I až IV na bázi jejich relativních schopností působit ve vzájemné kombinaci v cytolytickém testu na buňky HT29. Výsledky anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek poskytly v cytolytických testech paralelní údaje o vazbě na receptory, což naznačuje, že monoklonální protilátky v každé z rozdílných skupin rozpoznávají epitopy LT-beta-R.

Tabulka 1

Kombinace rozpustných anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek jsou cytotoxické pro humánní adenokarcinomatózní buňky HT29. Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky jsou seřazeny do skupin I, II, III a IV na bázi jejich účinků ve vzájemné kombinaci v cytolytických testech s buňkami HT29. Plusy se týkají relativní hladiny cytolytických účinků kombinace monoklonálních protilátek na buňky HT29 v přítomnosti 8 OU/ml interferonu gama.

nr = nerelevantní, nd = nedeterminovaná

Druhá mAb

Skupina	První mAb	Skupina I		Skupina II		Skupina III	Skupina IV	
		BDA8	AGH1	BCG6	BHA10	BKA11	CDH10	CBE11
I	BDA8	nr	-	+	++	+	nd	nd
	AGH1	-	nr	++	+++	++	nd	nd
II	BCG6	++	++	nr	-	+++	nd	nd
	BHA10	++	+++	-	nr	+	+++	++++
III	BKA11	+	++	+++	nd	nr	-	nd
	CDH10	++	++	++	+++	-	nr	+++
IV	CBE11	nd	+	+	++++	nd	++++	nr

Obrázek 5A až D kvantifikuje účinky začlenění reprezentativních párových kombinací spoluúčinkujících anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek, zaměřených proti různým epitopům LT-beta-R, do HT29 cytolytického testu. Obrázek 5A znázorňuje cytotoxické účinky BHA10 a CBE11, obrázek 5B znázorňuje cytotoxické účinky CDH10 a CBE11 a obrázek 5C představuje cytotoxické účinky CDH10 a AGH1 samotných a v kombinaci. Obrázek 5D ukazuje cytotoxické účinky kombinace monoklonálních protilátek CDH10 a AGH1 u jiné linie nádorových buněk zvané WiDr.

Tabulka 2 shrnuje vlastností reprezentativních anti-LT-beta-R monoklonálních protilátek podle vynálezu.

Tabulka 2

Souhrn myších antihumánních LT-beta-R monoklonálních protilátek

HT29 cytotoxicita

mAB skupina	mAB název	Barvení buněk ^a	Blokace vazby receptorů ^b	mAb imobilizovaná na plátnu ^c	Rozpustná mAb samotná	Rozpustná mAb s LTalfa1-beta1
I	BDA8	+++	+++	+	+/- ^d	inhibuje
I	AGH1	+++	+++		+/-	inhibuje
II	BCG6	+++	++	+	+/-	smíšená
II	BHA10	+++	+++	+	+/-	smíšená
III	BKA11	+++	+/-	+	-	potencuje
III	CDH10	+++	+/-	+	+/-	potencuje
IV	CBE11	+++	+++	+	+/-	bez účinku
Kontroly						
	MOPC21	-	-	-	-	bez účinku
	HT29/26	-	nd	-	-	bez účinku
	TS 2/9 ^e	nd	nd	-	-	bez účinku

^aFACS barvení CHO buněk, u nichž došlo k transfekci s LT-beta-R

^bTest vyhodnocen na to, jestli protilátka blokuje vazbu rozpustného receptoru na aktivovaný hybridom II-23 T-buňky, nd = neprovedeno

^cHT-29 buňky se nechaly růst s IFN-gama na destičkách pokrytých anti-LT-beta-R, jak definováno v metodách.

^dVariabilní, parciální inhibice v některých testech, žádné účinky v jiných.

^eAntihumánní LFA-3, myší IgG1

Příklad 9

Spolehnutí na endogenní IFN-gama pro působení na nádorové buňky

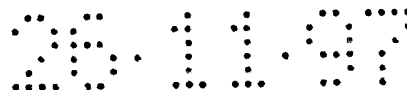
IFN-gama, výhodné LT-beta-R aktivující činidlo podle vynálezu, je cytokin, který se vyznačuje protinádorovou účinností a který je tolerován lidmi. Endogenní IFN-gama, přítomný v okolí obklopujícím nádor, může být přítomen v dostatečně vysokých koncentracích, aby fungoval jako LT-beta-R aktivující činidlo podle vynálezu bez přidání exogenního IFN-gama. Koncentrace IFN-gama v blízkosti nádoru může být stanovena použitím standardních imunotechnických metod na vzorcích tkání z oblasti nádoru. Jestliže je endogenní koncentrace IFN-gama dostatečně vysoká, aby vyvolala protinádorovou aktivitu v kombinaci s LT-alfa/beta heteromerními komplexy nebo anti-LT-beta-R monoklonálními protilátkami podle vynálezu (jak stanoveno cytolytickými testy zde popsány), pak nemusí být IFN-gama aplikován jako druhé LT-beta-R aktivující činidlo v prostředcích nebo metodách podle vynálezu.

Příklad 10

Indukce endogenního IFN-gama jako LT-beta-R aktivujícího činidla pro působení na nádorové buňky

Sloučeniny, které mohou vyvolat endogenní produkci interferonů, jako je IFN-gama, spadají do skupiny LT-beta-R aktivujících činidel podle vynálezu. Například mohou interferony být indukovány působením molekul dvouřetězcové RNA, jako polyriboguanylové/polyribocytidylové kyseliny (poly-G/C).

Samicím C57/b16 (starým 6 až 8 týdnů) může být aplikováno injekčně 18 mg (600 mg/kg) D-galaktosaminu, který senzitivuje myši na účinky TNF a jiných protinádorových činidel. K purifikovanému LT-alfa1/beta2 (10 až 100 µg) se přidá série koncentrací poly-G/C (Juraskova a spol., Eur. J. Pharmacol., 221, str. 107 až 111 (1992)) v neutrálním fyziologickém roz-



toku a roztok se aplikuje myším ve formě intraperitoneální (i.p.) injekce. Protinádorová účinnost LT-alfa1/beta2 bude zvýšena přítomností poly-rG/rC dvouřetězcové RNA.

