

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

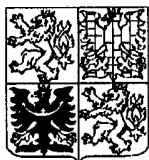
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1428-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24. 10. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.10.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/029060**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 07. 99**
(**Věstník č. 7/99**)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/19436**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/17313**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 39/395
A 61 K 38/17
A 61 K 38/55

// **C 07 K 19/00**,
(**A 61 K 39/395**, **A 61 K 38:17**),
(**A 61 K 38/55**, **A 61 K 38:17**)

(71) Přihlášovatel:

BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Původce:

Browning Jeffrey, Brookline, MA, US;
Hochman Paula Susan, Newton, MA, US;
Rennert Paul D., Holliston, MA, US;
MacKay Fabienne, Watertown, MA, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob ovlivnění imunitní odpovědi pomocí činidla blokujícího LT-β-R a farmaceutický přípravek obsahující takové činidlo

(57) Anotace:

Předmětem vynálezu jsou způsoby a přípravky obsahující "činidlo blokující receptor lymfotoxinu-b", které blokuje signální dráhu receptoru lymfotoxinu-b a je tudíž vhodné pro ovlivnění imunologických onemocnění, zvláště pak imunitní odpovědi zprostředkované protilátkami.

CZ 1428-99 A3

Způsob ovlivnění imunitní odpovědi pomocí činidla blokujícího LT- β -R a farmaceutický přípravek obsahující takové činidlo

Oblast techniky

Vynález se týká přípravků a způsobů, obsahujících "činidlo blokující receptor lymfotoxinu- β ", které blokuje signální dráhu lymfotoxinu- β . Činidlo blokující receptor lymfotoxinu- β je užitečné pro léčení imunologických onemocnění, a zejména pro potlačení imunitní odpovědi zprostředkované protilátkami, pro regulaci exprese tzv. adresinů a cílení přenosů látek v buňce a pro ovlivňování diferenciací folikulárních dendritických buněk. Vynález se týká rozpustných forem extracelulárních domén receptoru lymfotoxinu- β , a protilátek namířených proti receptorům lymfotoxinu- β nebo jejich ligandům, povrchovým lymfotoxinům, které působí jako činidlo blokující receptory lymfotoxinu- β .

Dosavadní stav techniky

Existují dva druhy získané imunity, které jsou schopny spolupracovat pro dosažení společného cíle, a sice eliminace antigenu, ale jsou zprostředkovány odlišnými složkami imunitního systému s různými účinky. Jeden typ získané imunitní odpovědi, imunita humorální (látková) je zprostředkován převážně B buňkami a cirkulujícími protilátkami. Druhý typ, označovaný jako buněčná nebo buňkami zprostředkovaná imunita, je zprostředkován T buňkami, které syntetizují a zpracovávají cytokiny, které působí zase na další buňky.

Aktivace a diferenciací B buněk jako odpověď na většinu

antigenů vyžaduje, aby (1) B buňky přijaly antigenní signál prostřednictvím svých receptorů specifických pro antigen, tj. membránových Ig, a (2) B buňky přijaly signály, jak kontaktně závislé tak i nezávislé, od aktivovaných T buněk. Kontaktně závislý kostimulační signál je důsledkem vazby receptoru CD40 na B buňkách s ligandem CD40 exprimovaným na aktivovaných pomocných ("helper") T buňkách (Laman et al., Crit. Rev. Immunol. 16, 59-108, 1996, Van Kooten a Bancherau, Adv. Immunol. 61, 1-77, 1996). Kontaktně nezávislý přenos signálů je zprostředkován cytokiny syntetizovanými a zpracovávanými aktivovanými T buňkami. Tyto kontaktně nezávislé signály společně s kontaktně závislými signály směřují diferenciaci B buněk buďto do (1) paměťových B buněk připravených zprostředkovat rychlejší odpověď v případě sekundární expozice antigenu, nebo (2) plazmatické buňky secernující protilátky. Plazmatické buňky, které představují terminální diferenciacní stadium B buněk syntetizují a secernují protilátky.

Pomocné T buňky (Th) mají několik významných úloh v imunitním systému. Bylo ukázáno, že cytokiny produkované Th buňkami na počátku imunitní odpovědi ovlivňují, které imunitní efektorové dráhy budou následně aktivovány. Th buňky jsou aktivovány tím, že jejich receptory specifické pro antigen reagují s buňkami prezentujícími antigen (APC), které exponují na svém povrchu peptidové fragmenty nebo zpracovaný cizorodý antigen ve spojení s molekulami MHC (hlavního histokompatibilního systému) II. třídy. Aktivované Th naopak secernují cytokiny (lymfokiny), které aktivují příslušné imunitní efektorové mechanismy.

Th buňky se dělí do třech podskupin Th0, Th1 a Th2 podle toho, jaké cytokiny secernují (Fitch a kol., Ann. Rev.

Immunol. 11: 29-48, 1993). Např. u myši nestimulované "naivní" pomocné T buňky produkují IL-2. Krátkodobá stimulace vede k přeměně na Th0 prekurzorovou buňku, která produkuje řadu cytokinů včetně IFN- α , IL-2, IL-4, IL-5 a IL-10. Trvale stimulované Th0 se mohou diferencovat buď na Th1 nebo Th2 buňky, v závislosti na změně typu exprimovaných cytokinů. Některé cytokiny jsou uvolňovány jak Th1 tak i Th2 buňkami (např. IL-3, GM-CSF a TNF). Jiné cytokiny jsou vytvářeny výlučně jednou podskupinou Th buněk (Romagnani a kol., Ann. Rev. Immunol. 12: 227-257, 1994). Th1 buňky produkují IL-2, IFN- γ , které aktivují makrofágy a zánětlivé odpovědi spojené s buněčnou imunitou a odolností proti intracelulárním infekcím.

Th2 buňky produkují cytokiny IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10. Cytokiny Th2 buněk zvyšují produkci eosinofilů a žírných buněk a podporují plný rozvoj a zrání B buněk (Howard a kol., "T-cell derived cytokines and their receptors", Fundamental Immunology, 3rd ed., Raven Press, New York, 1993). Th2 buňky se podílejí na vzniku paměti B buněk, somatických mutací a na afinitním zrání, a také na regulaci *de novo* přepínání isotypů imunoglobulinů. Tak např. cytokin IL-4 Th2 buněk přepíná aktivované B buňky na isotyp IgG1 a přitom potlačuje jiné isotypy. IL-4 také stimuluje nadprodukcii IgE v imunitní reakci při přecitlivělosti I. typu. Cytokin IL-5 Th2 buněk indukuje isotyp IgA, který hraje důležitou roli v slizniční (mukóзовé) imunitě.

Sekundární lymfatická tkáň, jako jsou lymfatické uzliny (LN), slezina a lymfatická tkáň sliznice, je velmi účinná v zachytávání a koncentrování cizorodých látek, a je to také hlavní místo, kde dochází k aktivaci a diferenciaci T a B lymfocytů pod vlivem antigenů. Tyto procesy jsou závislé

na diverzitě a organizaci buněk v takových tkáních, které poskytují rámec pro mnoho aspektů humorální imunitní odpovědi, jako je např. interakce T a B buněk, vytváření zárodečných (germinačních) center (GC), afinitní zrání, přepínání tříd imunoglobulinů a buněčný přenos (Klein, J., Immunology, John Willey and Sons, 1982). Molekulární mechanismy odpovědné za vývoj, udržování struktury a funkci periferní lymfatické tkáně nejsou dosud plně známy.

Ačkoliv se všeobecná struktura sekundární lymfatické tkáně výrazně odlišuje mezi různými druhy savců, detailní struktura sekundární lymfatické tkáně vykazuje některé společné vlastnosti jako je např. (1) dostupnost antigenu, (2) strukturní vlastnosti zajišťující pokračující kontakt antigenu s lymfocyty, (3) oblasti bohaté na T buňky obklopené B buňkami, (4) folikuly bohaté na B buňky, (5) místa typu marginální zóny, (6) specializované endotelové buňky a (7) místa produkce protilátek, což bude dále ještě podrobněji popsáno.

Sekundární lymfatická tkáň je přístupná pro antigen v systému. Např. antigen vstoupí do sleziny prostřednictvím sinusového krevního zásobení, do LN vstoupí prostřednictvím aferentních lymfatických cév a do slizniční lymfatické tkáně vstoupí transportem přes specializovaný epitel.

Sekundární lymfatická tkáň různých druhů sdílí také určité strukturní rysy, jako jsou např. folikulární dendritické buňky (FDC) a vmezeřené buňky (IDC), které zajišťují prodlouženou přítomnost antigenu v oblastech tkání bohatých na lymfocyty.

Dalším společným rysem je existence oblastí bohatých na T buňky obklopených B buňkami. K takovým oblastem bohatým na T buňky patří např. periarteriální lymfatické pochvy v bílé

dřeni sleziny a parakortikální oblasti v LN, které obsahují velké počty recirkulujících T buněk a IDC, které naopak fungují jako doprovodné buňky pro T a B buňky.

Kromě toho, v lymfatické tkáni, v bílé dřeni sleziny a v kůře LN, jsou typické primární a sekundární folikuly bohaté na B buňky. Sekundární folikuly v takové lymfatické tkáni jsou označovány také jako zárodečná centra (GC) a mají hustou síť FDC pro zachycení přítomných antigenů.

Oblasti typu marginální zóny jsou zřetelně histologicky definované oblasti v myší slezině a jako poněkud difúzní oblasti se vyskytují v lidských sekundárních lymfatických orgánech. Tyto oblasti obsahují hlavně makrofágy marginální zóny (MZM), metalofilní makrofágy (MM), B buňky marginální zóny a retikulocyty, ale mohou obsahovat i T buňky a dendritické buňky (Kraal, Int. Rev. Cytol. 132, 31-74, 1992). Vyústění arteriálního krevního řečiště do oblastí marginálních zón umožňuje přímý přístup antigenů k buňkám a podporuje buněčné reakce na antigen v těchto místech (Kraal, Int. Rev. Cytol. 132, 31-74, 1992). Přítomnost MZM je také vyžadována pro optimální přenos B buněk v bílé dřeni sleziny (Kraal, 1992, Kraal et al., Immunology, 68, 227-232, 1989).

Typicky krevní lymfocyty vstupují do sekundární lymfatické tkáně tak, že překročí specializovaný endotel, např. endotelovou výstelku žilek lymfatických uzlin (HEV), endotelovou výstelku krevních sinusů sleziny v marginální oblasti a podobné struktury. Tyto endotelové tkáně exprimují adhezivní molekuly a adresiny, které účinkují v přenosu buněk v sekundární lymfatické tkáni. Např. adresiny periferních lymfatických uzlin (PNA_d) se odlišují od adresinů slizničních lymfatických uzlin MA_dCAM-1, které se podílejí na přenosu



lymfocytů do slizničních lymfatických tkání jako jsou např. mesenterické lymfatické uzliny, Peyerské pláty a *lamina propria*.

Ne všechny adresiny jsou jasně definované, např. adresiny umožňující nasměrování do sleziny jsou dosud neznámé. K fyziologickým funkcím těchto adresinů patří zvyšování doplňování vhodných populací antigenně specifických lymfocytů do imunitní reakce a následné rozšíření imunitní reakce v celém těle.

A nakonec plazmatické buňky, což jsou plazmatické buňky produkující protilátky, se vyskytují na různých místech, kde jsou antigenem aktivované prekurzory B buněk. Např. protilátky produkované plazmatickými buňkami v červené dřeni sleziny pocházejí hlavně z B buněk aktivovaných v zónách T buněk, a plazmatické buňky ve dřeni LN pocházejí z B buněk aktivovaných v zónách T buněk v téže uzlině. Podobně protilátky produkované plazmatickými buňkami v kostní dřeni jsou odvozeny z B buněk aktivovaných ve slezině a lymfatických uzlinách, a plazmatické buňky v *lamina propria* pocházejí hlavně z B buněk aktivovaných v mezenterických LN nebo lymfatické tkáni spojené se střevem (viz např. ICM MacLennan, "The Structure and Function of Secondary Lymphoid Tissue", Clinical Aspects of Immunology, 5th ed., eds. P.J. Lachman, Sir D.K. Peters, F.S. Rosen, M.J. Walport, Blackwell Scientific Publication, 13-30, 1993).

Obecně buněčné a histologické události, ke kterým dochází při humorální imunitní odpovědi na T-závislé antigeny, jsou následující (Tollner et al., J. Exp. Med. 183, 2303-2312, 1996). V indukční fázi jsou naivní B a T buňky aktivovány a vtaženy do imunitní reakce během několika dní následujících po vstupu antigenu do těla.

Ve slezině se např. do 12 hodin po imunizaci na sekundární odpověď paměťové B buňky setkají s antigenem neseným krví v marginální zóně a ponechají tuto zónu, aby se přeměnila na zónu T buněk. B buňky je možné detekovat v zóně T buněk do 24 hodin. Imunoglobulinové přepínací transkripty je možné detekovat během 12 hodin po sekundární expozici antigenu, což ukazuje, že již došlo k interakci T a B buněk. B buňky pak migrují do výstupové zóny a červené dřeně, kde proliferují a vytvářejí ložiska nezralých B buněk a diferencují se do plazmatických buněk. B buňky také pokračují v proliferaci v zónách T buněk bohatých na IDC. Během 4 dnů po imunizaci, a po proliferaci v GC, začne produkce paměťových B buněk. V primární odpovědi jsou po 10 dnech zřetelné dobře vyvinuté GC a dosahují maxima velikosti 14. den po imunizaci.

Proliferace T buněk v zónách T buněk je prokázána po 48 až 72 hodinách a maxima dosahuje 7. den po imunizaci. Proliferace T buněk připívá k aktivaci B buněk závislé na T buňkách. Úroveň proliferace v zónách T buněk se sníží, když se vytvoří GC. Proliferace T buněk v GC nastává také tehdy, když centrocyty (B buňky) ve tmavé zóně převezmou antigen od IDC a prezentují antigen T buňkám ve světlé zóně.

Antigen závislý na T buňkách může aktivovat B buňky marginální zóny, nově vytvářené naivní B buňky a cirkulující lymfocyty vtahované do a udržované v sekundárních lymfatických orgánech prostřednictvím adhezivních molekul a adresinů. Naivní B buňky vykazují stejnou kinetiku pro přechod do zón T buněk apod. jako aktivované B buňky.

Stálá fáze imunitních odpovědí závislých na T buňkách

Stálá fáze imunitních odpovědí závislých na T buňkách je udržována pokračující aktivací paměťových B buněk ve

folikulech sekundárních lymfatických orgánů. V této fázi je velmi malý vstup nových naivních B buněk a odpověď je založena především na antigenu zachyceném na FDC. Pro optimální vytváření paměti, přepínání isotypů, somatické mutace a afinitní zrání imunoglobulinů jsou potřebné GC.

Tato lymfocytová odpověď vede k produkci protilátek schopných cirkulovat v těle různými cestami. Tak např. protilátky se krví dostanou ze sleziny a prostřednictvím eferentních lymfatických cév opustí lymfatické uzliny. Protilátky se tak hned setkávají mohou se vázat se vstupujícím patogenem. Událost rozpoznání spustí kaskádu imunitních efektorových mechanismů, včetně aktivace komplementové kaskády a buněčných reakcí pro ochranu hostitele před patogenem.

Protilátky hrají důležitou roli v některých patologických odpovědích známých jako přecitlivělosti, což jsou nevhodné nebo nepřiměřené imunitní odpovědi vyvolané po kontaktu s dříve rozpoznaným antigenem.

Existují čtyři typy přecitlivělosti. Přecitlivělost I. typu, tzv. "časná přecitlivělost", zahrnuje aktivaci Th2 buněk indukovanou alergenem a uvolnění cytokinů typu Th2. Cytokin IL-4 stimuluje B buňky ke změně izotypu na produkci IgE, což aktivuje žírné buňky, a vzniká tak akutní zánětlivá reakce, která vede např. k ekzému, astmatu nebo rýmě.

Přecitlivělost II. a III. typu je způsobena protilátkami IgG a IgM namířenými proti antigenům buněčného povrchu nebo specifickým tkáňovým antigenům (II. typ) anebo rozpustným sérovým antigenům (III. typ), kdy se vytvářejí cirkulující imunitní komplexy.

Přecitlivělost IV. typu, tzv. "pozdní přecitlivělost" (DTH) je zprostředkována Th1 buňkami. Reakce

může být přenesena mezi pokusnými myšmi Th1 buňkami, ale nikoliv samotným bezbuněčným sérem (Roitt a kol., Immunology, ss. 19.1-22.12, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3rd ed., 1993).

Patologické reakce Th1 buněk jsou spojeny s mnoha orgánově specifickými a systémovými autoimunitními stavy, jako jsou např. systémový *lupus erythematoses*, Wegenerova granulomatóza, *polyarteriitis nodosa* (PAN), rychlá progradující srpková glomerulonefritida a idiopatická trombocytopenická purpura, a také chronická zánětlivá onemocnění jako je např. Gravesova a Chagasova nemoc. Reakce typu Th1 také přispívá k buněčné imunitě, která způsobuje odhojení štěpu nebo orgánového transplantátu.

Léčení takovýchto různých imunologických stavů je založeno na užití imunomodulačních a imunosupresivních přípravků. Tři v současnosti nejužívanější imunosupresiva jsou steroidy, cyklofosfamid a azathioprin.

