

### Область техники изобретения

Данное изобретение относится к композициям и способам, включающим "блокаторы рецепторов лимфотоксина- $\beta$ ", которые блокируют передачу сигналов через рецепторы лимфотоксина- $\beta$ . Блокаторы рецепторов лимфотоксина- $\beta$  применимы для лечения лимфоцит-опосредованных иммунологических заболеваний и, более конкретно, для ингибиования иммунных ответов, опосредованных Th1-клетками. Данное изобретение относится к растворимым формам внеклеточного домена рецепторов лимфотоксина- $\beta$ , которые действуют как блокаторы рецепторов лимфотоксина- $\beta$ . Данное изобретение также относится к применению антител либо к рецептору лимфотоксина- $\beta$ , либо к его лиганду, поверхностному лимфотоксину, которые действуют как блокаторы рецепторов лимфотоксина- $\beta$ .

### Предпосылки изобретения

Профиль цитокинов, высвобождаемых при иммунной стимуляции, может повлиять на последующий выбор активируемого иммунного эффекторного пути. Выбор между иммунными эффекторными механизмами опосредован CD4-положительными хелперными Т-лимфоцитами (Т-хелперными клетками, или Th-клетками). Th-клетки взаимодействуют с антиген-презентирующими клетками (АПК), которые презентируют на своей поверхности пептидные фрагменты процессированного чужеродного антигена в комплексе с молекулами ГКГ класса II. Th-клетки активируются, когда распознают определенные эпигопы чужеродного антигена, представленные на поверхности подходящей АПК, на которые Th-клетки экспрессируют специфичный receptor. Активированные Th-клетки, в свою очередь, секретируют цитокины (лимфокины), которые запускают подходящие иммунные эффекторные механизмы.

Th-клетки способны запускать различные эффекторные механизмы, включая активацию киллерных Т-клеток, активацию продукции В-клетками антител и активацию макрофагов. Выбор между иммунными эффекторными механизмами зависит в значительной степени от того, какие цитокины производят активированные Th-клетки.

Th-клетки могут быть подразделены на три подгруппы на основании профилей секретируемых ими цитокинов (Fitch et al., Ann. Rev. Immunol., 11, стр. 29-48 (1993)). Данные подгруппы называют Th0, Th1 и Th2. У мышей нестимулированные "наивные" Т-хелперные клетки производят IL-2. Кратковременная стимуляция приводит к преобразованию в клетки-предшественники Th0, которые производят широкий спектр цитокинов, включая IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 и IL-10. Длительно стимулируемые Th0-клетки способны дифференцироваться либо в клеточный тип Th1, либо в клеточный тип

Th2, после чего изменяется профиль экспрессируемых цитокинов.

Некоторые цитокины секретируются как Th1-, так и Th2-клетками (например, IL-3, GM-CSF и TNF). Другие цитокины производятся исключительно одной либо другой подгруппой Th-клеток. Специализированные эффекты подгрупп Т-хелперных клеток впервые были выявлены у мышей. Сходное разделение применимо и к Т-хелперным клеткам человека (Romagnani et al., Ann. Rev. Immunol., 12, стр. 227-57 (1994)).

Th-клетки производят LT- $\alpha$ , IL-2 и IFN- $\gamma$ . У человека профиль секретируемых цитокинов Th1 обычно связывали с клеточным иммунитетом и резистентностью к инфекции. Цитокины Th1 имеют тенденцию к активации макрофагов и запуску определенных видов воспалительного ответа, таких как гиперчувствительность IV типа (замедленного типа) (смотри ниже). Цитокины Th1 играют важную роль в клеточном отторжении трансплантатов тканей и органов.

Th2-клетки производят цитокины IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10. Цитокины Th2 увеличивают продукцию эозинофилов и тучных клеток и стимулируют пролиферацию и созревание В-клеток (Howard et al., "T cell-derived cytokines and their receptors", Fundamental Immunology, 3d ed., Raven Press, New York (1993)). Цитокины Th2 также увеличивают продукцию антител, включая антитела IgE, связанные с аллергическими реакциями, и антитела к трансплантату. Th2-клетки могут также участвовать в супрессии иммунитета и толерантности к персистирующему антигенам.

Th1- и Th2-ассоциированные цитокины играют роль в развитии определенных видов реакций по типу гиперчувствительности - недостаточного или диспропорционального иммунного ответа, развивающегося при контакте с ранее встречавшимся антигеном. Выделяют четыре типа гиперчувствительности (Roitt et al., Immunology, стр. 19.1-22.12 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3d ed. 1993)).

Гиперчувствительность I типа (немедленного типа) включает в себя аллергениндуцированные активацию Th2-клеток и секрецию Th2-клетками цитокинов. Цитокин IL-4, производимый Th2, стимулирует претерпевание В-клетками переключения изотипа на продукцию IgE, который активирует тучные клетки с развитием острых воспалительных реакций, как, например, ведущие к развитию экземы, бронхиальной астмы и ринита.

Гиперчувствительность II и III типов вызывается антителами IgG и IgM к клеточной поверхности или к специфическим тканевым антигенам (II тип) или к растворимым сывороточным антигенам (III тип). Считается, что дан-

ные типы реакций гиперчувствительности не опосредованы Th-клетками.

Гиперчувствительность IV типа (замедленного типа) (ГЗТ) является опосредованной Th1-клетками. Развитие реакций ГЗТ занимает более 12 ч, и о них говорят как о "клеточно-опосредованных", поскольку они могут быть перенесены от одной мыши к другой лишь путем переноса Th1-клеток, а не только сыворотки. Реакции ГЗТ IV типа обычно подразделяют на три типа: контактную, туберкулинового типа и гранулематозную гиперчувствительность.

Многие клеточно-опосредованные реакции, которые способны вызывать заболевание, можно индуцировать у здоровых мышей путем переноса лимфоцитов от больной мыши (например, инсулин-зависимый сахарный диабет и экспериментальный аутоиммунный энцефалит). Данное свойство отличает ГЗТ IV типа от остальных трех типов гиперчувствительности, которые представляют собой гуморальные иммунные реакции, вызываемые преимущественно антителами, которые могут быть перенесены в бесклеточной сыворотке.

Т-хелперные клетки также участвуют в регуляции переключения изотипа иммуноглобулина de novo. Различные подгруппы Th могут влиять на соотношение иммуноглобулинов определенного изотипа, продуцируемых в ответ на иммунную стимуляцию. Например, цитокин IL-4, продуцируемый Th2, может переключать активированные В-клетки на изотип IgG1 и подавлять другие изотипы. Как обсуждалось выше, IL-4 также активирует избыточную продукцию IgE в реакциях гиперчувствительности I типа. Цитокин IL-5, продуцируемый Th2, индуцирует изотип IgA. Данное влияние цитокинов, продуцируемых Th2, на переключение изотипа уравновешено влиянием IFN- $\gamma$ , продуцируемого Th1-клетками.

Создается впечатление, что отличные профили цитокинов, секретируемых Th1- и Th2-клетками, направляют реакцию по различным иммунным эффекторным механизмам. Переключение, которое активирует либо клеточно-опосредованный, либо гуморальный эффекторный механизм, является чувствительным к процессам перекрестной супрессии между Th1- и Th2-клетками: IFN- $\gamma$ , продуцируемый Th1-клетками, подавляет пролиферацию Th2-клеток, а IL-10, секретируемый Th2-клетками, снижает секрецию цитокинов Th1-клетками.

В зависимости от относительных аффинностей цитокинов к их молекулярным мишениям круги отрицательной регуляции Th1 и Th2 могут умножать эффекты малых различий в концентрациях цитокинов, продуцируемых Th1- и Th2-клетками. Возможность контролировать данное переключение путем изменения относительных концентраций цитокинов, продуцируемых Th1- и Th2-клетками, была бы полезна для

лечения дисбаланса при многих иммунных реакциях, зависимых от Th1- и Th2-клеток, которые способны приводить к развитию иммунных нарушений и заболеваний.

Патологические реакции, опосредованные Th1, ассоциированы с рядом органо-специфических и системных аутоиммунных состояний, хронических воспалительных заболеваний и реакций гиперчувствительности замедленного типа. Как обсуждалось выше, реакции, опосредованные Th1, также способствуют развитию клеточных реакций, приводящих к отторжению трансплантированных тканей и органов.

До сих пор лечение данных различных иммунных состояний, опосредованных Th1-клетками, заключается, главным образом, в применении иммуномодуляторов и иммуносупрессоров, равно как и ряда лекарственных средств с плохо изученными механизмами действия (например, золото или пеницилламин). Тремя основными применяемыми в настоящее время иммуносупрессорами являются стероиды, циклоспорин и азатиоприн.

Стероиды представляют собой плейотропные противовоспалительные средства, которые подавляют активированные макрофаги и ингибируют активность антиген-презентирующих клеток так, что обращают многие эффекты цитокина IFN- $\gamma$ , продуцируемого Th1. Циклоспорин - мощный иммуносупрессор - подавляет продукцию цитокинов и снижает экспрессию рецепторов к IL-2 на лимфоцитах при их активации. Азатиоприн представляет собой противовоспалительное средство, которое ингибирует синтез ДНК. Обычно требуется введение высоких доз данных неспецифических иммуносупрессоров, что повышает их токсичность (например, нефро- и гепатотоксичность) и приводит к развитию нежелательных побочных эффектов. Таким образом, они являются неприменимыми в проведении длительных курсов лечения.

В порядке решения трудностей, вызываемых традиционными методами лечения с помощью неспецифических иммуносупрессоров, многие современные стратегии лечения направлены на подавление или активацию отдельных функций иммунной системы. Особенно привлекательной задачей является манипулирование балансом между цитокинами, продуцируемыми Th1 и Th2, в целях сдвигания баланса между клеточно-опосредованными и гуморальными эффекторными механизмами.

Для достижения сдвига между клеточно-опосредованными и гуморальными эффекторными механизмами полезной была бы возможность модулирования активности молекулы, которая способна изменять относительные активности подклассов Th1- и Th2-клеток. Кандидаты на роль таких молекул включают цитокины и рецепторы к ним. Последние данные по-

зволяют предположить, что LT- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  способствуют развитию Th1-опосредованных реакций, тогда как IL-1 и IL-4 направляют ответ по Th2-опосредованному эффекторному механизму (Romagnani et al., Ann. Rev. Immunol., 12, стр. 227-57 (1994)).

Многие из цитокинов Th-клеток представляют собой плейотропные регуляторы развития и функционирования иммунной системы, и ингибирование их продукции окажет вредное действие на неопосредованные Т-клетками реакции. Желательная и эффективная мишень для избирательного модулирования выбора между Th1- и Th2-опосредованными эффекторными механизмами не определена.

#### Суть изобретения

Настоящее изобретение позволяет решить трудности, указанные выше, путем обеспечения фармацевтических композиций и способов лечения иммунологических заболеваний путем ингибирования передачи сигнала через receptor лимфотоксина- $\beta$  (LT- $\beta$ -R) с применением блокаторов рецепторов лимфотоксина- $\beta$ . Более конкретно, композиции и способы, включающие блокаторы LT- $\beta$ -R, применимы для ингибирования иммунных реакций, опосредованных Th1-клетками, таких как например, синдром воспаленной толстой кишки.

В одном осуществлении обеспечиваются растворимые формы внеклеточного домена receptor к лимфотоксину-3, которые действуют как блокаторы LT- $\beta$ -R. Предпочтительные композиции и способы данного осуществления содержат рекомбинантный receptorный гибридный белок к лимфотоксину- $\beta$ , который включает в себя внеклеточный лиганд-связывающий домен LT- $\beta$ -R, слитый с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина. Более предпочтительно, лиганд-связывающий домен LT- $\beta$ -R гибридизован с Fc-доменом IgG человека.

В другом осуществлении данного изобретения предложены антитела, которые действуют как блокаторы LT- $\beta$ -R. Предпочтительные композиции и способы данного осуществления содержат одно или несколько антител к receptorу лимфотоксина- $\beta$ . Более предпочтительно, данное антитело представляет собой моноклональное антитело. Другие предпочтительные композиции и способы данного осуществления содержат одно или более антител к поверхностному лимфотоксину. Более предпочтительно, данное антитело представляет собой моноклональное антитело к лимфотоксину- $\beta$ .

#### Краткое описание рисунков

Фиг. 1 - последовательность внеклеточной части receptorа к LT- $\beta$  человека, которая кодирует лиганд-связывающий домен.

Фиг. 2 - растворимый мышеский receptor к LT- $\beta$ , присоединенный к Fc-домуену IgG1 человека (mLT- $\beta$ -R-Fc), блокирует передачу сигнала через LT- $\beta$ -R в клетках мышей WEHI 164, ин-

дуцированного растворимым мышеским LT- $\alpha$ / $\beta$ -лигандом. Клетки WEHI 164 гибнут как функция повышения концентрации LT-лиганды (mLT- $\alpha$ / $\beta$ ). Растворимый mLT- $\beta$ -R-Fc (10 мкг/мл) блокирует такую индуцированную LT-лигандом клеточную гибель. Гибридный белок растворимого мышеского receptorа к TNF (p55TNF-R-Fc) обладает небольшим эффектом на блокирование LT- $\alpha$ / $\beta$ -стимулированной клеточной гибели. Рост количественно оценивали по прошествии трех дней путем измерения оптической плотности (OD 550) прореагировавшей MTT, которая пропорциональна количеству клеток.

Фиг. 3 - антитело к LT- $\beta$ -R человека (mAb BDA8) блокирует взаимодействие между LT-лигандом и LT- $\beta$ -R на поверхности клеток человека. Рост опухолевых клеток WiDr блокируется комбинацией IFN- $\gamma$  и растворимого LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лиганды. Анти-LT- $\beta$ -R антитело BDA8 блокирует способность LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лиганды ингибировать рост опухолевых клеток WiDr. Закрашенные значки показывают клеточный рост в присутствии контрольного mAb IgG1 (10 мкг/мл). Незакрашенные значки показывают эффекты анти-LT- $\beta$ -R mAb BDA8 (10 мкг/мл).

Фиг. 4 - антитело к LT- $\beta$  человека (mAb B9) блокирует взаимодействие между LT- $\alpha$ / $\beta$ -лигандом на клеточной поверхности и растворимым receptorом к LT- $\beta$  (hLT- $\beta$ -R-Fc; 2 мкг/мл). Связавшийся с поверхностью LT- $\beta$ -R-Fc определяли, применяя меченные фикоэритрином ослиные антитела к IgG человека и FACS-анализ. Средняя интенсивность флюоресценции полученного пика отображена на графике как номер канала. Точечная линия показывает среднюю интенсивность флюоресценции, соответствующую количеству receptorа, связавшегося в отсутствие mAb B9.

Фиг. 5 - эффекты блокатора LT- $\beta$ -R (mLT- $\beta$ -R-Fc) на развитие отека уха в модели контактной гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у мышей. График иллюстрирует увеличение толщины уха, измеряемой в течение 24 ч после антигенной стимуляции ушей сенсибилизованных мышей 0,2% DNFB. Каждый значок представляет результат отдельного эксперимента. Во всех экспериментах использовали 7-8 животных на точку за исключением тех экспериментов, результат которых обозначен ромбом, и в которых использовали 4 животных на точку. Мыши, обрабатываемые буфером (PBS) и 20 мг/кг контрольного гибридного белка IgG (LFA3-Fc), служили в качестве отрицательных контролей. Мыши, обрабатываемые 8 мг/кг анти-VLA4 mAb (mAb PS/2), которое ингибирует развитие отека уха по механизму контактной ГЗТ, служили в качестве положительных контролей.

Фиг. 6 представляет собой графическое изображение изменения массы тела, наблюдав-

шегося у мышей через 14 дней после обработки гибридными белками mLT- $\beta$ -R-Ig и hLFA3-Ig.

Фиг. 7 представляет собой графическое изображение изменения длины толстого кишечника, наблюдавшегося у мышей через 14 дней после обработки гибридными белками mLT- $\beta$ -R-Ig и hLFA3-Ig.

Фиг. 8 представляет изменение массы тела мышей с течением времени после инъекции CD45RB<sup>low</sup>CD4-положительных Т-клеток; CD45 RB<sup>high</sup>CD4-положительных Т-клеток; CD45RB<sup>high</sup> и LT- $\beta$ -R-Ig; и CD45RB<sup>high</sup> и hLFA3-Ig.

Фиг. 9 представляет собой графическое изображение среднего и стандартного отклонений в массе тела, наблюдавшихся после обработок, описанных в аннотациях к фиг. 8-11.

Фиг. 10 представляет собой графическое изображение увеличения толщины подушечки на лапах мышей, которым были введены отрицательные и положительные контроли и mLT- $\beta$ -R-Ig.

#### Подробное описание изобретения

В целях полнейшего понимания описываемого здесь изобретения приведено следующее подробное описание.

Термин "цитокин" относится к молекуле, которая опосредует взаимодействия между клетками. "Лимфокин" представляет собой цитокин, секрецируемый лимфоцитами.

Термин "Т-хелперные (Th) клетки" относится к функциональному подклассу Т-клеток, которые способствуют наработке цитотоксических Т-клеток и которые взаимодействуют с В-клетками, стимулируя продукцию антител. Хелперные Т-клетки распознают антиген, ассоциированный с молекулами ГКГ II класса.