Podobně může být stimulátor interferonu z rostliny Glycyrrhiza glabra (Acharya a spol., Indian J. Med. Res., 98, str. 69 až 74 (1993)) aplikován lidem intravenózně v dávkách od 40 do 100 ml/den. Optimální dávka pro LT-beta-R aktivaci za přítomnosti buď LT-alfa/beta heteromerních komplexů nebo anti-LT-beta-R protilátek může být stanovena empiricky a bude záviset na faktorech jako je typ nádoru, způsob aplikace a program aplikace.

Imiquimod R-837 (Bernstein a spol., Antiviral Res., 20, str. 45 až 55 (1994)), Saparal (Paramanova a spol., Vopr. Virusol., 39, str. 131 až 134 (1994)), Bropirimine (Onishi a Machida, Hinyokika Kyo, 40, str. 195 až 200 (1994)) nebo Ridostin (Cheknev a spol., Vopr. Virusol., 39, str. 125 až 128 (1994)) mohou být též aplikovány jako LT-beta-R aktivující činidla ve spojení s LT-alfa/beta heteromerními komplexy, anti-LT-beta-R protilátkami nebo jejich kombinací. V každém případě mohou být výhodné způsoby aplikace a optimální dávky stanoveny empiricky za použití publikovaných zpráv jako výchozích bodů pro optimalizaci rutinními klinickými postupy.

Příklad 11

Myši tolerují injekce humánního LT-alfa1/beta2

Samicím C57/b16 (starým 6 až 8 týdnů), aklimatizovaným v ústavu po dobu několika dnů, bylo aplikováno injekčně i.p. 18 mg (600 mg/kg) D-galaktosaminu, který senzitivuje myši na TNF a jiné protinádorové prostředky. Byl aplikován i.p. buď humánní TNF, LT-alfa nebo LT-alfa1/beta2.

Tabulka 3 dokumentuje přežití myši 24 hodin po aplikované injekci.

Tabulka 3

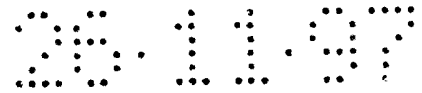
Činidlo	Dávka ($\mu\text{g}/\text{zvíře}$)	Přežití
fyziologický roztok	-	4/4
hu-TNF	0,2	0/6
hu-TNF	1,0	0/2
hu-TNF	10	0/4
hu-LT-alfa	0.2	2/2
hu-LT-alfa	1,0	2/2
hu-LT-alfal/beta2	10	2/2
hu-LT-alfal/beta2	100	2/2

Příklad 12

Vytvoření rekombinantní anti-LT-beta-R IgM monoklonální protilátky

Při použití shora popsaných protinádorových cytotoxických testů ve spojení se standardními modely růstu nádorů u imunodeficientních myší může být zvolen anti-LT-beta-R IgG s vhodnými vlastnostmi. Pro přípravu variabilní domény DNA z RNA izolované ze sekretující hybridomové buněčné linie za použití standardních metodologií reverzní transkriptázy/PCR může být použito univerzálních primérů, které hybridují ke každé z variabilních domén IgG těžkých a lehkých řetězců zvolených anti-LT-beta-R. Tyto protokoly byly popsány (Arulanandam a spol., J. Exp. Med., 177, str. 1439 až 1450 (1993), Lane a spol., Eur. J. Immunol, 22, str. 2573 až 2578 (1993), Traunecker a spol., Nature, 339, str. 68 až 70 (1989)).

Amplifikované produkty se pak shromáždí do vektorů obsahujících humánní CH1, CH2 a CH3 μ řetězcové domény. Koexprese dvou řetězců v jediném hostiteli umožní shromáždit těžké



a lehké řetězce do pentamerní IgM molekuly. Tato molekula je chimérou sestávající z myších variabilních oblastí připojených k humánním konstantním oblastem.

Alternativně může být použit proces používající PCR k amplifikaci DNA kódující pouze aktuální vazebné oblasti variabilních oblastí. Amplifikovaná DNA je pak vložena do vektorů obsahujících všechny sekvence humánního IgG kromě aktuálních aminokyselin účastnících se vazby na antigen. Takové konstrukce se nazývají "humanizované" protilátky a detailní metody pro jejich přípravu jsou dobře známé (např. WO 94/04679).

Příklad 13

Anti-LT-beta-R IgM monoklonální protilátky fungují jako LT-beta-R aktivující činidla

Anti-LT-beta-R IgM protilátky mohou být připraveny v rekombinantní formě, jak popsáno v příkladu 12.

Alternativně mohou být použity jako zdroj anti-LT-beta-R IgM monoklonálních protilátek kompletní myší imunoglobuliny třídy IgM izolované metodami fúze hybridomu za použití primární imunizace normálních myší nebo extenzivní imunizace myší CD40 postrádajících signalizaci (Kawabe a spol., *Immunity*, 1, str. 167 až 178 (1994), Xu a spol. *Immunity*, 1, str. 423 až 431 (1994)).

Anti-LT-beta-R IgM monoklonální protilátky budou podstatně účinnější jako LT-beta-R aktivující činidla než jejich normální bivalentní IgG protějšky, měřeno srovnáními odpovědi na dávku v HT29 cytolytickém testu za přítomnosti IFN-gama. Anti-LT-beta-R IgM monoklonální protilátky fungují jako LT-beta-R aktivující činidla jak když jsou imobilizovány, tak také, když jsou aplikovány v roztoku. Kromě toho lze očekávat, že zvětší protinádorovou účinnost LT-alfa/beta heteromerních komplexů.