Steroidy jsou pleiotropní protizánětlivé látky, které potlačují aktivované makrofágy a inhibují aktivitu buněk prezentujících antigen, a to takovým způsobem, že ruší mnohé patologické účinky T buněk. Cyklofosfamid, který je alkylační činidlo, napomáhá buněčné smrti tím, že inhibuje replikaci a reparaci DNA. Azathioprin je přípravek s antiproliferačním účinkem, který inhibuje syntézu DNA. Tato nespecifická imunosupresiva jsou zpravidla podávána ve velkých dávkách, což zvyšuje jejich toxicitu (např. nefro- a hepatotoxicitu) a způsobuje četné vedlejší účinky, nejsou proto vhodná pro dlouhodobé léčení.

Existuje proto značná dosud nenaplněná potřeba dalších přípravků a terapií, které by vyřešily problémy, způsobované při léčení současnými přípravky a postupy.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález řeší výše naznačené problémy tím, že poskytuje farmaceutický přípravek a způsob léčení imunologických onemocnění tak, že užívá látku blokuující receptory lymfotoxinu- β (LT- β -R), a tím inhibuje signální dráhu receptorů lymfotoxinu- β . Přípravky a způsoby obsahující látku blokuující LT- β -R jsou zvláště vhodné pro inhibici imunitní odpovědi zprostředkované protilátkami, pro regulaci expresní hladiny adresinů a buněčný přenos, pro ovlivňování diferenciace folikulárních dendritických buněk a pro změny strukturní organizace sekundární lymfatické tkáně a podobných lymfatických struktur vznikajících při patologických stavech, jako jsou např. systémový lupus erythematoses a idiopatická trombocytopenická purpura.

Kromě toho některá provedení předkládaného vynálezu jsou vhodná pro změny asociace mezi imunitními komplexy a B buňkami. Konkrétně způsoby podle předkládaného vynálezu mohou zabránit prezentaci nebo depozici antigenů na buňkách; alternativně mohou v podstatě rozpustit nebo vyrušit antigeny již přítomné na buňkách.

V alternativním provedení vynálezu je činidlo blokuující LT- β -R vybráno ze skupiny obsahující rozpustný lymfotoxin- β -R, protilátku namířenou proti LT- β -R a protilátku namířenou proti povrchovému ligandu LT.

Jedno provedení předkládaného vynálezu poskytuje rozpustné formy extracelulárních domén receptoru lymfotoxinu- β , které působí jako činidlo blokuující LT- β -R. Výhodné přípravky a způsoby podle tohoto provedení vynálezu obsahují rekombinantní fúzní protein receptoru lymfotoxinu- β , ve kterém je extracelulární vazebná doména LT- β -R pro ligand

spojena s konstantní doménou těžkého řetězce imunoglobulinu. Výhodněji je extracelulární vazebná doména LT- β -R pro ligand spojena s doménou Fc lidského IgG.

Další provedení vynálezu poskytuje protilátky, které působí jako činidlo blokující LT- β -R. Výhodné přípravky a způsoby v tomto provedení obsahují jednu nebo více protilátek namířených proti receptorům lymfotoxinu- β . Výhodněji protilátky jsou monoklonální protilátky namířené proti receptorům lymfotoxinu- β . Další výhodný přípravek a způsob v tomto provedení obsahuje jednu nebo více protilátek namířených proti povrchovému lymfotoxinu. Výhodněji je protilátka monoklonální protilátka proti lymfotoxinu- β . Výhodné protilátky podle předkládaného vynálezu jsou monoklonální protilátky BDA8 proti lidskému LT- β -R a B9 proti lidskému LT- β .

Další provedení předkládaného vynálezu se týká způsobu, jak změnit humorální imunitní odpověď zvířete tím, že se mu podá farmaceutický přípravek, který obsahuje terapeuticky účinné množství činidla blokujícího LT- β -R. V některých provedeních vynálezu se farmaceutický přípravek podává v takovém množství, které je dostatečné k pokrytí LT- β -R pozitivních buněk na dobu 1 až 14 dnů. Farmaceutický přípravek v některých provedeních podle vynálezu může dále obsahovat farmaceuticky přijatelný nosič nebo adjuvans.

Dalším provedením vynálezu je způsob inhibice signální dráhy LT- β -R, aniž by došlo k inhibici signální dráhy TNF-R, a to pomocí činidla blokujícího LT- β -R popsaného v předchozím textu. Předmětem předkládaného vynálezu je i způsob léčení, prevence nebo eliminace viru lidské imunodeficiency u savců, kterýžto způsob spočívá v tom, že se podá činidlo blokující LT- β -R buďto samotné nebo společně

s farmaceutickým nosičem nebo adjuvans, nebo společně s jinými léky odborníkovi známými a vhodnými pro léčení nebo zmírnění příznaků HIV nebo AIDS.

Kromě toho se předkládaný vynález týká také způsobu léčení v oboru transplantací, tj. odvržení štěpu. Některá provedení vynálezu se týkají současného podání činidla blokujícího dráhu CD40 a činidla blokujícího dráhu LT.

Popis obrázků

Obr. 1 je sekvence extracelulárního úseku lidského LT- β receptoru, který kóduje vazebnou doménu pro ligand.

Obr. 2 ukazuje imunohistochemickou analýzu sleziny myši, která obdržela opakované injekční dávky fúzních proteinů LT- β -R-Ig nebo LFA-3-Ig a antigen.

Obr. 3 ukazuje výsledky imunohistochemické analýzy, která dokazuje nepřítomnost germinálních center ve slezině myši ošetřovaných LT- β -R-Ig a MR-1 (protilátka proti ligand CD40) a přítomnost folikulárních dendritických buněk ve slezině myši ošetřovaných pouze MR-1 bez LT- β -R-Ig. Fúzní proteiny a SRBC byly podávány stejně jako u obr. 2.

Obr. 4 je imunohistochemická analýza exprese adresinu, která je změněna v lymfatických uzlinách (LN) myši ošetřovaných *in utero* a dále po narození LT- β -R-Ig.

Obr. 5 je imunohistochemická analýza umístění lymfocytů a exprese makrofágových markerů v mesenterických lymfatických uzlinách (LN) myši ošetřovaných (jako na obr. 4) *in utero* a dále po narození LT- β -R-Ig.

Obr. 6 je imunohistochemická analýza ukazující, že ošetřování myši LT- β -R-Ig inhibuje protilátkovou odpověď na SRBC.

Obr. 7 představuje scematically zachycení imunitních komplexů na FDC.

Podrobný popis vynálezu

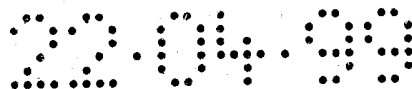
V této části je vynález ještě podrobněji popsán, aby mohl být zcela vysvětlen a pochopen.

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

Termín "zárodečné centrum" (nebo "germinální centrum") označuje folikul B buněk, které se vytvářejí po imunizaci antigenem. Objevení se takového histologického místa je ve vztahu s optimálním vytvářením paměti, přepínáním isotypů, somatickou hypermutací afinity zráním imunitní odpovědi.

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

Termín "adresin" označuje molekulu účastnící se nasměrování přenosu lymfocytů do sekundárních lymfatických orgánů. Takové molekuly jsou exprimovány na endotelových buňkách, na buňkách vysokého endotelu žilek lymfatických uzlin. Adresiny sleziny zatím nejsou známy. MAdCAM-1 je



mukózový adresin, PNAd je periferní adresin.

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

Termín "cytokin" v tomto textu znamená molekulu, která zprostředkovává interakci mezi buňkami. "Lymfokin" je pak cytokin uvolňovaný lymfocyty.

Termín "Th1" se týká podtřídou pomocných T buněk, které produkují LT- α , interferon- γ a IL-2 (a další cytokiny) a které vyvolávají zánětlivou reakci ve spojení s buněčnou (t.j. bez účasti imunoglobulinů) imunitní odpovědí.

Termín "Th2" označuje podtřídou pomocných T buněk, které produkují cytokiny včetně IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 a které jsou spojeny s imunoglobulinovou, t.j. humorální imunitní odpovědí.

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

Termín "protilátka anti-LT- β -receptor" popisuje jakoukoliv protilátku, která se specificky váže k alespoň jednomu epitopu na receptoru LT- β .

Termín "protilátka anti-LT" popisuje jakoukoliv protilátku, která se specificky váže k alespoň jednomu epitopu na LT α , LT β , nebo komplexu LT- α/β .

Termín "signální dráha LT- β -R" ("signalizace LT- β -R") označuje molekulární reakce spojené s celou metabolickou

cestou přenosu signálu LT- β -R a další molekulární reakce, které k ní vedou.

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

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

Termín "LT ligand" znamená heteromerický komplex LT α/β nebo jeho derivát, který se specificky váže na receptor LT- β .

Termín "doména LT- β -R vázající ligand" nebo "vazebná doména LT- β -R pro ligand" popisuje část nebo části LT- β -R, které se účastní specifického rozpoznání a interakce s ligandem LT.

Termíny "povrchový LT" a "povrchový LT komplex" označují komplex, skládající se z podjednotky LT- α a podjednotky LT- β vázané na membránu, včetně mutovaných, pozměněných a chimérických forem jedné nebo více podjednotek, kterýžto komplex je prezentován na povrchu buňky.

"Povrchový ligand LT " znamená povrchový LT komplex nebo jeho derivát, který se specificky váže na receptor LT- β .



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

Lymfotoxin- β : člen rodiny TNF

Cytokiny příbuzné s nádorovým nekrotickým faktorem (TNF "tumor necrosis factor") se vyskytují jako velká rodina pleiotropních mediátorů účastnících se regulace imunity a hostitelské obranyschopnosti. Členové této rodiny se vyskytují ve formě vázané na membránu, která lokálně působí prostřednictvím přímého mezibuněčného kontaktu, anebo ve formě secernovaného proteinu, který působí na vzdálené cíle. Paralelní rodina receptorů příbuzných TNF reaguje s těmito cytokiny a spouští tak různé metabolické dráhy včetně buněčné smrti, proliferace, diferenciací tkání a zánětlivé reakce.

TNF, lymfotoxin- α (LT- α , také zvaný TNF- β), a lymfotoxin- β (LT- β) jsou členy rodiny TNF ligandů, která zahrnuje také ligandy receptorů Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 a 4-1BB (Smith a kol., Cell 76: 959-962, 1994). Signální dráhy některých členů TNF rodiny, včetně TNF, LT- α , LT- β a Fas, mohou indukovat odumírání nádorových buněk tím, že způsobí nekrózu nebo apoptózu (programovanou buněčnou smrt). TNF a mnoho dalších interakcí ligand-receptor TNF rodiny ovlivňuje v netumorigenních buňkách vývoj imunitního systému a imunitní odpověď na různé antigeny.

Většina komplexů LT- α / β asociovaných s membránou

(povrchových LT) má stechiometrii LT- α 1/ β 2 (Browning a kol., Cell 72: 847-856, 1993, Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Povrchové LT ligandy se nevážou na TNF-R s vysokou afinitou a neaktivují signální dráhu TNF-R. Jiný receptor příbuzný TNF, zvaný LT- β receptor (LT- β -R), váže tyto povrchové lymfotoxinové komplexy s vysokou afinitou (Crowe a kol., Science 264: 707-710, 1994).

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

Současný výzkum genového cílení ("gene targeting") předpokládá úlohu LT- α / β ve vývoji sekundárních lymfatických orgánů (Banks et al., J. Immunol. 155, 1685-1693, 1995, DeTogni et al., Science 264, 703-706, 1994). Skutečně myši s deficitem LT- α postrádají lymfatické uzliny (LN) a Peyerovy ostrůvky (PP). Jejich sleziny mají narušenou architekturu a exprese funkčních markerů na buňkách marginální zóny sleziny je pozměněna (Banks et al., 1995, De Togni et al., 1994, Matsumoto et al., Science 271, 1289-1291, 1996). Žádná z těchto vlastností nebyla popsána u myši s geneticky vyřazenou funkcí ("knock out") TNF receptoru (Erickson et al., Nature 372, 560-563, 1994, Pfeffer et al., Cell 73, 457-467, 1993, Rothe et al., Nature 364, 798-802, 1993). Původce nedávno definoval roli membránových komplexů LT- α / β ve vývoji sekundárních lymfatických orgánů tím, že ukázal, že

potomstvo myši, kterým byla v průběhu gestace injikována rozpustná forma LT- β -R fúzovaného s úsekem Fc lidského IgG1 (LT- β -R-Ig) postrádá většinu lymfatických uzlin a vykazuje narušenou architekturu sleziny (Rennert et al., 1996, Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs, J. Exp. Med. 184, 1999-2006). V jiné studii bylo ukázáno, že transgenní myši s podobným konstruktem LT- β -R-Ig, jehož exprese začala tři dny po narození, měly lymfatické uzliny. Ale měly narušenou architekturu sleziny a několik markerů slezinné marginální zóny nebylo exprimováno (Ettinger et al., Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble LT- β -R/IgG1 fusion protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13102-7). Tyto údaje společně ukazují, že zde existuje dočasný požadavek na membránové funkce LT pro zprostředkování účinků na vývoj sekundárních lymfatických orgánů, ale bez účinku na architekturu sleziny.

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

Lymfatická tkáň nebo tkáň podobného typu nevzniká jen v průběhu vývoje, ale také při určitých patologických stavech, jako jsou např. chronické záněty, v procesu zvaném neolymfoorganogeneze (Picker a Butcher, Annu. Rev. Immunol. 10, 561-591, 1992, Kratz et al., J. Exp. Med. 183, 1461-1471,

1996). Tyto procesy jsou zjevně ovlivňovány členy rodiny TNF. U transgenních myši s genem LT- α řízeným promotorem krysího inzulinu (RIP-LT) se vyvinuly chronické zánětlivé léze s charakterem organizované lymfatické tkáně (Kratz et al., J. Exp. Med. 1183, 1461-1471, 19965, Picarella et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10036-10040, 1992).

Vyhodnocení funkce LT v průběhu imunitní odpovědi závislé na T buňkách pomocí myši deficitních v LT- α ukázalo na nezbytnost LT pro vytváření GC, a zřejmě také pro udržování organizované struktury folikulárních dendritických buněk (FDS) a pro imunitní humorální odpověď (Banks et al., J. Immunol. 155, 1685-1693, 1995, Matsumoto et al., Science 271, 1289-1291, 1996, Matsumoto et al., Nature 382, 462-466, 1996). myši deficitní v TNF-R55 také postrádají FDC, nevyvíjí se u nich GC a nejsou schopny optimální imunitní odpovědi na ovčí červené krvinky (SRBC). To předpokládá, že TNF-R55 může být spouštěn rozpustným signálem LT nebo TNF ve většině takových odpovědí (LeHir et al., J. Exp. Med. 183, 2367-2372, 1996, Alexopoulou et al., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 228, 1996, Pasparakis et al., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 239, 1996). Funkční role pro dráhu povrchového LT/LT- β -R v imunitní humorální odpovědi nebyla dosud identifikována.

Receptor LT- β , člen rodiny receptorů TNF, specificky váže povrchové LT ligandy. LT- β -R váže heteromerické LT komplexy (převážně LT- α 1/ β 2 a LT- α 2/ β 1), ale neváže ani TNF ani LT- α (Crowe a kol., Science 264: 707-710, 1994).

mRNA pro LT- β -R byla nalezena v lidské slezině, brzlíku i dalších orgánech spojených s imunitou. Ačkoliv výzkum exprese LT- β -R je teprve v počáteční fázi, profil exprese LT- β -R je podobný profilu p55-TNF-R, kromě toho, že LT- β -R

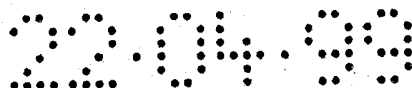
chybí na T a B buňkách periferní krve a na liniích T a B buněk.

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

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

Lymfotoxin- β (zvaný také p33) je exprimován na povrchu myších i lidských T lymfocytů, linií T buněk, linií B buněk a zabíječských buněk aktivovaných lymfokinem (LAK). LT- β je předmětem již projednávaných patentových přihlášek stejných původců jako předkládaný vynález PCT/US91/04588, publikované 9. ledna 1992 jako dokument WO 92/00329, a PCT/US93/11669, publikované 23. června 1994 jako WO 94/13808, na které se zde odkazujeme.

Povrchové LT komplexy jsou exprimovány primárně aktivovanými T lymfocyty (pomocnými, Th1 i zabíječskými buňkami) a B lymfocyty a zabíječskými buňkami, jak se dá ukázat analýzou pomocí FACS nebo imunohistologickou analýzou



užitím protilátek anti-LT- α nebo rozpustných fúzních proteinů LT- β -R-Fc. V projednávané přihlášce stejného původce US 08/505 606 podané 21. července 1995 jsou popsány přípravky a způsoby užívající rozpustné LT- β receptory a protilátky specifické proti LT- β receptoru a ligand jako léčivo pro léčení imunitních chorob zprostředkovaných Th1 buňkami.

Povrchové LT byly také nalezeny na klonech lidských cytotoxických T lymfocytů (CTL), v aktivovaných periferních mononukleárních lymfocytech (PML), lymfocytech periferní krve aktivovaných IL-2 (LAK), periferních B lymfocytech aktivovaných buď mitogenem z *Phytolacca americana* nebo anti-CD40 (PBL), a různých T a B buněk pocházejících z lymfoidních nádorů. Zapojení cílových buněk nesoucích alloantigen specificky indukuje expresi povrchových LT u klonů CD4⁺ a CD8⁺ CTL.

