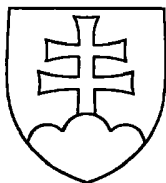


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

1130-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

A 61K 38/17,
A 61K 39/395,
A 61N 5/00,
A 61K 35/12
// (A 61K 38/17,
A 61N 5:00)
(A 61K 38/17,
A 61K 35:12)
(A 61K 39/395,
A 61K 35:12)
(A 61K 39/395,
A 61K 38:17)

(22) Dátum podania: 29.01.1999

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/073 112, 60/073 410

(32) Dátum priority: 30.01.1998, 02.02.1998

(33) Krajina priority: US, US

(40) Dátum zverejnenia: 18.01.2001

(86) Číslo PCT: PCT/US99/01928, 29.01.1999

(71) Prihlasovateľ: BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Browning Jeffrey, Brookline, MA, US;
Thorbecke Jeanette, Douglaston, NY, US;
Tsiagbe Vincent, Mt. Vernon, NY, US;

(74) Zástupca: Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: Použitie činidla inhibujúceho interakciu LT- β a jeho receptora na výrobu prípravku na liečenie folikulárneho lymfómu

(57) Anotácia:
Opisujú sa farmaceutické prípravky obsahujúce inhibítory lymfotoxínovej signálnej dráhy. Tieto prípravky sú užitočné na liečenie nádorov, najmä folikulárných lymfómov.

Použitie činidla inhibujúceho interakciu LT- β a jeho receptora na výrobu prípravku na liečenie folikulárneho lymfómu

Oblasť techniky

Vynález sa týka farmaceutických prípravkov, obsahujúcich inhibítory lymfotoxínovej signálnej dráhy. Tieto prípravky sú užitočné na liečenie lymfómov, ktoré pochádzajú z germinálnych centier (folikulárnych lymfómov).

Doterajší stav techniky

Cytokíny príbuzné nádorovému nekrotickému faktoru (TNF, „Tumor Necrosis Factor“) sú mediátory hostiteľskej obrannej a imunitnej regulácie. Členovia tejto proteínovej rodiny sa vyskytujú vo forme ukotvenej na bunkovú membránu, keď pôsobia lokálne prostredníctvom vzájomného kontaktu medzi bunkami, alebo sa vyskytujú ako vylučované proteíny, ktoré sú schopné difundovať k vzdialenejším cieľom. Paralelná rodina receptorov upozorňuje na výskyt týchto molekúl, ktoré vedú k iniciácii bunkovej smrti alebo bunkovej proliferácie a diferenciácie v cieľovom tkanive. V súčasnosti rodina TNF ligandov a receptorov obsahuje najmenej 11 známych párov receptor-ligand: TNF:TNF-R, LT- α :TNF-R, LT- α/β :LT- β -R, FasL:Fas, CD40L:CD40, CD30L:CD30, CD27L:CD27, OX40L:OX40 a 4-1BBL:4-1BB.

Členovia TNF rodiny sa môžu najlepšie opísať ako hlavné prepínače v imunitnom systéme na riadenie prežívania buniek a diferenciácie. V súčasnosti sú známe iba dva secernované cytokíny, a sice TNF a LT α , na rozdiel od väčšiny ostatných členov rodiny TNF zakotvených v membráne. Zatiaľ čo membránové formy TNF sa podrobne charakterizovali a pravdepodobne majú jedinečnú biologickú funkciu, funkciou secernovaných TNF je všeobecná signalizácia „poplachu“ bunkám vzdialeným od miesta, kde bola príslušnú udalosť vyvolaná. Sekrécia TNF môže znásobiť udalosť vedúcu k dobre známym zmenám vo výstelke ciev a v

bunkách v mieste zápalu. Naproti tomu členovia TNF rodiny viazané na membránu predávajú signál prostredníctvom receptora typu TNF iba bunkám v priamom kontakte. Tak napr. pomocné T bunky poskytujú „pomoc“ sprostredkovanú CD40 iba takým B bunkám, s ktorými sa dostanú do priameho kontaktu prostredníctvom interakcií TCR. Podobné obmedzenia na bezprostredný bunkový kontakt sa týkajú schopnosti indukovať bunkovú smrť v dobre preskúmanom systéme Fas.

Väčšina komplexov $LT\alpha/\beta$ asociovaných s membránou („povrchové LT“) má stechiometriu $LT\alpha 1/\beta 2$ (Browning a kol., Cell 72: 847-856, 1993, Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Povrchové LT ligandy sa neviažu na TNF-R s vysokou afinitou a neaktivujú signálnu dráhu TNF-R. Avšak $LT\beta$ receptor ($LT\beta$ -R) viaže tieto povrchové lymfotoxínové komplexy s vysokou afinitou (Crowe a kol., Science 264: 707-710, 1994).

Signalizácia $LT\beta$ -R, podobne ako signalizácia TNF-R, má antiproliferatívny účinok a môže mať cytotoxický účinok na nádorové bunky. V súčasne prejednávanej patentovej prihláške autorov predkladaného vynálezu (prihláška US 08/378 968) sa opisujú prípravky a spôsoby selektívnej stimulácie $LT\beta$ -R pomocou činidla aktivujúceho $LT\beta$ -R. Agens aktivujúci $LT\beta$ -R je užitočný na inhibíciu rastu nádorových buniek bez toho, aby súčasne viedol k aktivácii zápalovej reakcie alebo imunoregulačnej dráhy indukovanej TNF-R.

Súčasný výskum génového zameriavania („gene targeting“) predpokladá úlohu $LT\alpha/\beta$ vo vývoji sekundárnych lymfatických orgánov (Banks a kol., J. Immunol. 155, 1685-1693, 1995, De Togni a kol., Science 264, 703-706, 1994). Myši s deficitom $LT\alpha$ naozaj nemajú lymfatické uzliny (LN) a Peyerove ostrovčeky (PP). Ich sleziny majú narušenú architektúru a expresia funkčných markerov na bunkách marginálnej zóny sleziny je pozmenená (Banks a kol., 1995, De Togni a kol., 1994, Matsumoto a kol., Science 271, 1289-1291, 1996). Žiadna z týchto vlastností sa nepopísala u myši s geneticky vyradenou funkciou („knock out“) TNF

receptora (Erickson a kol., Nature 372, 560-563, 1994, Pfeffer a kol., Cell 73, 457-467, 1993, Rothe a kol., Nature 364, 798-802, 1993). Autor vynálezu nedávno definoval úlohu membránových komplexov $LT\alpha/\beta$ vo vývoji sekundárnych lymfatických orgánov tým, že ukázal, že potomstvu myši, ktorým sa v priebehu gestácie injekčne podala rozpustná forma $LT\beta$ -R fúzovaného s úsekom Fc ľudského IgG1 ($LT\beta$ -R-Ig) chýbala väčšina lymfatických uzlín a mali narušenú architektúru sleziny (Rennert a kol., 1996, Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs, J. Exp. Med. 184, 1999-2006). V inej štúdii sa ukázalo, že transgénne myši s podobným konštruktom $LT\beta$ -R-Ig, ktorého expresia začala tri dni po narodení, mali lymfatické uzliny. Ale mali narušenú architektúru sleziny a niekoľko markerov slezinovej marginálnej zóny sa neexprimovalo (Ettinger a kol., Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble $LT\beta$ -R/IgG1 fusion protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13102-7). Tieto údaje spoločne ukazujú, že tu existuje dočasná požiadavka na membránové funkcie LT na sprostredkovanie účinkov na vývoj sekundárnych lymfatických orgánov, ale bez účinku na architektúru sleziny.

Systém TNF sa tiež zúčastňuje vývinu sleziny. Bunky marginálnej zóny sleziny myši s deficienciou TNF neexprimujú makrofágové markery alebo MAdCAM-1 (Alexopoulou a kol., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 228, 1996, Pasparakis a kol., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 239, 1996). Myšiam s deficienciou TNF-R55 taktiež chýba MAdCAM-1 (ale nie MOMA-1) v marginálnej zóne sleziny (Neumann a kol., J. Exp. Med. 184, 259-264, 1996, Matsumoto a kol., Science 271, 1289-1291, 1996).