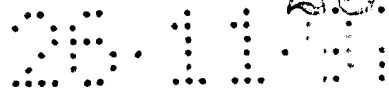
Příklad 14

Anti-LT-beta-R monoklonální protilátky inhibují růst humánních nádorových buněk u myši SCID

Balb/c SCID myším (Jackson Labas, Bar Harbor, ME) bylo aplikováno injekčně subkutánně (s.c.) do zadní partie zvířete 1×10^6 trypsinizovaných a promytých humánních adenokarcinomatózních WiDr buněk v objemu 0,2 ml PBS. Injekčně vpravené WiDr buňky vytvoří v myších nádory a schopnost anti-LT-beta-R monoklonální protilátky inhibovat růst nádoru byl monitorován. V jedné sadě pokusů se na myši působilo s nebo bez CBE11 anti-LT-beta-R monoklonální protilátky -- buď s nebo bez humánního IFN-gama (10^6 protivirových jednotek/myš) -- současně s inokulací WiDr buněk s.c. (obrázek 6A). Protilátky a IFN-gama byly aplikovány samotné nebo společně i.p. injekcí v 0,2 ml. Kontrolním myším byl aplikován injekčně samotný fyziologický roztok, IFN-gama samotný nebo kontrolní antihumánní LFA-3 monoklonální protilátka ($1E6$) s IFN-gama. Velikost každého výsledného nádoru byla změřena 30 dní po inokulaci. Objem nádoru (v cm^3 byl) vypočten z poloměru zjištěného měřením posuvným měřítkem ve dvou směrech. Zvířata, kterým byly aplikovány CBE11 nebo $1E6$ monoklonální protilátky, dostaly 10 μg /myš nebo 50 μg /myš protilátky (obrázek 6A, kroužky s tečkami a prázdné kroužky).

V jiné sadě pokusů byly myši inokulovány s.c. WiDr buňkami a nádory se nechaly růst 15 dní, dříve než se myším aplikovala CBE11 anti-LT-beta-R monoklonální protilátka (obrázek 6B). 15. den (před aplikací protilátky) činil objem nádoru $0,076 cm^3$ při středním průměru 0,53 cm. Pak byla aplikována CBE11 anti-LT-beta-R monoklonální protilátka (50 μg) -- buď s nebo bez humánního IFN-gama (10^6 protivirových jednotek/myš) -- i.p. injekcí v 0,2 ml skupině 12 zvířat. Injekce se opakovaly třikrát nebo vícekrát během období tří týdnů. Kontrolním skupinám (12 myší/skupina) byl injekčně aplikován IFN-gama samotný (10^6 protivirových jednotek/myš) ne-

bo s 50 µg kontrolní antihumánní LFA-3 monoklonální protilát-
ky (1E6) + IFN-gama (10^6 protivirových jednotek/myš). Růst
nádorů přítomných 15. den byl měřen během doby od 15. do 49.
dne po inokulaci nádorových buněk. Výsledky znázorněné na
obr. 6B byly zjištěny zaslepeným způsobem. Nádory, na které
se působilo monoklonální protilátkou CBE11 buď s nebo bez
IFN-gama, přestaly růst. Po třech injekcích monoklonální pro-
tilátky CBE11 (+/- IFN-gama) během tří týdnů se růst nádorů
zastavil nejméně na 7 týdnů po inokulaci, to jest v době, kdy
pokus byl ukončen.



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob léčby nebo omezení pokračování, závažnosti nebo účinků neoplazie, obsahující operaci aplikace terapeuticky účinného množství LT-alfa/beta heteromerního komplexu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že alfa/beta heteromerní komplex se aplikuje za přítomnosti terapeuticky účinného množství nejméně jednoho LT-beta-R aktivujícího činidla.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedním LT-beta-R aktivujícím činidlem je terapeuticky účinné množství IFN-gama.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že druhým LT-beta-R aktivujícím činidlem je terapeuticky účinné množství protilátky anti-LT-beta-R.

4. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že protilátka anti-LT-beta-R je monoklonální protilátka.

5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující anti-LT-beta-R monoklonální protilátku BKA11, CDH10, BCG6 a BHA10.

6. Způsob léčby nebo omezení pokračování, závažnosti nebo účinků neoplazie, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje operaci aplikace terapeuticky účinného množství nejméně (dvou) jednoho LT-beta-R aktivujícího činidla (aktivujících činidel) a farmaceuticky přijatelného nosiče.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nejméně jedno LT-beta-R aktivující činidlo je anti-LT-beta-R protilátka.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že protilátka anti-beta-R je CBE11.

SUBSTITUTE SHEET

25.11.97

9. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje nejméně dvě monoklonální protilátky anti-LT-beta-R, které jsou zaměřeny proti nepřekrývajícím se epitopům LT-beta-R.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující AGH1 a BDA8 a jiná monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující BCG6, BHA10, BKA11, CDH10 a CBE11.

11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující BCG6 a BHA10 a jiná monoklonální protilátka anti-LT-beta R je zvolena ze skupiny zahrnující AGH1, BDA8, BKA11, CDH10 a CBE11.

12. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující BKA11 a CDH10 a jiná monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující AGH1 a BDA8, BCG6, BHA10 a CBE11.

13. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je CBE11 a jiná monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující AGH1, BDA8, BCG6, BHA10, BKA11, CDH10 a CBE11.

14. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonálními protilátkami anti-LT-beta-R jsou CBE11 a BHA10.

15. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonálními protilátkami anti-LT-beta-R jsou CBE11 a CDH10.

SUBSTITUTE SHEET

25.1.97

15. Způsob podle nároku 9, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že monoklonálními protilátkami anti-LT-beta-R jsou AGH1 a CDH10.

17. Způsob podle nároků 6 až 16, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že jedním LT-beta-R aktivujícím činidlem je IFN-gama.

18. Způsob léčby nebo omezení pokračování, závažnosti nebo účinků neoplasie, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje operaci aplikace terapeuticky účinného množství zesítěných protilátek anti-LT-beta-R jako prvního LT-beta-R aktivujícího činidla za přítomnosti druhého LT-beta-R aktivujícího činidla a farmaceuticky přijatelného nosiče.

19. Způsob podle nároku 18, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že zesítěné protilátky anti-LT-beta-R jsou nekovalentně imobilizovány na povrchu.

20. Způsob podle nároku 18, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že zesítěné protilátky anti-LT-beta-R jsou kovalentně imobilizovány na povrchu.

21. Způsob podle nároku 18, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že zesítěné protilátky anti-LT-beta-R jsou nekovalentně agregovány v roztoku pomocí činidla zesíťujícího protilátku anti-LT-beta-R.