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

Až do předložení tohoto vynálezu nebyl význam signální dráhy LT- β -R pro humorální nebo imunogenní odpověď dobře vysvětlen. Původci poprvé v předkládaném vynálezu objevili, že činidlo blokující dráhu LT, buďto LT- β nebo LT- β -R, může změnit humorální imunitní odpověď u zvířete. Předkládaný vynález se tak v širším významu týká způsobu, jak změnit humorální imunitní odpověď u zvířete, přičemž tento způsob

obsahuje krok, kdy se podá farmaceutický přípravek, který obsahuje terapeuticky účinné množství činidla blokujícího dráhu LT, výhodně blokátoru LT- β -R.

Jakékoliv blokující činidlo může být použito podle vynálezu a odborník snadno stanoví činidlo, které blokuje LT- β -R. Tak např. takové činidlo může obsahovat malé molekulové inhibitory receptoru, rozpustné receptory LT- β , protilátky namířené proti LT- β -R nebo protilátky namířené proti povrchovému ligandu LT. Ve výhodném provedení vynálezu blokující činidlo obsahuje rozpustný LT- β -R, který má vazebnou doménu pro ligand, která může selektivně vázat povrchový LT ligand, a výhodněji, kde rozpustný LT- β -R obsahuje Fc doménu lidského imunoglobulinu.

V jiném provedení předkládaného vynálezu výhodně blokující činidlo obsahuje monoklonální protilátky namířené proti LT- β -R, včetně výhodných anti-lidských monoklonálních protilátek BDA8 proti LT- β -R a B9 proti LT- β . Ještě výhodnější protilátky jsou A1.D5.18 a A0.D12.10 a BB-F6. V některých případech může být výhodnější použít monoklonální protilátky namířené proti myšimu povrchovému LT ligand.

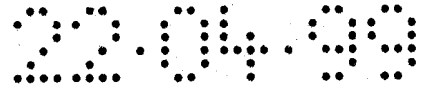
Dlouhodobá prezentace antigenu na FDC je pravděpodobně velmi důležitá u autoimunitních nemocí, kde kontinuální aktivace imunitního systému endogenními nebo autoantigeny udržuje nemoc. Zachycení imunitních systémů na FDC je znázorněno na obr. 7. Schopnost odstranit tyto imunitní komplexy z FDC by mohla sloužit k redukci imunitní aktivace a k utlumení nemoci nebo dokonce k zastavení postupu nemoci. Takové autoimunitní nemoci, na kterých se podílejí reakce aberantní protilátky jsou zřejmým cílem pro inhibitory LT dráhy, ačkoliv i autoimunitní nemoci „klasicky“ zprostředkované T buňkami mají dosud nerozpoznanou humorální

složku a mohou být tudíž ovlivněny.

Obdobně na poli transplantační medicíny, odvržení štěpu neboli „nemoc hostitel versus štěp a štěp versus hostitel“ vyžaduje prezentaci antigenu, aby mohla přetrvávat. Mechanismy zde popsané pro manipulaci FDC se mohou aplikovat také na problémy spojené s rozpoznáváním „ne-vlastního“, tj. při transplantacích.

Kromě toho, kontinuální prezentace antigenu nebo udržování antigenní paměti mohou hrát značnou roli v autoimunitních nemocích způsobených tzv. molekulárním mimikry. Např. imunitní reakce na infekční agens lymské nemoci *Borelia burgdorferi* vede k nemoci podobné artritidě, pravděpodobně proto, že nějaký antigenní epitop v této bakterii je podobný nějaké normální složce kloubu. Odstranění antigenu lymské nemoci vázaného na FDC může zmírnit artritidu indukovanou lymskou nemocí. Taková terapie by mohla být vhodná také v jiných případech mimikry spojených s infekčním agens.

Původce překvapivě zjistil, že podání činidla blokujícího LT- β -R je schopno interferovat s prezentací a/nebo depozicí antigenů na folikulárních dendritických buňkách. Typicky B buňky rozpoznávají antigeny jako imunitní komplexy vázané na povrch folikulárních dendritických buněk. Folikulární dendritické buňky si mohou udržet antigen po nesespecificky dlouhé období. Periodický kontakt s antigenem navázaným na FDC tak může být spojen s udržováním paměti B buněk. Takže způsoby podle předkládaného vynálezu se týkají mnohých nemocí, které jsou závislé na prezentaci antigenu na dendritických buňkách. Podání blokujícího činidla podle vynálezu může být provedeno před vnesením antigenu do zvířete, a v tomto případě pak blokující činidlo pak zabrání



všem nebo alespoň části depozic antigenu na folikulárních dendritických buňkách, čímž se zmírní nebo úplně odstraní imunitní odpověď. Alternativně se blokující činidlo podle vynálezu může podat zvířeti v okamžiku po tom, co již folikulární dendritické buňky na sobě antigen mají asociovaný. Způsob podle vynálezu v takovém případě může zrušit tuto asociaci, takže očekávaná imunitní odpověď bude zmírněna nebo úplně odstraněna. Takže způsoby podle předkládaného vynálezu zahrnují úplnou nebo alespoň částečnou eliminaci imunitních komplexů již navázaných na folikulech B buněk nebo zabránění, úplné nebo částečné, zachycení imunitních komplexů ve folikulech buněk.

Schopnost rozrušit asociaci mezi antigen prezentujícími folikulárními dendritickými buňkami a imunitním komplexem se zdá být jedinečnou vlastností dráhy LT- β . Tak např. anti-CD40 (MR-1) je jiný člen rodiny TNF a je také exprimován na folikulárních dendritických buňkách. Bylo ukázáno, že podobně jako LT- β -R/Ig také MR-1 zabraňuje tvorbě germinálních buněk, ale neovlivňuje expresi markerů FDC. Anti-CD40-L na rozdíl od LT- β -R nezabraňuje zachycení imunitních komplexů na folikulárních dendritických buňkách ani není schopen eliminovat imunitní komplexy již jednou zachycené na folikulárních dendritických buňkách. Kromě toho původce ukázal, že anti-CD40-L neovlivňuje přežívání a/nebo udržování dříve vzniklých paměťových B buněk.

Ačkoliv není známa podstata rozdílů mezi dopadem činidel blokujících anti-CD40-L a LT- β -R, hypoteticky se má za to, že CD40 poskytuje signály pro přežívání B buněk. Avšak systém LT je kritický pro udržování folikulárních dendritických buněk v plně diferencovaném a funkčním stavu, tj. v takovém stavu, který je nezbytnou podmínkou reakce zárodečných center.

a vytváření paměťových B buněk a jejich udržování. Takže blokování dráhy CD40 (CD40L může zabránit vytváření paměťových buněk, ale neovlivní zásobu již jednou vytvořených paměťových buněk. Blokování dráhy LT na druhé straně zabrání nejen vytváření a udržování paměťových B buněk, ale ovlivní i udržování již dříve vytvořených paměťových buněk.

Další možností využití inhibice dráhy LT spočívá v ovlivňování virů, které vytvářejí reservoáry v kompartmentu folikulárních dendritických buněk (FDC). Dobrým příkladem takového viru je HIV. Po virové infekci značné množství viru zůstává na FDC ve folikulech B buněk v sekundárních lymfatických orgánech (Heath et al., 1995, "Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity", *Nature* 377: 740-4). Předpokládá se, že virus je v podobě komplexů buďto s komplementem nebo imunoglobulinem vázán buď na Fc receptory nebo komplementové receptory nebo receptory obojího typu. Takže virus využívá normálního mechanismu imunitního systému k tomu, aby pozdržel antigenní paměť na velmi dlouhou dobu. V průběhu nemoci se pak objevuje akutní infekce lymfocytů primárně v těchto místech. Bylo vypočteno, že během asymptomatické fáze infekce je "pool" viru v tomto kompartmentu asi 10x větší než kolik obsahují T buňky a monocyty (Cavert et al., 1997, "Kinetics of response in lymphoid tissue to antiretroviral therapy of HIV-1 infection", *Science* 276: 960-4). V současných způsobech léčení virové infekce HIV se kombinují mnohé antivirové přípravky, aby se snížilo celkové množství viru a aby se zabránilo úniku rezistentních variant. Omezení této terapie spočívá ve špatné komplianci terapie a také v tom, že v průběhu těchto dlouhých intervalů se může zbytkový virus volně vyvíjet a mutovat na rezistentní varianty, a tak

zabránit léčení. Zatímco celkové množství viru v kompartmentu FDC je během terapie četnými přípravky dramaticky sníženo, přípravky samy jsou většinou namířeny proti mechanismu virové replikace a tedy nikoliv proti nereplikujícímu se viru na povrchu FDC. Takže rezervoár viru na FDC může sloužit jako inokulum pro opakované rozšíření infekce po zastavení podávání léků. Kromě toho je známo, že FDC mohou přeměnit neutralizovaný virus na infekční formu viru, což jen dále podtrhuje význam těchto buněk v patogenezi HIV.

Jelikož inhibice dráhy LT může způsobovat, že FDC uvolní imunitní komplexy z buněčného povrchu, může být uvolněn i HIV v podobě imunitních komplexů. Bylo by žádoucí uvolnit veškerý HIV z tohoto kompartmentu ještě před započetím režimu terapie s několika kombinovanými přípravky, neboť uvolněný virus by mohl být buďto ovlivněn a odstraněn z těla nebo by byl citlivější na podávané léky. Taková kombinace by mohl vést k podstatnému snížení celkového zbytkového viru na velmi nízkou hladinu a případně by mohla vést k vyléčení. V takovém případě by byly užitečné jak LT- β -R/Ig nebo blokující protilátky, a to buďto proti ligandu nebo proti receptoru. Případný postup léčení by měl zahrnovat zahájení podávání léků, a pak, během několika dalších dní, uvolnění všech vázaných virů jedním nebo opakovaným podáváním inhibitorů dráhy LT. Jakmile jednou dojde ke snížení množství viru, další podávání LT činidla již není potřeba.

Virus HIV je zvláště dobře zkoumaný příklad, ale je pravděpodobné, že i jiné viry se mohou skrývat na FDC v klidovém stavu a čekat na situaci, kdy dojde k nějakému narušení imunitního systému a jeho zatížení dalšími antigeny, a následně pak k uvolnění viru z FDC a jeho opětovnému rozšíření. Proto se předkládaný vynález týká také jakéhokoliv

prostředku k inhibici dráhy LT, který zabrání komplikacím s virem vázaným na FDC.

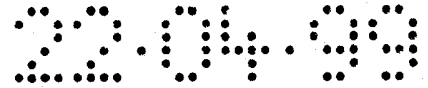
Předkládaný vynález má značné důsledky pro řadu nemocí, které jsou závislé na prezentaci antigenu na dendritických buňkách a na odpovědi vytvářené paměťovými B buňkami. Monoklonální protilátka namířená proti lidskému LT- α zvaná AOD12 byla schopná dobře blokovat LT- α / β 2 signální dráhu ve srovnání s většinou monoklonálních protilátek proti lidskému LT- α , a byla málo účinná proti samotnému LT- α . Takové monoklonální protilátky byly získány imunizací rozpustným ligandem LT- α / β 2, což vedlo k objevení protilátek s jedinečnou specifičností. Kromě toho zastáváme názor, že monoklonální protilátky anti-LT- α se specifičností namířenou přednostně proti LT- α / β 2 komplexům lze najít pouze po takovémto typu imunizace a nikoliv po imunizaci samotným LT- α , a představují tudíž jedinečnou třídu protilátek anti-LT- α .

Příklady provedení vynálezu

Materiál a metody

Myši

Načasovaně březí myši Balb/c byly zakoupeny od firmy Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), byly chovány v obvyklých klecích a zacházelo se s nimi v souladu s institucionálními směrnici. Proteiny receptoru Ig se injikovaly do ocasní žíly (i.v.) březí myši. Potomstvo těchto myši a 5 týdnů staré samice myši Balb/c (zakoupené od Jackson Laboratory, Bar

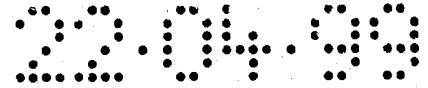


Harbor, ME) se injikovaly fúzními proteiny prostřednictvím intraperitoneální (i.p.) cesty.

Fúzní proteiny a protilátky

Fúzní proteiny obsahovaly extracelulární doménu buď myšího $LT\beta$ -R, lidského TNF-R55 nebo lidského LFA-3 (který neváže myši CD2), fúzovanou ke kloubové oblasti, a domény C_{H2} a C_{H3} lidského IgG1 byly připraveny, jak bylo již popsáno (Force et al., J. Immunol., 155, 5280-5288, 1995, Miller et al., J. Exp. Med., 178, 211-222, 1993). Purifikovaný lidský IgG1 použitý jako kontrola byl zakoupen od firmy Protos Immunoresearch (San Francisco, CA). MR1, protilátka proti myšimu CD40 ligand byla zakoupena od firmy Pharmingen (San Diego, CA).

Protilátky (MOMA-1, ED3) specifické pro markery exprimované myšimi metalofilními makrofágy (MM), (ED3 rozpoznává sialoadhezin), nebo specifické pro myši retikulární fibroblasty (ER-TR-7) byly zakoupeny od firmy Serotec (Oxon, UK). Protilátky specifické pro myši B220, CD4, a MadCAM-1 (MECA 367) byly zakoupeny od firmy Pharmingen (San Diego, CA). Protilátku specifickou pro marker exprimovaný makrofágy myši marginální zóny poskytl Dr. Reina Mebius (Vrije Universiteit, Amsterdam). Protilátky (FDC-M1 a FDC-M2) specifické pro myši folikulární dendritickou buňku (FDC) byly popsány již dříve (Marda et al., J. Immunol. 148, 2340-2347, 1992). Anti-myší protilátku CR1, (která značí také FDC) laskavě poskytl Dr. Randolph J. Noelle (Dartmouth Medical School). Pro detekci adresinu periferní lymfatické uzliny (PNAd) se používala protilátka MECA 79 (supernatant pocházející z buněk zakoupených od ATCC, Rockville, MD).



Antigeny a imunizace

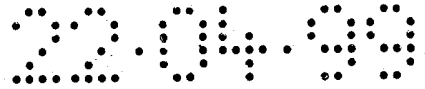
Myši se imunizovaly i.p. se 100 μ l 10% suspenze SRBC (zakoupené od firmy Colorado Serum Company), což je ekvivalent $1-5 \times 10^4$ SRBC na imunizaci.

Imunohistochemické analýzy

Slezina a lymfatické uzliny byly zmrazeny v zalévacím médiu OCT (Miles, Elkhart, IN) a upevněny pro řezání na kryostatu. Řezy silné 7-10 μ m byly sušeny a fixovány acetonem. Řezy se inkubovaly s konjugovanými protilátkami 1 hodinu při teplotě místnosti ve zvlhčené komůrce poté, co se protilátky naředily pufrem A, fyziologickým roztokem pufrovaným Tris (TBS-A, 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20 (v/v), 0,25% bovinní sérový albumin (BSA)), pak se řezy opláchly v TBS-B (0,05 M, Tris, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20) a fixovaly 1 min. v metanolu před zahájením enzymatické reakce. Aktivity křenové peroxidázy (HRP) a alkalické fosfatázy (AP) se vyvíjely pomocí substrátové soupravy s tabletami DAB (Sigma, St. Louis, MO) a 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfátu/tetrazoliumnitromodř (BCIP/NBT, Sigma). Tkáňové řezy se fixovaly 5 min. v metanolu a kontrastně barvily dle Giemsy (Fluka, Buchs, Švýcarsko).

Obrazová fluorescenční analýza

Pro imunofluorescenční značení byly zmrazené řezy fixovány acetonem, sušeny na vzduchu a předem blokovány 5 μ g/ml anti-CD16/CD32 Fc blokujícího činidla (Pharmingen, San Diego, CA) ve fyziologickém roztoku pufrovaném Tris s 0,25% BSA, 0,05% Tween-20 a 10% králičím sérem agregovaným zahřátím. Řezy se značily ve stejném pufru za použití následujících mAb (monoklonálních protilátek) a detekčních



reagencií: 10 µg/ml biotinylovaná anti-B220 mAb (Pharmingen) následovaná 20 µg/ml streptavidin-FITC (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), 10 µg/ml MECA 367 následovaná 10 µg/ml PE-kozí F(ab')₂ anti-kryší IgG (Southern Biotechnology Associates), supernatant z tkáňové kultury MECA79 následovaný 20 µg/ml FITC-myší anti-kryší IgM (Pharmingen), 20 mg/ml anti-sialoadhesin mAb následovaná 10 µg/ml PE-kozí F(ab')₂ anti-kryší IgG (Southern Biotechnology Associates), 50 µg/ml biotinylovaná PNA (Vector Laboratories, Burlingame, CA) následovaná 10 µg/ml streptavidin-PE (Southern Biotechnology Associates), 1:5 naředěná mAb ze supernatantu buněčné kultury MOMA-1 následovaná 20 µg/ml FITC-myším anti-kryším IgM (Pharmingen). Některé řezy byly značeny několika mAb simultánně, aby byla možná obrazová několikavrstevná analýza. Všechny řezy se pozorovaly za zvětšení 50x a fotografovaly za použití Ektachrome P1600 (Kodak, Rochester, nebo se zachycovaly jako oddělené červené a zelené obrazové soubory, jak bylo již dříve popsáno (Renner et al., J. Exp. Med., listopad 1996, v tisku).