Термин "Th1" относится к подклассу Т-хелперных клеток, которые продуцируют LT- $\alpha$ , интерферон- $\gamma$  и IL-2 (и другие цитокины) и которые вовлечены в воспалительные реакции, связанные с клеточным, т.е. не с иммуноглобулиновым ответом на иммунную стимуляцию.

Термин "Th2" относится к подклассу Т-хелперных клеток, которые продуцируют цитокины, включая IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10, которые связаны с иммуноглобулиновым-опосредованным (гуморальным) ответом на иммунную стимуляцию.

Термин "клеточно-опосредованный" относится к тем реакциям в иммунной системе, которые развиваются в результате прямых эффектов Т-клеток и их продуктов с развитием ответа. Данный тип ответа главным образом (но не исключительно) связан с классом Th1 Т-клеток. В данную категорию не входят хелперные эффекты Т-клеток на дифференцировку В-клеток и пролиферацию В-клеток, которые главным образом связаны с классом Th2 Т-клеток.

Термин "гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ)" относится к иммунному ответу, который характеризуется медленным разви-

тием реакции на антиген с полным проявлением эффекта в течение 1-3-суточного периода. Данное медленное развитие реакции отличается от относительно быстрого развития реакции, наблюдавшегося при иммуноглобулиновом-опосредованной (гуморальной) аллергической реакции. Существует три типа реакций ГЗТ: реакции по типу контактной гиперчувствительности, гиперчувствительности туберкулинового типа и гранулематозные реакции.

Термины "иммуноглобулиновом-опосредованный ответ" или "гуморальный ответ" относятся к иммунному ответу организма животного на чужеродный антиген, в ходе которого в организме животного продуцируются антитела на чужеродный антиген. Т-клетки класса Th2 принципиально важны для эффективной продукции высокоаффинных антител.

Термин "Fc-домен антитела" относится к части молекулы, содержащей шарнир, СН2- и СН3-домены, но не содержащей антиген-связывающие участки. Подразумевается, что термин также включает эквивалентные участки IgM или антитела другого изотипа.

Термин "антитело к рецептору к LT- $\beta$ " относится к любому антителу, которое специфично связывается, по крайней мере, с одним эпигеном рецептора к LT- $\beta$ .

Термин "антитело к LT" относится к любому антителу, которое специфично связывается, по крайней мере, с одним эпигеном LT- $\alpha$ , LT- $\beta$  или комплекса LT- $\alpha$ / $\beta$ .

Термин "передача сигналов через LT- $\beta$ -R" относится к молекулярным реакциям, связанным с LT- $\beta$ -R-путем, и последующим реакциям, которые развиваются вследствие первых.

Термин "блокатор LT- $\beta$ -R" относится к агенту, который способен ослабить связывание лиганда с LT- $\beta$ -R, объединение LT- $\beta$ -R клеточной поверхности в кластеры или передачу сигналов через LT- $\beta$ -R, либо который способен повлиять на интерпретацию сигнала внутри клетки.

Блокатор LT- $\beta$ -R, который действует на стадии лиганд-рецепторного связывания, способен ингибировать связывание LT-лиганды с LT- $\beta$ -R, по крайней мере, на 20%. Блокатор LT- $\beta$ -R, который действует после стадии лиганд-рецепторного связывания, способен ингибировать цитотоксические эффекты стимуляции LT- $\beta$ -R на опухолевую клетку, по крайней мере, на 20%. Примеры блокаторов LT- $\beta$ -R включают растворимые молекулы LT- $\beta$ -R-Fc и Ab к LT- $\alpha$ , LT- $\beta$ , LT- $\alpha$ / $\beta$  или LT- $\beta$ -R. Предпочтительно, антитела не вступают в перекрестные реакции с секре-тируемой формой LT- $\alpha$ .

Термин "биологическая активность LT- $\beta$ -R" относится к

1) способности молекулы LT- $\beta$ -R или производного конкурировать за связывание с рас-

творимым или поверхностным LT-лигандом с растворимыми или поверхностными молекулами LT- $\beta$ -R; или

2) способности стимулировать развитие иммунорегуляторного ответа или цитотоксической активности наподобие нативной молекулы LT- $\beta$ -R.

Термины "гетеромерный комплекс LT- $\alpha/\beta$ " и "гетеромерный комплекс LT" относятся к стойкому комплексу, по крайней мере, одной субъединицы LT- $\alpha$  и одной или более субъединиц LT- $\beta$ , включая растворимые, мутантные, измененные и химерные формы одной или более субъединиц. Субъединицы могут объединяться посредством электростатических, ван-дерваальсовых или ковалентных взаимодействий. Предпочтительно, гетеромерный комплекс LT- $\alpha/\beta$  содержит, по крайней мере, две соседние субъединицы LT- $\beta$  и не содержит соседних субъединиц LT- $\alpha$ . Когда гетеромерный комплекс LT- $\alpha/\beta$  служит в качестве стимулятора LT- $\beta$ -R в анализе клеточного роста, комплекс является, предпочтительно, растворимым и описывается стехиометрическим соотношением LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2. Растворимые гетеромерные комплексы LT- $\alpha/\beta$  не содержат трансмембранных доменов и могут быть секретированы подходящей клеткой-хозяином, которая экспрессирует субъединицы LT- $\alpha$  и/или LT- $\beta$  (Crowe et al., J. Immunol. Methods, 168, стр. 78-89 (1994)).

Термин "LT-лиганд" относится к гетеромерному комплексу LT или его производному, который специфично связывается с рецептором к LT- $\beta$ .

Термин "лиганд-связывающий домен LT- $\beta$ -R" относится к части или частям LT- $\beta$ -R, которые вовлечены в процесс специфичного распознавания и взаимодействия с LT-лигандом.

Термины "поверхностный комплекс LT- $\alpha/\beta$ " и "поверхностный комплекс LT" относятся к комплексу, содержащему субъединицы LT- $\alpha$  и мембранные субъединицы LT- $\beta$ , включая мутантные, измененные и химерные формы одной или более субъединиц, которые экспрессируются на клеточной поверхности. Термин "поверхностный LT-лиганд" относится к поверхностному комплексу LT или его производному, который способен специфично связываться с рецептором к LT- $\beta$ .

Термин "субъект" относится к животному или к одной или более клеткам животного происхождения. Предпочтительно, животное представляет собой млекопитающее. Клетки могут находиться в любом виде, включая, но не ограничиваясь, клетки, оставленные в ткани, кластеры клеток, иммортализованные, трансфицированные или трансформированные клетки и клетки, полученные из животного, которое было физически или фенотипически изменено.

#### Лимфотоксин- $\beta$ : Член семейства TNF

Выяснилось, что цитокины, родственные фактору некроза опухоли (TNF), представляют собой большое семейство плейотропных медиаторов иммунной защиты и регуляции иммунной системы. Члены данного семейства существуют в мембрально-связанной форме, которая действует местно посредством межклеточных контактов, или в виде секретируемых белков, которые способны действовать на удаленные мишени. Параллельно семейство TNF-родственных рецепторов взаимодействует с данными цитокинами и запускает разнообразные пути, включая клеточную гибель, клеточную пролиферацию, дифференцировку ткани и провоспалительные реакции.

TNF, лимфотоксин- $\alpha$  (LT- $\alpha$ , также называемый TNF- $\beta$ ) и лимфотоксин- $\beta$  (LT- $\beta$ ) являются членами семейства TNF лигандов, которые также включают лиганды рецепторов Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 и 4-1BB (Smith et al., Cell, 76, стр. 959-62 (1994)). Передача через некоторых членов семейства TNF - включая TNF, LT- $\alpha$ , LT- $\beta$  и Fas - может индуцировать гибель опухолевой клетки по механизму некроза или апоптоза (запограммированной клеточной гибели). В неопухолевых клетках TNF и многие лиганд-рецепторные взаимодействия в пределах семейства TNF влияют на развитие иммунной системы и ответы на различные антигенные стимулы.

Большинство мембрально-связанных комплексов LT- $\alpha/\beta$  ("поверхностных LT") отвечают стехиометрическому соотношению LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 (Browning et al., Cell, 72, стр. 847-56 (1993));

Browning et al., J. Immunol., 154, стр. 33-46 (1995)). Поверхностные LT-лиганды не связываются с TNF-R с высокой аффинностью и не стимулируют передачу сигналов через TNF-R. Другой TNF-родственный рецептор, называемый рецептором к LT- $\beta$  (LT- $\beta$ -R), связывает данные поверхностные лимфотоксиновые комплексы с высокой аффинностью. (Crowe et al., Science, 264, стр. 707-10 (1994)).

Передача сигналов через LT- $\beta$ -R, как и передача сигналов через TNF-R, обладает антипролиферативным эффектом и может являться цитотоксической по отношению к опухолевым клеткам. В совместно поданной заявке на Патент Соединенных Штатов серийный номер 0/378968 авторов настоящей заявки описаны композиции и способы для избирательной стимуляции LT- $\beta$ -R с применением стимуляторов LT- $\beta$ -R. Стимуляторы LT- $\beta$ -R применимы для ингибирования роста опухолевых клеток без коактивации TNF-R-индуцированных провоспалительных и иммунорегуляторных путей.

Что касается воздействия на неопухолевые клетки, TNF и TNF-родственные цитокины стимулируют развитие широкого круга иммунных реакций. Как TNF, так и LT- $\alpha$ -лиганды связываются и стимулируют TNF-рецепторы (p55 или

p60 и p75 или p80; называемые здесь TNF-R). TNF и LT- $\alpha$  продуцируются макрофагами в ранней и быстрой реакции на бактериальную инфекцию, которая усиливает бактерицидную активность макрофагов и нейтрофилов. TNF и LT- $\alpha$ , продуцируемые макрофагами или цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ или "киллерными Т-клетками"), связываются с рецепторами к TNF на поверхности клеток-мишеней и запускают гибель восприимчивых клеток.

TNF и TNF-родственные цитокины способны также запускать воспалительные каскады в ответ на инфекцию или стресс. Выброс TNF, LT- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  изменяет адгезивные свойства клеток сосудистого эндотелия и лимфоцитов определенных типов. Повышенная адгезивность облегчает миграцию фагоцитов и лейкоцитов из кровотока в ткани, окружающие очаг воспаления. Сходные воспалительные реакции играют основную роль в клеточном отторжении трансплантатов тканей и органов и при определенных иммунных нарушениях.

Лимфотоксивные (LT) комплексы клеточной поверхности были охарактеризованы на клетках CD4 $^{+}$  Т-клеточной гибридомы (II-23.D7), которые экспрессируют высокие уровни LT (Browning et al., J. Immunol., 147, стр. 1230-37 (1991); Androlewicz et al., J. Biol. Chem., 267, стр. 2542-47 (1992)). Данные по экспрессии и биологической роли LT- $\beta$ -R, субъединиц LT и поверхностных LT комплексов приведены в обзоре C.F. Ware et al., "The ligands and receptors of the lymphotoxin system", в Pathways for Cytolysis, Current Topics Microbiol. Immunol., Springer-Verlag, стр. 175-218 (1995).

Экспрессия LT- $\alpha$  индуцируется, а LT- $\alpha$  секретируется преимущественно активированными Т- и В-лимфоцитами и естественными киллерами (NK). Оказывается, что среди подклассов Т-хелперных клеток LT- $\alpha$  продуцируется Th1-, но не продуцируется Th2-клетками. LT- $\alpha$  также был определен в меланоцитах. Анти-LT- $\alpha$  антитела могут быть также сорбированы на клетки микроглии и Т-клетки в очагах рассеянного склероза.

Лимфотоксин- $\beta$  (также называемый p33) был выявлен на поверхности Т-лимфоцитов, Т-клеточных линий, В-клеточных линий и лимфокин-активированных киллерных (LAK) клеток. LT- $\beta$  является субъектом совместно поданных международных заявок авторов настоящей заявки PCT/US 91/04588, опубликованной 9 января 1992 года, как WO 92/00329; и PCT/US 93/11669, опубликованной 23 июня 1994 года, как WO94/13808, которые включены здесь в качестве ссылки.

Поверхностные LT комплексы преимущественно экспрессируются активированными Т- и В-лимфоцитами и естественными киллерами (NK), что может быть определено с помощью FACS-анализа или в соответствии с иммуноги-

стологическими методиками с применением анти-LT- $\alpha$  антител или растворимых гибридных белков LT- $\beta$ -R-Fc. Поверхностный LT был также описан в клонах цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) человека, на активированных периферических мононуклеарных лимфоцитах (PML), на IL-2-активированных периферических лимфоцитах крови (LAK-клетках), на периферических В-лимфоцитах (PBL), активированных митогеном фитолакки или активированных анти-CD40, и в различных лимфоидных опухолях из Т- и В-клеточных рядов. Контакт с аллоантителами-несущими клетками мишеними специфично индуцирует экспрессию поверхности LT клонами CD8 $^{+}$  и CD4 $^{+}$  CTL.

Рецептор к LT- $\beta$ , член TNF-семейства рецепторов, специфически связывает поверхность LT-лиганды. LT- $\beta$ -R связывает гетеромерные комплексы LT (преимущественно LT- $\alpha 1/\beta 2$  и LT- $\alpha 2/\beta 1$ ), но не связывает TNF или LT- $\alpha$  (Crowe et al., Science, 264, стр. 707-10 (1994)). Передача сигнала через LT- $\beta$ -R может играть роль в развитии периферических лимфоидных органов и в развитии гуморальных иммунных реакций.

Исследования экспрессии LT- $\beta$ -R находятся на ранних стадиях. мРНК, кодирующая LT- $\beta$ -R, обнаружена в селезенке, тимусе и других важнейших органах человека. Характер экспрессии LT- $\beta$ -R сходен с таковым, показанным для p55-TNF-R за исключением того, что LT- $\beta$ -R отсутствует на Т-клетках периферической крови и на Т-клеточных линиях.

#### Продукция растворимых LT-комплексов

Растворимые гетеромерные комплексы LT- $\alpha/\beta$  содержат субъединицы LT- $\beta$ , которые преобразованы из мембранны-связанной в растворимую форму. Данные комплексы подробно описаны в совместно поданной международной заявке авторов настоящей заявки (PCT/US 93/11669, опубликованной 23 июня 1994 года, как WO 94/13808). Растворимые LT- $\beta$ -пептиды определяются аминокислотной последовательностью лимфотоксина- $\beta$ , где последовательность расщепляется в любой точке между концом трансмембранных фрагментов (т.е. приблизительно у аминокислотного остатка № 44) и первым TNF-гомологичным фрагментом (т.е. у аминокислотного остатка № 88) в соответствии с системой нумерации Browning et al., Cell, 72, стр. 847-56 (1993).

Растворимые LT- $\beta$ -полипептиды могут быть получены путем усечения N-конца LT- $\beta$  с удалением цитоплазматического фрагмента и трансмембранных фрагментов (Crowe et al., Science, 264, стр. 707-10 (1994)). Альтернативно, трансмембранный домен может быть инактивирован путем делеции или замещения гидрофобных аминокислотных остатков, которые содержат трансмембранный домен в норме, гидрофильными остатками. В другом случае создает-

ся существенно гидрофильный профиль гидрофобности, который снижает сродство к липидам и повышает водорастворимость. Делеция трансмембранных домена является предпочтительной по сравнению с замещением гидрофильными аминокислотными остатками, поскольку это позволяет избежать внесения потенциально иммуногенных эпитопов.

Исключенный или инактивированный трансмембранный домен может быть замещен или присоединен к лидерной последовательности типа I (например, к лидерной последовательности VCAM-1) таким образом, что последовательность секретируемого белка начинается с остатка, находящегося между val40 и pro88. Растворимые LT- $\alpha$ -полипептиды могут включать в себя любое количество хорошо известных лидерных последовательностей на N-конце. Такая последовательность позволит пептидам экспрессироваться и служить мишенью для каскада секреции в эукариотической системе. Смотри, например, Ernst et al., Патент Соединенных Штатов № 5082783 (1992).

Растворимые гетеромерные комплексы LT- $\alpha/\hat{\alpha}$ , могут быть получены путем совместного трансфицирования подходящей клетки-хозяина ДНК, кодирующй LT- $\alpha$  и растворимый LT- $\hat{\alpha}$ , (Crowe et al., J. Immunol. Methods, 168, стр. 78-89 (1994)). Растворимый LT- $\hat{\alpha}$ , секрецируемый в отсутствие LT- $\alpha$ , сильно олигомеризован. Однако, когда он экспрессируется совместно с LT- $\alpha$ , образуется тримерная структура массой 70 кДа, которая содержит оба белка. Также можно получить растворимые гетеромерные комплексы LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$  путем трансфицирования клеточной линии, которая в норме экспрессирует только LT- $\alpha$  (такая, как линия RPMI 1788, обсуждавшаяся выше), геном, кодирующим растворимый полипептид LT- $\hat{\alpha}$ .

Полипептиды LT- $\alpha$  и LT- $\hat{\alpha}$  могут быть синтезированы по отдельности, денатурированы с использованием нестойких детергентов, смешаны вместе и ренатурированы путем удаления детергента с образованием смешанных гетеромерных комплексов LT, которые могут быть выделены (смотри ниже).