22. Způsob podle nároku 21, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že činidlem zesíťujícím protilátku anti-LT-beta-R je druhá protilátka zaměřená proti protilátce anti-LT-beta-R.

23. Způsob podle nároku 21, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že činidlem zesíťujícím protilátku anti-LT-beta-R je Fc receptor, který se váže na protilátku anti-LT-beta-R.

24. Způsob podle nároku 18, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že zesítěné protilátky anti-LT-beta-R jsou kovalentně

SUBSTITUTE SHEET

25.11.97

agregovány v roztoku pomocí chemického prostředku zesilujícího protilátku anti-LT-beta-R.

25. Způsob podle nároků 18 až 24, v y z n a č u j í c í s e t í m , že druhým LT-beta-R aktivujícím činidlem je IFN-gama.

26. Způsob léčby nebo omezení pokračování, závažnosti nebo účinků neoplazie, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje operaci aplikace terapeuticky účinného množství nejméně jednoho LT-alfa/beta-R aktivujícího činidla a farmaceuticky přijatelného nosiče.

27. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nejméně jedním LT-beta-R aktivujícím činidlem je protilátka anti-LT-beta-R.

28. Způsob podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m , že protilátkou LT-beta-R je CBEl1.

29. Způsob volby LT-beta-R aktivujícího činidla, které působí za přítomnosti LT-alfa/beta heteromerních komplexů, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje operace:

a) kultivaci nádorových buněk v přítomnosti heteromerních komplexů LT-alfa/beta, účinného množství prvního LT-beta-R aktivujícího činidla a druhého předpokládaného LT-beta-R aktivujícího činidla a

b) zjištění, zda druhé předpokládané LT-beta-R aktivující činidlo zvyšuje protinádorovou aktivitu heteromerního komplexu LT-alfa/beta v přítomnosti prvního LT-beta-R aktivujícího činidla.

30. Způsob podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m , že prvním LT-beta-R aktivujícím činidlem je IFN-gama.

SUBSTITUTE SHEET

20.11.97

31. Způsob podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m , že heteromerní komplex LT-alfa/beta má stechiometrii LT-alfa1/beta2.

32. Farmaceutický prostředek podle nároků 1 až 31, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje dále terapeuticky účinné množství nejméně jednoho LT-beta-R aktivujícího činidla.

33. Farmaceutický prostředek podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedním LT-beta-R aktivujícím činidlem je IFN-gama.

34. Farmaceutický prostředek podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedním LT-beta-R aktivujícím činidlem je protilátka anti-LT-beta-R.

35. Farmaceutický prostředek podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m , že anti-LT-beta-R protilátka je monoklonální protilátka

36. Farmaceutický prostředek podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonální protilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující anti-LT-beta-R monoklonální protilátku BKA11, CDH10, BCG6 a BHA10.

37. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje terapeuticky účinné množství nejméně dvou LT-beta-R aktivujících činidel bez exogenního heteromerního komplexu LT-alfa/beta a farmaceuticky přijatelný nosič.

38. Farmaceutický prostředek podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nejméně jedním LT-beta-R aktivujícím činidlem je protilátka anti-LT-beta-R.

39. Farmaceutický prostředek podle nároku 38, v y z n a č u j í c í s e t í m , že anti-LT-beta-R

SUBSTITUTE SHEET

20197

prottilátka je monoklonální prottilátka.

40. Farmaceutický prostředek podle nároku 39, v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je CBE11.

41. Farmaceutický prostředek podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nejméně dvě LT-beta-R aktivující činidla jsou monoklonální prottilátky anti-LT-beta-R, které jsou zaměřeny proti nepřekrývajícím se epitopům LT-beta-R.

42. Farmaceutický prostředek podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující AGH1 a BDA8 a jiná monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující BCG6, BHA10, BKA11, CDH10 a CBE11.

43. Farmaceutický prostředek podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující BCG6 a BHA10 a jiná monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující AGH1, BDA8, BKA11, CDH10 a CBE11.

44. Farmaceutický prostředek podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující BKA11 a CDH10 a jiná monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující AGH1, BDA8, BCG6, BHA10 a CBE11.

45. Farmaceutický prostředek podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je CBE11 a jiná monoklonální prottilátka anti-LT-beta-R je zvolena ze skupiny zahrnující AGH1, BDA8, BCG6, BHA10, BKA11, CDH10 a CBE11.

SUBSTITUTE SHEET

25.11.97

46. Farmaceutický prostředek podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonálními protilátkami anti-LT-beta-R jsou CBE11 a BHA10.

47. Farmaceutický prostředek podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonálními protilátkami anti-LT-beta-R jsou CBE11 a CDH10.

48. Farmaceutický prostředek podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonálními protilátkami anti-LT-beta-R jsou AGH1 a CDH10.

49. Farmaceutický prostředek podle nároků 41 až 48, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje IFN-gama jako jedno z LT-beta-R aktivujících činidel

50. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje terapeuticky účinné množství zesí-
těných protilátek anti-LT-beta-R jako LT-beta-R aktivující či-
nidlo a farmaceuticky přijatelný nosič.

51. Farmaceutický prostředek podle nároku 50, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zesítené protilát-
ky anti-LT-beta-R jsou nekovalentně imobilizovány na povrchu.

52. Farmaceutický prostředek podle nároku 50, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zesítené protilát-
ky anti-LT-beta-R jsou kovalentně imobilizovány na povrchu.

53. Farmaceutický prostředek podle nároku 50, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zesítené protilát-
ky anti-LT-beta-R jsou nekovalentně agregovány v roztoku po-
mocí činidla zesíťujícího protilátku anti-LT-beta-R.

54. Farmaceutický prostředek podle nároku 53, v y z n a č u j í c í s e t í m , že činidlem zesíťují-
cím protilátku anti-LT-beta-R je sekundární protilátka zamě-

SUBSTITUTE SHEET

25.11.97

řená proti protilátce anti-LT-beta-R.

55. Farmaceutický prostředek podle nároku 50, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zesíťené protilátky anti-LT-beta-R jsou kovalentně agregovány v roztoku pomocí chemického činidla zesíťujícího protilátku anti-LT-beta-R.