Hemaglutinační testy

Sériová ředění séra se prováděla na 96jamkových mikrotitračních destičkách (Costar, Cambridge, MA) v PBS/1% glukóze. SRBC-specifický IgM titr se určoval přidáním 25 µl 10% SRBC suspenze do každé jamky a inkubací destičky 1 hodinu ve zvlhčovaném inkubátoru ve 37°C. Pro SRBC-specifický IgG se séra inkubovala 30 min. ve 37 °C s 20 µl/jamku 1% merkaptoetanolu (o/o) (Bio-Rad, Richmond, CA), aby se vyloučily IgM pentamery. Poté se přidalo 25 µl/jamku 10% suspenze SRBC, následováno 25 µl/jamku 10 mg/ml roztoku

(v PBS/1% glukóze) kozího anti-myšího IgG (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) jako zkříženě vázajícího činidla pro hemaglutinaci. Titr se určoval jako převrácená hodnota posledního ředění séra, pro které je jasně zjevná hemaglutinace.

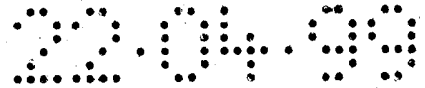
Testy ELISA

Pro analýzy pro receptor-Ig v plazmě se používaly mAb specifické pro myší $LT\beta$ -R (Browning et al., připravovaný rukopis), LFA-3 (Miller et al., J. Exp. Med., 178, 211-222, 1993) nebo doménu CH3 lidského IgG_1 (CDG5, připraveno v Biogenu), přímo imobilizováno (10 μ g/ml) na 96jamkových mikrotitračních destičkách pro vylučování a oslí anti-lidský IgG_1 - křenová peroxidáza (HRP) pro detekci (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, ředění 1:4000).

Produkce rozpustných molekul $LT\beta$ -R

Činidlo blokující $LT\beta$ -R podle jednoho provedení tohoto vynálezu obsahuje molekulu $LT\beta$ receptoru. Obr. 1 ukazuje sekvenci extracelulárního úseku lidského $LT\beta$ -R, která kóduje doménu vázící ligand. Na základě znalosti sekvence (obr. 1) a využitím postupů rekombinantní DNA v oboru dobře známých, je možné klonovat funkční fragment domény vázající ligand do vektoru a pak exprimovat ve vhodné hostitelské buňce, a tak produkovat rozpustnou $LT\beta$ -R molekulu. Rozpustné $LT\beta$ -R molekuly, které soutěží (kompetují) s nativními $LT\beta$ receptory o LT ligand v testu popsaném výše jsou vybrány jako činidlo blokující $LT\beta$ -R.

Rozpustné $LT\beta$ receptory obsahující sekvenci aminokyselin vybranou ze sekvence uvedené na obr. 1 se mohou připojit k jedné nebo více heterologní proteinové doméně



("fúzní doméně"), aby se zvýšila *in vivo* stabilita receptorového fúzního proteinu, nebo aby se modulovala jeho biologická aktivita nebo lokalizace.

Výhodně jsou použity k vytvoření receptorových fúzních proteinů stabilní plazmatické proteiny, které mají typicky poločas oběhu větší než 20 hodin. Takové plazmatické proteiny jsou např. (ale výčet není omezující) imunoglobuliny, sérový albumin, lipoproteiny, apolipoproteiny a transferrin. Sekvence, které zacílí rozpustnou LT- β -R molekulu na určitý buněčný nebo tkáňový typ, se mohou také připojit k doméně vázající ligand, aby se vytvořil specificky lokalizovaný rozpustný fúzní protein LT- β -R.

Buď celý, nebo funkční úsek z extracelulární oblasti LT- β -R obsahující doménu vázající ligand, se může fúzovat s konstantním úsekem imunoglobulinu, např. s Fc doménou těžkého řetězce lidského IgG1 (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Rozpustné fúzní proteiny receptor-IgG jsou výhodné, jsou běžným imunologickým reagens a způsoby jejich přípravy jsou v oboru dobře známy (viz např. U.S. patent č. 5 225 538, na který zde odkazujeme).

Funkční doména vázající ligand z LT- β -R se může fúzovat s Fc doménou imunoglobulinu (Ig) odvozeného z imunoglobulinu jiné třídy či podtřídy než IgG1. Fc domény protilátek patřících do odlišných tříd nebo podtříd mohou aktivovat odlišné druhotné efektorové funkce. K aktivaci dojde, když se Fc doména naváže na vhodný receptor. Druhotné efektorové funkce zahrnují např. schopnost aktivovat komplement, křížově reagovat s placentou nebo vázat různé mikrobiální proteiny. Vlastnost různých tříd a podtříd imunoglobulinů jsou popsány v Roitt a kol., Immunology, s. 4.8, Mosby-Zear Book Europe Ltd., 3. vyd., 1993).

Aktivace komplementu iniciuje kaskádu enzymatických reakcí, které zprostředkovávají zánětlivou reakci. Jednotlivé produkty komplementu mají různé funkce včetně poutání bakterií, endocytózy, fagocytózy, cytotoxicity, produkce volných radikálů a solubilizace imunitních komplexů.

Enzymová kaskáda komplementu je aktivována Fc doménami protilátek IgG1, IgG3 a IgM s navázanými antigeny. Fc doména IgG2 se zdá být méně účinná a domény IgG4, IgA, IgD a IgE jsou zcela neúčinné v aktivaci komplementu. Takže se dá vybrat Fc doména v závislosti na tom, zda s ní spojená druhotná efektorová funkce je žádoucí pro určitou imunitní odpověď nebo nemoc, která je pomocí fúzního proteinu LT- β -R-Fc léčena.

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

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

Produkce rozpustného lidského fúzního proteinu obsahujícího sekvence vázající ligand fúzované s Fc doménou lidského imunoglobulinu (hLT- β -R-Fc) je popsána v příkladu 1. Jedna linie buněk CHO vytvořená podle příkladu 1, která secernuje hLT- β -R-Fc, je nazvána "hLT β ;hG1 CHO 14". Vzorek byl deponován v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v souladu s Budapeštskou dohodou dne



21. července 1995 pod přístupovým číslem CRL11965.

Produkce rozpustného myšního fúzního proteinu LT- β -R-Ig je popsána v příkladu 2. Buněčná linie CHO připravená podle příkladu 2, která secernuje LT- β -R-Ig je zvána "mLT;R-hG1 CHO 1.3. BB". Vzorek této linie byl deponován v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v souladu s Budapešťskou dohodou dne 21. července 1995 pod přístupovým číslem CRL11964.

Všechna omezení týkající se dostupnosti těchto deponovaných vzorků pro veřejnost budou zrušena, jakmile budou dány záruky udělení patentu pro tuto přihlášku.

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

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

Na základě sekvence domény LT- β -R vázající ligand uvnitř extracelulární domény, která je ukázána na obr. 1, lze vytvářet různé sekvenční varianty, aby se modifikovala afinita rozpustného LT- β receptoru nebo fúzního proteinu pro LT ligand. Rozpustné molekuly LT- β -R podle vynálezu mohou soutěžit o navázání povrchového LT ligandu s endogenními receptory LT- β -R na povrchu buněk. Dá se předpokládat, že

jakákoliv rozpustná molekula obsahující doménu LT- β -R vázající ligand, která soutěží s povrchovými buněčnými receptory LT- β o navázání LT ligandů, je blokující činidlo ve smyslu předkládaného vynálezu.

Zdroj protilátek proti lidskému LT- β -R

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

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

Myší monoklonální protilátky proti lidskému fúznímu proteinu LT- β -R-Fc se připraví tak, jak je to popsáno v projednávané přihlášce původce č. US 08/505 606 podané 21. července 1995. Hybridomová buněčná linie BD.A8.AB9, která produkuje myší monoklonální protilátku BDA8 namířenou proti lidskému LT- β -R byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v souladu s Budapešťskou dohodou dne 12. ledna 1995 pod přístupovým číslem CRL11964.

Všechna omezení dostupnosti pro veřejnost takto uloženého vzorku budou zrušena, jakmile budou dány záruky udělení patentu pro tuto přihlášku.

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

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

Různé třídy rekombinantních protilátek proti LT- β -R se mohou připravit jako chimérické nebo humanizované protilátky

obsahující variabilní domény protilátek LT- β -R a lidských konstantních domén (CH1, CH2, CH3) izolovaných z různých tříd imunoglobulinů. Tak např. protilátky anti-LT- β -R-IgM se zvýšenou valencí míst vázajících antigen lze připravit metodami rekombinantní DNA tak, že se klonuje místo vázající antigen do vektoru, který obsahuje konstantní oblast lidského μ -řetězce (Arulanandam a kol., J. Exp. Med. 177: 1439-1450, 1993, Lane a kol., Eur. J. Immunol. 22: 2573-78, 1993, Traunecker a kol., Nature 339: 68-70, 1989).

Navíc lze užít standardní techniky rekombinantní DNA, aby se změnila afinita vazby rekombinantních protilátek s antigenem, a to tím, že se změní aminokyseliny sousedící s vazebným místem. Afinitu k antigenu u humanizovaných protilátek lze zvýšit mutagenezí založenou na molekulárním modelování (Queen a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033, 1989, WO 94/04679).

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

Zdroj protilátek proti povrchovým ligandům LT

Jiné výhodné provedení vynálezu se týká přípravků a způsobů, které obsahují protilátky, namířené proti LT ligandům, které působí jako činidlo blokující LT- β -R. Stejně, jak se popisuje výše pro protilátky anti-LT- β -R, protilátky proti LT ligandům, účinné jako činidlo blokující LT- β -R, jsou

polyklonální nebo monoklonální protilátky, a mohou se modifikovat rutinními postupy, aby se modulovaly jejich vazebné vlastnosti a imunogeničnost.

Protilátky anti-LT podle předkládaného vynálezu mohou být namířeny individuálně proti jedné ze dvou podjednotek LT, a to včetně rozpustných, mutovaných, změněných nebo chimérických forem LT podjednotek. Pokud se užije podjednotek LT- α , je výhodné, když se výsledné anti-LT- α protilátky váží s povrchovým LT ligandem a nereagují křížově se secernovaným LT- α ani nemodulují aktivitu TNF-R (podle testu popsaného v projednávané přihlášce původce č. US 08/505 606 podané 21. července 1995).

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

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

Myší anti-lidské monoklonální protilátky anti-LT- β byly připraveny postupem popsaným v projednávané patentové přihlášce původce WO 94/13808. Hybridomová buněčná linie B9.C9.1 produkující myší anti-lidské monoklonální protilátky anti-LT- β B9 byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v souladu s Budapeštskou dohodou dne

21. července 1995 pod přístupovým číslem HB11962.

Křeččí anti-myší monoklonální protilátky anti-LT- α/β BB.F6 byly připraveny postupem popsáním v již podané patentové přihlášce původce WO 94/13808. Hybridomová buněčná linie BB.F6.1 produkující křeččí protimyší monoklonální protilátky anti-LT- α/β BB.F6 byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v souladu s Budapešťskou dohodou dne 21. července 1995 pod přístupovým číslem HB11963. Všechna omezení dostupnosti pro veřejnost takto uloženého vzorku budou zrušena, jakmile budou dány záruky udělení patentu pro tuto přihlášku.

Použití rozpustných LT β -R-Ig k inhibici imunologických funkcí povrchového komplexu LT.

Nyní jsme ukázali účinky povrchového LT vazebného činidla, fúzního proteinu skládajícího se z extracelulární domény myšího LT β -R a kloubového úseku, domén CH2 a CH3 lidského IgG1 (LT β -R-Ig), na vznik a charakter imunoglobulinové odpovědi, na udržení buněčné organizace sekundárních lymfoidních tkání včetně účinků na stav diferenciací folikulárních dendritických buněk a formaci zárodečných center, a na expresní hladiny adresinu, které mají vliv na pohyb buněk.

Opakované injekce LT β -R-Ig myším pozměňují organizaci lymfocytů ve slezině a expresi funkčních markerů v buňkách marginální zóny sleziny

Zkoumal se účinek povrchové blokády LT na strukturu sleziny tím, že se myším podalo v šesti po sobě jdoucích týdnech celkem šest injekcí LT β -R-Ig. Myši se pak imunizovaly se SRBC a 4 dny později se jim podala další injekce LT β -R-Ig.

Myši byly usmrceny 10. den po injekci SRBC. Imunohistochemické značení zmražených řezů sleziny odhalilo několik histologických změn. Folikuly, které obsahují u normálních myši kompartment splenických B buněk, nejsou po ošetření $LT\beta$ -R-Ig již déle zřetelně vymezené. Místo toho jsou B buňky nyní organizovány v difúzním pásu obklopujícím oblasti T buněk (obr. 2B) a hranice mezi zónami T a B buněk je rozrušena (obr. 2B). Na rozdíl od toho u kontrolních myši ošetřených LFA-3-Ig jsou folikuly B buněk ve slezině oddělené a je jasné ohraničení mezi oblastmi T a B buněk (obr. 2A).

U myši ošetřených $LT\beta$ -R-Ig chybí exprese markerů buněčného povrchu rozpoznávaných monoklonálními protilátkami ER-TR-9 a MOMA-1 u dvou odlišných populací makrofágů, které sídlí v marginální zóně sleziny. Je známo, že ER-TR-9 značí marker na MZM (Dijkstra et al., Immunol., 55, 23-30, 1985) a MOMA-1 značí marker na metalofilních makrofázích (Kraal a Janse, Immunol., 58, 665-669, 1986) (obr. 2 D,F). Tyto markery jsou exprimovány na buňkách u kontrolně (LFA-3-Ig) ošetřených myši (obr. 2 C,E). Expese sialoadhezinu, dalšího markeru MOMA-1+ makrofágů v myši splenické marginální zóně, u myši ošetřených $LT\beta$ -R-Ig také chybí (data nejsou uvedena).

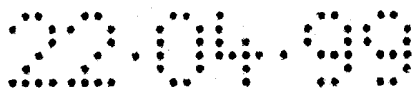
Protilátka MECA-367 váže adhezivní molekulu a slizniční adresin MAdCAM-1, původně popsány na endotelových buňkách Peyerských plátů, mezenterických lymfatických uzlinách, sliznici a lamina propria střev (Briskin et al., Nature, 363, 461-464, 1993, Nakache et al., Nature, 337, 179-181, 1989). Expese MAdCAM-1 byla popsána v marginální zóně sleziny (pravděpodobně exprimováno na endotelových buňkách malých terminálních arteriol otevírajících se do sinus marginalis) a na retikulární síťce v zárodečných centrech (Kraal et al., Am. J. Pathol., 147, 763-771, 1995) (obr. 2G). Značení MECA

367 řezů z myši ošetřených $LT\beta$ -R-Ig ukázalo, že exprese MAdCAM-1 byla ve slezině potlačena (obr. 2H).

Podobně je abnormálně rozloženo značení protilátkou ER-TR-7 (Van Vliet et al., *Cytochem.*, 34, 883-890, 1986), které vykresluje populaci retikulárních fibroblastů v marginální zóně (obrázek 2I), a je silnější v bílé dřeni zvířat ošetřených $LT\beta$ -R-Ig než LFA-3-Ig (obr. 2J). Změny pozorované u myši ošetřených $LT\beta$ -R-Ig byly nezávislé na expozici antigenu, protože vzorec značení byl totožný s neimunizovanými myši ošetřenými $LT\beta$ -R-Ig (data neuvedena).

Ve slezinách myši ošetřených $LT\beta$ -R-Ig je odstraněno vytváření zárodečných center a folikulární dendritické buňky nejsou detekovány

Aby se určilo na histologické úrovni, zda opakované injekce $LT\beta$ -R-Ig myším ovlivňují imunitní odpověď na SRBC, prováděla se analýza tvorby zárodečných center (GC) a distribuce folikulárních dendritických buněk (FDC) jako odpověď na antigenový podnět ("antigen priming"). Zmražené řezy sleziny z myši, které byly předem ošetřeny několikrát $LT\beta$ -R-Ig nebo LFA-3-Ig, jak bylo popsáno na obr. 2, byly označeny arašídovým aglutininem (PNA), aby se vyznačila GC a protilátkou FDC-M1, aby se detekovala FDC, buněčná složka vyžadovaná pro tvorbu GC (Schriever a Nadler, *Adv. Immunol.*, 51, 243-284, 1992, Tew et al., *Immunol. Rev.*, 117, 185-211, 1990). Bylo také ukázáno, že pro tvorbu GC je kritická interakce ligandů CD40-CD40 (Foy et al., *J. Exp. Med.*, 180, 157-163, 1994). Pro srovnání byla skupina myši ošetřena s MR1, anti-myši protilátkou ligandu CD40, následující injekční protokol, u kterého bylo již dříve prokázáno, že inhibuje tvorbu GC (Han et al., *J. Immunol.*, 155, 556-567,



1995). 10 dnů po podnětu SRBC se u myši ošetřených kontrolním proteinem LFA-3-Ig vyvinuly ve slezině četné GC zvýrazněné PNA (obr. 3A). GC nebyly detekovány ve slezině myši ošetřených $LT\beta$ -R-Ig nebo MR1 (obr. 3 B,C). Ale účinek MR1 a $LT\beta$ -R-Ig může být rozlišen dvěma dalšími pozorováními značení na FDC (FDC-M1) v GC (obr. 3D) chybí ve slezině myši ošetřených $LT\beta$ -R-Ig (obr. 3E), ale je stále přítomné ve slezině myši ošetřených MR1 (obr. 3F). Podobná pozorování byla učiněna za použití protilátky FDC-M2 pro označení FDC (data neuvedena). Tak ošetření $LT\beta$ -R-Ig má za následek fenotypové změny FDC ve slezině a selhání tvorby GC.