Lymfatické tkanivo alebo tkanivo podobného typu nevzniká iba v priebehu vývinu, ale taktiež pri určitých patologických stavoch, ako sú napr. chronické zápal, v procese nazývanom neolymfoorganogenéza (Picker a Butcher, Annu. Rev. Immunol. 10,

561-591, 1992, Kratz a kol., J. Exp. Med. 183, 1461-1471, 1996). Tieto procesy sú zjavne ovplyvňované členmi rodiny TNF. U transgénnych myší s génom LT α riadeným promótorom génu inzulínu potkana (RIP-LT) sa vyvinuli chronické zápalové lézie s charakterom organizovaného lymfatického tkaniva (Kratz a kol., J. Exp. Med. 1183, 1461-1471, 19965, Picarella a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10036-10040, 1992).

Vyhodnotenie funkcie LT v priebehu imunitnej odpovede závislej na T bunkách pomocou myší s deficienciou LT α ukázalo na nutnosť LT na vytváranie GC, a zrejme taktiež na udržiavanie organizovanej štruktúry folikulárnych dendritických buniek (FDC) a na imunitnú humorálnu odpoveď (Banks a kol., J. Immunol. 155, 1685-1693, 1995, Matsumoto a kol., Science 271, 1289-1291, 1996, Matsumoto a kol., Nature 382, 462-466, 1996). Myšiam s deficienciou v TNF-R55 taktiež chýbal FDC, nevyvíja sa u nich GC a nie sú schopné optimálnej imunitnej odpovede na ovčie červené krvinky (SRBC). To naznačuje, že TNF-R55 sa môže spustiť rozpustným signálom LT alebo TNF vo väčšine takýchto odpovedí (LeHir a kol., J. Exp. Med. 183, 2367-2372, 1996, Alexopoulou a kol., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 228, 1996, Pasparakis a kol., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 239, 1996).

Receptor LT β , člen rodiny receptorov TNF, špecificky viaže povrchové LT ligandy. LT β -R viaže heteromerické LT komplexy (prevažne LT α 1/ β 2 a LT α 2/ β 1), ale neviaže ani TNF ani LT α (Crowe a kol., Science 264: 707-710, 1994). mRNA pre LT β -R sa našla v ľudskej slezine, brzlíku i v ďalších orgánoch spojených s imunitou. Hoci výskum expresie LT β -R je iba v počiatočnej fáze, profil expresie LT β -R je podobný profilu p55-TNF-R, s tým rozdielom, že LT β -R chýba na T a B bunkách periférnej krvi a na líniiach T a B buniek.

Komplexy povrchových lyfotoxínov (LT) sa charakterizovali v hybridómových T bunkách CD4⁺ (II-23.D7), ktoré exprimujú vysokú hladinu LT (Browning a kol., J. Immunol. 147: 1230-1237, 1991,

Androlewicz a kol., J. Biol. Chem. 267: 2542-2547, 1992).
 Expresia a biologická funkcia $LT\beta$ -R, LT podjednotiek a
 povrchových LT komplexov sa opísala v prehľade Ware, C.F., „The
 ligands and receptors of the lymphotoxin system“, v: Pathways
 for Cytolysis. Current Topics Microbiol. Immunol. Springer-
 Verlag, str. 175-218, 1995, ktorý je zahrnutý vo forme odkazu.

Expresia $LT\alpha$ sa indukuje a $LT\alpha$ sa primárne secernuje
 aktivovanými T a B lymfocytmi a cytotoxickými „zabíjačskými“
 bunkami (NK, „natural killer“). $LT\alpha$ sa produkuje v rámci
 pomocných T buniek podskupinou Th1, ale v žiadnom prípade nie
 podskupinou Th2 buniek. $LT\alpha$ sa taktiež našiel v melanocytoch.
 Mikroglie a T bunky v léziách pacientov so sklerózou multiplex
 reagujú pozitívne s antisérom anti- $LT\alpha$ (Selmaj a kol., J. Clin.
 Invest. 87, 949-954, 1991).

Lymfotoxín β (nazývaný taktiež p33) sa exprimuje na povrchu
 myších i ľudských T lymfocytov, línii T buniek, línii B buniek a
 „zabíjačských“ buniek aktivovaných lymfokínom (LAK). $LT\beta$ je
 predmetom súčasne prejednávaných patentových prihlášok rovnakých
 autorov, a síce PCT/US91/04588, publikované 9. januára 1992 ako
 dokument WO 92/00329, a PCT/US93/11669, publikované 23. júna
 1994 ako WO 94/13808, ktoré sú zahrnuté vo forme odkazu.

Povrchové LT komplexy sa exprimujú primárne aktivovanými T
 lymfocytmi (pomocnými, Th1 i zabíjačskými bunkami) a B
 lymfocytmi a zabíjačskými bunkami, ako sa dá ukázať analýzou
 pomocou FACS alebo imunohistologickou analýzou pomocou
 protilátok anti-LT alebo rozpustných fúzných proteínov $LT\beta$ -R-Fc.
 V prejednáwanej prihláške rovnakého autora US 08/505 606 podanej
 21. júla 1995 sa opísali prípravky a spôsoby používajúce
 rozpustné $LT\beta$ receptory a protilátky špecifické proti $LT\beta$
 receptoru a ligandu ako liečivo na liečenie imunitných chorôb
 sprostredkovaných Th1 bunkami. Povrchové LT sa taktiež našli na
 klonoch ľudských cytotoxických T lymfocytov (CTL),
 v aktivovaných periférnych mononukleárnych lymfocytoch (PML),
 lymfocytoch periférnej krvi aktivovaných IL-2 (LAK), periférnych

B lymfocytoch aktivovaných buď mitogénom z *Phytolacca americana* alebo anti-CD40 (PBL), a na rôznych T a B bunkách pochádzajúcich z lymfoidných nádorov. Zapojenie cieľových buniek nesúcich aloantigén špecificky indukuje expresiu povrchových LT u klonov CD4⁺ a CD8⁺ CTL.

Autori vynálezu opísali niekoľko imunologických funkcií povrchového LT a ukázal sa vplyv LT α / β väzobného činidla na vyvolanie a charakter imunoglobulínovej odpovede, udržiavanie bunkovej organizácie sekundárneho lymfatického tkaniva vrátane účinku na diferenciačný stav folikulárných dendritických buniek a vytváranie germinálnych centier, a taktiež na úroveň exprese adresínov, ktorá ovplyvňuje bunkový transport. Autor tak definoval terapeutické využitie väzobných činidiel povrchových LT α / β a LT α receptorov.

Štúdie ukázali, že B bunky sú aktivované v lymfatických uzlinách (LN) a v slezine po stretnutí s rôznymi antigénmi. V špecializovaných štruktúrach LN a sleziny, ktoré sa nazývajú germinálne centrá, kde sa tvoria oblasti bohaté na B bunky, B bunky dozrievajú a tvoria sa pamäťové B bunky (¹). B bunky sú schopné nádorovej transformácie počas väčšiny svojho vývinu (²). Transformácia B buniek vedie k lymfómom, a lymfómy pochádzajúce z B buniek germinálnych centier sa nazývajú folikulárne lymfómy. Presné vymedzenie rôznych druhov lymfómov sa stále vykonáva a spresňuje, pretože sa nachádza stále viac povrchových markerov, ktoré umožňujú presnejšie stanovenie pôvodu buniek. Folikulárne lymfómy je možné rozdeliť do mnohých podskupín na základe štádia alebo typu B buniek, ktoré sa delia, a taktiež prognóza sa veľmi líši v závislosti od typu buniek. Konvenčné chemoterapeutické režimy sú schopné pomôcť a liečiť pacientov s bunkami nízkeho stupňa. Napriek tomu sú niektorí z týchto pacientov rezistentní k chemoterapii a majú zlú prognózu.

Napriek pokrokom v liečení nádorov stále pretrváva potreba nových prístupov v liečení nádorov, najmä rezistentných k chemoterapii a taktiež potreba nových liečebných režimov

s menšími vedľajšími účinkami, než majú súčasné terapie.

Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu je použitie zlúčeniny, ktorá inhibuje interakciu $LT\beta$ s receptorom, na výrobu lieku na liečbu nádorov. Predkladaný vynález poskytuje prípravky na liečbu nádorov ako sú folikulárne lymfómy. Tieto nové lieky majú značné výhody v porovnaní s doteraz známymi liekmi a ponúkajú možnosť alternatívnej terapie v prípade nádorov rezistentných k súčasnej chemoterapii.

Výhodné uskutočnenie predkladaného vynálezu sa týka liečenia subjektu, ktorý trpí folikulárnym lymfómom, keď sa subjektu podáva účinné množstvo prípravku, ktorý blokuje interakciu heteroméru $LT\alpha/\beta$ s receptorom. Podľa výhodných uskutočnení vynálezu prípravky obsahujú, pričom výpočet nie je obmedzujúci, rozpustné receptory lymfotoxínu β , protilátky namierené proti $LT\beta$ receptorom a protilátky namierené proti povrchovým LT ligandom. Výhodnejšími sú rozpustné receptory lymfotoxínu β , ktoré majú väzobnú doménu ligandu, ktorá môže selektívne viazať povrchový LT ligand, ako je napr. rozpustná forma $LT\beta$ -R fuzovaná s Fc doménou humánneho imunoglobulínu. Okrem toho k výhodným prípravkom patria monoklonálne protilátky, ktoré sú namierené proti $LT\beta$ receptorom, vrátane humanizovaných a chimérických protilátok alebo i inak modifikovaných protilátok.

V inom uskutočnení sa predkladaný vynález týka liečenia subjektu trpiaceho folikulárnym lymfómom, pri ktorom sa podáva blokujúce činidlo dovtedy, pokiaľ nedôjde k regresii alebo zastaveniu rastu nádorov. Činidlá blokujúce LT dráhu sa môžu podávať v kombinácii s inými činidlami, ktoré sú užitočné pri liečení nádorov, ako sú napr. chemoterapeutiká. Okrem toho je možné podávať prípravky podľa predkladaného vynálezu spoločne s ožarovaním alebo transplantáciou kostnej drene.

V ešte ďalšom uskutočnení predkladaného vynálezu sa činidlo

blokujúce LT β -R podáva spoločne s činidlom blokujúcim dráhu iných členov rodiny TNF. Napr. činidlo blokujúce TNF sa môže podávať súčasne alebo striedavo s činidlom podľa predkladaného vynálezu.

Podrobný opis vynálezu

V tejto časti sa vynález opisuje ešte podrobnejšie, aby sa mohol úplne vysvetliť a pochopiť, a sú tu definované použité pojmy.

Pojem „imunoglobulínová odpoveď“ alebo „humorálna odpoveď“ sa v tomto texte používa na označenie imunitnej odpovede zvierata na cudzorodý antigén, pri ktorej zviera produkuje protilátky proti uvedenému antigénu. Trieda Th2 pomocných T buniek je dôležitá na produkciu protilátok s vysokou afinitou.

Pojem „zárodočné centrum“ (alebo „germinálne centrum“) označuje folikul B buniek, ktoré sa vytvárajú po imunizácii antigénom. Objavenie sa takéhoto histologického miesta súvisí s optimálnym vytváraním pamäti, prepínaním izotypov, somatickou hypermutáciou a teda afinitným zretím imunitnej odpovede.

Pojem „marginálna zóna“ alebo „oblasť typu marginálnej zóny“ sa týka histologicky popísaného kompartmentu sekundárneho lymfatického tkaniva obsahujúceho predovšetkým makrofágy marginálnej zóny (MZM), metalofilné makrofágy (MM), B bunky marginálnej zóny a retikulocyty, a taktiež T bunky a dendritické bunky. Vyústenie arteriálneho krvného riečišťa do oblastí marginálnych sínusov umožňuje priamy prístup antigénu k bunkám a podporuje bunkové reakcie na antigén v týchto miestach.

Pojem „pomocná T bunka (Th bunka)“ označuje funkčnú podtriedu T buniek, ktoré pomáhajú generovať cytotoxické T bunky, a ktoré spolupracujú s B bunkami a stimulujú tak tvorbu protilátok. Pomocné T bunky rozpoznávajú antigén v spojení s molekulami MHC II. triedy a poskytujú kontaktne závislé a kontaktne nezávislé (cytokíny) signály pre efektorové bunky.

Pojem „doména Fc“ protilátky označuje časť molekuly obsahujúcu kĺbovú oblasť, doménu CH2 a CH3, ale neobsahuje miesto viažuce antigén. Pojem sa taktiež používa na označenie zodpovedajúcej oblasti IgM alebo protilátky iného izotypu.

Pojem „protilátka anti-LT- β -receptor“ popisuje akúkoľvek protilátku, ktorá sa špecificky viaže k aspoň jednému epitopu na receptore LT β .

Pojem „protilátka anti-LT“ popisuje akúkoľvek protilátku, ktorá sa špecificky viaže k aspoň jednému epitopu na LT α , LT β , alebo na komplexe LT α/β .

Pojem „signálna dráha LT β -R“ („signalizácia LT β -R“) označuje molekulovú reakciu spojenú s celou metabolickou cestou prenosu signálu LT β -R a ďalšie molekulové reakcie, ktoré k nej vedú.

Pojem „činidlo blokujúce LT β -R“ označuje také činidlo, ktoré naruší väzbu ligandu na LT β -R, zhlukovanie LT β -R na bunkovom povrchu alebo signalizáciu LT β -R, alebo ktoré spôsobia zmenu v tom, ako sa signál dráhy LT β -R interpretuje v bunke. Činidlo blokujúce LT β -R, ktoré pôsobí v kroku väzby ligand-receptor, inhibuje väzbu LT ligandu na LT β -R aspoň o 20%. Príklady činidla blokujúceho LT β -R zahrnujú rozpustné molekuly LT β -R-Fc a protilátky anti-LT α , anti-LT β , anti-LT α/β a anti-LT β -R. Je výhodné, ak protilátky nereagujú krížovo so secernovanou formou LT α .

Pojem „biologická aktivita LT β -R“ znamená 1) schopnosť molekuly LT- β -R alebo jej derivátov súťažiť o rozpustný alebo povrchový LT ligand viažuci sa k rozpustnej alebo k povrchovej molekule LT- β -R, alebo 2) natívnu aktivitu LT- β ako je schopnosť stimulovať regulačnú imunitnú odpoveď alebo všeobecne cytotoxickú aktivitu.

Pojem „LT ligand“ znamená heteromerický komplex LT α/β alebo jeho derivát, ktorý sa špecificky viaže na receptor LT β .

Pojem „väzobná doména LT β -R ligandu“ popisuje časť alebo

časti $LT\beta$ -R, ktoré sa zúčastňujú špecifického rozpoznania a interakcie s ligandom LT.

Pojmy „povrchový LT“ a „povrchový LT komplex“ označujú komplex, skladajúci sa z podjednotky $LT\alpha$ a podjednotky $LT\beta$ viazanej na membránu, vrátane mutovaných, pozmenených a chimerických foriem jednej alebo viacerých podjednotiek, pričom je tento komplex prezentovaný na povrchu bunky. „Povrchový ligand LT“ znamená povrchový LT komplex alebo jeho derivát, ktorý sa špecificky viaže na receptor $LT\beta$.

Pojem „subjekt“ tu znamená zviera alebo jednu či niekoľko buniek pochádzajúcich zo zvieraťa. Je výhodné, ak je zvieraťom cicavec. Bunky sú v akejkoľvek forme, vrátane, ale nie výlučne, buniek nachádzajúcich sa v tkanive, zhlukov buniek, imortalizovaných, transfekovaných alebo transformovaných buniek, a taktiež buniek pochádzajúcich zo zvieraťa, ktoré bolo fyzikálne alebo fenotypovo zmenené.