56. Farmaceutický prostředek podle nároků 50 až 55, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje IFN-gama jako druhé LT-beta-R aktivující činidlo.

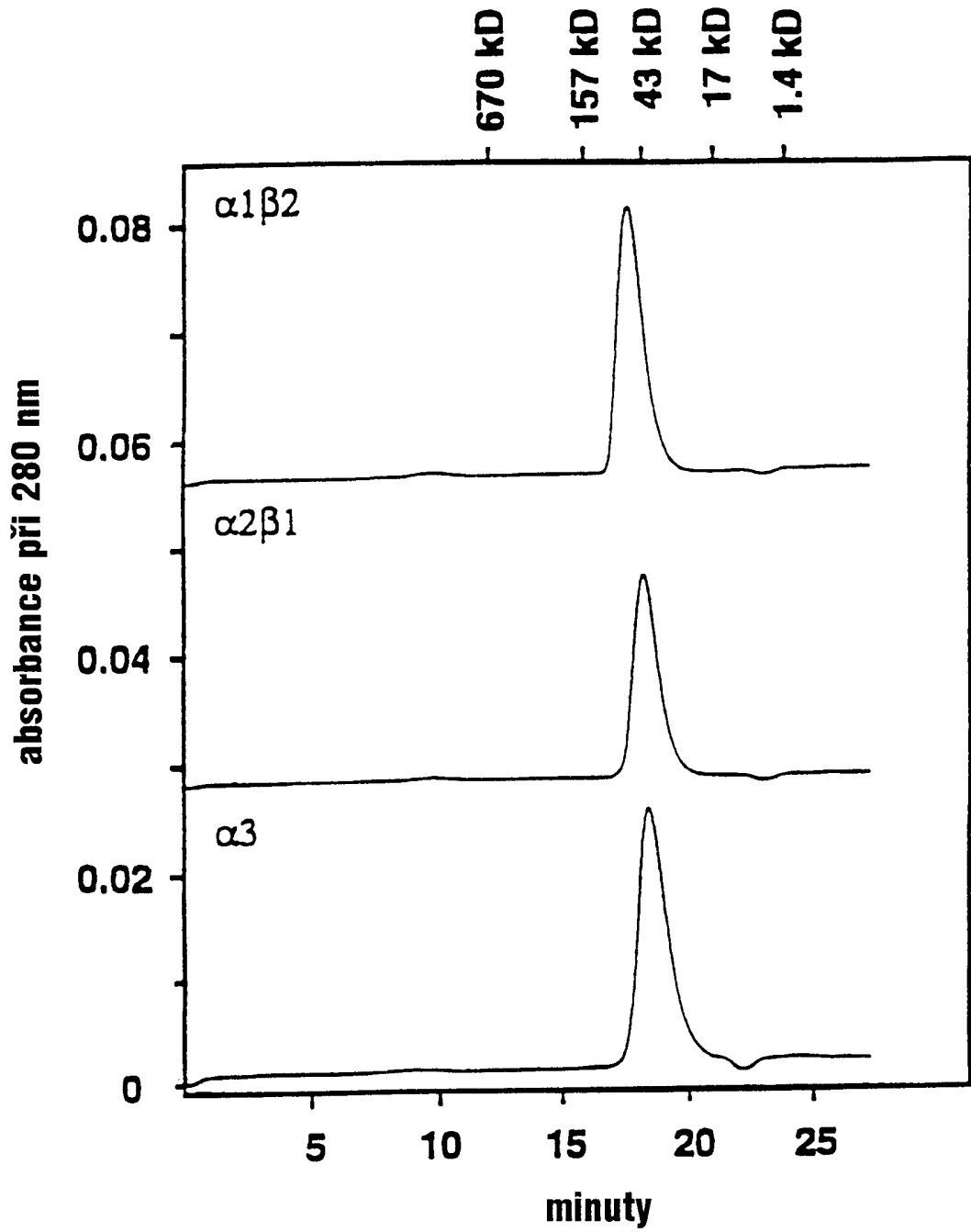
57. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje terapeuticky účinné množství nejméně jednoho LT-beta-R aktivujícího činidla bez exogenního heteromerního komplexu LT-alfa/beta a farmaceuticky přijatelný nosič.

58. Farmaceutický prostředek podle nároku 57, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nejméně jedním LT-beta-R aktivujícím činidlem je protilátka anti-LT-beta-R.