Kromě označení GC, PNA také značí marginální zónu ve slezině normálních myši. Takové značení bylo také pozorováno u myši ošetřených LFA-3-Ig (obr. 3A) a MR1 (obr. 3C), ale chybělo ve slezině myši ošetřených $LT\beta$ -R-Ig (obr. 3B).

Ukázalo se, že exprese sialoadhezinu, MOMA-1, ER-TR-9, ER-TR-7 a MAdCAM-1 ve slezině myši ošetřených MR1, byla také normální (data neuvedena), což dále odlišovalo molekulární účinky interference se signalizací pro CD40 a $LT\beta$ -R.

Kinetika alterací vyvolaných $LT\beta$ -R-Ig v organizaci lymfocytů sleziny a exprese markerů buněk marginální zóny

Byl analyzován počet injekcí $LT\beta$ -R-Ig vyžadovaných pro ovlivnění organizace lymfocytů a exprese markerů buněk marginální zóny ve slezině. Myši byly injikovány i.p. $LT\beta$ -R-Ig buď jednou nebo několikrát, jak uvedeno v tabulce 1. Některé myši byly poté imunizovány také SRBC v den poslední injekce $LT\beta$ -R-Ig. Na zmražených řezech ze slezin ošetřených myši se hodnotila exprese B220 a CD4 na B a T buňkách a značení s PNA (pro GC) a MECA367 (pro MAdCAM-1), MOMA-1, ER-TR-9 a FDC-M1. Ukázalo se, že kinetika vymizení značení

metalofilních makrofágů, makrofágů marginální zóny, MAdCAM-1, GC a FDC, je rozdílná.

Jedna injekce $LT\beta$ -R-Ig je postačující pro eliminaci značení MAdCAM-1 o týden později. Po třech injekcích $LT\beta$ -R-Ig v týdenních intervalech není detekováno značení na GC a FDC a kompartmenty lymfocytů T/B jsou rozrušeny. Ke zrušení značení metalofilních makrofágů jsou vyžadovány minimálně čtyři injekce $LT\beta$ -R-Ig. Šest injekcí $LT\beta$ -R-Ig neodstraní úplně značení makrofágů marginální zóny protilátkou ER-TR-9 (také zobrazeno na obr. 2 D).

Přesnější analýza rychlé inhibice značení MOMA-1, MAdCAM-1, FDC-M1, FDC-M2 a CR1 po jedné injekci $LT\beta$ -R-Ig se prováděla v nepřítomnosti antigenu (tabulka 2).

Tabulka 2: přesné načasování účinku $LT\beta$ -R-Ig na značení MOMA-1, MAdCAM-1, CR1, FDC-M1 a FDC-M2

	DNY PO JEDNÉ INJEKCI $LT\beta$ -R-Ig						
	0	1	3	5	7	10	14
MOMA-1*	+++	+++	+++	+++		++	++ +
MAdCAM-1*	+++	+/-	-	-	-	-	-
CR1*	+++	+++	++	++	++	++	+
FDC-M1*	+++	+/-	-		-	-	-
FDC-M2*	+++	+/-	-	-	-	-	-

Myši Balb/c, 5-6 týdnů dostávaly jednu i.p. injekci 100 μ g $LT\beta$ -R-Ig nebo lidského Ig. Myši z každé skupiny byly usmrceny v den 0, 1, 3, 5, 7, 10 a 14. Zmražené řezy sleziny byly značeny následujícími protilátkami: krysí proti myším metalofilním makrofágům (MOMA-1), krysí anti-myší MAdCAM-1 (MECA 367), krysí anti-myší FDC (FDC-M1), krysí anti-myší FDC (FDC-M2) a biotinem značenou krysí anti-myší CR1, následováno myší anti-krysí Ig-peroxidázou (MOMA-1, MAdCAM-1, FDC-M1 a FDC-M2) nebo peroxidázou značeným streptavidinem (CR1).

* - Intenzita značení se určovala okem: normální značení +++, snížené značení ++, slabé značení + a žádné značení -. Intenzita značení na řezech z neošetřených zvířat a zvířat ošetřených s LFA-3-Ig byla brána jako referenční pro normální značení. Analyzovaly se řezy z alespoň 2 zvířat na skupinu.

Tabulka 1: Účinek LT β -R-Ig na organizaci sleziny a tvorbu zárodečných center jako odpověď na SRBC u dospělých myši

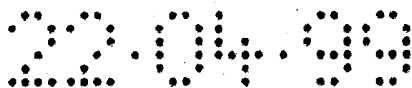
Počet injekcí LT β -R-Ig	Organizace buněk	T/B Metalofilní makrofágy*	Makrofágy marginální zóny*	Expres MADCAM-1*	Zárodečná centra [§]	FDC*
0	normální	+++	+++	+++	+++	+++
1	normální	++	+++	-	+	+
2	lehce abnormální	+	+++	-	+	+/-
3†	porušena	+	++	-	N	N
4†	porušena	+/-	++	-	N	N
5†	porušena	-	+	-	N	N
6	porušena	-	+/-	-	-	-

Myši byly injikovány i.p. se 100 μ g LT β -R-Ig každý týden 1 až 5 týdnů, a poté se usmrtily. LT β -R-Ig se podával před injekcí SRBC i.p. (100 μ l 10% suspenze), jestli není uvedeno jinak, a poslední injekce LT β -R-Ig se podávala ve stejný den jako antigen. Zvířata se usmrtila 10 dnů po injekci SRBC. Zmražené řezy sleziny byly dvojité značeny s biotinylovanou krysí anti-myší B220 a krysí anti-myší CD4, následováno streptavidin-alkalickou fosfatázou a myší ant-krysí Ig-peroxidázou. Splenické řezy byly také značeny s následujícími anti-myšími protilátkami: krysí proti makrofágům marginální zóny (ER-TR9), krysí proti metalofilním makrofágům (MOMA-1), krysí proti MADCAM-1 (MECA 367) a krysí proti FDC (FDC-M1), následováno myší anti-krysí Ig-peroxidázou. Další série zmražených řezů se značila s biotinylovaným arašidovým aglutininem (PNA-biotin), následováno značením se streptavidin-peroxidázou pro detekci zárodečných center. Pozorování se prováděla na řezech z alespoň 3 zvířat ve skupině.

* - Intenzita značení se určovala okem: normální značení +++, snížené značení ++, slabé značení + a žádné značení -. Intenzita značení na řezech z neošetřených zvířat a ošetřených s LFA-3-Ig byla brána jako referenční pro normální značení.

§ - Počet zárodečných center na řez sleziny je zaznamenán následovně: > 10 +++, 5-10 ++, 1-5 +, žádné -.

† - Zvířata z těchto skupin neobdržela SRBC. N - neprovedeno



Myši Balb/c, které obdržely jednu i.p. injekci $LT\beta$ -R-Ig, byly usmrcovány každý den po dobu čtrnácti dnů po injekci a jejich sleziny byly odňaty a zmrazeny. Zmražené řezy sleziny byly značeny s MOMA-1, anti-MAdCAM-1 (MECA-367) a FDC specifickými reagensii: protilátkami FDC-M1, FDC-M2 a anti-CR1. Jeden den po injekci $LT\beta$ -R-Ig bylo značně sníženo značení s reagensii anti-MAdCAM-1, FDC-M1 a FDC-M2 (tabulka 2). Rychlejší inhibice značení FDC-M1 v tomto pokuse ve srovnání s výsledky popsány v tabulce 1 může být způsobena intenzitou značení FDC-M1, která je silnější u imunizovaných zvířat. Značení na CR1 bylo detekovatelné stále po 14 dnech, což svědčilo pro to, že FDC byly stále přítomny 3. den po ošetření s $LT\beta$ -R-Ig, ale že byla potlačena exprese markerů detekovaných s FDC-M1 a FDC-M2. Tak ošetření $LT\beta$ -R-Ig změnilo fenotyp FDC. A nakonec, značení MOMA-1 bylo 14. den sníženo, ale stále detekováno.

Opakované ošetření $LT\beta$ -R-Ig inhibuje expresi adresinu v lymfatických uzlinách

Vyšetřovali jsme expresi adresinu v LN u potomků načasovaně březích myši Balb/c, kterým bylo injikováno i.v. 14. a 17. gestační den 200 μ g proteinu "receptor-Ig". Po narození byli potomci buď neošetřeni nebo byli jednou týdně injikováni 100 μ g $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig nebo LFA-3-Ig i.p. Hladiny fúzních proteinů zůstávaly během života na 10 μ g/ml nebo výše, jak určováno testem ELISA (data neuvedena).

Imunohistochemické značení s MECA367 a MECA79 ukázalo, že MAdCAM-1 a adresiny periferních LN byly zcela chybějící v mezenterických LN myši ošetřených během života s $LT\beta$ -R-Ig (obr. 4 A,B). Sakrální LN těchto myši také postrádaly expresi všech adresinů a cervikální lymfatické uzliny a iliakální

uzliny nevykazovaly značení na periferní lymfatické uzliny (PNAd) (data neuvedena). Utlumení exprese adresinů bylo reverzibilní, protože exprese se v normální hladině obnovila u zvířat, která byla ošetřena pouze *in utero* (obr. 4 G,H). U myši ošetřených během života se 100 $\mu\text{g}/\text{týden}$ TNF-R55-Ig nebo LFA-3-Ig, zůstala exprese adresinu v LN srovnatelná s expresí u neošetřených myši (obr. 4 C,D,E,F).

Lokalizace B lymfocytů a exprese makrofágových markerů je změněna v LN myši ošetřených LT β -R-Ig

Protilátky, které vážou markery na populacích makrofágů v lymfatické uzlině (LN) subkapsulárního sinu (analogické k marginální zóně sleziny), byly použity pro provedení imunohistochemické analýzy LN odebraných z myši, které byly ošetřeny během gestace a kontinuálně po porodu, jak bylo popsáno pro obr. 4 s LT β -R-Ig, TNF-R55-Ig nebo LFA-3-Ig. Fluorescenční snímky se analyzovaly za použití software pro obrazovou analýzu. Ukázalo se, že exprese sialoadhezinu je snížena v LN myši ošetřených s rozpustným LT β -R-Ig (obr. 5 B), ale ne v LN myši TNF-R55-Ig nebo LFA-3-Ig (obr. 5 E, H). V LN myši ošetřených LT β -R-Ig byla stále detekována exprese MOMA-1 na makrofázích v subkapsulárním sinu (obr. 5 C).

Byly také vyhodnoceny účinky kontinuálního ošetření LT β -R-Ig na organizaci lymfocytů v LN. Řezy LN byly značeny s mAb specifickými pro B buněčný marker B buněk B220 a marker T buněk CD4. Aby se identifikovaly oblasti překryvu T a B buněčných zón, použila se obrazová analýza. Ošetření LT β -R-Ig způsobilo rozrušení B buněčných folikulů tak, že B buňky byly přítomny v difúzním pásu na vnějším okraji T buněčné oblasti (obrázek 5 A). Navzdory rozrušení své folikulární struktury

nebyly B buňky přítomny v T buněčných oblastech LN, místo toho se objevily v oblastech, které nejsou normálně obsazeny lymfocyty. Velmi podobný obraz T a B buněčného značení byl pozorován u myši ošetřených během života se 100 $\mu\text{g}/\text{týden}$ TNF-R55-Ig, ale ne u myši ošetřených LFA-3-Ig (obr. 5 D). B buněčné folikuly byly opět rozrušeny a B buňky byly přítomny v oblastech LN, které obvykle neobsahují lymfocyty. Překryv B buněk T buňkami nebyl pozorován.

Ošetření myši $\text{LT}\beta\text{-R-Ig}$ inhibuje protilátkovou odpověď IgM a IgG

Selhání tvorby splenických GC po podnětu SRBC u myši ošetřených několikrát $\text{LT}\beta\text{-R-Ig}$ (jako na obr. 3) svědčilo pro změny v humorální imunitní odpovědi u těchto myši. Aby se to otestovalo přímo, dostaly dospělé myši šest injekcí, jednu týdně, $\text{LT}\beta\text{-R-Ig}$ nebo LFA-3-Ig, a poté následoval podnět SRBC. Myšim se odebrala krev 7. a 14. den po imunizaci a analyzoval se výskyt SRBC-specifických IgM a IgG v séru za použití hemaglutinačních testů. Sedm dní po imunizaci SRBC byl titr IgM normální, ale odpověď IgG je značně snížena u myši ošetřených $\text{LT}\beta\text{-R-Ig}$ ve srovnání s myšmi ošetřenými lidským Ig nebo PBS (obr. 6 A). 14. den po imunizaci ještě stále není detekován SRBC specifický IgG v séru myši ošetřených $\text{LT}\beta\text{-R-Ig}$ a titr SRBC specifického IgM je u těchto myši také snížen více než na polovinu ve srovnání s myšmi ošetřenými lidským Ig nebo PBS (obr. 6 A).

Deset dnů po podnětu SRBC jsou detekována GC ve slezinách myši ošetřených jednou nebo dvakrát s $\text{LT}\beta\text{-R-Ig}$, ale počet GC je značně snížen ve srovnání s kontrolami (tabulka 1). Když myši dostali dvě injekce $\text{LT}\beta\text{-R-Ig}$, první injekci týden před podnětem SRBC a druhou injekci v týž den jako

injekci SRBC, je inhibice odpovědi IgM a IgG na SRBC 7. a 14. (obr. 6 B) den podobná odpovědi detekované, když myši dostaly opakované injekce LT β -R-Ig (obr. 6 A). 30. den po imunizaci SRBC-specifický IgG není detekován a hladiny IgM jsou sníženy o více než 80 % ve srovnání s kontrolami (obr. 6 B). Tyto postupy ošetření LT β -R-Ig mají tedy za následek kompletní inhibici odpovědi IgG a zkrácenou/sníženou odpověď IgM vzhledem ke kontrolám.

Když myši dostaly jednu injekci LT β -R-Ig v týž den, jako podnět SRBC, byly hladiny odpovědi IgM a IgG na SRBC 7. den srovnatelné s odpovědí kontrolních skupin (obr. 6 C). Avšak 24. den po imunizaci jsou titry IgM a IgG sníženy o 30 %. 34. den po podnětu SRBC je titr SRBC-specifického IgM snížen o 50 % ve srovnání s kontrolními skupinami a SRBC-specifický IgG nebyl detekován (obr. 6 C). Tato data ukazují, že protokol ošetření LT β -R-Ig měl za následek zřetelné zkrácení/snížení hladin odpovědi IgM a IgG, tedy že ošetření LT β -R-Ig může inhibovat humorální odpověď, která již byla iniciována.

Nemoci zprostředkované protilátkami

Mnoho orgánově specifických a multisystémových autoimunitních stavů je spojeno s patologickou protilátkovou odpovědí. K takovým stavům patří: *myasthenia gravis*, autoimunitní hemolytická anémie, Chagasova nemoc, Gravesova nemoc, idiopatická trombocytopenická purpura (ITP), systémový *lupus erythematosus* (SLE), Wegenerova granulomatóza, *polyarteriitis nodosa* a rychlá progredující srpková glomerulonefritida (viz Benjamini et al., *Imunology, A Short Course*, Wiley-Liss, New York, 3. vyd., 1996).

Ačkoliv etiologie SLE je neznámá, je dosti známo o imunologickém mechanismu zodpovědným za pozorované patologické změny. Pacienti se SLE tvoří z neznámého důvodu protilátky proti jaderným složkám těla (antinukleární protilátky (ANA)) jmenovitě proti nativní dvojvláknové DNA. Přítomnost těchto protilátek koreluje klinicky nejlépe s patologií renálního postižení u SLE. Tyto protilátky tvoří komplexy s DNA zjevně pocházející z rozpadu normální tkáně, a jako u každé nemoci s imunitními agregáty, tyto komplexy tvoří depozita zachycená na bazální membráně glomerulů, ve stěnách arteriol a v kloubních synoviálních prostorech. Tyto komplexy aktivují komplementovou kaskádu a přitahují granulocyty. Následná zánětlivá reakce je charakterizována jako glomerulonefritis, s výsledným poškozením ledvin vedoucím k proteinurii a hematurii.