### Очистка комплексов LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$

Растворимые гетеромерные комплексы LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$  выделяют из совместно экспрессируемых комплексов с различными стехиометрическими соотношениями субъединиц по методу хроматографии, применяя рецепторы к TNF и LT- $\hat{\alpha}$  в качестве реагентов для аффинной очистки. TNF-рецепторы связываются лишь с  $\alpha/\alpha$ -щелями комплексов LT. Рецептор к LT- $\hat{\alpha}$  с высокой аффинностью связывается с  $\hat{\alpha}/\hat{\alpha}$ -щелями и с меньшей аффинностью с  $\alpha/\hat{\alpha}$ -щелями гетеромерных комплексов LT- $\alpha/\hat{\alpha}$ . Соответственно, LT- $\alpha3$  и LT- $\alpha2/\hat{\alpha}1$  будут связываться с TNF-R. LT- $\hat{\alpha}$ -R также способен связывать тримеры LT- $\alpha2/\hat{\alpha}1$  (с  $\alpha/\hat{\alpha}$ -щелями), но не способен связывать LT- $\alpha3$ .

В дополнение к этому, LT- $\hat{\alpha}$ -R (но не TNF-R) связывает LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$  и LT- $\hat{\alpha}n$  (точный состав такого соединения неизвестен, однако, оно представляет собой крупные агрегаты).

Аффинные реагенты на основе рецепторов могут быть получены либо в виде растворимого внеклеточного домена (смотри, например, Loetscher et al., J. Biol. Chem., 266, стр. 18324-29 (1991)), либо в виде химерных белков, состоящих из внеклеточного лиганд-связывающего домена, присоединенного к Fc-домену иммуноглобулина (Loetscher et al., J. Biol. Chem., 266, стр. 18324-29 (1991); Crowe et al., Science, 264, стр. 707-10 (1994)). Рецепторы связывают с аффинными матрицами посредством химического поперечного сшивания, применяя устоявшиеся методики.

Существуют две схемы, по которым LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$ -лиганд может быть очищен с применением рецепторов и иммуноаффинной хроматографии. В соответствии с первой схемой супернатант из системы с подходящей экспрессией, экспрессирующей как LT- $\alpha$ , так и усеченную форму LT- $\hat{\alpha}$ , пропускают через колонку с TNF-R. TNF-R будет связывать LT- $\alpha3$  и тримеры LT- $\alpha2/\hat{\alpha}1$ . Элюат, прошедший через колонку с TNF-R, будет содержать LT- $\hat{\alpha}(n)$  и LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$ .

В соответствии со второй схемой, все LT- $\hat{\alpha}$ -содержащие формы (LT- $\hat{\alpha}(n)$ , LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$  и LT- $\alpha2/\hat{\alpha}1$ ) сажают на колонку с LT- $\hat{\alpha}$ -R и элюируют с нее, применяя классические методики изменения chaotropic или pH. (LT- $\alpha3$  элюируется сквозь колонку). Элюат нейтрализуют или удаляют chaotropic, а элюат затем пропускают через колонку с TNF-R, который связывает лишь тримеры LT- $\alpha2/\hat{\alpha}1$ . Элюат, прошедший через данную колонку, будет содержать LT- $\hat{\alpha}(n)$  и LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$ .

В обоих случаях, чистые тримеры LT- $\alpha1/\hat{\alpha}2$  могут быть отделены от LT- $\hat{\alpha}$  с помощью последовательного выполнения методик гель-фильтрации и/или ионообменной хроматографии, известных в данной области.

Альтернативно, различные формы гетеромерных комплексов LT- $\alpha/\hat{\alpha}$  могут быть разделены и очищены в соответствии с множеством традиционных хроматографических методик. Также предпочтительным может являться объединение серии традиционных схем очистки с одной из стадий иммуноаффинной очистки, описанных выше.

### Скрининг для поиска блокаторов LT- $\beta$ -R

В одном осуществлении данного изобретения блокатор LT- $\beta$ -R содержит антитело (Ab) к LT- $\beta$ -R, которое ингибирует передачу сигнала через LT- $\beta$ -R. Предпочтительно, анти-LT- $\beta$ -R Ab представляет собой моноклональное антитело (mAb). Одним из таких анти-LT- $\beta$ -R mAb является mAb BDA8.

Ингибирующие анти-LT- $\beta$ -R Ab и другие блокаторы LT- $\beta$ -R могут быть идентифицированы с применением методов скрининга, которые определяют способность одного или более агентов либо связываться с LT- $\beta$ -R или с LT-лигандом, либо ингибиовать эффекты передачи сигнала через LT- $\beta$ -R на клетки.

В одном скрининговом методе применяются цитотоксические эффекты передачи сигнала через LT- $\beta$ -R на опухолевые клетки, экспрессирующие LT- $\beta$ -R. Опухолевые клетки подвергают воздействию одного или более стимуляторов LT- $\beta$ -R с тем, чтобы вызвать передачу сигнала через LT- $\beta$ -R. Стимуляторы LT- $\beta$ -R включают гетеромерные комплексы LT- $\alpha/\beta$  (предпочтительно, растворимые LT- $\alpha 1/\beta 2$ ) в присутствии IFN- $\gamma$  или стимулирующее анти-LT- $\beta$ -R Ab (смотри ниже; также описанное в совместно поданной заявке на патент Соединенных Штатов серийный номер 08/378968 авторов настоящей заявки). Антитела и другие агенты, которые способны блокировать передачу сигнала через LT- $\beta$ -R выбирают, основываясь на их способности ингибиовать цитотоксический эффект передачи сигнала через LT- $\beta$ -R на опухолевые клетки в следующем анализе:

1) Опухолевые клетки, такие как клетки HT29, культивируют в течение от трех до четырех суток в серии лунок для тканевой культуры, содержащих среду и, по крайней мере, один стимулятор LT- $\beta$ -R в присутствии или в отсутствие серийных разведений тестируемого агента;

2) К опухолевым клеткам добавляют витальный краситель, по которому определяют функцию митохондрий, такой как мТТ, и реакции дают протекать в течение нескольких часов;

3) Количественно определяют оптическую плотность смеси в каждой лунке при длине волны 550 нм (ОП 550). Значение ОП 550 пропорционально количеству опухолевых клеток, выживших в присутствии стимулятора LT- $\beta$ -R и тестируемого блокатора LT- $\beta$ -R в каждой лунке. Агент или комбинация агентов, которые в данном анализе способны уменьшить LT- $\beta$ -R-стимулированную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам, по крайней мере, на 20%, являются блокаторами LT- $\beta$ -R, входящими в сферу данного изобретения.

Любой агент или комбинация агентов, которые стимулируют передачу сигнала через LT- $\beta$ -R, могут быть применены в описанном выше анализе для идентификации блокаторов LT- $\beta$ -R. Стимуляторы LT- $\beta$ -R, которые индуцируют передачу сигнала через LT- $\beta$ -R (такие, как стимулирующие анти-LT- $\beta$ -R mAb, могут быть выбраны на основании их способности - одного или в сочетании с другими агентами - потенцировать цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам с применением анализа

выживаемости опухолевых клеток, описанного выше.

Другой способ выбора блокатора LT- $\beta$ -R представляет собой исследование способности предполагаемого агента непосредственно вмешиваться в процесс LT-лиганд-рецепторного связывания. Агент или комбинация агентов, которые способны блокировать лиганд-рецепторное связывание, по крайней мере, на 20%, являются блокаторами LT- $\beta$ -R, входящими в сферу данного изобретения.

Для проведения анализа конкуренции с предполагаемыми блокаторами LT- $\beta$ -R может быть применена любая из ряда методик проведения анализа, с помощью которого измеряют прочность лиганд-рецепторного связывания. Прочность связывания между рецептором и лигандом может быть измерена с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или радиоиммуноанализа (RIA). Параметры специфичного связывания также могут быть измерены с помощью комплексов антиген-антитело, меченых флюоресцентной меткой, или с помощью выполнения проведения анализа на клеточном сортере с возбуждением флуоресценции (FACS) или путем постановки других подобных методик иммунологического анализа, каждая из которых представляет собой методику, хорошо известную в данной области.

Параметры лиганд-рецепторного связывания также могут быть измерены с помощью прибора BIACore (Pharmacia Biosensor), в котором используется явление plasmon резонансного определения (Zhou et al., Biochemistry, 32, стр. 8193-98 (1993); Faegerstram and O'Shannessy "Surfase plasmon resonance detection in affinity technologies", в Handbook of Affinity Chromatography, стр. 229-52, Marcel Dekker, Inc., New York (1993)).

Технология BIACore позволяет посадить рецептор на золотую поверхность и пропускать над ним лиганд. Plasmon резонансное определение позволяет непосредственно количественно определить массу, связавшуюся с поверхностью за определенное время. Данная методика позволяет определить константы скорости как прямой, так и обратной реакции, и, таким образом, константа диссоциации и константа сродства комплекса лиганд-рецептор могут быть непосредственно определены в присутствии и в отсутствие предполагаемого блокатора LT- $\beta$ -R.

С помощью данных или иных методик для измерения параметров связи в комплексе рецептор-лиганд можно оценить способность блокатора LT- $\beta$ -R, одного или в сочетании с другими агентами, ингибиовать связывание поверхностными или растворимыми LT-лигандами с поверхностными или растворимыми молекулами LT- $\beta$ -R. Такие анализы также могут быть применены для тестирования блокаторов LT- $\beta$ -R или производных таких агентов (например, конденси-

рованных, химерных, мутантных или химически модифицированных форм) - одних или в сочетании с другими агентами - для оптимизации способности данного модифицированного агента блокировать стимуляцию LT- $\beta$ -R.

#### Продукция растворимых молекул LT- $\beta$ -R

В одном осуществлении данного изобретения блокаторы LT- $\beta$ -R содержат растворимые молекулы рецептора к LT- $\beta$ .

Фиг. 1 показывает последовательность внеклеточного фрагмента человеческого LT- $\beta$ -R, которая кодирует лиганд-связывающий домен. Применяя информацию последовательности, приведенную на фиг. 1, и методики получения рекомбинантной ДНК, хорошо известные в данной области, функциональные фрагменты, кодирующие лиганд-связывающий домен LT- $\beta$ -R, могут быть клонированы в векторе и экспрессированы подходящим хозяином с получением растворимой молекулы LT- $\beta$ -R. Растворимые молекулы LT- $\beta$ -R, которые по данным описанных здесь анализов могут конкурировать с нативными рецепторами к LT- $\beta$  за связывание LT-лиганда, отбирают как блокаторы LT- $\beta$ -R.

Растворимый рецептор к LT- $\beta$ , содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из таковых, приведенных на фиг. 1, может быть присоединен к одному или более гетерологичных белковых доменов ("гибридных доменов") в целях увеличения устойчивости рецепторного гибридного белка *in vivo* или в целях модулирования его биологической активности или локализации.

Предпочтительно, для создания рецепторных гибридных белков применяют стойкие белки плазмы - которые, как правило, имеют период полужизни в циркуляторном русле более, чем 20 ч. Такие белки плазмы включают, но не ограничиваются: иммуноглобулины, сывороточный альбумин, липопротеины, аполипопротеины и трансферрин. Последовательности, которые способны нацеливать растворимую молекулу LT- $\beta$ -R на определенную клетку или тип ткани, также могут быть присоединены к лиганд-связывающему домену LT- $\beta$ -R в целях создания специфически локализованного растворимого гибридного белка LT- $\beta$ -R.

Весь внеклеточный фрагмент LT- $\beta$ -R или его функциональная часть (фиг. 1), содержащая лиганд-связывающий домен LT- $\beta$ -R, может быть гибридизован с постоянным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, таким как Fc-домен тяжелой цепи IgG1 человека (Browning et al., J. Immunol., 154, стр. 33-46 (1995)). Растворимые гибридные белки рецептор-IgG являются предпочтительными и представляют собой распространенные иммунологические реагенты, а способы их создания известны специалистам в данной области (смотри, например, патент Соединенных Штатов № 5225538, включенный здесь в качестве ссылки).

Функциональный лиганд-связывающий домен LT- $\beta$ -R может быть гибридизован с Fc-доменом иммуноглобулина (Ig), относящегося к классу или подклассу иммуноглобулинов, отличному от IgG1. Fc-домены или антитела, относящиеся к различным классам или подклассам Ig, способны активировать различные вторичные эффекторные функции. Активация происходит, когда Fc-домен связывается сходным Fc-рецептором. Вторичные эффекторные функции включают способность активировать систему комплемента, проникать через плаценту и связывать различные белки микробного происхождения. Свойства различных классов или подклассов иммуноглобулинов описаны Roitt et al., Immunology, стр. 4.8 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3d ed. 1993).

Активация системы комплемента запускает каскады ферментативных реакций, которые опосредуют воспаление. Продукты системы комплемента обладают множеством функций, включая связывание бактерий, эндоцитоз, фагоцитоз, цитотоксичность, продукцию свободных радикалов и солюбилизацию иммунных комплексов.

Ферментативный каскад системы комплемента может быть активирован Fc-доменами антиген-связанных антител классов IgG1, IgG3 и IgM. Выяснилось, что Fc-домен IgG2 является менее эффективным, а Fc-домены IgG4, IgA, IgD и IgE являются неэффективными для активации системы комплемента. Таким образом, Fc-домен выбирают на основании того, являются ли связанные с его применением вторичные эффекторные функции желаемыми при конкретной иммунной реакции или заболевании, которые лечат с помощью гибридного белка LT- $\beta$ -R-Fc.

Если предпочтительно будет повредить или убить LT-лиганд-несущие клетки-мишени, для создания гибридного белка LT- $\beta$ -R-Fc можно выбрать особенно активный Fc-домен (IgG1). Альтернативно, если предпочтительно будет нацелить гибридный белок LT- $\beta$ -R-Fc на клетку без активации системы комплемента, можно выбрать неактивный Fc-домен IgG4.

Были описаны мутации в Fc-домене, которые снижают или прекращают связывание с Fc-рецепторами и активацию системы комплемента (S. Morrison, Annu. Rev. Immunol., 10, стр. 239-65 (1992)). Данные или другие мутации могут быть применены одни или в сочетании для оптимизации активности Fc-домена, применяемого для создания гибридного белка LT- $\beta$ -R-Fc.

Получение растворимого человеческого гибридного белка LT- $\beta$ -R, содержащего лиганд-связывающие последовательности, конденсированные с Fc-доменом человеческого иммуноглобулина (hLT- $\beta$ -R-Fc), описано в примере 1. Одну линию CHO, созданную в соответствии с примером 1, которая секретирует hLT- $\beta$ -R-Fc,

называют "hLT $\beta$ ; R-hG1 CHOtt14". Образец данной линии был принят на хранение 21 июля 1995 года в American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) в соответствии с положениями Будапештского договора (the Budapest Treaty) и ему был присвоен номер по каталогу ATCC CRL11965.

Получение молекулы растворимого мышиного гибридного белка LT- $\beta$ -R(mLT- $\beta$ -R-Fc) описано в примере 2. Линию CHO, созданную в соответствии с примером 2, которая секретирует mLT- $\beta$ -R-Fc, называют "mLT $\beta$ ; R-hG1 CHO#1.3.BB". Образец данной линии был принят на хранение 21 июля 1995 года в American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) в соответствии с положениями Будапештского договора (the Budapest Treaty) и ему был присвоен номер по каталогу ATCC CRL11964.

Все ограничения доступности широкому кругу исследователей вышеуказанных хранищ ATCC будут окончательно сняты по выдаче патента на данную заявку.

Различные аминокислотные остатки, образующие точку соединения в гибридном белке рецептор-Ig могут изменять структуру, устойчивость и предельную биологическую активность растворимого LT- $\beta$ -рецепторного гибридного белка. На С-конец выбранного фрагмента LT- $\beta$ -R может быть добавлена одна или более аминокислот в целях модификации точки соединения выбранным доменом слияния.

N-конец гибридного белка LT- $\beta$ -R также может быть модифицирован путем изменения положения, по которому выбранный фрагмент ДНК, кодирующей LT- $\beta$ -R, расщепляется на 5'-конце для вставки в рекомбинантный экспрессирующий вектор. Устойчивость и активность каждого гибридного белка LT- $\beta$ -R могут быть протестированы и оптимизированы с помощью устоявшихся методик постановки эксперимента и анализов для выбора описываемых здесь блокаторов LT- $\beta$ -R.

Применяя последовательности лиганд-связывающего домена LT- $\beta$ -R во внеклеточном домене, показанном на фиг. 1, можно также создать варианты аминокислотных последовательностей с тем, чтобы модифицировать средство растворимого рецептора к LT- $\beta$  или гибридного белка к LT-лиганду. Растворимые молекулы LT- $\beta$ -R по данному изобретению способны конкурировать за связывание поверхностного LT-лиганда с эндогенными рецепторами к LT- $\beta$  на клеточной поверхности. Представляется, что любая растворимая молекула, содержащая лиганд-связывающий домен LT- $\beta$ -R, которая способна конкурировать с рецепторами к LT- $\beta$  на клеточной поверхности за связывание поверхностного LT-лиганда, является блокатором LT- $\beta$ -R, который входит в сферу настоящего изобретения.