Ako sa už spomínalo, transformácia B buniek vedie k vzniku lymfómov a transformácia B buniek pochádzajúcich z germinálnych centier, špecializovaných štruktúr vyskytujúcich sa v lymfatických uzlinách a v slezine v oblastiach bohatých na B bunky, vedie k vzniku lymfómov nazývaných folikulárne lymfómy. Germinálne centrá B buniek vyžadujú špecifické prostredie na dozrievanie a proliferáciu, a folikulárne dendritické bunky poskytujú tak antigén, ako i väčšinou špecifické signály pre B bunky germinálnych centier, ktoré spúšťajú dozrievanie, prežívanie a proliferáciu buniek. Štúdie na SJL myšiach, ktoré spontánne vytvárajú sarkómy retikulárnych buniek (RCS, pôvodný názov tohto typu nádorov) poskytli transplantovateľné bunkové línie a taktiež *in vitro* línie buniek RCS (CRCS), ktoré sú vhodné ako model na skúmanie interakcie medzi hostiteľom a nádorom (^{3,4}). Tieto RCS vznikajú často v LN SJL myší, sú heterogénne a obsahujú rôzne typy hematopoetických buniek. Významné dôkazy poukazujú na to, že tieto lymfómy pochádzajú z germinálnych centier a na svoje prežívanie a proliferáciu

vyžadujú rôzne signály alebo faktory poskytované hostiteľom (^{5,6}). Možnosť meniť tieto signály nutné k prežívaniu poskytuje prostriedok ako kontrolovať rast týchto nádorov.

Jeden typ buniek, ktoré sa nazývajú folikulárne dendritické bunky (FDC), má rozhodujúci význam na vytváranie a funkciu germinálnych centier. Predpokladá sa, že na prežívaní a udržiavaní germinálnych centier B buniek sa podieľajú mnohé faktory. Najmä členovia rodiny TNF cytokínov, ktoré sú signálnymi ligandami na bunkovom povrchu, sa na tom podieľajú tak zo strany B buniek, napr. CD40, ako aj zo strany FDC, napr. receptory TNF a lymfotoxínu (LT). Myši s deficienciou LT alebo TNF osou majú taktiež defektný FDC a preto im chýbajú germinálne centrá (⁷). TNF os je dôležitá na vývoj FDC, hoci zrejme existujú i „downstream“ funkcie. LT os sa zdá byť dôležitejšia na udržiavanie FDC vo funkčnom stave. Systém LT zahrnuje signalizáciu z rôznych lymfocytov pozitívnych k ligandom na bunky pozitívne k receptorom, ktoré sú pravdepodobne derivátmi iných buniek než buniek kostnej drene, napr. derivátmi FDC, aby sa FDC udržali v plne funkčnom stave. Autor vynálezu zistil, že zablokovanie tejto signálnej dráhy, buďto napr. protilátkami k LT ligandom alebo rozpustným fúznym proteínom receptor-imunoglobulín, vedie k strate zrelých FDC (Mackay a Browning, 1998, Nature, V.395, 26-27). Okrem toho inhibícia LT dráhy vedie k strate tvorby germinálnych centier a k určitej dezorganizácii sleziny (⁸).

Autor predkladaného vynálezu po prvýkrát publikoval v tejto prihláške, že inhibítory LT dráhy rušia interakciu medzi B bunkami folikulárneho lymfómu a ich okolím, t.j. FDC, a vedú k spomaleniu alebo zastaveniu rastu nádorov. Preto sú takéto inhibítory užitočné pri liečení týchto úporných nádorov v primárnej terapii alebo k doplneniu konvenčnej chemoterapie. Špecificky, hoci bola v danej oblasti známa domnienka, že aktivácia LT dráhy by sa mohla využiť v nádorovej terapii, autor prekvapivo zistil, že prechodné zablokovanie LT dráhy vedie

k spomaleniu alebo k zastaveniu rastu nádorov, ako sú napr. folikulárne lymfómy.

V širšom zmysle sa predkladaný vynález týka prípravkov na liečenie nádorov alebo lymfómov, konkrétne folikulárneho lymfómu, tým, že sa subjektu podáva účinné množstvo prípravku, ktorý inhibuje LT dráhu. Takýto prípravok môže obsahovať rozpustný $LT\beta$ receptor, fúzny proteín obsahujúci $LT\beta$ -R, protilátky proti $LT\beta$ -R a protilátky proti LT ligandom. Takéto inhibujúce prípravky výhodne obsahujú farmaceuticky prijateľný nosič.

Výhodným subjektom je cicavec, a najvýhodnejším je človek.

Prípravok podľa tohto vynálezu sa podáva subjektu dovtedy, pokiaľ nie je zjavný ústup alebo zastavenie rastu nádorov. Čas liečenia je teda veľmi premenlivý a môže trvať od niekoľkých týždňov po niekoľko mesiacov, v niektorých prípadoch i značne dlhšie. Odborník je schopný určiť, kedy došlo k ústupu alebo k zastaveniu rastu nádorov, a k tomu je možné použiť akúkoľvek metódu známu v danom odbore. Použitie markerov FACS k rozdeleniu B lymfómov sa značne zlepšilo a je možné očakávať, že lymfómy istých subtypov bude možné zvládať terapiou pomocou prípravkov podľa predkladaného vynálezu.

Je pravdepodobné, že na udržiavaní architektúry orgánov imunitného systému sa podieľajú taktiež ďalšie regulačné molekuly imunitného systému, ako sú napr. ostatní členovia rodiny TNF, a preto prispievajú k vytváraniu prostredia vhodného k proliferácii lymfómov. Preto kombinovanie inhibície LT dráhy s ďalšími dráhami môže byť účinným prostriedkom na liečenie niektorých subjektov. Tak napr. je možné užiť inhibítory LT dráhy v kombinácii napr. s činidlom blokujúcim dráhu CD40/ligand CD40. Môže to byť akékoľvek činidlo blokujúce túto dráhu, teda napr. protilátky, rozpustné ligandy alebo receptory. Je výhodné podávať protilátky proti ligandu CD40 v kombinácii s inhibítormi LT dráhy. Pokiaľ sa podáva viac než jedno činidlo

blokujúce dráhu členov TNF rodiny, prípravky je možné podávať v podstate súčasne, alebo striedavo, jedno činidlo po druhom. Odborník ľahko určí najúčinnnejší spôsob na liečenie konkrétneho pacienta v závislosti od nádoru, aký sa lieči a od stavu pacienta.

Konvenčné chemoterapeutické protokoly sa môžu použiť k eliminácii zvyškov nádoru po liečení prípravkami podľa predkladaného vynálezu, alebo je ich možné v niektorých prípadoch použiť súčasne alebo taktiež pred prípravkami podľa tohto vynálezu. Inhibítory LT dráhy je možné užiť na zastavenie rastu lymfómov pred tým, než sa započne s konvenčným chemoterapeutickým režimom. Je pravdepodobné, že strata signálov podporujúcich rast a/alebo prežívanie spôsobí, že lymfóm sa stane citlivejším k chemoterapeutickým činidlám, a preto je výhodné podávať inhibítory LT dráhy pred podávaním tradičných chemoterapeutických činidiel.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Liečenie nádorov SJL RCS inhibítormi LT dráhy redukuje LN/veľkosť nádorov

Myši SJL sa liečili buď 3 dni pred transplantáciou nádorov (D-3), alebo v čase transplantácie (D0) alebo 3 dni po transplantácii (D3) podaním 0,3 až 0,4 mg fúzneho proteínu myši LTBR-hIgG1 intraperitoneálnym spôsobom. Transplantácia nádorov sa vykonala v podstate tak, ako sa to popísalo v (⁹). 5×10^6 RCS buniek zbavených T buniek sa podalo i.v. a ponechali sa, aby sa usadili v orgánoch a začali rásť. Po 5 až 7 dňoch sa odstránili mezenteriálne, brachiálne a axilárne LN a stanovila sa ich hmotnosť a vyjadrila sa ako percento celkovej telesnej hmotnosti. Tabuľka 1 ukazuje, že veľkosť uzlín sa znížila vo všetkých pokusoch. Veľkosť sleziny sa taktiež znížila v jednom z 3 pokusov, ale toto zníženie nebolo veľké. Zníženie hmotnosti LN bolo približne 50% pri jedinom podaní a 80 až 90% pri

niekoľkonásobnom podaní.