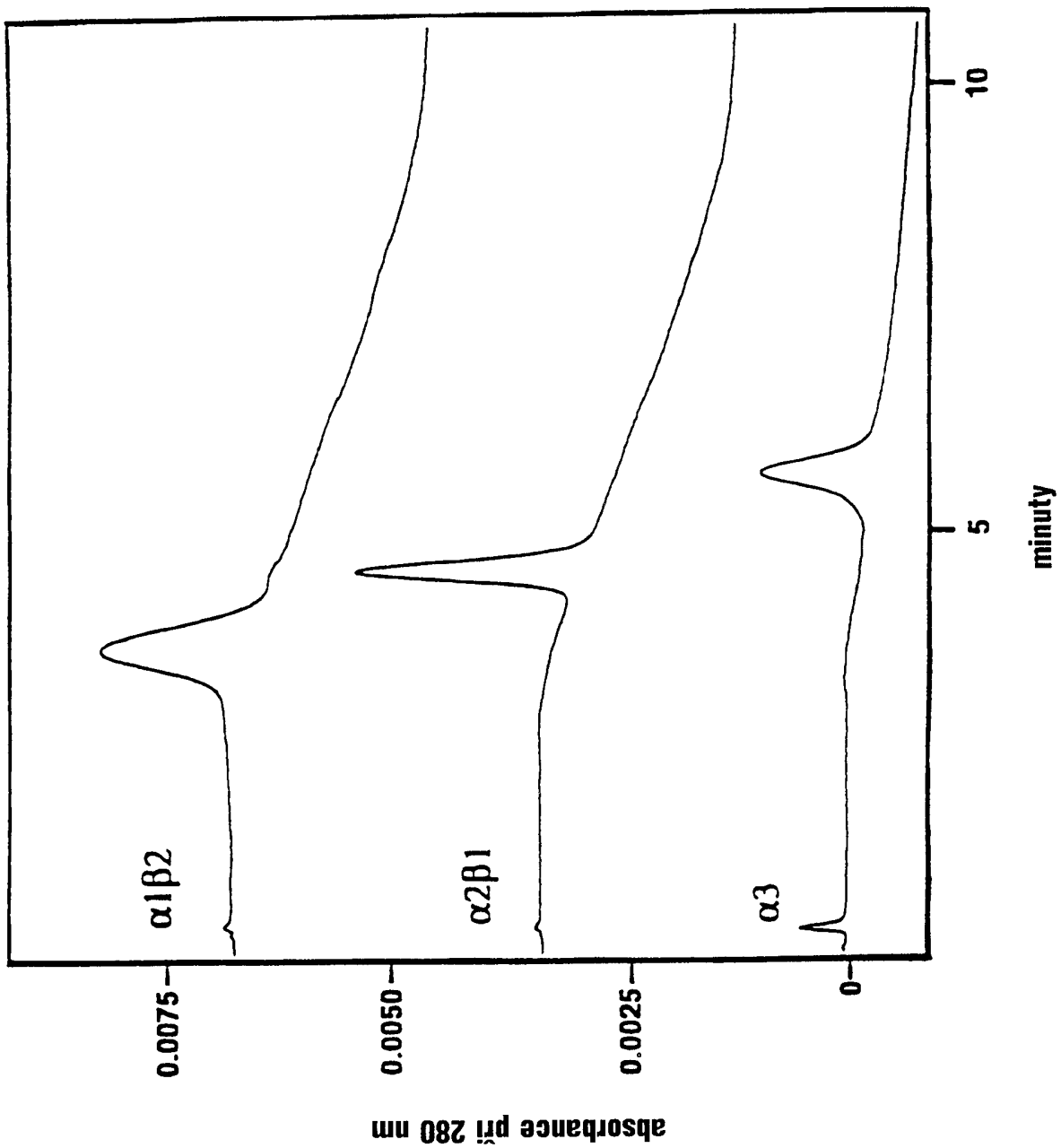
59. Farmaceutický prostředek podle nároku 58, v y z n a č u j í c í s e t í m , že anti-LT-beta-R protilátkou je CBE11.

60. LT-beta-R aktivující činidlo zvolené způsobem podle nároku 29.

SUBSTITUTE SHEET

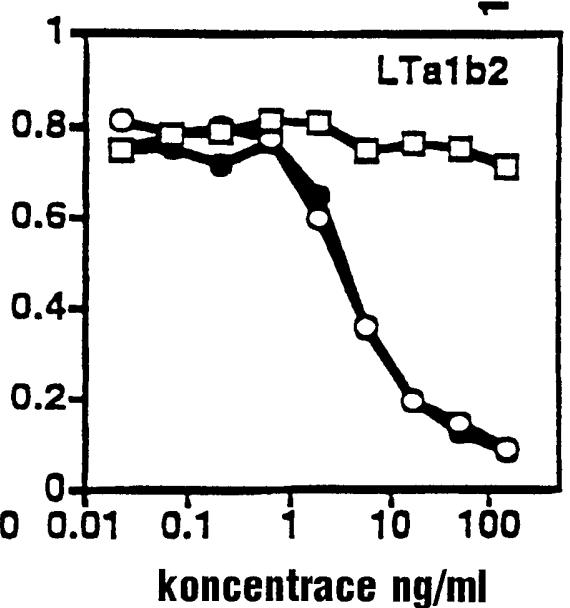
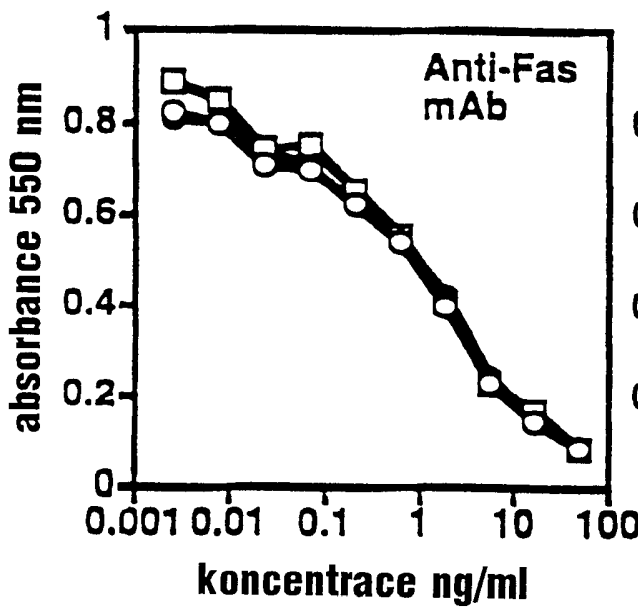
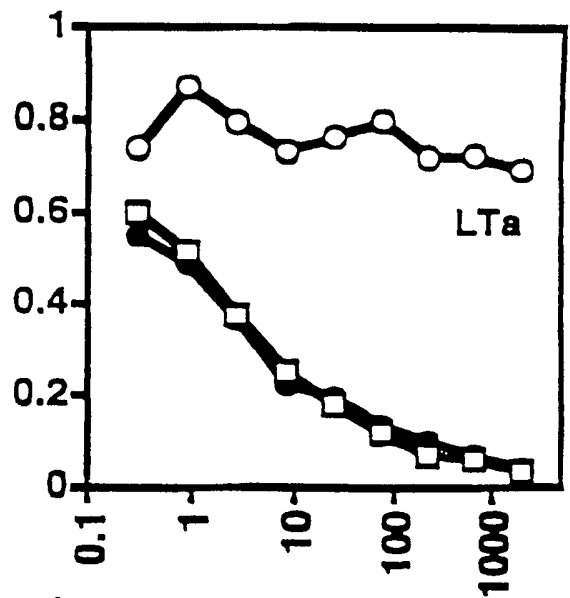
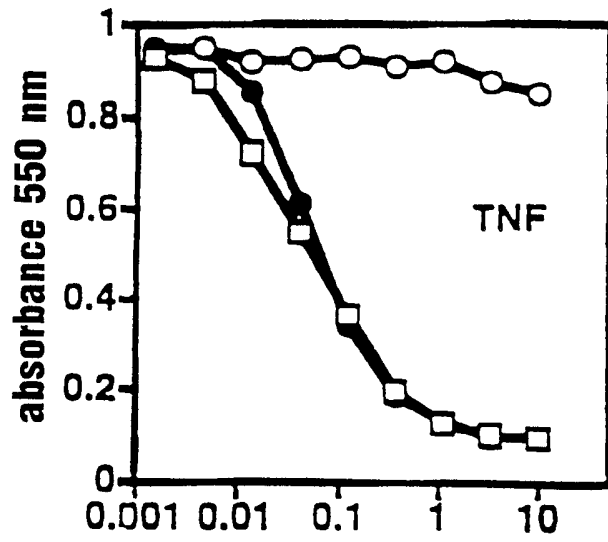