### Растворимые молекулы LT- $\beta$ -R как блокаторы LT- $\beta$ -R

Растворимый гибридный белок, состоящий из рецептора к LT- $\beta$  и иммуноглобулина человека (hLT- $\beta$ -R-Fc), получали в соответствии с методиками, приведенными в примере 1, и тестировали на предмет его способности блокировать LT- $\beta$ -R-индуцированную цитотоксичность по отношению к человеческим опухолевым клеткам HT29. В таблице 1 (пример 3) приводится сравнение способности растворимых гибридных белков рецептора к LT- $\beta$  (hLT- $\beta$ -R-Fc) и рецептора к TNF (p55-TNF-R-Fc) блокировать ингибирующие эффекты различных TNF- и растворимых LT-лигандов на рост опухолевых клеток HT29.

Среди данных, изложенных в таблице 1, указаны концентрации, при которых растворимый рецептор к LT- $\beta$  (hLT- $\beta$ -R-Fc) способен предотвращать гибель опухолевых клеток, вызванную взаимодействием между LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лигандом и рецепторами к LT- $\beta$  клеточной поверхности на 50%. Способность блокировать рост опухолевых клеток, по крайней мере, на 20% свидетельствует о данном растворимом рецепторе к LT- $\beta$  как о блокаторе LT- $\beta$ -R по данному изобретению. Как и ожидалось, растворимый гибридный белок TNF-R (p55-TNF-R-Fc) полностью блокирует TNF-индуцированное ингибирование роста путем связывания с TNF и предотвращения его взаимодействия с поверхностным рецептором.

Растворимый гибридный белок TNF-R не влияет на опосредованные LT-лигандом (LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2) антитролиферативные эффекты. В противоположность этому, гибридный белок LT- $\beta$ -R блокировал эффекты LT-лиганда, но не блокировал эффекты TNF или LT- $\alpha$ . Таким образом, растворимые гибридные белки LT- $\beta$ -R человека не вмешиваются в процесс активации TNF-R TNF- и LT $\alpha$ -лигандами.

Для того, чтобы определить, является ли передача сигнала через LT- $\beta$ -R также цитотоксической для опухолевых клеток у мышей, и способны ли растворимые гибридные белки LT- $\beta$ -R блокировать LT- $\beta$ -R-индуцированную цитотоксичность, проводили сходный эксперимент, применяя мышиные опухолевые клетки. Растворимый мышеский гибридный белок LT- $\beta$ -R-Fc (mLT- $\beta$ -R-Fc; смотри пример 2) тестировали на предмет его способности предотвращать гибель мышиных клеток WEHI 164, обработанных LT-лигандом (пример 4).

На фиг. 2 показаны эффекты растворимого мышеского LT- $\beta$ -R (mLT- $\beta$ -R-Fc) на LT-лиганд-индуцированную передачу сигнала через LT- $\beta$ -R на мышиных клетках WEHI 164. Как показано данным анализом, клетки WEHI 164 гибнут при обработке растворимым LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лигандом. Добавление mLT- $\beta$ -R-Fc блокирует LT-лиганд-

стимулированную клеточную гибель. Контрольный гибридный белок TNF-рецептора обладает слабым эффектом на блокирование клеточной гибели.

Эти данные показывают, что растворимый гибридный белок LT- $\beta$ -R способен эффективно конкурировать с поверхностными молекулами LT- $\beta$ -R за связывание LT-лиганда. Таким образом, растворимый гибридный белок LT- $\beta$ -R-Fc действует у мышей как блокатор LT- $\beta$ -R.

#### **Источник антител к человеческому LT- $\beta$ -R**

В другом осуществлении данного изобретения антитела к человеческому рецептору к LT- $\beta$  (анти-LT- $\beta$ -R Ab) функционируют как блокатор LT- $\beta$ -R. Анти-LT- $\beta$ -R Ab по данному изобретению могут являться поликлональными или моноклональными (mAb) и могут быть модифицированы в целях оптимизации их способности блокировать передачу сигнала через LT- $\beta$ -R, их биологической доступности *in vivo*, устойчивости и других желаемых свойств.

Поликлональные антисыворотки к человеческому рецептору к LT- $\beta$  получают, применяя традиционные методики подкожного введения животным, таким как козы, кролики, крысы, хомяки, мыши, гибридного белка человеческого рецептора к LT- $\beta$  и Fc-домена иммуноглобулина (Пример 1) в полном адьюванте Фройнда с последующим реиммунизирующими внутрибрюшинным или подкожным введением в неполном адьюванте Фройнда. Поликлональные антисыворотки, содержащие желаемые антитела к рецептору к LT- $\beta$ , тестируют с помощью традиционных иммунологических методик.

Мышьи моноклональные антитела (mAb) к гибридному белку человеческого рецептора к LT- $\beta$  и Fc-домена иммуноглобулина получают, как описано в примере 5. Гибридомная клеточная линия (BD.A8.AB9), которая производит мышиные mAb BDA8 к человеческому LT- $\beta$ -R, была принята на хранение 12 января 1995 года в American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) в соответствии с положениями Будапештского договора (the Budapest Treaty) и ему был присвоен номер по каталогу ATCC HB11798. Все ограничения доступности широкому кругу исследователей вышеуказанных хранилищ ATCC будут окончательно сняты по выдаче патента на данную заявку.

Различные виды анти-LT- $\beta$ -R антител также могут быть созданы с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК (Winter and Milstein, *Nature*, 349, стр. 293-99 (1991)). Например, могут быть сконструированы "химерные" антитела, в которых антиген-связывающий домен антитела животного сшит с постоянным доменом иммуноглобулина человека (например, Cabilly et al., US 4816567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, стр. 6851-55 (1984)). Химерные антитела снижают выраженность наблюдаемых иммуногенных реакций,

вызываемых антителами животных, если последние применяют в клинических лечебных процедурах на человеке.

В дополнение к этому, могут быть синтезированы рекомбинантные "гуманизированные" антитела, которые распознают LT- $\beta$ -R. Гуманизированные антитела представляют собой химерные молекулы, содержащие в основном последовательности человеческого IgG, в которые введены фрагменты, ответственные за специфичное связывание антигена (например, WO 94/04679). Животных иммунизируют желаемым антигеном, соответствующие антитела выделяют и удаляют часть последовательностей вариабельных доменов, ответственную за специфичное связывание антигена. Антиген-связывающие фрагменты животного происхождения затем клонируют в подходящее положение генов человеческих антител, из которых были удалены антиген-связывающие фрагменты. Наличие гуманизированных антител сводит к минимуму применение гетерологичных (межвидовых) последовательностей в человеческих антителах, а индукция ими иммунного ответа у обрабатываемого субъекта менее вероятна.

Конструирование различных классов рекомбинантных анти-LT- $\beta$ -R антител может быть также усовершенствовано созданием химерных или гуманизированных антител, содержащих вариабельные домены анти-LT- $\beta$ -R антител и постоянные домены человеческих антител (CH1, CH2, CH3), выделенных из иммуноглобулинов различных классов. Например, анти-LT- $\beta$ -R IgM антитела с повышенной валентностью антиген-связывающего сайта могут быть рекомбинантно получены путем клонирования антиген-связывающего сайта в векторах, несущих ДНК, кодирующую постоянные домены цепи человеческого IgM (Arulanandam et al., *J. Exp. Med.*, 177, стр. 1439-50 (1993); Lane et al., *Eur. J. Immunol.*, 22, стр. 2573-78 (1993); Traunecker et al., *Nature*, 339, стр. 68-70 (1989)).

В дополнение к этому, стандартные методики рекомбинантной ДНК могут применяться для изменения значений сродства связывания рекомбинантных антител с антигенами путем замены аминокислотных остатков поблизости от антиген-связывающих сайтов. Сродство связывания гуманизированного антитела с антигеном может быть увеличено с помощью мутагенеза, основанного на молекулярном моделировании (Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, стр. 10029-33 (1989); WO 94/04679).

Может оказаться желательным повысить или понизить сродство анти-LT- $\beta$ -R Ab к LT- $\beta$ -R в зависимости от типа ткани-мишени или конкретной предполагаемой схемы лечения. Например, может являться предпочтительной обработка пациента постоянными уровнями анти-LT- $\beta$ -R Ab со сниженной способностью к передаче сигнала через LT- $\beta$ -путь в порядке

полупрофилактического лечения. Кроме того, ингибирующие анти-LT- $\beta$ -R Ab с повышенным сродством к LT- $\beta$ -R могут являться предпочтительными для кратковременных курсов лечения.

#### **Анти-LT- $\beta$ -R антитела как блокаторы LT- $\beta$ -R**

Анти-LT- $\beta$ -R антитела могут быть отобраны путем тестирования их способности ингибировать LT- $\beta$ -R-индуцированную цитотоксичность, направленную на опухолевые клетки (пример 5).

В предпочтительном осуществлении данного изобретения композиции и способы содержат мышиные mAb к человеческому LT- $\beta$ -R BDA8. На фиг. 3 показано, что mAb BDA8 действует как блокатор LT- $\beta$ -R, что определено данным изобретением. Опухолевые клетки WiDr прекращают рост в присутствии IFN- $\gamma$  и растворимого LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лиганды. Контрольные антитела (IgG1) не влияют на данное ингибирование роста. В противоположность этому, анти-LT- $\beta$ -R mAb BDA8 блокирует способность растворимого LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лиганды ингибировать рост клеток WiDr. Таким образом, антитело к человеческому рецептору к LT- $\beta$  способно действовать как блокатор LT- $\beta$ -R, что определено настоящим изобретением.

Тестируя другие антитела к человеческому рецептору к LT- $\beta$ , можно ожидать, что дополнительные анти-LT- $\beta$ -R антитела, которые действуют как блокаторы LT- $\beta$ -R у людей, могут быть идентифицированы с помощью устоявшихся методик постановки эксперимента и анализов, описанных здесь.

#### **Источник антител к поверхностному LT-лиганду**

Другое предпочтительное осуществление данного изобретения содержит композиции и способы, которые включают в себя антитела к LT-лиганду, которые действуют как блокаторы LT- $\beta$ -R. Как описано выше для случая анти-LT- $\beta$ -R Ab, антитела к LT-лиганду, которые действуют как блокаторы LT- $\beta$ -R, могут являться поликлональными или моноклональными и могут быть модифицированы в соответствии с устоявшимися методиками в целях модулирования их антиген-связывающих свойств и их иммуногенности.

Антитела к LT по данному изобретению могут быть выработаны по отдельности к одной из двух субъединиц LT, включая растворимые, мутантные, измененные и химерные формы субъединицы LT. Если в качестве антигена применяют субъединицы LT, они предпочтительно представляют собой субъединицы LT- $\beta$ . Если применяют субъединицы LT- $\alpha$ , предпочтительно, чтобы полученные анти-LT- $\alpha$  антитела связывались с поверхностным LT-лигандом и не вступали в перекрестную реакцию с секретируемым LT- $\alpha$  и не модулировали активность

TNF-R (в соответствии с анализами, описанными в примере 3).

Альтернативно, антитела к гомомерному (LT- $\beta$ ) или гетеромерному (LT- $\alpha$ / $\beta$ ) комплексу, содержащему одну или более субъединиц LT, могут быть выработаны и протестированы на предмет LT- $\beta$ -R-блокирующей активности. Предпочтительно, комплексы LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 применяют в качестве антигена. Как обсуждалось выше, предпочтительно, чтобы полученные анти-LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 антитела связывались с поверхностным LT-лигандом и не связывались с секретируемым LT- $\alpha$  и не влияли на активность TNF-R.

Продукция поликлональных антител к человеческому LT- $\alpha$  описана в совместно поданной заявке авторов настоящей заявки (WO 94/13808). Моноклональные анти-LT- $\alpha$  и анти-LT- $\beta$  антитела также были описаны (Browning et al., J. Immunol., 154, стр. 33-46 (1995)).

Мышьные mAb к человеческому LT- $\beta$  получали, как описано в примере 6. Гибридомная клеточная линия (B9.C9.1), которая продуцирует мышиные mAb B9 к человеческому LT- $\beta$ -R, была принята на хранение 21 июля 1995 года в American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) в соответствии с положениями Будапештского договора (the Budapest Treaty) и ей был присвоен номер по каталогу ATCC HB11962.

Моноклональные антитела хомяка к мышенному LT- $\alpha$ / $\beta$  получали, как описано в примере 7. Гибридомная клеточная линия (BB.F6.1), которая продуцирует mAb хомяка к мышенному LT- $\alpha$ / $\beta$  BB.F6, была принята на хранение 21 июля 1995 года в American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) в соответствии с положениями Будапештского договора (the Budapest Treaty) и ей был присвоен номер по каталогу ATCC HB11963.

Все ограничения доступности широкому кругу исследователей вышеуказанных хранилищ ATCC будут окончательно сняты по выдаче патента на данную заявку.

#### **Антитела к LT-лиганду как блокаторы LT- $\beta$ -R**

Проводили анализ на клеточном сортере с возбуждением флюоресценции (FACS) в целях скрининга на предмет антител к субъединицам LT или комплексам LT, которые действуют как блокаторы LT- $\beta$ -R (примеры 6 и 7). В данном анализе растворимый гибридный белок LT- $\beta$ -R-Fc добавляют к активированным митогеном фитолакки клеткам 11-23, которые экспрессируют поверхностные LT-комpleksы (Browning et al., J. Immunol., 154, стр. 33-46 (1995)) - в присутствии возрастающих концентраций тестируемого антитела. Антитело, которое способно ингибировать взаимодействие рецептора к LT- $\beta$  и его лиганда, по крайней мере, на 20%, отбирают как блокатор LT- $\beta$ -R.

Результаты данного анализа, проведенного в целях тестирования мышиных mAb B9 к человеческому LT- $\beta$ , приведены на фигуре 4. На фигуре 4 показано, что анти-LT- $\beta$  mAb B9 способно избирательно ингибировать связывание растворимых гибридных белков LT- $\beta$ -R-Fc с поверхностными LT-лигандами, индуцированное на активированных клетках. Данные результаты подтверждают представление о том, что антитела к субъединице LT-лиганда будут действовать как блокаторы LT- $\beta$ -R.

Описанный выше FACS-анализ также применяли для тестирования LT, выработанных в организме хомяка к растворимому комплексу мышиных LT- $\alpha/\beta$  (пример 7). Результаты данного анализа, проведенного в целях тестирования mAb хомяка к мышенному LT- $\alpha/\beta$  BB.F6, приведены в таблице 2 (пример 7). В таблице 2 показано, что анти-LT- $\alpha/\beta$  mAb BB.F6 способны эффективно ингибировать связывание растворимых гибридных белков LT- $\beta$ -R-Fc (пример 2) с поверхностными LT-лигандами, экспрессируемыми на клетках мышной Т-клеточной гибридомы, и, таким образом, являются блокаторами LT- $\beta$ -R по данному изобретению.

Предпочтительное применение комплекса LT- $\alpha/\beta$  по сравнению с субъединицей LT в качестве антигена для иммунизации животного может привести к более эффективной иммунизации или может привести к продукции антител, обладающих большим сродством к поверхностному LT-лиганду. Представляется возможным, что в случае иммунизации комплексом LT- $\alpha/\beta$  могут быть выделены антитела, которые распознают аминокислотные остатки на обеих субъединицах LT- $\alpha$  и LT- $\beta$  (например, остатки, которые образуют щель в комплексе LT- $\alpha/\beta$ ). Тестируя антитела к человеческому гетеромерному комплексу LT- $\alpha/\beta$ , можно ожидать, что дополнительные анти-LT антитела, которые действуют как блокаторы LT- $\beta$ -R у людей, могут быть идентифицированы с помощью устоявшихся методик постановки эксперимента и анализов, описанных здесь.

#### **Блокаторы LT- $\beta$ -R ингибируют опосредованную Th1-клетками контактную гиперчувствительность у мышей**

Блокаторы LT- $\beta$ -R по данному изобретению способны ингибировать опосредованные Th1-клетками иммунные реакции. Одной такой опосредованной Th1-клетками реакцией является гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ; Cher and Mosmann, J. Immunol., 138, стр. 3688-94 (1987); смотри также I. Roitt et al., Immunology, стр. 22.1-22.12, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3d ed. (1993) для общего обсуждения). ГЗТ индуцируется, когда сенсибилизованные антигеном Th1-клетки секретируют цитокины после повторного контакта с тем же антигеном.

Цитокины, продуцируемые Th1, являются аттрактантами и стимуляторами макрофагов, которые секретируют дополнительные эффекторные молекулы, которые запускают воспалительные реакции.

Реакции, протекающие по типу ГЗТ, подразделяются на три различных типа: контактную гиперчувствительность, гиперчувствительность туберкулинового типа и гранулематозные реакции. Три типа гиперчувствительности (ГЧ) можно различить по скорости и природе ответа на чужеродный антиген, когда его наносят непосредственно на кожу или вводят под кожу сенсибилизированного субъекта. За ходом реакции ГЗТ следят путем определения скорости и степени отека кожи.

Реакции ГЧ туберкулинового типа представляют собой кожные реакции, которые развиваются в месте введения чужеродного антигена из микроорганизма, с которым субъект ранее контактировал (например, *Mycobacterium tuberculosis* или *M. leprae*). Данную кожную реакцию, которая достигает своего максимума в интервале от 48 до 72 ч после введения антигена, зачастую применяют как базовую для диагностических тестов чувствительности к ранее встречавшимся микроорганизмам (например, туберкулиновый кожный тест). Если развивается повреждение туберкулинового типа, оно может перейти в гранулематозную реакцию при условии, что антиген будет персистировать в ткани.