V inom uskutočnení vynálezu je potrebné podávať inhibítory LT dráhy súčasne s radiačnou terapiou, alebo buď pred alebo po tejto terapii. Odborníkovi je pritom zrejmé, že výhodná terapia je založená na posúdení individuálnych charakteristík, ako je stav pacienta a typ nádoru, ktorý sa lieči.

Inhibujúce protilátky anti-LT β -R a iné činidlá blokujúce LT β -R je možné identifikovať spôsobom, ktorý sa popísal už predtým (v súčasne prejednáwanej prihláške USA č. 08/378 968).

Tabuľka 1

Inhibičný účinok LTBR-Ig na rast RCS u normálnych SJL myši

Injekčné podanie myši (deň:dávka v mg)	Hmotnosť LN ^a (n)	p	Hmotnosť sleziny	p
Experiment 1				
kontrolné huIgG (usmrtené D5)	2,70±0,37 (7)		3,18±0,37 (7)	
mLT β R-Ig ^c (D0, +3:0,4, 0,3)	1,42±0,15 (4)	<0,001	3,29±0,18 (4)	NS ^b
Experiment 2				
kontrolné huIgG (usmrtené D7)	3,35±0,21 (3)		4,04±0,34 (3)	
mLT β R-Ig (D0, +3:0,3, 0,2)	2,37±0,24 (4)	0,0024	3,04±0,19 (4)	0,004 ↓
Experiment 3				
kontrolné huIgG (usmrtené D6)	2,34±0,11 (5)		2,93±0,57 (5)	
mLT β R-Ig (D-3:0,4)	1,10±0,38 (3)	0,0024	2,27±1,39 (3)	NS
mLT β R-Ig (D-3,0:0,4, 0,3)	0,78±0,02 (3)	<0,000 1	3,95±0,53 (3)	0,046 ↑
mLT β R-Ig (D0:0,3)	0,92±0,10 (3)	<0,000 1	3,25±0,1 (3)	NS

^a Hmotnosť orgánu je vyjadrená v percentách celkovej telesnej hmotnosti. Hmotnosť LN bez liečenia je typicky 0,5% telesnej hmotnosti.

^b NS = nie je významný

^c mLT β R-Ig je fúzny proteín extracelulárnej domény LT β R a úsekov CH2 a CH3 hIgG1

Činidlo blokujúce LT β -R podľa jedného uskutočnenia tohto vynálezu obsahuje rozpustnú molekulu LT β receptoru. Sekvencia extracelulárneho úseku ľudského LT- β -R, ktorá je tu uvedená ako sekvencia id. č. 1, kóduje doménu viažucu ligand. Na základe poznania sekvencie id. č. 1 a pomocou využitia postupov rekombinantnej DNA, ktoré sú v danom odbore dobre známe, je možné klonovať funkčný fragment domény viažucej ligand do vektoru a potom ho exprimovať vo vhodnej hostiteľskej bunke, a tak pripraviť rozpustnú molekulu LT β -R.

Rozpustné LT β receptory obsahujúce sekvenciu aminokyselín uvedenú v sekvencii id. č. 1 sa môžu pripojiť k jednej alebo viacerým heterológnym proteínovým doménam („fúzna doména“), aby sa zvýšila *in vivo* stabilita receptorového fúzneho proteínu, alebo aby sa modulovala jeho biologická aktivita alebo lokalizácia.

Výhodne sa na vytvorenie receptorových fúznych proteínov použijú stabilné plazmatické proteíny, ktoré majú typicky polčas obehu väčší než 20 hodín. Takéto plazmatické proteíny sú napr. (ale výpočet nie je obmedzujúci) imunoglobulíny, sérový albumín, lipoproteíny, apolipoproteíny a transferín. Sekvencie, ktoré nasmerujú rozpustnú LT β -R molekulu do určitého bunkového alebo tkanivového typu, sa môžu taktiež pripojiť k doméne viažucej ligand, aby sa vytvoril špecificky lokalizovaný rozpustný fúzny proteín LT β -R.

Buď celý, alebo funkčný úsek z extracelulárnej oblasti LT β -R obsahujúci doménu viažucu ligand, sa môže fúzovať s konštantným úsekom imunoglobulínu, napr. s Fc doménou ťažkého reťazca

ľudského IgG1 (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Rozpusťné fúzne proteíny receptor-IgG sú výhodné, sú všeobecne používaným imunologickým reagens a spôsoby ich prípravy sú v odbore dobre známe (pozri napr. patent USA č. 5 225 538, ktorý je zahrnutý vo forme odkazu).

Funkčná doména viažuca ligand $LT\beta$ -R sa môže fúzovať s Fc doménou imunoglobulínu (Ig) odvodeného z imunoglobulínu inej triedy či podtriedy než IgG1. Fc domény protilátok patriacich do odlišných tried alebo podtried môžu aktivovať odlišné druhotné efektorové funkcie. K aktivácii dôjde, keď sa Fc doména naviaže na vhodný receptor. Druhotné efektorové funkcie zahŕňujú napr. schopnosť aktivovať komplement, krížovo reagovať s placentou alebo viazať rôzne proteíny mikroorganizmov.

Pokiaľ by bolo výhodné poškodiť alebo usmrtiť cieľové bunky nesúce LT ligand, je možné vybrať obzvlášť aktívnu Fc doménu (IgG1) pre fúzny receptorový proteín. Pokiaľ by bolo žiaduce zacieliť fúzny proteín $LT\beta$ - β -Fc na bunku, bez toho, aby sa aktivoval komplement, vyberie sa neaktívna Fc doména IgG4.

Popísali sa mutácie v Fc doméne, ktoré redukujú alebo úplne eliminujú väzbu na Fc receptor a aktiváciu komplementu (Morrison, S., Annu. Rev. Immunol. 10: 239-265, 1992). Tieto mutácie, či už samotné alebo v kombinácii, je možné využiť na optimalizáciu aktivity Fc domén použitých na vytvorenie fúzneho proteínu $LT\beta$ -R-Fc.

Rôzne aminokyselinové zvyšky tvoriace spojovací bod vo fúznom proteíne receptor-Ig ovplyvňujú štruktúru, stabilitu a teda aj konečnú biologickú aktivitu rozpustného $LT\beta$ receptorového fúzneho proteínu. Jedna alebo viac aminokyselín sa môže pridať k C-koncu vybraného fragmentu $LT\beta$ -R, a tak je možné modifikovať spojovací bod vo vybranej fúznej doméne.

Taktiež N-koniec fúzneho proteínu $LT\beta$ -R sa môže pozmeniť tým, že sa mení poloha, v ktorej sa vybraný DNA fragment $LT\beta$ -R štiepi na svojom 5'-konci, aby sa mohol vložiť do

rekombinantného expresného vektora. Stabilita a aktivita každého fúzneho proteínu $LT\beta$ -R sa testuje a optimalizuje pomocou rutinných testov a taktiež pomocou testu na výber činidla blokujúceho $LT\beta$ -R, tak ako sa to popísalo v tejto prihláške.

Na základe sekvencie $LT\beta$ -R domény viažucej ligand vnútri extracelulárnej domény je možné vytvárať rôzne sekvenčné varianty, aby sa modifikovala afinita rozpustného LT - β receptoru alebo fúzneho proteínu pre LT ligand. Rozpustné molekuly $LT\beta$ -R podľa tohto vynálezu môžu súťažiť o naviazanie povrchového LT ligandu s endogénnymi receptormi $LT\beta$ -R na povrchu buniek. Dá sa predpokladať, že akákoľvek rozpustná molekula, ktorá obsahuje ligand viažuci $LT\beta$ -R doménu, a ktorá súťaží s povrchovými bunkovými receptormi $LT\beta$ o naviazanie LT ligandu, je blokujúcim činidlom v zmysle predkladaného vynálezu.

V inom uskutočnení tohto vynálezu protilátky namierené proti ľudskému $LT\beta$ receptoru (protilátka anti- $LT\beta$ -R) pôsobia ako činidlo blokujúce $LT\beta$ -R. Protilátky anti- $LT\beta$ -R podľa predkladaného vynálezu sú buďto polyklonálnymi alebo monoklonálnymi protilátkami a je možné ich modifikovať tak, aby sa dosiahla optimálna schopnosť blokovania signálnej dráhy $LT\beta$ -R, ich *in vivo* biologická dostupnosť, stabilita alebo iné potrebné znaky.