Obr. 1A



Ohr. 1B

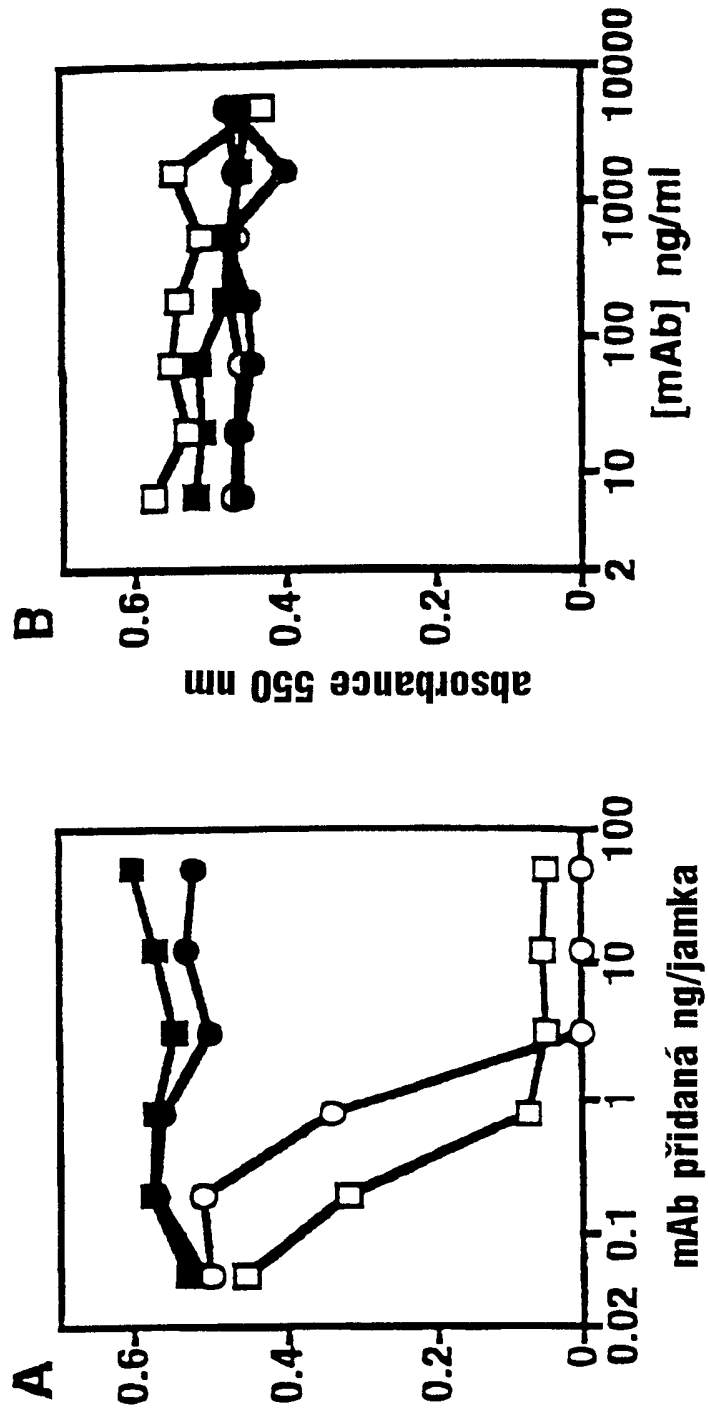
Obr. 2B

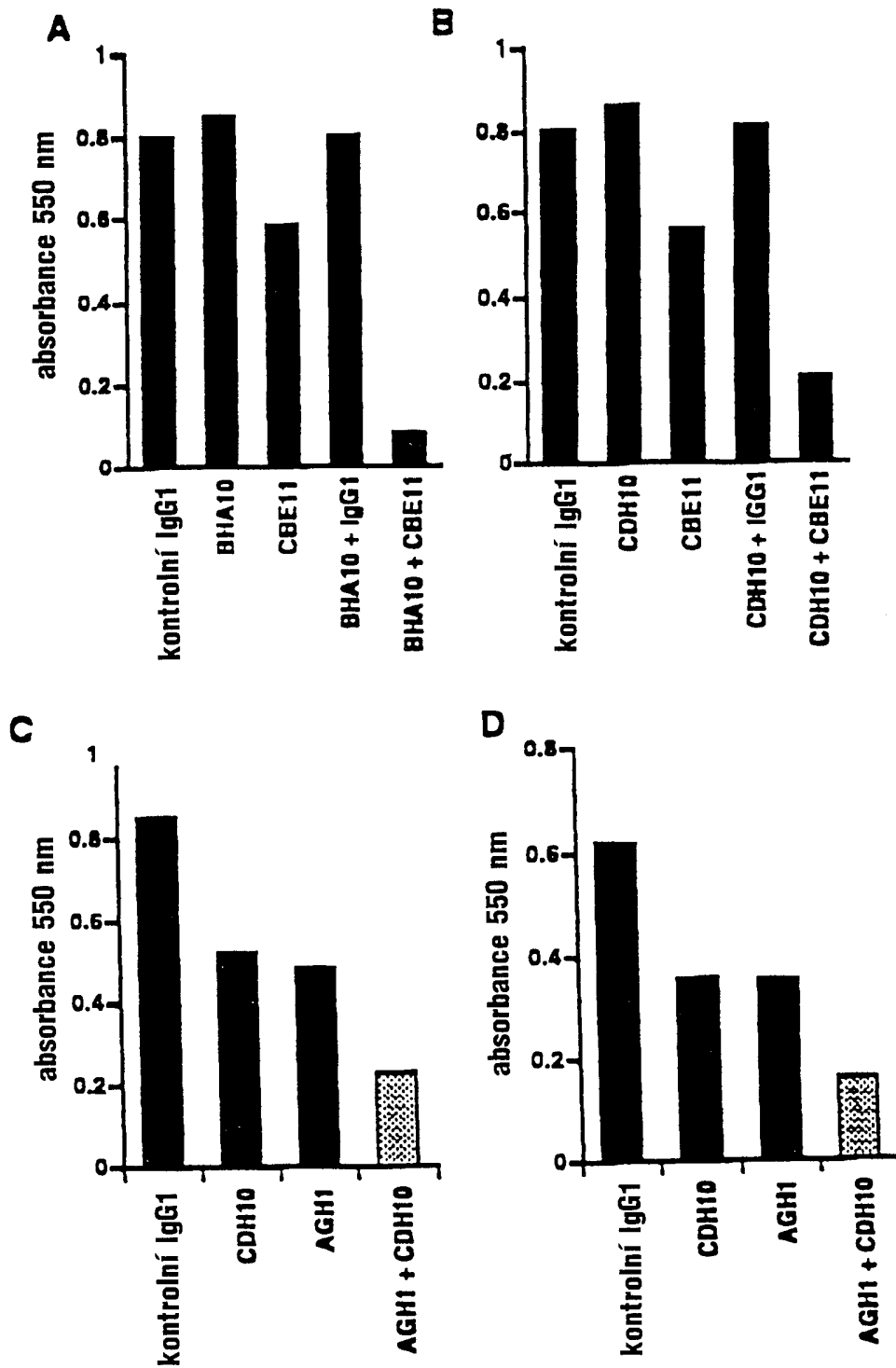