Гранулематозные реакции являются клинически наиболее серьезными реакциями, протекающими по типу ГЗТ, поскольку они способны привести к развитию множества патологических эффектов, связанных с заболеваниями, опосредованными Th1-клетками. Гранулематозные реакции развиваются в случае, если макрофаги оказываются неспособными элиминировать антигены или иммунные комплексы, и последние продолжают стимулировать секрецию цитокинов Th1. Хроническое воспаление и скопление активированных макрофагов в месте нахождения стимулирующего агента характеризуют гранулематозные реакции.

Ядро из эпителиальных клеток и макрофагов, которое может быть окружено лимфоцитами и фиброзными отложениями, формирует твердое образование, называемое гранулемой. Иногда в центре гранулемы происходит интенсивная клеточная гибель (например, в пораженной туберкулезом ткани легкого). Формирование твердого образования в ткани-мишени гранулематозной реакции протекает в течение приблизительно 4 недель.

Агенты, которые влияют на частоту образования гранулем, могут быть идентифицированы с использованием инфицированных шистосомами мышей (Amiri et al., Nature, 356, стр. 604-607 (1992)). Гельминты шистосомы способны вызывать паразитарное заболевание, которое

ведет к образованию гранулем вокруг яиц шистосом в воротных венулах инфицированной печени. Агенты, которые способны ингибиовать данную опосредованную Th1-клетками реакцию ГЗТ, способны снижать размер гранулем или частоту или скорость образования гранулем в инфицированной шистосомами печени мышей. Клеточная реакция на яйца шистосом может быть оценена с помощью определения изменения количества и размера гранулем, образующихся у мышей, обрабатываемых возрастающими концентрациями предполагаемого блокатора LT- $\beta$ -R с течением времени.

Контактная гиперчувствительность (КГЧ) представляет собой класс ГЗТ, в котором органом-мишенью является кожа. При КГЧ воспалительная реакция вызывается местным нанесением реактивного гаптена на кожу. Аллергены, как правило, состоят из, по крайней мере, одной молекулы гаптена, который обычно очень мал, чтобы являться антигеном самим по себе. Гаптен проникает через эпидермис и взаимодействует под кожей с нормальным белком с образованием нового антигенного комплекса.

Повторный контакт сенсибилизированного субъекта с гаптеном запускает реакцию ГЗТ. Коньюгат гаптена и белка-носителя в сочетании с антиген-презентирующими клетками активирует эффекторные механизмы, которые запускают секрецию цитокинов (включая IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$  и GM-CSF). Каскад секреции цитокинов стимулирует пролиферацию CD4 $^{+}$  Т-клеток, изменение профилей экспрессии различных молекул адгезии клеточной поверхности и миграцию Т-клеток и макрофагов в очаг воспаления в коже. Активация цитокинового каскада и, как следствие, вазодилатация, клеточная инфильтрация и отек дермы и эпидермиса приводят к образованию припухлости и воспалению ткани-мишени, благодаря которым происходит измеримое утолщение кожи в процессе развития реакций ГЗТ.

Степень, до которой конкретный гаптен способен сенсибилизировать индивидуума, зависит от множества факторов. Данные факторы включают параметры прохождения гаптена через кожу и его взаимодействия с белком-носителем хозяина с образованием коньюгата. Один гаптен, который сенсибилизирует почти всех индивидуумов, представляет собой 2,4-динитрофторбензол (ДНФБ).

Кожная реакция на гаптен, такой как ДНФБ, по типу КГЧ представляет собой классическую животную модель клеточно-опосредованного иммунитета. Локализация данной реакции КГЧ на ухе сенсибилизированной мыши позволяет просто, точно и воспроизводимо количественно оценивать данный клеточно-опосредованный иммунный ответ *in vivo* путем измерения толщины уха. Данные об особенностях реакции КГЧ у мышей и гистопатологии ДНФБ-индуцированной воспалительной реак-

ции были опубликованы (Chisholm et al., Eur. J. Immunol., 23, стр. 682-688 (1993)).

Способность ДНФБ вызывать реакцию контактной гиперчувствительности у большинства индивидуумов может быть применена для определения агентов, которые снижают или устраняют воспалительные реакции, связанные с опосредованными Th1-клетками реакциями ГЗТ. Растворимый мышний гибридный белок LT- $\beta$ -R-Fc эффективно ингибирует ДНФБ-индуцированную реакцию контактной гиперчувствительности у мышей (пример 8). Первоначально мышей сенсибилизировали путем нанесения ДНФБ на нижнюю часть каждой задней лапы в течение двух дней подряд. Через пять дней после первичной сенсибилизации на поверхность левого уха наносили субирритантную дозу ДНФБ в растворе-носителе. Растворноситель в отдельности наносили на правое ухо в качестве контроля.

Затем возрастающие концентрации блокатора LT- $\beta$ -R mLT- $\beta$ -R-Fc (пример 2) внутривенно вводили мышам (пример 8). Инъекции фосфатно-солевого буфера в отдельности или гибридного белка IgG человека (LFA3-Fc) служили в качестве отрицательных контролей, а инъекция mAb, специфичных к VLA4, (mAb PS/2), которые ингибируют КГЧ, служила в качестве положительного контроля. Через двадцать четыре часа после иммунной стимуляции измеряли толщину каждого уха (ДНФБ-стимулированного и нестимулированного). Об ингибировании реакции отека уха блокатором LT- $\beta$ -R судили по сравнению обрабатываемых групп с группой отрицательного контроля.

На фиг. 5 показано, что mLT- $\beta$ -R-Fc вызывает значительное уменьшение реакции отека уха у мышей, обработанных ДНФБ, по сравнению с ДНФБ-обработанными контрольными животными, не получившими инъекции ингибитора, (PBS и LFA3-Fc). Растворимый LT- $\beta$ -R способен ингибировать данную реакцию КГЧ так же эффективно, как и ингибирующее mAb, специфичное к VLA4, (mAb PS/2), которое действует путем ингибирования миграции Т-клеток в место действия стимула (Chisholm et al., Eur. J. Immunol., 23, стр. 682-688 (1993)).

Эти данные показывают, что растворимый гибридный белок LT- $\beta$ -R, который действует как блокатор LT- $\beta$ -R *in vitro*, также способен эффективно ингибировать опосредованную Th1-клетками иммунную реакцию, будучи введен в организм животного. Блокаторы LT- $\beta$ -R по данному изобретению, идентифицированные *in vitro*, могут быть протестированы с помощью данного анализа отека уха или других анализов на ГЗТ, как описанные выше, для выбора дополнительных блокаторов LT- $\beta$ -R, которые были бы применимы для уменьшения тяжести связанных с Th1-клетками иммунных реакций *in vivo*.

### Блокаторы LT-β-R не ингибируют опосредованный Th2-клетками (гуморальный) иммунный ответ

Как показано выше, блокаторы LT-β-R по данному изобретению способны ингибирировать опосредованный Th1-клетками эффекторный механизм, такой как контактная гиперчувствительность замедленного типа (фиг. 5). Данная опосредованная Th1-клетками реакция ингибируется без оказания значительного влияния на зависимые от Th2-клеток реакции. Дифференциальный эффект блокаторов LT-β-R на опосредованные Th1-клетками иммунные реакции был продемонстрирован с помощью наблюдения за зависимыми от Th2-клеток реакциями - такими как первичный гуморальный ответ и переключение изотипов - в присутствии блокатора LT-β-R.

Мышам пять раз в течение десятидневного промежутка времени вводили либо растворимый гибридный белок LT-β-R (mLT-β-R-Fc; пример 2), либо контрольный гибридный белок IgG человека (LFA3-Fc), либо оставляли необработанными. После второго введения всем мышам вводили в основание хвоста 100 мкл полного адьюванта Фройнда, содержащего 100 мкг овальбумина. Через 11 дней анализировали первичные сывороточные титры антител, специфичных к овальбумину, с помощью ELISA, специфичного к изотипам IgG1, IgG2a и IgM.

На фиг. 6 показан эффект блокатора мышного LT-β-R mLT-β-R-Fc на продукцию сывороточных антител к овальбумину у мышей, иммунизированных овальбумином (пример 9). Введение блокатора LT-β-R не влияет значительно на первичные титры антител после иммунизации овальбумином. В качестве сравнения, вмешательство в процесс CD40-лиганд-индукции передачи сигнала через рецептор CD40 полностью ингибирует антиген-специфичный IgG ответ у мышей (Renshaw et al., J. Exp. Med., 180, стр. 1889-1900 (1994)). CD40 представляет собой еще одну пару лиганд/рецептор из семейства TNF.

Весь процесс продукции и созревания иммуноглобулинов, несомненно, является зависимым от Th2-клеток. Однако, также очевидно, что продуцируемый Th1 цитокин IFN-γ принимает участие, но не является абсолютно необходимым для переключения на подкласс IgG2a (Huang et al., Science, 259, стр. 1742-45 (1993)). Блокатор LT-β-R mLT-β-R-Fc не ингибирировал переключение на IgG2a в данных экспериментах. Возможно, что блокаторы LT-β-R по данному изобретению не ингибируют данное гуморальное направление опосредованной Th1-клетками реакции. В дополнение к этому, параметры пролиферативных реакций лимфоцитов из мышей, обработанных mLT-β-R-Fc, не снижались (пример 10; фиг. 7).

Результаты данных экспериментов указывают на то, что лечение, основанное на введении блокаторов LT-β-R по данному изобретению, не окажет неблагоприятного влияния на функции Th2-зависимой продукции антител при развитии иммунного ответа. Нормальный профиль гуморального ответа, приведенный на фиг. 6, также указывает, что интенсивная обработка растворимым mLT-β-R-Fc была нетоксичной для мышей, что далее указывает на применимую в терапии природу композиций и способов, изложенных далее в данном изобретении.

### Заболевания, опосредованные Т-хелперными клетками

Оказывается, что во многие органо-специфичные аутоиммунные состояния вовлечен патологический Th1-ответ. По этим данным был составлен обзор (Modlin and Nutman, Current. Opinion in Immunol., 5, стр. 511-17 (1993); Romagnani et al., Ann. Rev. Immunol., 12, стр. 227-57 (1994)). Данные органо-специфичные аутоиммунные состояния включают в себя: рассеянный склероз, инсулин-зависимый сахарный диабет, симпатическая офтальмия, увеит и псoriasis.

Инсулин-зависимый сахарный диабет представляет собой аутоиммунное заболевание, при котором инсулин-продуцирующие бета-клетки поджелудочной железы разрушены лейкоцитами, инфильтрующими островки Лангерганса. Диабет может быть с легкостью индуцирован у новорожденных нетучных диабетических (neonatal nonobese diabetic) (NOD) мышей путем переноса активированных преддиабетических спленоцитов. Недавно Th1- и Th2-подобные клетки, по другим признакам генетически идентичные, переносили новорожденным мышам NOD. Быстрое развитие диабета индуцировали только Th1-клетки - причем почти у всех реципиентов (Katz et al., Science, 268, стр. 1185-88 (1995)). Данный факт указывает на то, что блокаторы LT-β-R по данному изобретению, которые способны ингибирировать эффекты опосредованной Th1-клетками иммунной реакции *in vivo*, будут применимы для лечения или предотвращения инсулин-зависимого сахарного диабета.

Некоторые системные аутоиммунные заболевания, включая различные поражения кожи ревматического происхождения, являются ассоциированными с Th1-клетками. Оказывается, что в развитие как ревматоидного артрита, так и сухого кератоконъюнктивита, вовлечены Th0- и Th1-клетки. В противоположность этому, системная красная волчанка (СКВ) протекает по типу аберрантной реакции с преобладанием роли Th0/Th2.

Некоторые хронические воспалительные заболевания также протекают по типу аберрантной Th1-опосредованной реакции, включая синдром воспаленной (раздраженной?) толстой

кишки, саркоидоз легкого и отторжение аллотрансплантата. Синдром воспаленной (раздраженной?) толстой кишки (СВТК) у людей включает в себя, по крайней мере, две категории: язвенный колит и болезнь Крона. Считается, что оба заболевания являются результатом иммунопатологических нарушений аутоиммунного типа. В некоторых моделях СВТК на мышах очевидно, что некоторые агенты, которые ингибируют Th1-опосредованные реакции, способны ингибировать развитие или течение заболевания (F. Powrie et al., *Immunity* 1:553 1994). Возможно, что ингибирование Th1-зависимого компонента иммунного ответа возымеют благоприятные эффекты при СВТК у человека, многие модели СВТК были описаны и включены в обзоры (C. Elson et al., *Gastroenterology* 109:1344 1995). Существует, по крайней мере, три группы моделей: индуцированные химическим агентом, индуцированные полимерным/микробным агентом и модели иммунологического типа с использованием мутантных мышей.

В одной часто применяемой индуцированной полимерным/микробным агентом модели раствор декстрансульфата вводят мышам в питьевую воду, и после приема внутрь эпителиальная выстилка кишечника раздражается, что ведет к массивному иммунному ответу на повреждение. У животных развивается колит, который проявляется в виде диареи, стула с кровью, потери массы тела и уменьшения длины кишечника благодаря утолщению стенки кишечника. В данной модели развиваются признаки язвенного колита: левосторонний колит и дисплазия эпителия, которая может привести к образованию злокачественной опухоли.

Вторая модель включает в себя трансплантацию отобранной группы CD4 Т-клеток мышам scid, т.е. мышам, у которых отсутствуют Т- и В-клетки (F. Powrie et al., *International Immunology* 5:1461-1471 1993; Morrissey et al., *J. Exp. Med.* 178:237 1993). Так как отобранные клетки, называемые CD45RB<sup>hi</sup>- клетки, распространяются и заселяют лимфоидные органы мышей scid, нормальные механизмы предотвращения возникновения аутоактивных Т-клеток не способны функционировать нормально, и аутоактивные клетки развиваются. У крыс наблюдается появление клеток, реактивных ко многим органам, тогда как у мышей реактивность наблюдается преимущественно к кишечнику. В данной модели эффективными будут являться либо агенты, которые изменяют характер распространения и развития аутоактивных клеток, либо агенты, которые ингибируют способность клеток атаковать клетки кишечника. Более того, поскольку данная модель, по крайней мере, частично имитирует патологическое развитие аутоактивных иммуно-компетентных клеток, обработка, с помощью которой ингибируется данная модель, фактически может иметь модифицирующий течение заболевания эффект

у человека. В данной модели развитие заболевания может быть ингибирировано с помощью антител к TNF (F. Powrie et al., *Immunity* 1, 552 1994), и было обнаружено, что данные антитела эффективны в лечении заболеваний человека (H.M. van Dullemen et al., *Gastroenterology* 109:109 1995). Таким образом, с помощью данной модели можно предсказать, какие агенты могут найти терапевтическое применение при СВТК. Более того, поскольку модель CD45RB является примером развития Th1-опосредованного заболевания, и фактически у крыс в данной модели развиваются заболевания многих органов, эффективность LT-β-R-Ig в данной системе указывает на то, что LT-β-R-Ig или другие средства, ингибирующие взаимодействие LT-β-R со своим лигандом, могут оказать благоприятный эффект в лечении широкого круга родственных иммунных заболеваний.

Вообще, точный размер вклада аутоантител по сравнению со специфичными Т-клетками при данных аутоиммунных заболеваниях не был описан. Клеточные реакции могут вносить основной вклад в патогенез тех системных аутоиммунных заболеваний, которые в настоящее время считаются вызываемыми преимущественно антителами, например, различные поражения кожи ревматического происхождения.

Нормальный иммунный ответ на некоторые патогенные инфекционные агенты также включает в себя Th1-опосредованный ответ, который может стать избыточным и начать представлять медицинскую проблему сам по себе. Примеры гранулематозных реакций (класса реакции ГЗТ, описанного выше), которые ведут к развитию тяжелых проблем со здоровьем, включают в себя лепру, образование гранулем в легких больных туберкулезом, саркоидоз и шистосомоз (Roitt et al., *Immunology*, стр. 22.5-6 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3d ed. 1993)). Видимо, течение псориаза также опосредовано Th1-клетками.

Цитолитические Т-клетки, т.е. CTL (CD8-положительные Т-клетки) также могут быть подразделены на Th1- и Th2-подобные популяции. Таким образом, возможно, что многое из того, что известно о группах Th также применимо и к CD8<sup>+</sup>-клеткам, которые преимущественно вовлечены в антивирусный ответ и реакцию отторжения трансплантированной ткани.

#### **Способы лечения с применением блокаторов**

##### **LT-β-R**

Композиции по данному изобретению будут вводиться в эффективной дозе для направленного лечения конкретного клинического состояния. Определение предпочтительного фармацевтического состава и терапевтически эффективной схемы приема лекарственного средства для данного применения проводят по методике, известной в данной области, принимая во внимание, например, состояние и массу тела

пациента, объем желаемого лечения и переносимость пациентом такого лечения. Ожидается, что дозы растворимого LT- $\beta$ -R приблизительно в 1 мг/кг будут являться подходящими начальными точками для оптимизации терапевтических доз.