Polyklonálne protilátkové sérum proti ľudskému $LT\beta$ receptoru sa pripraví konvenčným spôsobom tak, že sa zvieraťu, ako je napr. koza, králik, potkan, škrečok alebo myš, subkutánne injekčne podá ľudský fúzny proteín „ $LT\beta$ receptor-Ig” (pozri príklad 1) v kompletnom Freundovom adjuvans, a potom nasleduje druhá (spúšťacia) intraperitoneálna alebo subkutánna injekcia s neúplným Freundovým adjuvans. Polyklonálne sérum obsahujúce požadované protilátky sa testuje obvyklým imunochemickým spôsobom.

Myšie monoklonálne protilátky proti ľudskému fúznemu proteínu $LT\beta$ receptor-Fc sa pripravia tak, ako sa to popísalo v

príklade 5 (USA prihláška autora č. 08/505 606). Hybridómová bunková línia BD.A8.AB9, ktorá produkuje myšiu monoklonálnu protilátku BDA8 namierenú proti ľudskému LT β -R sa uložila v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v súlade s Budapeštianskou dohodou zo dňa 12. januára 1995 pod prístupovým číslom CRL11964. Všetky obmedzenia dostupnosti pre verejnosť takto uloženej vzorky sa zrušia, akonáhle sa udelí patent.

Štandardnými technikami rekombinantnej DNA (Winter a Milstein, Nature 349: 293-299, 1991) sa môžu pripraviť rôzne formy anti-LT β -R protilátok. Napríklad je možné vytvoriť „chimérické“ protilátky, v ktorých sú domény viažuce antigén zo zvieracej protilátky spojené s ľudskou konštantnou doménou (Cabilly a kol., US 4 816 567, Morrison a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851-6855, 1984). Pri klinickom použití sa pozorovalo, že chimérické protilátky redukujú imunitnú reakciu vyvolanú zvieracími protilátkami použitými u človeka.

Okrem toho sa môžu syntetizovať aj rekombinantné „humanizované protilátky“ rozpoznávajúce LT β -R. Humanizované protilátky sú chimérické molekuly obsahujúce väčšinou sekvencie ľudského IgG, do ktorých sa vložili úseky, zodpovedajúce za špecifickú väzbu s antigénom (napr. WO 94/04679). Zvieratá sa imunizujú požadovaným antigénom, zodpovedajúca protilátka sa potom izoluje a odstráni sa variabilný úsek zodpovedný za špecifickú väzbu s antigénom. Úsek, odvodený zo živočíšnej molekuly, zodpovedný za špecifickú väzbu s antigénom, sa potom klonuje do vhodného miesta v géne ľudskej protilátky, z ktorého sa odstránila oblasť špecificky viažuca antigén. Humanizované protilátky minimalizujú použitie heterológnych (medzidruhových) sekvencií v ľudských protilátkach, a preto s oveľa menšou pravdepodobnosťou vyvolávajú nežiaducu imunitnú odpoveď ošetrovaného.

Rôzne triedy rekombinantných protilátok proti LT β -R sa môžu skonštruovať ako chimérické alebo humanizované protilátky

obsahujúce variabilné domény protilátok anti-LT β -R a ľudských konštantných domén (CH1, CH2, CH3) izolovaných z rôznych tried imunoglobulínov. Tak napr. protilátky anti-LT β -R-IgM so zvýšenou valenciou miest viažucich antigén je možné pripraviť metódami rekombinantnej DNA tak, že sa klonuje miesto viažuce antigén do vektoru, ktorý obsahuje konštantnú oblasť ľudského T-reťazca (Arulanandam a kol., J. Exp. Med. 177: 1439-1450, 1993, Lane a kol., Eur. J. Immunol. 22: 2573-78, 1993, Traunecker a kol., Nature 339: 68-70, 1989).

Okrem toho sa môžu použiť štandardné techniky rekombinantnej DNA, aby sa zmenila afinita väzby rekombinantných protilátok s antigénom, a to tým, že sa zmenia aminokyseliny susediace s väzobným miestom. Afinitu k antigénu u humanizovaných protilátok je možné zvýšiť mutagénou založenou na molekulovom modelovaní (Queen a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033, 1989, WO 94/04679).

Môže byť taktiež potrebné zvýšiť alebo znížiť afinitu protilátok anti-LT β -R k LT β -R podľa typu cieľového tkaniva alebo v závislosti na predpokladanom liečebnom postupe. Tak napr. z profylaktických dôvodov môže byť výhodné ošetrovať pacienta tak, že sa použije konštantná hladina anti-LT β -R so zníženou schopnosťou prenášať signál v signálnej dráhe LT β -R. Inhibičné anti-LT β -R so zvýšenou afinitou k LT β -R môžu byť zase výhodné na krátkodobé ošetrovanie.

Protilátky anti-LT β -R ako činidlo blokujúce LT β -R

Protilátky anti-LT β -R, ktoré pôsobia ako činidlo blokujúce LT β -R, sa môžu selektovať testovaním ich schopnosti inhibovať LT β -R indukovanú cytotoxicitu proti nádorovým bunkám. Testovaním iných protilátok namierených proti ľudskému LT β receptoru rutinnými metódami alebo testmi, ktoré sa tu popísali, je možné identifikovať ďalšie anti-LT β -R protilátky, ktoré pôsobia ako činidlo blokujúce LT β -R u človeka.

K ďalšiemu výhodnému uskutočneniu predkladaného vynálezu

patria prípravky, ktoré obsahujú protilátky namierené proti LT ligandu, ktoré pôsobia ako činidlo blokujúce $LT\beta$ -R. Ako sa už opísalo pre protilátky anti- $LT\beta$ -R, protilátky anti-LT ligand, ktoré pôsobia ako činidlo blokujúce $LT\beta$ -R, môžu byť tak monoklonálne ako aj polyklonálne protilátky a môžu byť rutinnými postupmi modifikované tak, aby sa modulovali ich väzobné vlastnosti pre antigén a ich imunogenicitu.

Protilátky anti-LT podľa predkladaného vynálezu môžu byť namierené individuálne proti jednej z dvoch podjednotiek LT, a to vrátane rozpustných, mutovaných, zmenených alebo chimérických foriem LT podjednotiek. V prípade, že sa použijú podjednotky LT, je výhodné, keď sú to $LT\beta$ podjednotky. V prípade, že sa užijú $LT\alpha$ podjednotky, je výhodné, keď sa výsledné anti- $LT\alpha$ protilátky viažu s povrchovým LT ligandom a nereagujú krížovo so secernovanými $LT\alpha$ a ani nemodulujú aktivitu TNF-R.

Alternatívne sa môžu pripraviť protilátky namierené proti homomerickému ($LT\beta$) alebo heteromerickému ($LT\alpha/\beta$) komplexom, zloženým z jednej alebo viacerých LT podjednotiek, a potom sa testuje aktivita blokujúca $LT\beta$ -R. Ako antigén je výhodné použiť komplex $LT\alpha 1/\beta 2$. Ako sa už uviedlo, je výhodné, keď sa výsledné anti- $LT\alpha 1/\beta 2$ protilátky viažu s povrchovým LT ligandom a nereagujú krížovo so secernovanými $LT\alpha$ ani nemodulujú aktivitu TNF-R.

Produkcia polyklonálnych proti-ludských protilátok $LT\alpha$ sa opisuje v už podanej patentovej prihláške autora WO 94/13808. Taktiež sa publikovali monoklonálne protilátky anti- $LT\alpha$ a anti- $LT\beta$ (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995).

Prípravky podľa vynálezu

Prípravky podľa vynálezu obsahujú akékoľvek zlúčeniny, ktoré blokujú interakciu $LT\beta$ s receptorom $LT\beta$ a preto inhibujú signálnu dráhu LT. K zlúčeninám anti-LT patria tak polyklonálne protilátky ako aj monoklonálne protilátky (mAb), a taktiež deriváty protilátok, ako sú chimerické molekuly, humanizované

molekuly, molekuly s redukovanou efektorovou funkciou, dvojšpecifické molekuly a konjugáty protilátok.