Lupusová nefritida byla studována na myších modelech po desetiletí. V současnosti byla na takovém modelu vyhodnocena terapeutická účinnost reagentie specifické pro myší ligand CD40 (Mohan et al., J. Immunol., 154, 1470-1480, 1995). Bylo ukázáno, že akcelerace lupusu přenosem buněk, které vyvolávají tvorbu patogenních protilátek *in vivo*, byla inhibována podáváním monoklonální protilátky, která blokuje interakce ligandu CD40/CD40. Navíc krátká léčba myší s lupusem protilátkou anti-ligand CD40 měla trvalý prospěšný účinek na jejich spontánní nemoc dlouho poté, co byla protilátka odstraněna z jejich organismu. Pokus naznačoval, že patogenní B buňky nemohly tvořit protilátku dokonce ještě 9 měsíců po léčbě, což svědčí pro oddálení expanze autoimunitních paměťových B buněk s důsledkem dlouhodobé léčebné prospěšnosti. Protože jsme ukázali, že reagentie, které blokují interakce $LT\alpha\beta/LT\beta-R$ *in vivo* inhibují vznik

protilátkové odpovědi, mění fenotyp FDC a tvorbu zárodečných center zapojených do optimální generace paměti B buněk, budou $LT\alpha\beta/LT\beta$ -R blokující reagentie tohoto vynálezu použitelné pro léčbu nebo prevenci SLE.

Normální imunitní odpověď na některé patogenní infekční činidlo také vyvolává autoprotiátkovou odpověď, která se může stát nadměrnou a představovat léčebný problém. Jedním příkladem je Chagasova nemoc, zánětlivá kardiomyopatie, která se rozvíjí u člověka a pokusných zvířat s chronickou infekcí *Trypanosoma cruzi*. Z možných mechanismů zapojených do patogeneze lidské Chagasovy kardiomyopatie dostalo v současné době podstatnou experimentální podporu vyvolání autoimunitní odpovědi specifické pro srdce. Nedávná studie (Tibetts et al., J. Immunol., 152, 1493-1499, 1994) zjistila, že protilátky specifické pro srdeční antigeny jsou tvořeny u myši C57Bl/6 se srdeční nemocí, které jsou infikovány *T. cruzi*. Při infekci brazilským kmenem *T. cruzi* se u myši C57Bl/6 rozvíjí kardiomyopatie, která je histologicky podobná kardiomyopatii pozorované u chronicky infikovaných lidí. Antiséra těchto myši reagují se třemi srdečními antigeny, zatímco myši C57Bl/6 infikované kmenem Guayas *T. cruzi*, u kterých se kardiomyopatie nerozvíjí, takové protilátky netvoří. Tato data naznačují, že tyto protilátky jsou specifickými markery kardiomyopatie. Schopnost činidla blokujícího $LT\beta$ -R inhibovat poškození zprostředkované autoprotiátkami může být tedy určena na takovém modelu hlodavců.

Dalším příkladem buněčného poškození autoprotiátkami, které vzniká jako následek určitých infekčních nemocí nebo z jiných neznámých důvodů, je idiopatická trombocytopenická purpura (ITP). U tohoto stavu mají protilátky namířené proti

destičkám za následek zničení destiček (komplementem nebo fagocytárnými buňkami s receptorem Fc nebo C3b), což může vést ke krvácení. Léčiva, která budou inhibovat takové autoimunitní reakce zprostředkované protilátkou *in vivo*, jako je $LT\beta$ -R blokuující činidlo tohoto vynálezu - které inhibuje vznik protilátek, budou rovněž užitečná k léčbě nebo prevenci těchto autoimunitních nemocí.

Normální imunitní odpověď na některá patogenní infekční činidla také vyvolává hypersenzitivní reakce, které se mohou stát nadměrnými a samy o sobě představovat léčebný problém. Nejběžnější příklad přecitlivělosti I. typu je alergická reakce. Ta je zprostředkována protilátkami IgE, které se vážou prostřednictvím jejich Fc části na receptory na žírných buňkách a bazofilech, aby spustily uvolnění farmakologicky aktivních látek, které zprostředkovávají anafylaxi. ITP a Goodpastureův syndrom jsou někdy považovány za reakce II. typu, které nastávají, když se protilátky IgM nebo IgG vážou na antigen na buněčném povrchu a aktivují komplementovou kaskádu. Granulocyty jsou poté přitahovány do místa aktivace a poškození uvolněním lytických enzymů z jejich granul má za následek zničení buněk. Revmatická artritida se považuje za důsledek reakce přecitlivělosti III. typu, zprostředkované imunitními komplexy antigenu (v tomto případě revmatoidního faktoru, autoprottilátky IgM), která se váže na Fc část normálního IgG. Tyto imunitní komplexy se účastní vyvolání zánětu kloubů a poškození charakteristického pro tuto nemoc. Protože tyto patologie jsou zprostředkované částečně protilátkami, léčiva, která budou inhibovat vznik protilátky, jako je $LT\beta$ -R blokuující činidlo tohoto vynálezu budou rovněž užitečná pro léčbu nebo prevenci těchto nemocí.

Léčení podáváním činidla blokujícího LT- β -R

Přípravky podle vynálezu se budou podávat v účinné dávce k léčení určitých klinických stavů. Určení výhodného farmaceutického přípravku a terapeuticky účinné dávky a režimu pro určité použití je plně zvládnutelné a v rámci současného stavu oboru, např. pokud se vezme v úvahu hmotnost pacienta, rozsah požadovaného léčení, tolerance pacienta. Dávky v hodnotě 1 mg/kg rozpustného LT- β -R jsou vhodným výchozím bodem pro optimalizaci léčebných dávek.

Vhodné terapeuticky účinné dávky se také mohou stanovit provedením pokusů *in vitro*, ve kterých se měří koncentrace činidla blokujícího LT- β -R potřebná k vysycení povrchu cílových buněk (v závislosti na činidle buď buňky pozitivní na LT- β -R nebo LT ligand) během 1 až 14 dnů. Test založený na sledování vazby ligand-receptor popsany v projednávané přihlášce původce č. US 08/505 606 podané 21. července 1995 se může použít ke sledování reakce vysycování povrchu buněk. Buňky pozitivní na LT- β -R nebo LT ligand se dají separovat od populace aktivovaných lymfocytů pomocí FACS. Na základě výsledků testů *in vitro* lze stanovit vhodný rozsah koncentrací činidla blokujícího LT- β -R pro další testování na zvířatech způsobem popsáným ve vynálezu.

Podávání rozpustných molekul LT- β -R, protilátek anti-LT-ligand a anti-LT- β -R podle vynálezu, samotných nebo kombinovaných, včetně izolovaných a purifikovaných forem protilátek nebo komplexů, jejich solí nebo farmaceuticky přijatelných derivátů, lze provádět obvyklým způsobem pro podávání látek s imunosupresivní aktivitou.

Farmaceutické přípravky pro tuto terapii mohou být v různých formách. To znamená např. tuhé, polotuhé nebo

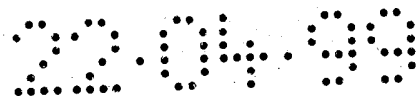


tekuté lékové formy jako např. tablety, pilulky, prášky, roztoky nebo suspenze, čípky, injekční a infúzní roztoky. Výhodná forma závisí na požadovaném způsobu podávání a terapeutickém použití. Způsoby podávání zahrnují způsob parenterální, perorální, subkutánní, intravenózní, intralézni (do poškozeného místa) a topický.

Rozpustné molekuly LT- β -R, ligandy anti-LT a protilátky anti-LT- β -R podle vynálezu se mohou např. přidat do sterilního izotonického přípravku, buď s anebo bez kofaktorů stimulujících příjem nebo stabilitu. Přípravek je výhodně tekutý nebo lyofilizovaný prášek. Přípravek se z rozpustných molekul LT- β -R, ligandů anti-LT a protilátek anti-LT- β -R podle vynálezu vytvoří např. tak, že se naředí puforem, který obsahuje 5,0 mg/ml monohydrátu kyseliny citronové, 2,7 mg/ml citrátu trojsodného, 41 mg/ml manitolu, 1 mg/ml glycinu a 1 mg/ml polysorbátu 20. Tento roztok se lyofilizuje, uskladní zamražený a rekonstituuje před použitím sterilní vodou pro injekce (viz lékopis USA).

Přípravek také výhodně obsahuje obvyklé farmaceuticky přijatelné nosiče, dobře známé v oboru (viz např. Remington Pharmaceutical Sciences, 16. vyd., 1980, Mac Publishing Company). Takové farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují další farmaceutická činidla, nosiče, genetické nosiče, adjuvans, excipienty a další, např. lidský sérový albumin nebo preparáty z plazmy. Přípravek je výhodně v podobě jednotkové lékové formy a podává se jedenkrát nebo vícekrát denně.

Farmaceutický přípravek podle vynálezu lze podávat také pomocí mikrosfér, lipozomů nebo jiných mikročasticových systémů anebo retardet umístěných přímo v ovlivňovaném orgánu, v jeho blízkosti anebo v jiném spojení s ním, nebo



v krevním oběhu. Vhodným příkladem takové lékové formy s prodlouženým uvolňováním léčiva je semipermeabilní polymerní matrice formovaná do tvaru čípků nebo mikrotobolek. Implantovatelné nebo v mikrotobolkách použitelné matrice zahrnují polylaktidy (U.S. patent č. 3,773,319, EP 58,481) kopolymery kyseliny L-glutamové a etyl-L-glutamátu (Sidman a kol., Biopolymers 22: 547-556, 1985), poly-2-hydroxyetylmetakrylátu nebo etylvinylacetátu (Langer a kol., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277, 1981, Langer, Chem. Tech. 12: 98-105, 1982).

Lipozomy obsahující rozpustné molekuly LT- β -R, ligandy anti-LT a protilátky anti-LT- β -R podle vynálezu, samotné nebo v kombinacích, se připraví v oboru dobře známým způsobem (viz např. DE 3,218,121, Epstein a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-3692, 1985, Hwang a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 4030-4034, 1980, U.S. patenty č. 4 485 045 a 4 544 545). Lipozomy jsou obvykle malého (200 až 800 Angstrom) jednovrstevného typu, a obsah lipidů je vyšší než 30 % (molárních) cholesterolu. Podíl cholesterolu se vybere tak, že určuje optimální míru uvolňování rozpustných molekul LT- β -R, protilátek anti-LT-ligand a anti-LT- β -R.

Rozpustné molekuly LT- β -R, ligandy anti-LT a protilátky anti-LT- β -R podle vynálezu se mohou připojit k lipozomům obsahujícím jiná činidla blokující LT- β -R, imunosupresiva nebo cytokiny modulující aktivitu blokující LT- β -R. Navázání rozpustných molekul LT- β -R, ligandů anti-LT a protilátek anti-LT- β -R se provede známým zesítujícím činidlem jako např. heterobifunkční zesítující činidlo, které se užívá pro navázání toxinů nebo chemoterapeutických agens na protilátky pro cílené podávání. Konjugace s lipozomy se dá také uskutečnit užitím zesítujícího činidla zacíleného na



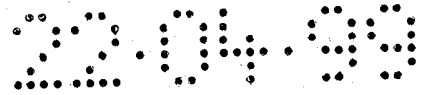
sacharidy, tj. 4-(4-maleimidofenyl)hydrazidu kyseliny máselné (MPBH) (Duzgues a kol., J. Cell. Biochem. Abst. Suppl. 16E 77, 1992).

Výhody terapeutických přípravků obsahujících činidlo blokující LT- β -R

Činidla blokující LT- β -R podle vynálezu jsou schopná selektivně inhibovat imunitní efektorové mechanismy. Inhibice imunity zprostředkované protilátkami je inhibována různými mechanismy včetně regulace vytváření GC ovlivňováním funkce FDC. Jak protilátkami zprostředkovaná imunita tak i buněčná imunita jsou částečně inhibovány regulací exprese adresinů a tím ovlivňováním pohybu a umístování lymfocytů. Takže činidlo blokující LT- β -R bude užitečné pro léčení stavů, které jsou exacerbovány aktivitami protilátek nebo aberantní expresí adresinů. Schopnost selektivně potlačovat takto zprostředkovanou imunitní odpověď je užitečná pro léčení abnormalit různých typů buněčné imunitní odpovědi, včetně různých autoimunitních a chronických zánětlivých stavů.

Jak bylo zmíněno již výše, léčení takto zprostředkovaných imunologických stavů využívá imunomodulační a imunosupresivní činidla, která mají pleiotropní účinek na široké spektrum buněčných typů a imunitních odpovědí. Tato nespecifická imunosupresivní činidla jsou zpravidla vyžadována ve vysokých a často i cytotoxických dávkách, které způsobují řadu vedlejších účinků.

Schopnost přípravku, který inhibuje protilátkovou odpověď, mírnit patologickou imunitní odpověď je dokumentována a podporována současným výzkumem *lupus nephritis* u myši. V této studii bylo ukázáno, že podání protilátky, která blokuje dráhu CD40/CD40L, inhibuje



akceleraci *lupus nephritis* indukovanou přenosem buněk indukujících produkci patologických protilátek *in vivo*, a má trvale prospěšný vliv na na spontánní nemoc ještě dlouhou dobu poté, co byla protilátka odstraněna ze systému. Tato data ukazují, že činidla blokující LT- β -R podle vynálezu jsou užitečná pro potlačení odvržení buněk tkáňového štěpu nebo orgánového transplantátu, neboť inhibují procesy vedoucí ke vzniku protilátkové odpovědi.

Činidlo blokující LT- β -R v přípravku a způsobu podle vynálezu se může modifikovat, aby se dosáhlo požadované úrovně signální dráhy LT- β -R v závislosti na stavu, poruše nebo nemoci, která je léčena. Lze předvídat, že absolutní úroveň signální dráhy LT- β -R může být jemně nastavena tím, že se budou měnit koncentrace a afinity (k příslušným molekulárním cílům) činidel blokujících LT- β -R.

Například v jednom provedení vynálezu je přípravek obsahující rozpustné molekuly LT- β -R podán subjektu. Rozpustný receptor LT- β -R účinně soutěží s receptory LT- β na povrchu buněk o navázání povrchových ligandů. Schopnost kompetice s povrchovými ligandy je závislá na relativních koncentracích rozpustných LT- β -R a molekul LT- β -R na buněčném povrchu, a také na jejich relativních afinitách pro vázání ligandu.

Rozpustné molekuly nesoucí mutace, které zvyšují nebo snižují vazebnou afinitu daného mutovaného rozpustného LT- β -R k povrchovému ligandu, se mohou vytvořit technikami rekombinantní DNA, odborníkovi dobře známými. Velký počet molekul s místně cílenými nebo náhodnými mutacemi se může testovat na svou schopnost působit jako činidlo blokující LT- β -R užitím rutinních pokusů a způsobů popsanych v předkládaném vynálezu.



Podobně v jiném provedení vynálezu protilátky namířené proti LT- β receptorům nebo proti jedné či více podjednotkám LT ligandů působí jako činidlo blokující LT- β -R. Schopnost těchto protilátek blokovat signální dráhu receptoru LT- β se může modifikovat mutací, chemickou modifikací nebo jiným způsobem, který může změnit účinné koncentrace nebo aktivity protilátky podané subjektu.

Schopnost omezit signalizaci (snížit aktivitu signální dráhy) LT- β -R, aniž by se přitom úplně inhibovala, může být důležitá pro vytvoření nebo udržení redukované hladiny signální dráhy LT- β -R, která podporuje normální imunitní funkci zatímco inhibuje imunitní odpovědi, které převyšují normální úroveň nebo jsou jinak abnormální.

Poškození genu LT- α u myši vede k aberantnímu vývoji periferních lymfoidních orgánů (DeTongi a kol., Science 264: 703-707, 1994). Takovéto myši postrádají lymfatické uzliny a v jejich slezinách chybí ve folikulech obvykle zcela jasná hranice mezi oblastmi bohatými na B buňky a T buňky. Věříme, že tento fenotyp je spojen se ztrátou signální dráhy LT- β -R indukované povrchovými LT, protože podobné fenotypy nebyly pozorovány, když se modulovala aktivita TNF-R. Schopnost selektivně nebo částečně blokovat dráhu LT- β -R může být užitečná pro léčení abnormálního vývoje lymfoidních orgánů v důsledku chronických zánětů spojených s chybnou nebo nadměrnou expresí v signální dráze LT- β -R.

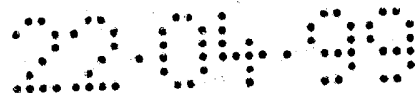
Protilátky jsou rozhodující mediátory imunitní odpovědi na patologická činidla. Absolutní inhibice protilátkové odpovědi může být tedy za určitých okolností nežádoucí. Například protilátky jsou vyžadovány pro zprostředkování rezistence na infekce extracelulárními bakteriemi, jako jsou např. pneumokoky a hemofilus.

Schopnost ovlivnit hladinu vznikající protilátky blokováním signalizace $LT\beta$ -R může být důležitá v maximalizaci prospěšných výsledků, kterých může být dosaženo ošetřením s $LT\beta$ -R blokujícím agens tohoto vynálezu.

Léčebné způsoby podle vynálezu zahrnují selektivní inhibici odpovědi, které jsou zcela nebo částečně závislé na dráze $LT\beta$ -R. Konkrétní léčebné použití předkládaného vynálezu závisí na relevantním etiologickém mechanismu procesu, který má být buď inhibován, nebo podporován, jako léčebně žádoucí proces, jak je odborníkovi zjevné. Způsoby vynálezu tedy zahrnují, v různých provedeních, podávání léčebně účinného množství činidla blokujícího $LT\beta$ -R nebo $LT\beta$. Protein použitý v těchto způsobech může být buď úplný protein plné délky, fragmenty proteinu nebo fúzní fragmenty. V dalších provedeních způsoby zahrnují podávání rozpustného fragmentu, jako je rozpustný receptor pro lymfotoxin- β . V dalších výhodných provedeních se nárokováný vynález týká podávání protilátek proti $LT\beta$ -R nebo $LT\beta$. Blokující činidlo podle vynálezu může být podáváno současně s léčebně účinným množstvím druhé sloučeniny, která projevuje léčebně žádoucí účinek.