Определение терапевтически эффективной дозы также может быть проведено путем постановки экспериментов *in vitro*, с помощью которых измеряют концентрацию блокатора LT- $\beta$ -R, необходимую для того, чтобы покрыть клетки-мишени (LT- $\beta$ -R- или LT-лиганд-положительные клетки в зависимости от блокатора) на срок от 1 до 14 суток. Анализы лиганд-рецепторного связывания, описанные здесь, могут быть применены для контроля за реакцией покрытия клеток. LT- $\beta$ -R- или LT-лиганд-положительные клетки могут быть отобраны из популяций активированных лимфоцитов с помощью FACS. На основании результатов данных анализов связывания *in vitro* можно выбрать интервал подходящих концентраций блокатора LT- $\beta$ -R для испытания на животных в соответствии с анализами, описанными здесь.

Введение растворимых молекул LT- $\beta$ -R Ab к LT-лиганду и к LT- $\beta$ -R по данному изобретению, одних или в сочетании, включая выделенные и очищенные формы антител или комплексов, их солей и их фармацевтически пригодных производных, может быть завершено с помощью любого общепринятого способа введения агентов, которые проявляют иммуносупрессивную активность.

Фармацевтические композиции, применяемые в данных способах лечения, также могут находиться во множестве форм. Они включают в себя, например, твердые, полутвердые и жидкие дозированные формы, такие как таблетки, пилюли, порошки, жидкие растворы или супензии, суппозитории и растворы для инъекций и инфузий. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Способы введения могут включать пероральное, парентеральное, подкожное, внутривенное, внутриочаговое и местное введение.

Растворимые молекулы LT- $\beta$ -R Ab к LT-лиганду и к LT- $\beta$ -R по данному изобретению могут быть помещены, например, в стерильные изотонические составы, содержащие или не содержащие кофакторы, которые стимулируют поглощение или устойчивость. Состав является, предпочтительно, жидким или может представлять собой лиофилизованный порошок. Например, растворимые молекулы LT- $\beta$ -R Ab к LT-лиганду и к LT- $\beta$ -R по данному изобретению могут быть разбавлены буферным составом, содержащим 5,0 мг/мл моногидрата лимонной кислоты, 2,7 мг/мл трехзамещенного цитрата натрия, 41 мг/мл маннитола, 1 мг/мл глицина и 1 мг/мл полисорбата 20. Данный раствор может

быть лиофилизирован, положен на хранение в замороженном состоянии, а объем может быть доведен до введения стерильным Water-For-Injection (USP).

Также композиции будут, предпочтительно, содержать традиционные фармацевтически пригодные носители, хорошо известные в данной области (смотри, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Edition, 1980, Mac Publishing Company). Такие фармацевтически пригодные носители могут включать другие лекарственные средства, носители, генетические носители (genetic carriers), адьюванты, разбавители и т.д., такие как человеческий сывороточный альбумин или препараты плазмы. Композиции, предпочтительно, находятся в форме разовых доз и обычно будут вводиться один или более раз в сутки.

Фармацевтические композиции по данному изобретению могут также быть введены с применением микросфер, липосом, других систем доставки на основе микрочастиц или составов продолжительного высвобождения непосредственно в пораженные ткани, в их окружение или иным образом в контакт с пораженными тканями или с кровотоком. Показательные примеры носителей продолжительного высвобождения включают полупроницаемые полимерные матрицы в форме заостренных предметов, таких как суппозитории или микрокапсулы. Имплантируемые или микрокапсулярные матрицы продолжительного высвобождения включают полилактиды (патент США № 3773319; ЕР 58481), сополимеры L-глютаминовой кислоты и этил-L-глютамата (Sidman et al., Biopolymers, 22, стр. 547-56 (1985)); поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или этиленвинилацетат (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15, стр. 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12, стр. 98-105 (1982)).

Липосомы, содержащие растворимые молекулы LT- $\beta$ -R Ab к LT-лиганду и к LT- $\beta$ -R по данному изобретению, одни или в сочетании, могут быть получены в соответствии с хорошо известными способами (смотри, например, DE 3218121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, стр. 3688-92 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, стр. 4030-34 (1980); Патенты США № 4485045 и 4544545). Обычно липосомы относятся к типу небольших (приблизительно 200-800 Ангстрем) однослоистых липосом, содержание холестерина составляет более 30 мол.% от содержания липидов. Пропорцию содержания холестерина выбирают так, чтобы контролировать оптимальную скорость высвобождения растворимых молекул LT- $\beta$ -R Ab к LT-лиганду и к LT- $\beta$ -R.

Растворимые молекулы LT- $\beta$ -R Ab к LT-лиганду и к LT- $\beta$ -R по данному изобретению также могут быть присоединены к липосомам, содержащим другие блокаторы LT- $\beta$ -R, иммуносупрессивные средства или цитокины для

модулирования LT- $\beta$ -R-ингибирующей активности. Присоединение к липосомам молекул LT- $\beta$ -R, Ab к LT-лиганду и к LT- $\beta$ -R может быть проведено с помощью любого известного поперечно-сшивающего агента, такого как гетеробифункциональные агенты, которые широко применяли для присоединения токсинов или химиотерапевтических средств к антителам для направленной доставки. Коньюгация с липосомами также может быть проведена с помощью углевод-направленного поперечно-сшивающего реагента гидразида 4-(4-малеимидофенил)масляной кислоты (ГМФМ) (Duzgunes et al., J. Cell. Biochem. Abst. Suppl. 16E 77 (1992)).

#### Преимущества терапевтических композиций, содержащих блокаторы LT- $\beta$ -R

Блокаторы LT- $\beta$ -R по данному изобретению способны избирательно ингибировать зависимости от Th1- и Th2-клеток иммунные эффекторные механизмы. Блокаторы LT- $\beta$ -R будут применимы в лечении состояний, которые обостряются благодаря активностям цитокинов, продуцируемых Th1 (например, IL-2 и IFN- $\gamma$ ). Поскольку цитокины, продуцируемые Th1, способны ингибировать реакции, зависящие от Th2-клеток, блокаторы LT- $\beta$ -R могут также косвенно стимулировать определенные реакции, зависящие от Th2-клеток, которые в норме ингибируются Th1-индуцированными цитокиновыми каскадами.

Способность избирательно подавлять клеточные реакции, опосредованные Th1, (или косвенно стимулировать таковые, опосредованные Th2), будет применима для лечения аномалий при разнообразных клеточно-опосредованных иммунных реакциях, включая различные аутоиммунные и хронические воспалительные состояния, толерантность к антигенам и клеточную реакцию отторжения трансплантатов тканей и органов.

Как обсуждалось выше, в лечении иммунных состояний с преобладающей ролью Th1-клеток обычно применяют иммуномодуляторы и иммуносупрессоры, которые обладают плейотропными эффектами на широкий круг типов клеток и иммунных реакций. Обычно требуется применение данных неспецифических иммуносупрессоров в высоких и зачастую цитотоксических дозах, что вызывает неблагоприятные побочные эффекты.

Наличие способности изменять характер иммунного ответа подтверждено недавними исследованиями сахарного диабета у мышей, что обсуждалось выше (Katz et al., Science, 268, стр. 1185-88 (1995)), и модели аллогенной трансплантации (Sayegh et al., J. Exp. Med., 181, стр. 1869-74 (1995)). В последнем из них было показано, что гибридный белок, который ингибирует костимуляторный путь CD28-B7 Т-клеток, вызывает толерантность к трансплантату почки. Толерантность коррелировала со сни-

жением концентрации цитокинов, продуцируемых Th1, и повышением концентрации цитокинов, продуцируемых Th2, *in vivo*. Эти данные указывают на то, что блокаторы LT- $\beta$ -R по данному изобретению будут применимы для подавления клеточной реакции отторжения трансплантатов тканей и органов путем подавления секреции цитокинов Th1-клетками.

Блокаторы LT- $\beta$ -R из композиций и способов по данному изобретению могут быть модифицированы с получением желаемого уровня передачи сигнала через LT- $\beta$ -R в зависимости от состояния, подвергающегося лечению нарушения или заболевания. Представляется, что абсолютный уровень передачи сигнала через LT- $\beta$ -R может быть точно настроен путем манипулирования концентрацией и значениями средства блокаторов LT- $\beta$ -R к соответствующим им молекулярным мишениям.

Например, в одном осуществлении данного изобретения субъекту вводят композиции, содержащие растворимые молекулы LT- $\beta$ -R. Растворимый рецептор к LT- $\beta$  способен эффективно конкурировать с рецепторами к LT- $\beta$  клеточной поверхности за связывание поверхностных LT-лигандов. Способность конкурировать за связывание поверхностных LT-лигандов зависит от относительных концентраций растворимых молекул LT- $\beta$ -R и молекул LT- $\beta$ -R клеточной поверхности и от их относительных аффинностей к связыванию лиганда.

Растворимые молекулы LT- $\beta$ -R, несущие мутации, которые повышают или снижают сродство связывания данного мутантного растворимого LT- $\beta$ -R с поверхностным лигандом, могут быть получены с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК, хорошо известных специалистам в данной области. Большие количества молекул с сайт-специфичными или случайными мутациями могут быть протестированы на предмет их способности действовать как блокаторы LT- $\beta$ -R с применением устоявшихся методик постановки эксперимента и анализов, описанных здесь.

Сходным образом, в другом осуществлении данного изобретения антитела либо к рецептору к LT- $\beta$ , либо к одной или более субединицам LT-лиганда функционируют как блокаторы LT- $\beta$ -R. Способность данных антител ингибировать передачу сигнала через LT- $\beta$ -R может быть модифицирована с помощью мутации, химической модификации или других методов, с помощью которых можно изменять эффективную концентрацию или активность антител, введенных субъекту.

Способность снижать передачу сигнала через LT- $\beta$ -R без ее полного ингибирования может оказаться важной для установления или поддержания сниженных уровней передачи сигнала через LT- $\beta$ -R, которые поддерживают нормальное функционирование иммунной системы,

при ингибиравании реакций, опосредованных Th1-клетками, когда те являются избыточными или аномальными.

Разрушения гена LT- $\alpha$  у мышей приводят к отклонению от нормы в развитии периферических лимфоидных органов (De Togni et al., *Science*, 264, стр. 703-7 (1994)). У таких мышей отсутствовали лимфатические узлы, а в их селезенке отсутствовало обычно четкое разделение между Т- и В-зонами в фолликулах. Авторы считают, что данный фенотип связан с утратой индуцированной поверхностным LT-лигандом передачи сигнала через LT- $\beta$ -R, поскольку при модулировании активности TNF-R сходные фенотипы не наблюдались. Таким образом, способность избирательно или частично ингибиовать LT- $\beta$ -R-путь может быть применена в лечении аномалий развития лимфоидных органов, связанных с аномальной или избыточной экспрессией передачи сигнала через LT- $\beta$ -R-путь.

Некоторые Th1-ассоциированные реакции являются принципиально важными компонентами ряда клеточно-опосредованных иммунных ответов (Romagnani et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12, стр. 227-57 (1994)), и полное ингибиравание Th1-клеточной активности при определенных обстоятельствах может быть нежелательным. Например, если может развиться значительный Th1-ответ, мышь может эффективно противостоять паразитарной инфекции. Инфекционные агенты, такие как *Listeria* и *Toxoplasma*, также вызывают сильные ответы Th1-типа. У человека в ответе на инфекцию *Mycobacterium tuberculosis* преобладающую роль играют Th1. Патогенность возбудителя лейшманиоза коррелирует с реакциями, сходными с Th1-ответами, охарактеризованными у мышей (Reed and Scott, *Current Opinion in Immunol.*, 5, стр. 524-31 (1993)).

Возможность оказывать влияние на уровень ингибиравания Th1 путем ингибиравания передачи сигнала через LT- $\beta$ -R может оказаться важной для получения предельно полезных результатов, которые только могут быть получены путем обработки блокаторами LT- $\beta$ -R по данному изобретению.

Далее следуют примеры, которые иллюстрируют растворимые молекулы LT- $\beta$ -R Ab к LT-лиганду и к LT- $\beta$ -R по данному изобретению и способы, примененные для их охарактеризации. Данные примеры не следует истолковывать как ограничивающие: примеры включены в целях иллюстрации, а настоящее изобретение ограничено лишь формулой изобретения.

Пример 1. Получение растворимых человеческих рецепторов к LT- $\beta$  в виде гибридных белков с Fc-доменом иммуноглобулина.

Последовательность из клона человеческой кДНК, выделенную из библиотеки человеческих транскрибуемых последовательностей 12p, взятой из гибридной соматической клетки (Baens et al., *Genomics*, 16, стр. 214-18 (1993)),

ввели в GenBank, а затем идентифицировали как последовательность, которая кодирует человеческий LT- $\beta$ -R. Последовательность данного полного клона кДНК человеческого LT- $\beta$ -R доступна с 1992 года как ввод в GenBank L04270.

Внеклеточный домен LT- $\beta$ -R до трансмембранных фрагмента (фиг. 1) амплифицировали с помощью PCR с клона кДНК с применением праймеров, которые включали в себя сайты рестрикции NotI и Sall на 5'- и 3'-концах соответственно (Browning et al., *J. Immunol.*, 154, стр. 33-46 (1995)). Амплифицированный продукт вырезали с помощью NotI и Sall, очищали и лигировали к NotI-линеаризованному вектору pMDR901 вместе с Sall-NotI-фрагментом, кодирующим Fc-домен человеческого IgGI. Полученный вектор содержал ген дигидрофолатредуктазы и ген гибридного белка LT- $\beta$ -R-Fc, транскрипция которых запускалась отдельными промоторами.

Вектор электропорировали в клети СНО dhfr<sup>r</sup> и выделяли метотрексатрезистентные клонны согласно стандартным методикам. LT- $\beta$ -R-Fc секретировался в среду, и для выбора клеточных линий, продуцирующих наивысший уровень рецепторного гибридного белка, применяли ELISA. Клеточные линии с высоким уровнем продукции культивировали в больших количествах и кондиционную среду отбирали. Чистый гибридный белок рецептора к LT- $\beta$  выделяли по методу высокоскоростной аффинной хроматографии на Protein A Sepharose (Pharmacia).

Пример 2. Получение растворимых мышиных рецепторов к LT- $\beta$  в виде гибридных белков с Fc-доменом иммуноглобулина.

Полный клон кДНК mLT- $\beta$ -R получали путем лигирования 5'-NotI/ApaLI- и 3'-ApaLI/NotI-фрагментов из двух частичных изолятов кДНК в сайт NotI pCDNA3 (InVitrogen, San Diego, CA). Последовательность данного клона кДНК доступна как ввод в GenBank U29173. При сравнении с другой последовательностью, кодирующей mLT- $\beta$ -R, находящейся в GenBank под номером L38423, не было отмечено различий в кодирующих последовательностях.

Растворимый гибридный белок mLT- $\beta$ -R (hIgGI) получали путем амплификации с помощью PCR, используя полный клон кДНК mLT- $\beta$ -R в качестве матрицы и праймеры 5'-AACTGCAGCGGCCATGCGCTGGCCC-3' и 5'-GACTTTGTCGACCATTGCTCCTGGCTCTGGGG-3'. Амплифицированный продукт очищали и вырезали с помощью NotI Sall и лигировали с Sall/NotI Fc-доменом человеческого IgGI в NotI-линеаризованный и обработанный фосфатазой вектор SAB132 с получением JLB122. В целях обеспечения устойчивой экспрессии в сайт NotI pMDR901 переносили кассету NotI, содержащую mLT- $\beta$ -R-Fc-фрагмент, с получением PSH001 и данным вектором трансфициро-

вали клетки СНО, как было описано (Browning et al., J. Immunol., 154, стр. 33-46 (1995)). Клоны клеток, секретирующих mLT- $\beta$ -R-Fc, идентифицировали с помощью ELISA. Очищенный рецепторный гибридный белок выделяли из супернатанта клеток СНО по методу высокоскоростной аффинной хроматографии на Protein A Sepharose (Pharmacia).

Пример 3. Применение растворимого человеческого LT- $\beta$ -R-Fc для ингибиования взаимодействия рецептора к LT- $\beta$  и его лиганда.

Растворимый hLT- $\beta$ -R-Fc тестировали на предмет его способности ингибиовать связывание LT-лиганды с рецептором к LT- $\beta$  с помощью анализа цитотоксичности, направленной на опухолевые клетки, описанного выше. В данном анализе растворимую форму LT-лиганды (LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2), которая стимулирует передачу сигнала через LT- $\beta$ -R, применяют для цитолиза человеческих опухолевых клеток. Ингибиторы передачи сигнала через LT- $\beta$ -R способны снижать LT- $\beta$ -R-индуцированную цитотоксичность, направленную на опухолевые клетки.

Растворимые LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лиганды состоят из усеченных или модифицированных субъединиц LT- $\beta$  без функционального трансмембранных домена. Растворимые LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лиганды связываются с LT- $\beta$ -R и стимулируют передачу через него сигнала так же, как и поверхностные формы LT-лиганда (Browning et al., J. Immunol., 154, стр. 33-46 (1995)).