Obr. 3

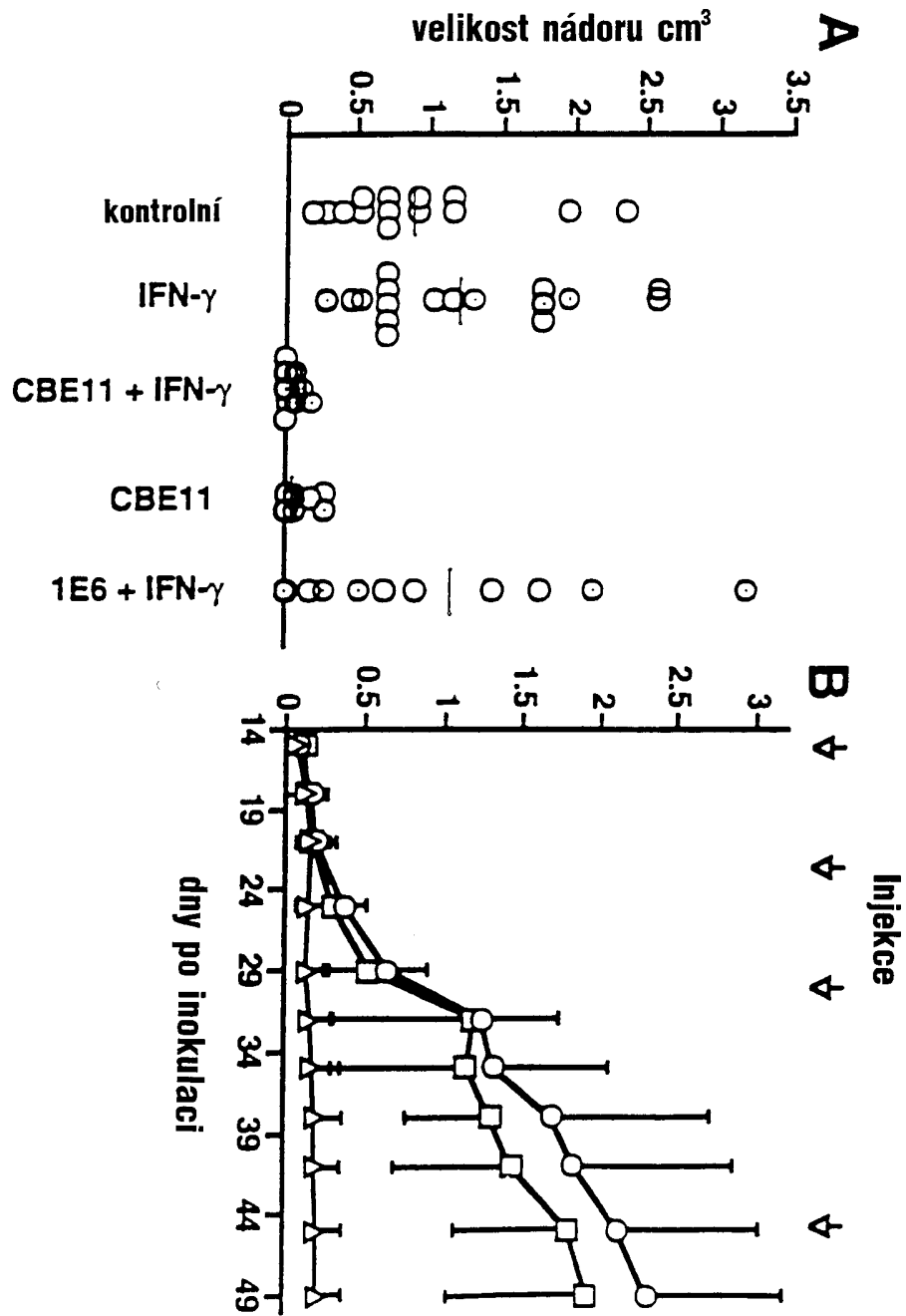


Obr. 4





Obr. 5



Obr. 6