Predkladaný vynález zahrnuje i molekuly anti-LT β a anti-LT β receptor iných typov, ako sú úplné protilátkové fragmenty Fab, F(ab')² fragmenty, úseky V^H alebo úseky F^v, jednoreťazcové protilátky (pozri napr. WO 96/23071), polypeptidy, fúzne konštrukty polypeptidov, fúzie LT β receptora, malé molekuly ako napr. malé semi-peptidové zlúčeniny alebo zlúčeniny iné než peptidy, ktoré sú schopné blokovať LT dráhu.

Rôzne formy protilátok je možné pripraviť štandardnými technikami rekombinantnej DNA (Winter a Milstein, Nature 349: 293-299, 1991). Napr. je možné skonštruovať také chimérické protilátky, kde väzobná doména pre antigén z protilátky zvieraťa je spojená s ľudskou konštantnou doménou (Cabilly a kol., patentová prihláška USA č. 4 816 567). Chimérické protilátky redukujú pozorovanú imunitnú odpoveď vyvolanú zvieracími protilátkami, keď sa použijú v klinických aplikáciách pre humánnych pacientov.

Okrem toho sa môžu syntetizovať rekombinantné „humanizované“ protilátky. Takéto humanizované protilátky sú protilátky, pôvodne získané z cicavca iného než z človeka, kde sa metódy génového inžinierstva využili na nahradenie niektorých alebo všetkých aminokyselín, ktoré nie sú nutné pre väzbu antigénu aminokyselinami zo zodpovedajúcich úsekov ľahkého alebo ťažkého reťazca ľudského imunoglobulínu (chiméry obsahujú hlavne sekvencie IgG, do ktorých sa vložili úseky zodpovedné za špecifickú väzbu antigénu, pozri napr. medzinárodná patentová prihláška WO 94/04679). Zvieratá sa imunizujú požadovaným antigénom, potom sa izoluje príslušná protilátka a odstráni sa z nej časť variabilného úseku zodpovedná za špecifickú väzbu antigénu. Úsek viažuci antigén zo zvieraťa sa potom klonuje do vhodného miesta génu ľudskej protilátky, z ktorého sa odstránil úsek viažuci antigén. Humanizované protilátky minimalizujú použitie heterológnych (t.j. medzidruhových) sekvencií

v ľudských protilátkach, ktoré potom s menšou pravdepodobnosťou vyvolajú imunitnú odpoveď u liečeného pacienta.

Podľa predkladaného vynálezu sú taktiež užitočné protilátky primátov alebo tzv. „primatizované“ protilátky.

V prípravkoch podľa predkladaného vynálezu sa môžu taktiež použiť fragmenty protilátok alebo univalentné protilátky. Univalentné protilátky obsahujú dimér „ťažký reťazec/lahký reťazec“ viazaný k úseku Fc (tzv. stonku) druhého ťažkého reťazca. Úseky Fab sú také úseky oboch reťazcov, ktoré sú približne zhodné alebo analogické so sekvenciami obsahujúcimi vetviaci sa úsek tvaru Y ťažkého reťazca a celé ľahké reťazce, a ktoré dohromady (ako agregáty) vykazujú protilátkovú aktivitu. Proteín Fab obsahuje agregáty jedného ťažkého a jedného ľahkého reťazca (všeobecne známe ako Fab) a taktiež tetraméry, ktoré zodpovedajú dvojramenným segmentom protilátky tvaru Y (všeobecne známe ako $F(ab)^2$), nech už sú spojené kovalentne alebo nekovalentne, pokiaľ sú agregáty schopné selektívnej reakcie s konkrétnym antigénom alebo rodinou antigénov.

Okrem toho je možné použiť štandardné techniky rekombinantnej DNA na zmenu väzobnej afinity rekombinantných protilátok s ich antigénmi tým, že sa zmenia zvyšky aminokyselín v blízkosti väzobného miesta pre antigén.

Subjekty

Subjekty, pre ktoré je určený prípravok podľa predkladaného vynálezu trpia folikulárnym lymfómom.

Spôsoby podávania

Prípravky podľa predkladaného vynálezu sa môžu podávať akýmkoľvek spôsobom, ktorý je lekárske prijateľný. K takýmto spôsobom podávania patrí injekčné parenterálne podávanie, a to intravenózne, intravaskulárne, intraarteriálne, subkutánne, intramuskulárne, intratumorové, intreperitoneálne, intraventriculárne, intraepidurálne a iné. Vhodné sú taktiež ďalšie spôsoby

ako je perorálny, nazálny, oftalmický, rektálny alebo topický. Liekové formy s protrahovaným uvoľňovaním liečiva sú obzvlášť výhodné, napr. depotné injekcie. Niektoré formy činidiel blokujúcich LT môžu byť vhodné na perorálne podávanie a môžu byť formulované do suspenzií alebo piluliek.

Dávkovanie a frekvencie podávania

Veľkosť dávky a frekvencie dávok konkrétnej zlúčeniny podávanej pacientovi na liečenie určitej choroby posúdi ošetrojúci lekár na základe celého radu faktorov. Všeobecné dávkovanie je stanovené v klinických testoch, ktoré zahŕňujú extenzívne experimenty na stanovenie prospešného účinku a vedľajších nežiaducich účinkov pri rôznych dávkach podaných pacientovi. Ale i keď existuje takéto doporučenie, ošetrojúci lekár často mení takéto dávkovanie na základe úvahy týkajúcej sa pacientovho veku, zdravotného stavu, hmotnosti, pohlavia a prípadnej súčasnej liečby inými prípravkami. Stanovenie optimálnej dávky konkrétneho prípravku blokujúceho LT na liečenie folikulárneho lymfómu je teda v kompetencii odborníka v odbore medicíny a farmácie.

Všeobecne je frekvencia dávok stanovená ošetrojúcim lekárom, a môže ísť o jednotlivú dávku alebo o opakované dávky, buďto denne alebo v intervaloch 2 až 6 dní, týždňa, dvoch týždňov alebo mesiacov.

Pri kombinovanej terapii podľa predkladaného vynálezu sa na liečenie folikulárneho lymfómu užívajú iné prípravky alebo prostriedky zamerané na takýto lymfóm, ako je ožarovanie, chemoterapia a iné spôsoby liečenia známe odborníkom.

Zlúčenina blokujúca LT podľa predkladaného vynálezu sa pacientovi podáva ako farmaceutický prípravok, ktorý obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič. Tento nosič je pre pacienta netoxický a inertný v koncentráciách nutných pre účinok blokujúcej zlúčeniny alebo inej účinnej látky, takže vedľajšie účinky nosiča nijako neoslabujú pôsobenie účinnej látky.

Prípravok môže obsahovať i ďalšie kompatibilné látky, to znamená také zložky, ktoré sú schopné miešania sa so zlúčeninou blokujúcou LT, bez toho, aby došlo k podstatnému zníženiu terapeutickú účinnosti liečiva. Prípravky podľa predkladaného vynálezu vhodné na perorálne podávanie môžu byť v podobe oddelených jednotiek ako sú tobolky, tablety, pilulky, pastilky a papierové sáčky, obsahujúce dopredu stanovené účinné látky v podobe prášku alebo granulátu, alebo ako lipozómy, suspenzie vo vodnej alebo inej kvapaline ako je sirup alebo elixír, emulzia alebo výťažok.