Серийные разведения hLT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2, hTNF или hLT- $\alpha$  готовили в 0,05 мл в 96-луночных планшетах и 5000 трипсинизированных клеток HT29 (ATCC) вносили в 0,05 мл среды, содержащей 80 Ед/мл (в антивирусных единицах) huINF- $\gamma$ . Через 4 дня содержание восстановленного митохондриями красителя MTT измеряли следующим образом: добавляли 10 мкл MTT и через 3 ч восстановленный краситель растворяли 0,09 мл изопропанола с 10 мм HCl и ОП измеряли на 550 нм. До внесения клеток добавляли растворимые формы рецептора или чистый человеческий IgG в 10 мкл с получением конечной концентрации 5 мкг/мл.

В таблице 1 сравнивается способность hLT- $\beta$ -R-Fc и химерных молекул p55-TNF-R-Fc (с человеческим IgG в качестве контроля) блокировать ингибирующие эффекты различных растворимых TNF- и LT-лигандов на рост опухолевых клеток HT29.

Таблица 1.

Способность белков LT- $\beta$ -R и p55-TNF-R, гибридизованных с иммуноглобулином, блокировать ингибирующие эффекты различных TNF- и LT-лигандов на рост HT29.

Концентрация цитотоксического агента (нг/мл), приводящая к 50%-ному ингибированию роста.

В присутствии <sup>a</sup>			
Цитотоксический агент	Контрольный hIgG	p55-TNF-R-Fc	LT- $\beta$ -R-Fc
TNF	0,08	>10 <sup>b</sup>	0,08
LT- $\alpha$	3	>1000	3
LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2	5	5	>200

<sup>a</sup> Каждый цитотоксический агент предварительно смешивали с белками, гибридизованными с Ig, за 10 мин до добавления к клеткам. Конечная концентрация гибридного белка составила 5 мкг/мл.

<sup>b</sup> Более высокие концентрации не тестировали.

Данные в таблице 1 указывают на то, что растворимый гибридный белок человеческого LT- $\beta$ -R (hLT- $\beta$ -R-Fc) способен эффективно ингибиовать взаимодействие между LT-лигандом (LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2) и рецепторами к LT- $\beta$  клеточной поверхности и, таким образом, является блокатором LT- $\beta$ -R по данному изобретению.

Как и ожидалось, растворимый гибридный белок TNF-R (p55-TNF-R-Fc) полностью блокировал TNF-индуцированное ингибиование роста путем связывания с TNF и предотвращения его взаимодействия с поверхностными рецепторами к TNF. Данный растворимый рецептор к TNF не оказывает влияния на LT-лиганд-опосредованные антитромиферативные эффекты. В противоположность этому, LT- $\beta$ -R-Fc ингибиравал LT-лиганд-индуцированные цитотоксические эффекты, но не таковые, индуцированные TNF или LT- $\alpha$ . Таким образом, гибридные белки человеческого LT- $\beta$ -R не вмешиваются в активацию TNF-R TNF и лигандами LT- $\alpha$ .

Пример 4. Применение растворимого мышьего LT- $\beta$ -R-Fc для ингибиования взаимодействия мышьего рецептора к LT- $\beta$  и его лиганда.

Растворимый мышьный рецептор к LT- $\beta$ , сшитый с Fc-доменом человеческого IgGI (mLT- $\beta$ -R-Fc: смотри пример 2) тестировали на предмет его способности ингибиовать связывание рецептора к LT- $\beta$  со своим лигандом с помощью анализа цитотоксичности, направленной на мышевые клетки (фиг. 2). Анализ цитотоксичности проводили на клетках WEHI 164, применяя, по существу, ту же методику, которая была применена в анализе на клетках HT29, описанном в примере 3 (смотри также Browning and Ribolini, J. Immunol., 143, стр. 1859-67 (1989)).

На фиг. 2 показаны эффекты mLT- $\beta$ -R-Fc на лиганд-индуцированную передачу сигнала через LT- $\beta$ -R на мышевых клетках WEHI 164. Как показано данным анализом, клетки WEHI 164 гибнут при обработке растворимым LT- $\alpha$ 1/ $\beta$ 2-лигандом в концентрациях в интервале от 1 до 100 нг/мл. mLT- $\beta$ -R-Fc ингибиует LT-лиганд-стимулированную клеточную гибель. Добавление растворимого мышьего гибридного белка p55-TNF-R-Fc или контрольных анти-тел IgG (каждого по 10  $\mu$ мл) обладает незначи-

тельным или не обладает эффектом на ингиби-  
рование клеточной гибели.

Эти данные показывают, что гибридный  
белок mLT- $\beta$ -R-Fc способен эффективно конку-  
рировать с поверхностными молекулами LT- $\beta$ -R  
за связывание LT-лиганда. Эти данные также  
показывают, что LT- $\alpha/\beta$ -индуцированная цито-  
токсичность является LT- $\beta$ -R-опосредованной и  
может быть ингибирирована растворимым mLT- $\beta$ -  
R-Fc, который действует как блокатор LT- $\beta$ -R  
по настоящему изобретению.

Пример 5. Применение антител к челове-  
ческому LT- $\beta$ -R для ингибирирования взаимодей-  
ствия рецептора к LT- $\beta$  и его лиганда.

Мышьи моноклональные антитела mAb  
к человеческому рецептору к LT- $\beta$  получали  
путем неоднократной внутрибрюшинной имму-  
низации мышей RBF гибридным белком hLT- $\beta$ -  
R-Fc, полученным из клеток СНО, посаженным  
на гранулы Protein A Sepharose в отсутствие  
адьюванта. В итоге животных повторно имму-  
низировали растворимым hLT- $\beta$ -R-Fc как вну-  
трибрюшинно, так и внутривенно, клетки селе-  
зенки гибридизовали в соответствии с классиче-  
скими методиками и супернатанты гибридом  
исследовали с помощью ELISA (Ling et al., Inter-  
feron and Cytokine Res., 15, стр. 53-59 (1995)).  
Супернатанты гибридом исследовали далее на  
предмет способности ингибирировать связывание  
активированных клеток гибридомы II-23 - кото-  
рые экспрессируют поверхностный LT- $\alpha/\beta$  - с  
покрытыми LT- $\beta$ -R-Fc планшетами в анализе  
клеточного пэннинга. Чистые mAb получали  
путем очистки IgG из культуральных суперна-  
тантов на Protein A Sepharose (Pharmacia).

Для того, чтобы определить, способны ли  
mAb к рецептору к LT- $\beta$  ингибирировать передачу  
сигнала через LT- $\beta$ -R, стимулированную связы-  
ванием растворимого LT, может быть поставлен  
анализ цитотоксичности, направленной на опу-  
холевые клетки, с применением клеток WiDr  
человеческой карциномы. В анализах цитоток-  
сичности серийные разведения LT- $\alpha/\beta$ 2 готови-  
ли в 0,05 мл в 96-луночных планшетах и до-  
бавляли 10 мкл 100 мкг/мл раствора, содержа-  
щего либо контрольные мышиные mAb IgGI,  
либо mAb к рецептору к LT- $\beta$ . Затем в каждую  
лунку вносили 5000 трипсинизированных кле-  
ток WiDr (ATCC) в 0,05 мл среды, содержащей  
50 ЕД/мл (в антивирусных единицах) hIFN- $\gamma$ .  
Через 4 дня содержание восстановленного ми-  
тохондриями красителя МТТ измеряли сле-  
дующим образом: добавляли 10 мкл МТТ и че-  
рез 3 ч восстановленный краситель растворяли  
0,09 мл изопропанола с 10 мМ HCl и ОП изме-  
ряли на 550 нм. Интенсивность пурпурной ок-  
раски пропорциональна интенсивности клеточ-  
ного роста.

На фиг. 3 показано, что анти-LT- $\beta$ -R mAb  
BDA8 действует как блокатор LT- $\beta$ -R по дан-

ному изобретению. Клетки WiDr человеческой  
карциномы прекращают рост в присутствии  
IFN- $\gamma$  и растворимого LT- $\alpha/\beta$ -лиганды (от  
приблизительно 0,05 до 50 нг/мл). Контрольные  
антитела IgGI не оказывают влияния на данное  
ингибирирование роста. В противоположность  
этому, анти-LT- $\beta$ -R mAb BDA8 (10 мг/мл) вос-  
становливают способность клеток WiDr расти в  
присутствии растворимого LT- $\alpha/\beta$ -лиганды.

Пример 6. Применение антител к челове-  
ческому LT- $\beta$  для ингибирирования лиганд-  
рецепторного взаимодействия.

mAb к человеческому LT- $\beta$  получали путем  
иммунизации мышей RBF промытыми гра-  
нулами Protein A Sepharose-9E10-rLT- $\beta$ , содер-  
жащими приблизительно 1-2 мкг человеческого  
рекомбинантного LT- $\beta$  в CFA с последующей  
еще одной повторной иммунизацией тем же  
веществом в IFA. Через восемь недель после  
последней иммунизации мышам внутривенно  
вводили 30 мкг очищенного растворимого rLT- $\beta$   
(сэлюированного кислотой со смолы 9E10) и 20  
мкг того же растворимого вещества через 2 су-  
ток. Через одни сутки после второй внутривен-  
ной иммунизации клетки селезенки гибридизо-  
вали в соответствии с классическими методика-  
ми с получением mAb. Супернатанты гибридом  
исследовали непосредственно методом ELISA  
или FACS окрашиванием PMA - активирован-  
ных 11-23 клеток. Чистые mAb получали путем  
высокоскоростной очистки IgG из культураль-  
ных супернатантов на Protein A Sepharose  
(Pharmacia).

FACS-анализ применяли для выбора анти-  
тел к LT- $\beta$ , которые способны эффективно ин-  
гибирировать связывание растворимого LT- $\alpha/\beta$ -  
лиганды с рецепторами к LT- $\beta$  на клеточной по-  
верхности, имитируя таким образом взаимодей-  
ствие между двумя клетками *in vivo*. В данном  
анализе растворимому человеческому LT- $\beta$ -R-  
Fc (2 мкг/мл) давали связаться с поверхностным  
LT-лигандом на активированных митогеном  
фитолакки клетках 11-23 (Browning et al., J. Im-  
munol., 154, стр. 33-46 (1995)) в присутствии  
возрастающих концентраций тестируемого  
анти-LT- $\beta$  mAb (0,02-20 мкг/мл). Клетки про-  
мывали и связавшийся LT- $\beta$ -R-Fc определяли  
путем реакции с мечеными фикоэритрином ос-  
лиными антителами к человеческому IgG. Ко-  
личество связавшейся флюоресцентной метки  
определяли с помощью FACS-анализа и значе-  
ние средней интенсивности флюоресценции  
наносили на график.

На фиг. 4 приведены результаты FACS-  
анализа, с помощью которого определяли спо-  
собность анти-LT- $\beta$  mAb B9 ингибирировать  
взаимодействия рецептора к LT- $\beta$  и его лиганда,  
как описано выше. В данном эксперименте по-  
казано, что анти-LT- $\beta$  mAb B9 (0,02-5 мкг/мл)  
способны специфично и эффективно конкури-

ровать с растворимым гибридным белком LT- $\beta$ -R (2 мкг/мл) за связывание LT-лиганда клеточной поверхности и, таким образом, могут быть квалифицированы как блокаторы LT- $\beta$ -R по данному изобретению.

Пример 7. Применение антител к мышному LT- $\alpha/\beta$  для ингибиования лиганд-рецепторного взаимодействия.

Растворимые комплексы мышных LT- $\alpha/\hat{\alpha}$  получали, как описано для растворимых комплексов человеческих LT- $\alpha/\beta$ . Растворимую мышнюю субъединицу LT- $\hat{\alpha}$  получали, основываясь на информации по последовательности, описанной ранее (Lawton et al., J. Immunol., 154, стр. 239-46 (1995)). Растворимые комплексы мышных LT- $\alpha/\hat{\alpha}$  экспрессировали, применяя систему экспрессии бакуловирус/клетка насекомого, а комплексы LT- $\alpha/\hat{\alpha}$  выделяли по методу аффинной хроматографии, применяя колонки с человеческими p55 TNF-R и LT- $\hat{\alpha}$ -R, по существу, так же, как описано выше для экспрессии и очистки комплексов человеческих LT- $\alpha/\hat{\alpha}$ . Армянских хомяков иммунизировали очищенными растворимыми комплексами мышных LT- $\alpha/\hat{\alpha}$ , по существу, так же, как описано в примере 6. Спленоциты хомяка гибридизовали с мышной клеточной линией гибридомы Р3Х, как было описано (Sanchez-Madrid et al., Methods of Enzymology, 121, стр. 239-44 (1986)). Гибридомы группировали как анти-mLT- $\hat{\alpha}$  или анти-LT- $\alpha$  на основании их характеристик связывания либо с комплексом LT- $\alpha/\hat{\alpha}$ , либо лишь с LT- $\alpha$  соответственно. Гибридомные клетки культивировали, а антитела выделяли в чистом виде из культурального супернатанта по методу аффинной хроматографии на Protein A Sepharose (Pharmacia).

Чтобы установить, способны ли mAb к мышним LT- $\alpha$  или LT- $\beta$  ингибиовать связывание LT-лиганда с mLT- $\hat{\alpha}$ -R, авторы применяли клетки TIMI-4 (ATCC), мышную Т-клеточную линию, которая экспрессирует поверхностный LT-лиганд через 7 ч после активации митогеном фитолакки. Анти-mLT- $\alpha$  и анти-mLT- $\beta$  mAb хомяка предварительно инкубировали с клетками в течение 30 мин при 4°C и затем дважды промывали. Промытые клетки инкубировали с 1 мкг/мл mLT- $\beta$ -R-Fc при 4°C. Через 30 мин клетки отмывали от несвязавшегося mLT- $\beta$ -R-Fc и затем инкубировали в течение 30 мин с 10 мкг/мл меченых фикоэритрином ослиных антител к человеческому IgG для определения связавшегося mLT- $\beta$ -R-Fc. Количество связавшейся флюоресцентной метки определяли с помощью FACS-анализа и рассчитывали среднее значение интенсивности флюоресценции.

С помощью данного анализа было обнаружено, что анти-mLT- $\hat{\alpha}$  mAb хомяка способны эффективно ингибиовать связывание растворимого рецептора к LT- $\beta$  с LT-лигандом на по-

верхности Т-клеток. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2

Способность моноклональных антител к мышному LT- $\beta$  ингибиовать связывание mLT- $\beta$ -R-Fc с мышним поверхностным LT-лигандом

Концентрация mAb (мкг/мл)	анти-mLT- $\hat{\alpha}$ (BB.F6)		анти-mLT- $\alpha$ (AF.B3)	
	MFC <sup>b</sup>	% ИНГ <sup>c</sup>	MFCT <sup>b</sup>	% ИНГ <sup>c</sup>
0 <sup>a</sup>	6	-	6	-
0	85	0	85	0
0,01	71	18	84	2
0,03	67	23	86	2
0,1	51	44	86	0
0,3	36	62	84	2
1,0	29	71	89	0
3,0	17	86	88	0
10,0	11	94	95	0
30,0	10	95	94	0
100,0	8	98	92	0

<sup>a</sup> рецептор не добавляли;

<sup>b</sup> номер канала среднего значения флюоресценции;

<sup>c</sup> процент ингибиования;

Пример 8. Блокаторы LT- $\beta$ -R ингибируют опосредованную Th1-клетками контактную гиперчувствительность у мышей.

Самок мышей Balb/c массой 20 г (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) первично сенсибилизовали путем нанесения 25 мкл 0,5% 2,4-динитрофторбензола (ДНФБ) в 4:1 ацетоне: оливковом масле по объему на нижнюю часть каждой задней лапы. Через 24 ч после первичной сенсибилизации авторы вновь сенсибилизовали каждую мышь 25 мкл того же раствора. Сенсибилизацию проводили, удерживая неанестезированную мышь. На 5 сутки (120 ч после первичной сенсибилизации) авторы анестезировали мышей 90:10 мг/кг кетамина:ксилазина (внутрибрюшинно) и наносили субирритантную дозу 10 мкл 0,2% ДНФБ на дорзальную и центральную поверхности левого уха. На правое ухо сходным образом наносили носитель из 4:1 ацетона:оливкового масла по объему.

Через четыре часа после стимулирования иммунного ответа авторы вводили возрастающие концентрации mLT- $\beta$ -R-Fc (0,08-5,0 мг/кг; пример 2) мышам в 0,1 мл фосфатно-буферного раствора (PBS) с помощью внутривенной инъекции. Инъекции одного фосфатно-буферного раствора или 20 мг/кг гибридного белка человеческого IgG (LFA3-Fc) (Miller et al., J. Exp. Med., 178, стр 211-22 (1993)) служили в качестве отрицательных контролей. Инъекция 8 мг/кг mAb, специфичного к VLA4 (mAb PS/2; Chisolm et al., Eur. J. Immunol., 23, стр. 682-88 (1993)), которое является известным ингибитором КГЧ по механизму ингибиования миграции Т-клеток в место нанесения стимула, служила в качестве положительного контроля. Группы, состоящие из четырех-восьми мышей, обрабатывали концентрацией антитела.

Через 24 ч после стимулирования мышей вновь анестезировали кетамином:ксилазином и

с помощью инженерного микрометра измеряли толщину обоих ушей с точностью до  $10^{-4}$  дюйма ( $2,54 \times 10^{-4}$  см). У каждой мыши наблюдались различия в интенсивности реакции отека уха между толщиной контрольного и ДНФБ-стимулированного уха. Результаты при типичной неингибионной реакции отека уха составляли  $95-110 \times 10^{-4}$  дюйма ( $241,3 - 279,4 \times 10^{-4}$  см). Об ингибионии реакции отека уха судили по сравнению обработанных групп с соответствующей им группой отрицательного контроля. Статистическую значимость различия между обработанными группами оценивали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с последующим расчетом достоверно значимой разности Tukey-Kramer (JMP, SAS Institute), используя значения  $p < 0,05$ .

На фиг. 5 показано, что введение возрастающих концентраций mLT- $\beta$ -R-Fc вызывает значительное уменьшение реакции отека уха у мышей, обработанных ДНФБ, по сравнению с ДНФБ-обработанными контрольными животными, не получавшими инъекции ингибитора, (PBS и LFA3-Fc). Растворимый LT- $\beta$ -R (от приблизительно 1-5 мг/кг) способен ингибионовать данную реакцию контактной ГЗТ так же эффективно, как и ингибионущее mAb, специфичное к VLA4. Та часть результатов, которая наблюдается в данном анализе отека уха, возможно, объясняется неспецифической гранулоцитарной инфильтрацией.

Пример 9. Модель СВТК, вызванной раствором декстрансульфата (РДС).

Мышей обрабатывали так, как определено в аннотации к фиг. hLFA3-Ig, т.е. контрольным гибридным белком Ig, или mLT- $\beta$ -R-Ig с помощью внутрибрюшинной инъекции. На 0 сутки питьевую воду заменили на 5% раствор декстрансульфата и мышей оставили на такой жидкости на одну неделю. Через одну неделю, т.е. через 2 недели после начала введения РДС, мышей забивали и измеряли изменения массы тела и длины толстого кишечника (от анального отверстия до слепой кишки). На фиг. 6 и 7 показаны значения изменения массы тела и длины толстого кишечника после различных обработок. Уменьшившаяся длина толстого кишечника, равно как и потеря в весе, указывают на развитие СВТК. Было замечено, что обработка mLT- $\beta$ -R-Ig решительно предотвращают уменьшение длины толстого кишечника и потерю в весе, что указывает на ее эффективность.

Фиг. 6 - изменение массы тела, наблюдавшееся у мышей через 14 дней после начала поения РДС после различных обработок. Нос = носитель, LT- $\beta$ -R и LFA3 относятся к гибридным белкам mLT- $\beta$ -R-Ig и hLFA3-Ig, которые вводили путем внутрибрюшинной инъекции 100 мкг за 1 неделю до введения РДС, во время введения РДС и через 1 неделю (т.е. 3 инъекции на

-1, 0 и 1 неделях). В каждой группе было по 10 животных.

Фиг. 7 - длина толстого кишечника, наблюдавшаяся на 14 день после различных обработок, описанных для фиг. 6.

Пример 10. Модель СВТК у CD45RB<sup>hi</sup>/scid.

CD4-положительные Т-клетки выделяют из самок мышей С.В-17, применяя методику на основе магнитных гранул, как описано ранее (F. Powrie et al., International Immunology, 5:1461-1471 (1993)). CD4-клетки, очищенные от CD8-положительных Т-клеток, В-клеток и моноцитов, затем сортировали с помощью сортировки клеток с возбуждением флюоресценции также, по существу, в соответствии с вышеописанными методиками, на CD45RB<sup>high</sup>- и CD45RB<sup>low</sup>-популяции. Самкам С.В-17 scid мышей внутриенно вводили  $5 \times 10^5$  CD45RB-клеток и наблюдали за массой тела мышей. Может быть замечено, что животные, чьи лимфоидные органы заселяли CD45RB<sup>low</sup>-клетки, нормально прибавляли в весе. В противоположность этому, животные, получившие инъекцию CD45RB<sup>high</sup>-клеток со временем теряли в весе и через 10 недель были близки к гибели. Когда контрольные мыши теряли приблизительно 20% исходной массы тела, мышей забивали и различные органы отбирали на гистологический анализ. Обычно больные животные выглядели кахетичными, страдали диареей и имели сильно удлиненный толстый кишечник и слепую кишку. Животные, обрабатываемые, как описано в аннотации к фиг., hLFA3-Ig, находились в сходном с необрабатываемыми животными состоянии, тогда как обрабатываемые mLT- $\beta$ -R-Ig животные не теряли в весе, имели толстый кишечник относительно нормальных размеров и не имели массивных воспалительных инфильтратов, обычно наблюдавшихся в толстом кишечнике больных животных. На фиг. 8 показана потеря в весе у животных, которым различными способами вводили CD45RB<sup>high</sup>, а на фиг. 9 показаны конечные значения массы тела через 8 недель после инъекции. Эффективность введения mLT- $\beta$ -R-Ig в двух чрезвычайно различных моделях СВТК, т.е. в моделях введения CD45RB<sup>high</sup> и РДС, создает полную очевидность сильного влияния данной обработки на иммунную систему.

Фиг. 8 - уменьшение массы тела с течением времени после инъекции CD45RB CD4-положительных Т-клеток у мышей scid. Каждая кривая представляет результаты по одному животному, а надписи на панелях относятся к тому, какие клетки вводились, т.е. CD45RB<sup>high</sup>- или CD45RB<sup>low</sup>, и к способу обработки. Животное еженедельно обрабатывали 100 мкг вводимого внутрибрюшинно белка. Обработку начинали за 2 недели до инъекции клеток и продолжали в течение всего эксперимента.

Фиг. 9 - среднее и стандартное отклонение массы тела, наблюдавшиеся после различных обработок, через 10 недель после трансплантации (5-6 животных в группе).

Пример 11. Модель гиперчувствительности замедленного типа на ЭБ.

Самок мышей Balb/c сенсибилизировали путем подкожной инъекции  $2 \times 10^7$  отмытых эритроцитов барана (ЭБ) в PBS. Через 5 суток мышей стимулировали путем инъекции  $1 \times 10^8$  ЭБ в PBS в подошву правой лапы (субплантарная инъекция). Толщину подошвы измеряли с помощью кронциркуля через различные промежутки времени после инъекции в подошву. На фиг. 10 показана выраженность реакции отека подошвы у мышей, обработанных путем инъекции mLT- $\beta$ -R-Ig. Обработка mLT- $\beta$ -R-Ig либо на стадии сенсибилизации, либо на стадии как сенсибилизации, так и нанесения антигенного стимула, ингибирировала ЭБ-индуцированную реакцию ГЗТ.

Фиг. 10 - показано увеличение толщины подошвы, измеренной через 18 ч после инъекции стимулирующих ЭБ. Виды обработки представляли собой либо отрицательный контроль в виде инъекции PBS, либо положительный контроль в виде инъекции антител PS/2, что ингибирует взаимодействия VLA4 и, таким образом, миграцию клеток, либо инъекцию mLT- $\beta$ -R-Ig (внутривенные инъекции по 100 мкг), вводимые либо непосредственно перед сенсибилизирующей инъекцией ЭБ, либо во время нанесения антигенного стимула, либо в оба момента.

#### Список последовательностей

(2) Информация по ПОСЛ. ИД. № 1:

(I) Характеристики последовательности:

(А) Длина: 197 аминокислот

(Б) Тип: аминокислотная

(В) Количество цепей:

(Г) Топология: линейная

(И) Тип молекулы: пептид

(Х) Описание последовательности: ПОСЛ.

ИД. № 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

```

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество блокатора рецептора лимфотоксина- $\beta$  (LT- $\beta$ -R) и фармацевтически приемлемый носитель.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что блокатор LT- $\beta$ -R выбран из группы, включающей растворимый receptor лимфотоксина- $\beta$  с аминокислотной последовательностью SEQ ID №1, антитело к рецептору лимфотоксина- $\beta$  (LT-R) и антитело к поверхностному лиганду лимфотоксина (LT-лиганду).

3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что растворимый receptor лимфотоксина- $\beta$  представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен указанного receptor, который способен избирательно соединяться с поверхностным LT-лигандом.

4. Композиция по п.3, отличающаяся тем, что растворимый receptor лимфотоксина- $\beta$  дополнительно содержит Fc-домен человеческого иммуноглобулина.

5. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что блокатор LT- $\beta$ -R представляет собой моно-клональное антитело к receptorу LT- $\beta$ .

6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что моноклональное антитело представляет собой mAb BDA8 к LT- $\beta$ -R человека.

7. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что блокатор LT- $\beta$ -R представляет собой моно-клональное антитело к поверхностному LT-лиганду.

8. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что указанное антитело специфично к субъединице LT-лиганды.

9. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что моноклональное антитело представляет собой mAb B9 к LT- $\beta$ - человека.

10. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что блокатор LT- $\beta$ -R представляет собой моноклональное антитело к поверхностному LT-лиганду мыши.

11. Способ лечения или уменьшения прогрессивного развития, тяжести или последствий заболеваний иммунной системы у млекопитающего путем ингибирования передачи сигнала через рецептор лимфотоксина- $\beta$ , заключающийся в том, что млекопитающему вводят фармацевтическую композицию, охарактеризованную в любом из пп.1-10 формулы.

12. Способ ингибирования иммунного ответа, опосредованного Th1-клетками, у млекопитающего, заключающийся в том, что млекопитающему вводят фармацевтическую композицию, охарактеризованную в любом из пп.1-10 формулы.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что иммунный ответ, опосредованный Th1-клетка-

ми, вносит вклад в клеточную реакцию отторжения ткани у млекопитающего после трансплантации.

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что иммунный ответ, опосредованный Th1-клетками, вносит вклад в клеточную реакцию отторжения органа у млекопитающего после трансплантации.

15. Способ по п.12, отличающийся тем, что иммунный ответ, опосредованный Th1-клетками, вносит вклад в аутоиммунное заболевание млекопитающего.

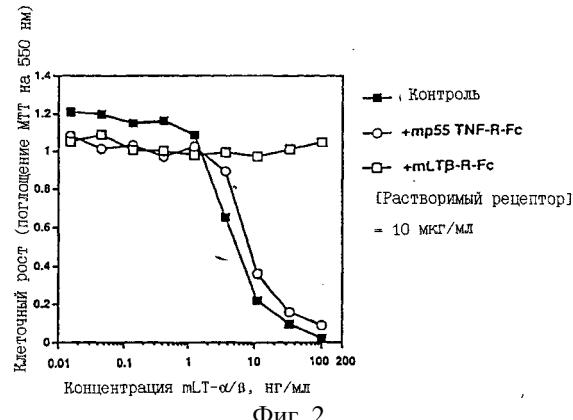
16. Способ по п.15, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание выбрано из группы, включающей рассеянный склероз, инсулин-зависимый сахарный диабет, симпатическую офтальмию,uveит и псориаз.

17. Способ по п.12, отличающийся тем, что он не затрагивает ингибирования иммунного ответа, опосредованного Th2-клетками.

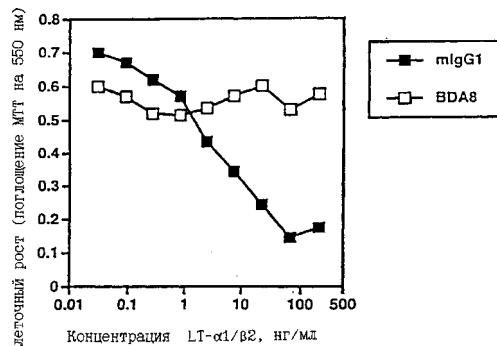
18. Способ лечения синдрома воспаления толстой кишки у млекопитающего, заключающийся в том, что млекопитающему вводят фармацевтическую композицию, охарактеризованную в п.4 формулы.

1 SQPQAVPPYA SENQTCRDQE KEYYEPQHRI CCSRCPGTY VSAKCSRIRD 50  
 51 TVCATCAENS YNEBWNYLTI CQLCRPCDPV MGLEELIAPCT SKRKTQCRQ 100  
 101 PGMFCAAWAL ECTHCCELLSD CPCTGTEAELK DEVGKGNHNC VPCKAGHFQN 150  
 151 TSSPSARCQP HTRCENQGLV EAAPGTAQSD TTCKNPLEPL PPEMSGT 197

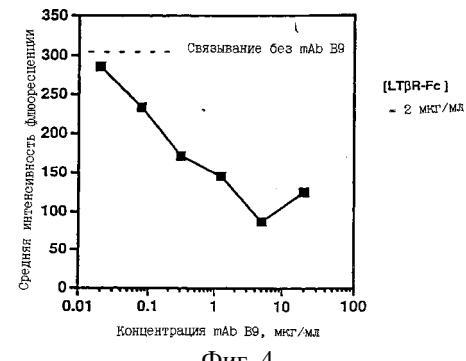
Фиг. 1



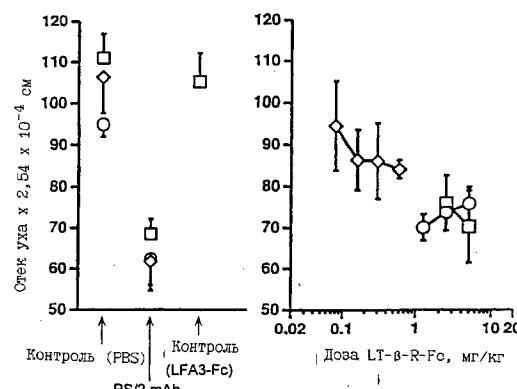
Фиг. 2



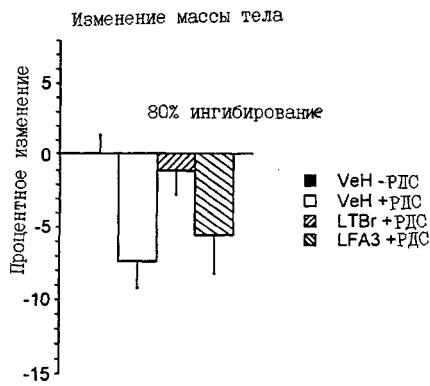
Фиг. 3



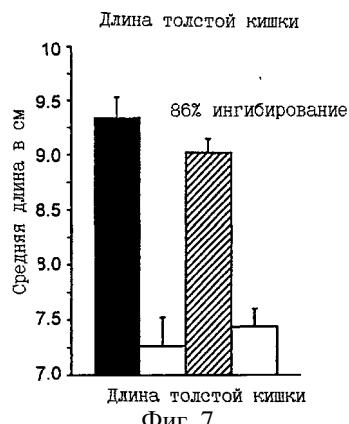
Фиг. 4



Фиг. 5

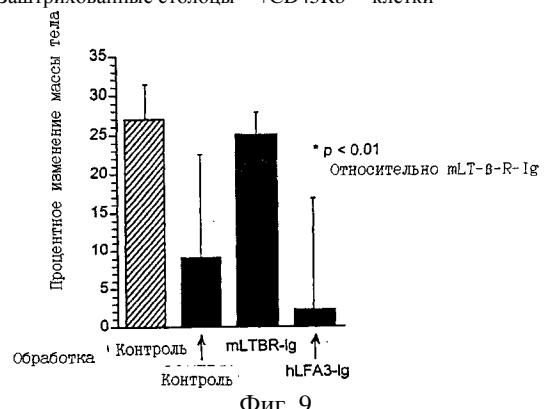


Фиг. 6



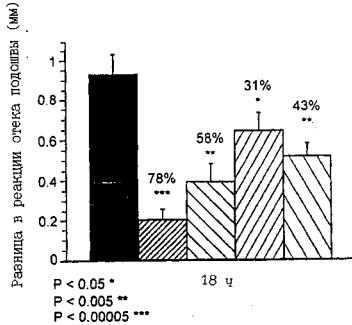
Фиг. 7

Эффект mLT- $\beta$ -R-Ig на массу тела мышей через 10 недель после трансплантации CD45Rb<sup>hi</sup>-клеток.  
Закрашенные столбцы = +CD45Rb<sup>hi</sup>-клетки  
Заштрихованные столбцы = +CD45Rb<sup>low</sup>-клетки

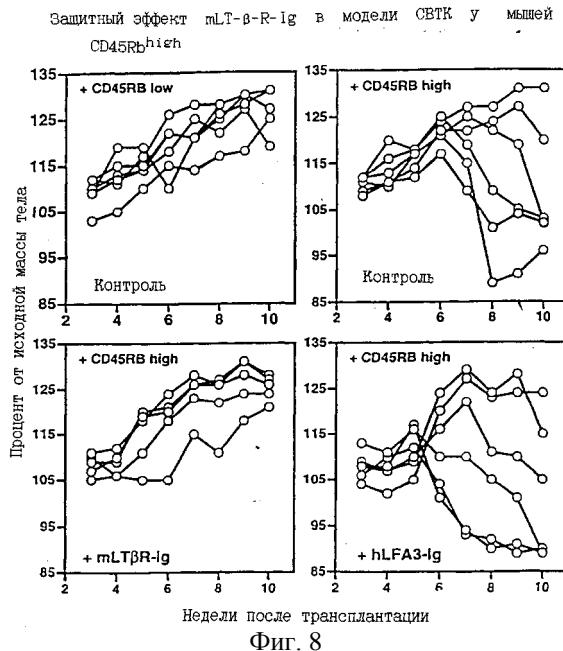


Фиг. 9

Ответ на mLT- $\beta$ -R-higGl в модели ГЗТ СВТК у самок мышей Balb/c



Фиг. 10



Фиг. 8