Prípravok podľa predkladaného vynálezu môže byť v nádobke, ktorá zaisťuje sterilitu a ochraňuje aktivitu účinnej látky počas distribúcie a skladovania a súčasne umožňuje pohodlný a účinný spôsob podávania prípravku pacientovi. Zlúčeniny blokujúce LT formulované na injekčné podávanie sa môžu dodávať v uzavretej fľaštičke vhodnej na odobratie obsahu pomocou injekčnej striekačky s ihlou. Takáto fľaštička je buď na jedno alebo na opakované použitie. Prípravok sa môže dodávať taktiež vo forme dopredu naplnenej injekčnej striekačky. V niektorých prípadoch je prípravok formulovaný ako kvapalný, inokedy je v suchom alebo lyofilizovanom stave a vyžaduje rekonštitúciu štandardným alebo súčasne dodávaným riedidlom. Pokiaľ sa prípravok dodáva ako kvapalný prípravok na intravenózne podávanie, môže byť v sterilnom vaku alebo v kontajneri vhodnom na napojenie na súpravu na intravenózne podávanie alebo katéter. V prípade, že sa blokujúca zlúčenina podáva v perorálnej forme ako tablety alebo pilulky, je v sklenenej fľaške/kontajneri s odnímateľným uzáverom. Kontajner je označený údajmi ako je meno zlúčeniny, o ktorú ide, meno výrobcu alebo distributéra, indikácie, dávkovanie a ďalšie inštrukcie na vhodné skladovanie alebo podávanie.

Citovaná literatúra

1. Tsiagbe, V.K., Inghirami, G. & Thorbecke, G.J. The physiology of germinal centers. *Crit Rev Immunol* **16**, 381-421 (1996).
2. Freedman, A.S. & Nadler, L.M. in *Cancer Medicine 3rd Ed.* (ed. Holland, J.F.e.a.) 2028-2068 (Lea&Febiger, London. 1994).
3. Lasky, J.L., Ponzio, N.M. & Thorbecke, G.J. Characterization and growth factor requirements of SJL lymphomas. I. Development of a B cell growth factor-dependent in vitro cell line, cRCS-X [published erratum appears in *J Immunol* 1988 Apr 1;140(7):2478]. *J Immunol* **140**, 679-87 (1988).
4. Lasky, J.L. & Thorbecke, G.J. Characterization and growth factor requirements of SJL lymphomas. II. Interleukin 5 dependence of the in vitro cell line, cRCS-X, and influence of other cytokines. *Eur J Immunol* **19**, 365-71 (1989).
5. Ponzio, N.M., Brown, P.H. & Thorbecke, G.J. Host-tumor Interactions in the SJL lymphoma model. *Intern. Rev. immunol.* **1**, 273-301 (1986).
6. Tsiagbe, V.K., *et al.* Syngeneic response to SJL follicular center B cell lymphoma (reticular cell sarcoma) cells is primarily in V beta 16+ CD4+ T cells. *J Immunol* **150**, 5519-28 (1993).
7. Matsumoto, M., *et al.* Distinct roles of lymphotoxin alpha and the type I tumor necrosis factor (TNF) receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. *J Exp Med* **186**, 1997-2004 (1997).
8. Mackay, F., Majeau, G.R., Lawton, P., Hochman, P.S. & Browning, J.L. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. *Eur J Immunol* **27**, 2033-42 (1997).
9. Katz, I.R., Chapman-Alexander, J., Jacobson, E.B., Lerman, S.P. & Thorbecke, G.J. Growth of SJL/J derived transplantable reticulum cell sarcoma as related to its ability to induce T-cell proliferation in the host. III. Studies on thymectomized and congenitally athymic SJL mice. *Cellular Immunol.* **65**, 84-92 (1981).

Zoznam sekvencií

(2) INFORMÁCIE O SEKVENCII S IDENTIFIKAČNÝM ČÍSLOM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 197 aminokyselín

(B) TYP: aminokyseliny

(C) TYP VLÁKNA:

(D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKUKY: peptid

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEKVENCIA S ID. Č. 1:

Ser	Gln	Pro	Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Tyr	Ala	Ser	Glu	Asn	Gln	Thr	Cys
1			5						10					15	

Arg	Asp	Gln	Glu	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Glu	Pro	Gln	His	Arg	Ile	Cys	Cys
		20						25					30		

Ser	Arg	Cys	Pro	Pro	Gly	Thr	Tyr	Val	Ser	Ala	Lys	Cys	Ser	Arg	Ile
		35					40					45			

Arg	Asp	Thr	Val	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Glu	Asn	Ser	Tyr	Asn	Glu	His
	50					55					60				

Trp	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ile	Cys	Gln	Leu	Cys	Arg	Pro	Cys	Asp	Pro	Val
65				70					75					80	

Met	Gly	Leu	Glu	Glu	Ile	Ala	Pro	Cys	Thr	Ser	Lys	Arg	Lys	Thr	Gln
			85					90					95		

Cys	Arg	Cys	Gln	Pro	Gly	Met	Phe	Cys	Ala	Ala	Trp	Ala	Leu	Glu	Cys
			100					105					110		

Thr	His	Cys	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Cys	Pro	Pro	Gly	Thr	Glu	Ala	Glu
		115						120					125		

Leu Lys Asp Glu Val Gly Lys Gly Asn Asn His Cys Val Pro Cys Lys
 130 135 140

Ala Gly His Phe Gln Asn Thr Ser Ser Pro Ser Ala Arg Cys Gln Pro
 145 150 155 160

His Thr Arg Cys Glu Asn Gln Gly Leu Val Glu Ala Ala Pro Gly Thr
 165 170 175

Ala Gln Ser Asp Thr Thr Cys Lys Asn Pro Leu Glu Pro Leu Pro Pro
 180 185 190

Glu Met Ser Gly Thr
 195

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie zlúčeniny, ktorá inhibuje interakciu medzi $LT\beta$ a jeho receptorom, na výrobu farmaceutického prípravku na zastavenie alebo spomalenie rozvoja, závažnosti alebo vplyvu nádoru, pričom subjektu sa podáva prípravok v účinnom množstve.
2. Použitie podľa nároku 1, pričom nádorom je folikulárny lymfóm.
3. Použitie podľa nároku 2, pričom zlúčenina sa vyberá zo skupiny obsahujúcej rozpustný $LT\beta$ receptor, protilátky anti- $LT\alpha$, protilátky anti- $LT\beta$ a protilátky anti- $LT\beta$ -R.
4. Použitie podľa nároku 3, pričom zlúčeninou je rozpustný $LT\beta$ receptor.
5. Použitie podľa nároku 1, pričom subjektom je cicavec.
6. Použitie podľa nároku 5, pričom subjektom je človek.
7. Použitie podľa nároku 4, pričom rozpustný $LT\beta$ receptor obsahuje doménu viažucu ligand, ktorá sa selektívne viaže k povrchovému LT ligandu.
8. Použitie podľa nároku 7, pričom rozpustný $LT\beta$ receptor obsahuje FC doménu ľudského imunoglobulínu.
9. Použitie podľa nároku 3, pričom prípravok obsahuje monoklonálnu protilátku namierenú proti $LT\beta$ receptoru.

10. Použitie podľa nároku 9, pričom monoklonálnou protilátkou je humanizovaná alebo chimérická protilátka.

11. Farmaceutický prípravok na liečenie subjektu trpiaceho folikulárnym lymfómom, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje zlúčeninu, ktorá blokuje interakciu $LT\beta$ s jeho receptorom.

12. Použitie podľa nároku 1, pričom subjektu sa podáva aspoň jeden chemoterapeutický prípravok.

13. Použitie podľa nároku 1, pričom subjektu sa podáva inhibítor ďalšej TNF signálnej dráhy.

14. Použitie podľa nároku 13, pričom sa podáva prípravok inhibujúci dráhu CD40/CD40 ligand.

15. Použitie podľa nároku 14, pričom sa podáva protilátka anti-CD40 ligand.

16. Použitie podľa nároku 1, pričom subjekt je liečený ožarovaním.

17. Použitie podľa nároku 1, pričom subjekt je liečený ešte ožarovaním alebo transplantáciou kostnej drene.

18. Použitie zlúčeniny, ktorá je inhibítorom interakcie medzi $LT\beta$ a jeho receptorom, na výrobu farmaceutického prípravku na pozmenenie prežívania alebo udržiavania folikulárných dendritických buniek.

19. Použitie zlúčeniny, ktorá inhibuje interakciu medzi $LT\beta$ a jeho receptorom, na výrobu farmaceutického prípravku

na pozmenenie architektúry orgánov imunitného systému, pričom sa súčasne podáva inhibítor signálnej dráhy ďalšieho člena rodiny TNF ligandov a receptorov.