Například v určitých způsobech pro léčení AIDS a/nebo HIV může být žádoucí podávat současně další antivirová agens v oboru známá. Například AZT nebo inhibitory proteáz. Může být výhodné zejména podávání blokujících činidlo podle vynálezu, výhodněji fúzního proteinu $LT\beta$ -R-Ig/IgG, v kombinaci s lékovým „koktejlem“ pro léčbu AIDS. Tyto lékové „koktejly“ zahrnují podávání několika léků pacientovi ke snížení množství viru v pacientově systému.

Přípravky vynálezu mohou být formulovány podle standardní praxe, tzn. jako přípravky obsahující nosné



vehikulum. Termín farmaceuticky přijatelný nosič se týká jedné nebo více organických nebo anorganických složek, přírodních nebo syntetických, které mohou usnadnit podávání blokujícího činidla podle vynálezu pacientovi. Vhodné nosiče jsou odborníkovi známy.

Každý z přípravků vynálezu může být podáván jakýmkoliv způsobem, který je lékařsky přijatelný. To může zahrnovat injekce parenterální cestou, jako je intravenózní, intravaskulární, intraarteriální, subkutánní, intramuskulární, do nádoru, intraperitoneální, intraventrikulární, intraepidurální, nebo jiná, a také perorální, nazální, oftalmická, rektální nebo topická. Podávání s prodlouženým uvolňováním je ve vynálezu také specificky zahrnuto, pomocí depotních injekcí nebo implantátů. Místně specifické podávání může být také žádoucí. Odborník snadno určí způsoby podávání.

Blokující činidla dráhy LT, která jsou použitelná podle předkládaného vynálezu, zahrnují protilátky funkčních derivátů rozpustného $LT\beta$ -R. Funkční deriváty zahrnují fragmenty, varianty, analogy nebo chemické deriváty molekuly. Fragmentem molekuly, jako je např. každý z antigenů předkládaného vynálezu, je myšlena každá polypeptidová podskupina molekuly. Má se za to, že varianta takové molekuly odpovídá přirozeně se vyskytující molekule v podstatě podobné buď celé molekule nebo jejímu fragmentu. Analog molekuly se týká nepřirozeně se vyskytující molekuly v podstatě podobné buď celé molekule nebo jejímu fragmentu.

Varianty blokujících činidel podle vynálezu se liší od přirozeně se vyskytujících činidel aminokyselinovou sekvencí nebo způsobem, který nepostihuje sekvenci, nebo platí obě možnosti. Varianty aminokyselinové sekvence sevytvářejí tak, že je jedna nebo více aminokyselin v přirozeně se

vyskytujících molekulách substituována odlišnou přirozenou aminokyselinou, derivátem aminokyseliny nebo aminokyselinou, která se přirozeně nevyskytuje. Zvláště výhodné varianty zejména zahrnují přirozeně se vyskytující proteiny nebo biologicky aktivní fragmenty přirozeně se vyskytujících proteinů, jejichž sekvence se liší od sekvence divokého typu substitucí jedné nebo více konzervativních aminokyselin. Takové substituce jsou odborníkovi dobře známy a mají typicky minimální vliv na sekundární strukturu a hydrofobní povahu blokujícího činidla.

V dalších provedeních předkládaného vynálezu mohou mít varianty se substitucemi aminokyselin, které jsou méně konzervativní, za následek také požadované deriváty, např. vyvoláním změn v náboji, konformaci a jiných biologických vlastnostech. Takové substituce například zahrnují substituci hydrofobních aminokyselinových zbytků hydrofilními, substituci zbytku cysteinem nebo prolinem, substituci zbytku majícího rozsáhlý postranní řetězec zbytkem s malým postranním řetězcem, nebo substituci zbytku majícího čistý negativní náboj zbytkem s čistým pozitivním nábojem. Pokud nemůže být výsledek dané substituce předpovězen s jistotou, mohou být deriváty snadno testovány podle způsobů zde popsaných, aby se určil výskyt nebo chybění žádoucích vlastností.

Varianty v rozsahu vynálezu zahrnují proteiny a peptidy s aminokyselinovými sekvencemi, které mají alespoň osmdesát procent homologie s blokujícím činidlem podle předkládaného vynálezu. Výhodněji je sekvenční homologie alespoň devadesát procent nebo alespoň devadesát pět procent. Pro účel určování homologie je délka srovnávaných sekvencí obecně alespoň 8 aminokyselinových zbytků, obvykle alespoň 20 amino-

kyselinových zbytků. Varianty v rozsahu vynálezu také zahrnují každé blokující činidlo, které 1) má aminokyselinovou sekvenci, která je alespoň ze čtyřiceti procent homologní se sekvencí blokujícího činidla, a také která 2) v optimální poloze při srovnání ("alignment") se sekvencí blokujícího činidla podle vynálezu má alespoň 80 % svých cysteinových zbytků "srovnaných" s cysteiny blokujícího činidla podle vynálezu.

Ve vynálezu jsou také činidla, která se specificky vážou k blokujícím činidlům podle vynálezu, včetně ligandů a protilátek.

Následující konkrétní příklady ilustrují rozpustné LT β receptory, anti-LT ligandy a protilátky anti-LT β -R podle vynálezu a způsoby použité k jejich charakterizaci. Tyto příklady by neměly být chápány jako omezující: příklady jsou zde uvedeny pouze s cílem podrobněji vysvětlit a ilustrovat vynález a předkládaný vynález je omezen pouze patentovými nároky.

Příklad 1

Příprava rozpustných lidských LT- β receptorů v podobě fúzních proteinů s imunoglobulinovým Fc

Sekvence cDNA lidského klonu izolovaná z lidské knihovny 12p transkribovaných sekvencí odvozená ze somatických hybridních buněk (Baens a kol., Genomics 16: 214-218, 1993) byla vložena do GenBank a teprve později byla identifikována jako sekvence kódující lidský LT- β -R. Úplná sekvence cDNA lidského LT- β -R je dostupná od r. 1992 v GenBank jako položka č. L04270.

Extracelulární doména LT- β -R až po transmembránovou oblast (obr. 1) byla amplifikována metodou PCR z cDNA klonu pomocí primerů obsahujících místa pro restriční enzymy NotI a SallI na svých 5'- a 3'-koncích (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Amplifikovaný produkt byl naštěpen NotI a SallI, přečištěn a ligován (vložen) do NotI linearizovaného vektoru pMDR901, společně se SallI-NotI fragmentem kódujícím Fc úsek lidského IgG1. Výsledný vektor obsahoval gen dihydrofolátreduktázy a fúzního proteinu LT- β -R-Ig, každý se zvláštním promotorem.

Vektor byl elektroporací vnesen do buněk CHO dhfr- a standardním způsobem byly izolovány klony rezistentní vůči metotrexátu. LT- β -R-Ig byl secernován do média a test ELISA byl užit k výběru buněčných linií produkujících nejvyšší hladinu receptorového fúzního proteinu. Vysokoprodukční buněčná linie byla poté kultivována ve velkém a upravené médium se sbíralo. Čistý LT- β receptorový fúzní protein byl získán přečištěním pomocí afinitní chromatografie s protein-A-sefarózou (Pharmacia).

Příklad 2

Příprava rozpustných myších LT- β receptorů v podobě fúzních proteinů s imunoglobulinem

Úplný cDNA klon myšího LT- β -R byl připraven ligací fragmentů 5'NotI/ApaLI a 3'ApaLI/NotI ze dvou částečných izolátů cDNA do NotI místa vektoru pCDNA3 (InVitrogen, San Diego, CA). Sekvence tohoto cDNA klonu je přístupná v GenBank jako položka č. U29173. Žádné rozdíly v sekvenci nebyly nalezeny při porovnání s jinou sekvencí myšího LT- β -R nalezenou v GenBank pod číslem L38423.

Rozpustný fúzní protein "myši LT- β -R/lidský IgG1" byl připraven tak, že pomocí PCR se amplifikoval klon s úplnou cDNA mLT- β -R s primery 5'AACTGCAGCAGCGGCCGCCATGCGCCTGCCC 3' a 5'GACTTTGTGACCATTTGCTCCTGGCTCTGGGGG 3'. Amplifikovaný produkt byl přečištěn a naštěpen NotI a Sali a ligován společně se Sali/NotI fragmentem Fc lidského IgG1 do NotI linearizovaného a fosfatázou ošetřeného vektoru SAB132, čímž vznikl vektor JLB122. NotI kazeta obsahující mLT- β -R-Fc byla pro stálou expresi přenesena do NotI místa plasmidu pMDR901, a tak vznikl vektor PSH001, který byl transfekován do CHO buněk, jak bylo publikováno (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Buněčné klony secernující "myši LT- β -R-lidský Ig" byly identifikovány testem ELISA. Čistý LT- β receptorový fúzní protein byl získán přečištěním ze supernatantu CHO buněk pomocí afinitní chromatografie s protein-A-sefárovou (Pharmacia) a byl používán v příkladech, které následují.

Příklad 3

Imunohistochemická analýza myši sleziny po opakovaných injekcích LT β -R-Ig

4-5 týdnů staré myši dostaly 6 injekcí, jednu týdně, LT β -R-Ig nebo LFA-3-Ig (100 μ g i.p.), a byly imunizovány se SRBC v den šesté injekce fúzního proteinu. Myši poté obdržely další injekci LT β -R-Ig nebo LFA-3-Ig 4. den po podnětu SRBC. Zvířata byla usmrcena 10. den po podnětu SRBC a byly odebrány orgány pro analýzu struktury. Levý sloupec na obr. 2 představuje řezy sleziny ze zvířat ošetřených LFA-3-Ig (A, C, E, G, I) a pravý sloupec ze zvířat ošetřených LT β -R-Ig (B, D, F, H, J). Acetonem fixované zmražené řezy sleziny byly

dvojitě značeny s biotinylovanými anti-myšimi B220 a anti-myšimi CD4 protilátkami (A a B), pak následovalo odpovídající druhé značení s alkalickou fosfatázou označeným streptavidinem (purpurová modř, tmavé zbarvení) a s křenovou peroxidázou označeným myším anti-krysím Ig (světle hnědé zbarvení). Další série zmražených řezů byla značena s protilátkami ER-TR-9 (pro detekci MZM, C a D), MOMA-1 (pro detekci metalofilních makrofágů, E a F), MECA-367 (specifické pro MAdCAM-1, G a H), a ER-TR-7 (pro obarvení retikulárních fibroblastů, I a J), pak následovalo druhé značení s křenovou peroxidázou označeným myším anti-krysím Ig (hnědé zbarvení). Tyto obrázky představují značení řezů z minimálně šesti zvířat. Zvětšení 10x.

Příklad 4

Účinek $LT\beta$ -R-Ig a ligandu anti-CD40 na tvorbu GC a značení FDC

Zvířata byla ošetřena stejně jako bylo již popsáno v příkladu 3 s $LT\beta$ -R-Ig nebo LFA-3-Ig. Další skupina zvířat byla ošetřena s MR1 (anti-myší ligand CD40, 250 μ g/injekci, intraperitoneálně) v den -1, v 1. den a 3. den, dostala SRBC v den 0 a byla usmrcena 10. den. Acetonem fixované řezy sleziny zvířat ošetřených s LFA-3-Ig (obr. 3, levý sloupec, A a D) nebo $LT\beta$ -R-Ig (střední sloupec, B a E) nebo MR1 (pravý sloupec, C a F) byly značeny s biotinem označeným arašídovým aglutininem (PNA, horní řádka, A, B a C) nebo s FDC-M1 (spodní řádka, D, E a F), pak následovalo druhé značení s křenovou peroxidázou označeným streptavidinem a s křenovou peroxidázou označeným myším anti-krysím Ig, v uvedeném pořadí (hnědé zbarvení). Značení PNA marginální zóny je ukázáno

šipkou v A a C. tvorba GC je ukázána bílou hvězdičkou v A. Značení na FDC je ukázáno černou šipkou v D a F. Tyto obrázky představují značení řezů z alespoň čtyř zvířat. Zvětšení 10x.

Příklad 5

Expresie adresinu v lymfatických uzlinách (LN) myši ošetřených *in utero* a kontinuálně po narození LT β -R-Ig

V těchto pokusech se používali potomci načasovaně březích myši Balb/c, kterým bylo 14. a 17. gestační den i.v. injikováno 200 μ g proteinů receptoru Ig. Po narození bylo potomkům injikováno i.p. jednou týdně 100 μ g LT β -R-Ig, TNF-R55-Ig nebo LFA-3-Ig. Hladiny fúzních proteinů zůstávaly během života 10 μ g/ml nebo více, jak bylo zjišťováno testem ELISA (data neuvedena). Obr. 4: panely A, B, G, H značení lymfatických uzlin myši ošetřených s LT β -R-Ig, panely C, D značení lymfatických uzlin myši ošetřených s LFA-3-Ig, panely E, F značení lymfatických uzlin myši ošetřených s TNF-R55-Ig. Panely A,C,E,G jsou mezenterické lymfatické uzliny značené s protilátkou MECA367 pro detekci slizničního adresinu, MAdCAM-1. Panely B,D,F,H jsou periferní (brachiální) lymfatické uzliny značené protilátkou MECA79 specifickou pro adresiny periferních LN (PNAds). Panely G,H jsou lymfatické uzliny 6 týdnů starých myši vystavených pouze LT β -R-Ig *in utero*. Všechny obrázky jsou ve zvětšení 50x.

Příklad 6

Lokalizace lymfocytů a exprese makrofágových markerů v lymfatických uzlinách (LN) myši ošetřených *in utero* a kontinuálně po narození LT β -R-Ig

Myši byly ošetřeny *in utero* a kontinuálně po narození, jak bylo popsáno pro příklad 5, s LT β -R-Ig, TNF-R55-Ig nebo LFA-3-Ig. Řezy LN byly poté označeny s protilátkami specifickými pro markery exprimované makrofágy nebo s mAb specifickými pro B buněčný marker B220 a T buněčný marker CD4. Aby se identifikovaly oblasti překryvu T a B buněčných zón, byla použita obrazová analýza. Obr. 5: panely A,D,G jsou značení B220/CD4 LN myši ošetřených LT β -R-Ig, LFA-3-Ig a TNF-R55-Ig, v uvedeném pořadí. Fluorescenční obrazy byly analyzovány za použití software pro obrazovou analýzu. Panely B,E,H jsou značení na sialoadhezin a panely C,F,I jsou značení na MOMA-1.

Příklad 7

Účinek ošetření pomocí LT β -R-Ig na protilátkovou odpověď na SRBC

Myším Balb/c byl injikován LT β -R-Ig, lidský Ig nebo PBS, následujícím způsobem: Obr. 6A: myši dostaly 6 injekcí, jak bylo popsáno pro obr. 2 (příklad 3). Zvířatům byla odebrána krev 7. den (černé sloupce) a 14. den (pruhované sloupce) po imunizaci SRBC. Obr. 6B: zvířata dostala fúzní proteiny v den -7 a den 0. SRBC byly podány v den 0 a zvířatům byla odebrána krev 7. den (černé sloupce), 14. den (pruhované sloupce) a 30. den (bílé sloupce). Obr. 6C: zvířata dostala fúzní proteiny jednou v den 0, ve stejnou dobu jako imunizaci SRBC.

Krev se odebírala 7. den (černé sloupce), 14. den (pruhované sloupce) a 34. den (šedé sloupce).

Titř SRBC-specifických IgM a IgG se určoval analýzou séra v hemaglutinačních testech. Titr je definován jako převrácená hodnota posledního ředění séra, pro které se detekuje hemaglutinace, a je znázorněn na logaritmické stupnici se základem 2 (1 = ředění 1/15 séra). Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se standardní odchýlkou ze 4 různých zvířat ve skupině.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob jak změnit humorální imunitní odpověď zvířete v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se a) podá farmaceutický přípravek obsahující terapeuticky účinné množství činidla blokujícího LT- β -R .
2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R se vybere ze skupiny obsahující: rozpustný receptor lymfotoxinu- β , protilátku namířenou proti receptoru LT- β a protilátku namířenou proti povrchovému ligandu LT.
3. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zvíře je savec.
4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že savec je člověk.
5. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R obsahuje rozpustný receptor lymfotoxinu- β s vazebnou doménou pro ligand, která se může selektivně vázat na povrchový ligand LT.
6. Způsob podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpustný receptor lymfotoxinu- β obsahuje doménu Fc lidského imunoglobulinu.
7. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R obsahuje monoklonální protilátku namířenou proti receptoru LT- β .

8. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že přípravek se podává v množství, které je dostatečné k pokrytí (vysycení) buněk pozitivních na LT- β receptory po dobu 1 až 14 dnů.
9. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R obsahuje monoklonální protilátku BDA8 proti lidskému LT- β -R (anti-lidský LT- β -R mAb BDA8).
10. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R obsahuje monoklonální protilátku namířenou proti povrchovému ligandu LT.
11. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že přípravek se podává v množství, které je dostatečné k pokrytí (vysycení) buněk pozitivních na povrchový ligand LT po dobu 1 až 14 dnů.
12. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka je namířena proti podjednotce povrchového ligandu LT.
13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R obsahuje monoklonální protilátku B9 proti lidskému LT- β (anti-lidský LT- β mAb B9).

14. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R obsahuje monoklonální protilátku namířenou proti myšímu povrchovému ligandu LT.
15. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič nebo adjuvans.
16. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se inhibuje humorální imunitní odpověď.
17. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje terapeuticky účinné množství činidla blokujícího LT- β -R a farmaceuticky přijatelný nosič.
18. Přípravek podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R je vybráno ze skupiny obsahující rozpustný receptor lymfotoxinu- β , protilátku namířenou proti receptoru LT- β a protilátku namířenou proti povrchovému ligandu LT.
19. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že pacient je infikován lidským virem imunodeficiencie.
20. Způsob léčení, prevence nebo eliminace lidského viru imunodeficiencie u savce v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se podá farmaceutický přípravek obsahující terapeuticky účinné množství činidla blokujícího LT- β -R a farmaceuticky účinný nosič.

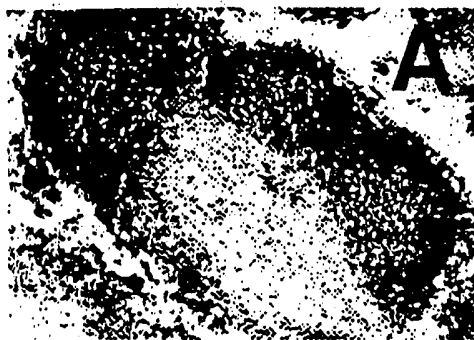
21. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R se vybere ze skupiny obsahující rozpustný receptor lymfotoxinu- β , protilátku namířenou proti receptoru LT- β a protilátku namířenou proti povrchovému ligandu LT.
22. Způsob podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R obsahuje rozpustný receptor lymfotoxinu- β s vazebnou doménou pro ligand, která se může selektivně vázat na povrchový ligand LT.
23. Způsob podle nároku 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpustný receptor obsahuje doménu Fc lidského imunoglobulinu.
24. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R obsahuje monoklonální protilátku namířenou proti LT- β -R.
25. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že blokující činidlo obsahuje monoklonální protilátku BDA8 proti lidskému LT- β -R (anti-lidský LT- β -R mAb BDA8).
26. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že blokující činidlo obsahuje monoklonální protilátku namířenou proti povrchovému ligandu LT.
27. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje současné podání dalšího antivirového činidla.

28. Farmaceutický přípravek pro léčení odvržení štěpu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje terapeuticky účinné množství činidla blokujícího LT- β -R a terapeuticky účinné množství činidla blokujícího CD40L.
29. Přípravek podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující LT- β -R je LT- β -R/IgG a činidlo blokující CD40L je sloučenina anti-CD40L.
30. Farmaceutický přípravek pro léčení AIDS nebo HIV, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje AZT, inhibitor proteázy a činidlo blokující LT- β -R.
31. Přípravek podle nároku 30 v y z n a č u j í c í s e t í m, že blokující činidlo je fúzní protein LT- β -R/IgG.
32. Přípravek podle nároku 29 v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina anti-CD40L je monoklonální protilátka.
33. Přípravek podle nároku 32 v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka je protilátka 5c8.

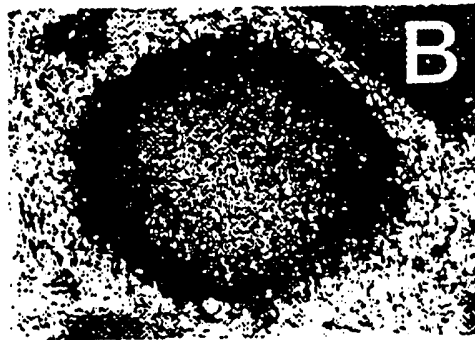
Obr. 1

1	SQPQAVPPYA	SENQTCRDQE	KEYYEPQHRI	CCSRCPPGTY	VSAKCSRIRD	50
51	TVCATCAENS	YNEHWNYLTI	CQLCRPCDFV	MGLEEIAPCT	SKRKTQCRCQ	100
101	PGMFCAAWAL	ECTHCELLSD	CPPGTEAELK	DEVGKGNHC	VPCKAGHFQN	150
151	TSSPSARCQP	HTRCENQGLV	EAAPGTAQSD	TTCKNPLEPL	PPEMSGT	197

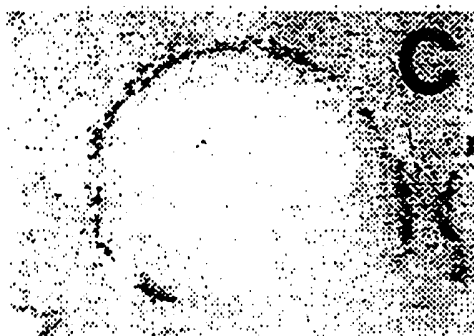
2/10



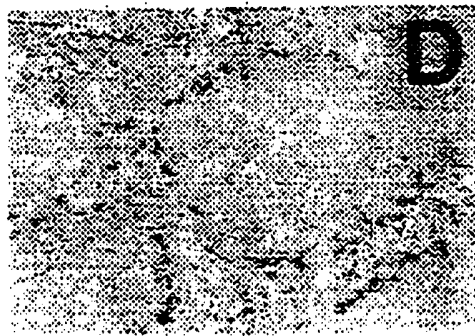
Obr. 2A



Obr. 2B



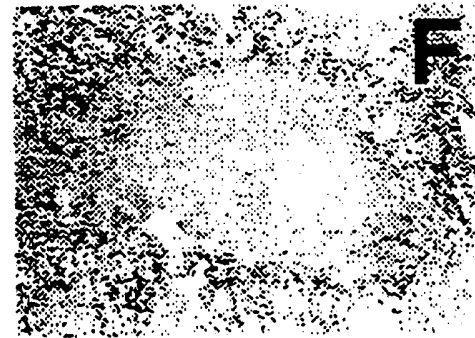
Obr. 2C



Obr. 2D



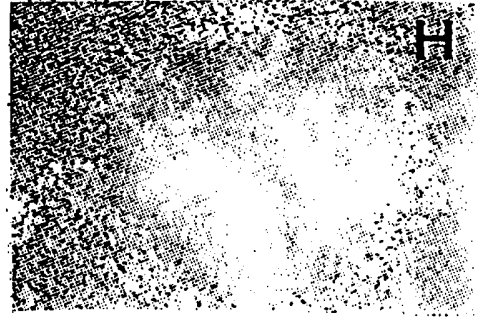
Obr. 2E



Obr. 2F



Obr. 2G



Obr. 2H



Obr. 2I



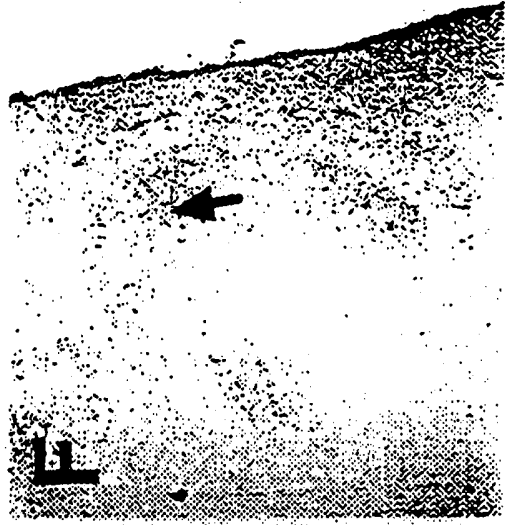
Obr. 2J

4/10

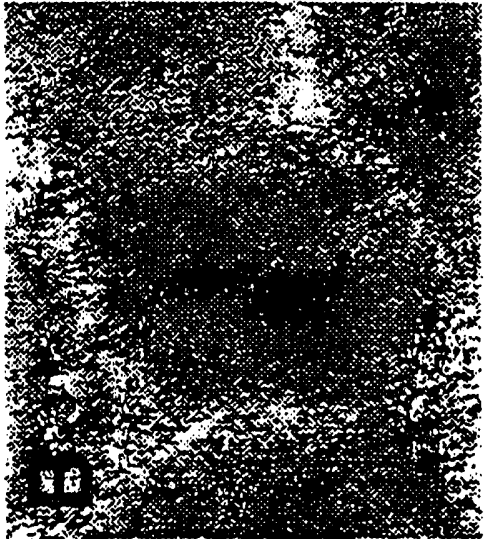
Obr. 3C



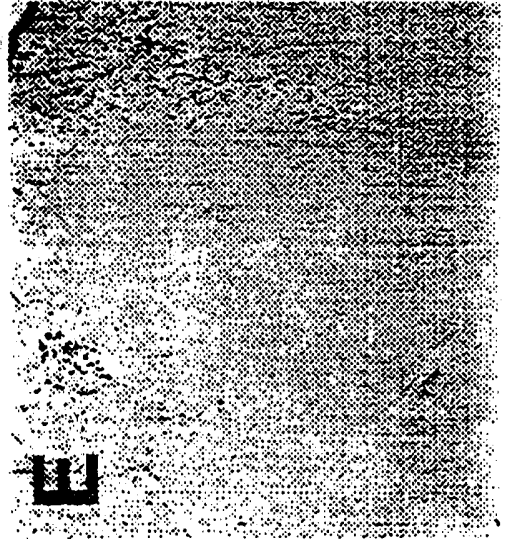
Obr. 3F



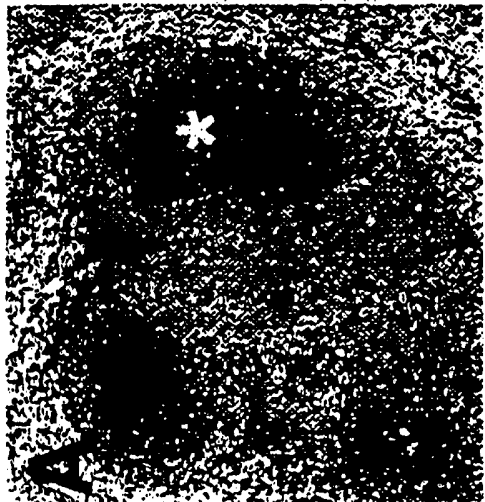
Obr. 3B



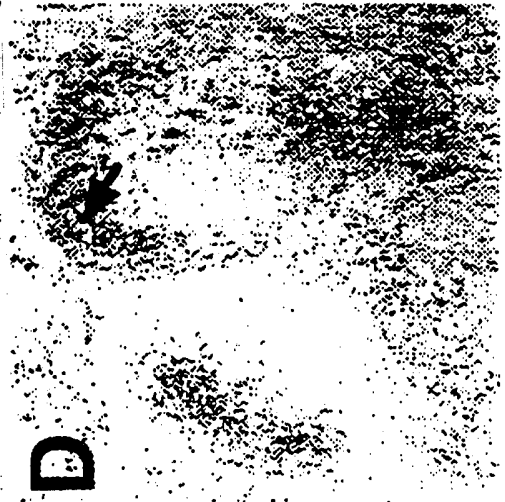
Obr. 3E

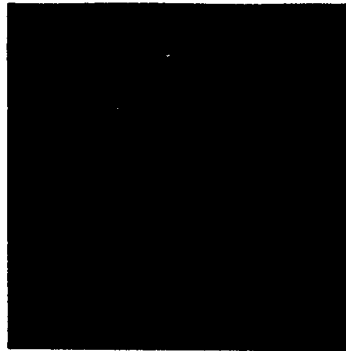


Obr. 3A

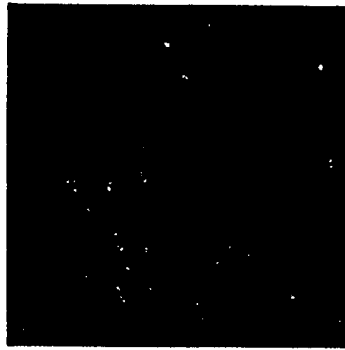


Obr. 3D





Obr. 4A



Obr. 4C



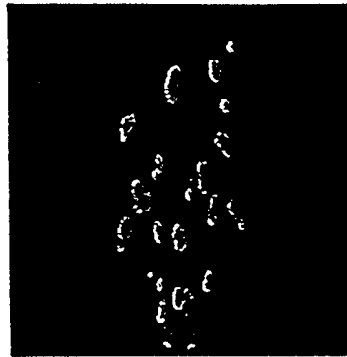
Obr. 4E



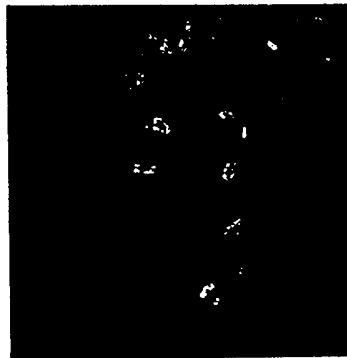
Obr. 4G



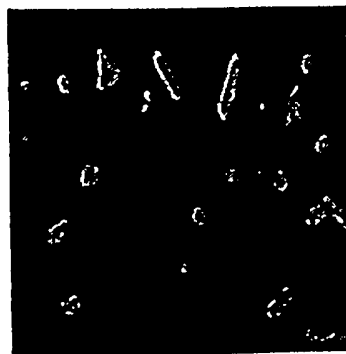
Obr. 4B



Obr. 4D



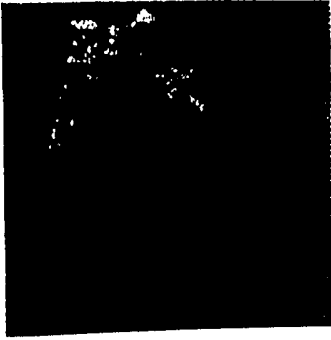
Obr. 4F



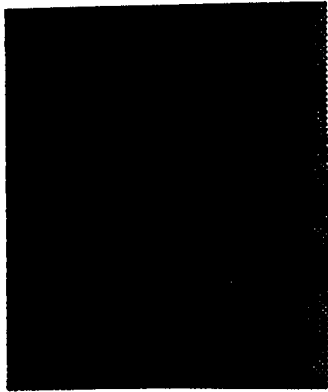
Obr. 4H

1428-99
200400

7/10



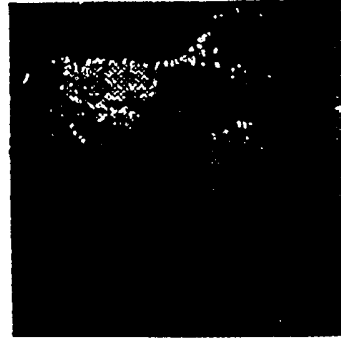
Obr. 5C



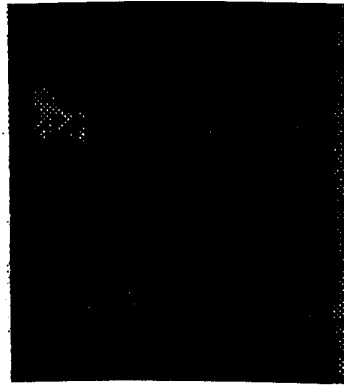
Obr. 5B



Obr. 5A



Obr. 5F



Obr. 5E



Obr. 5D

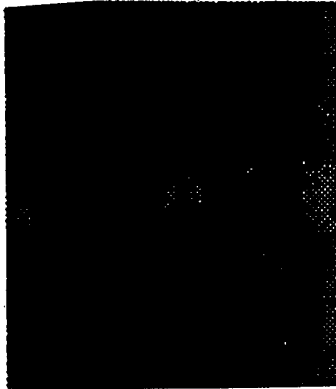
1428-99

20.04.99

8/10



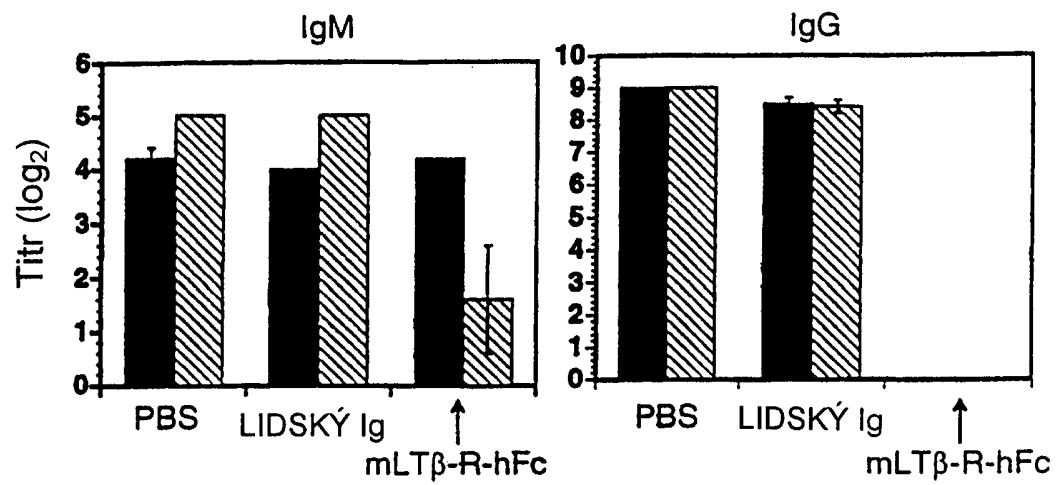
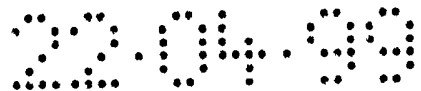
Obr. 5I



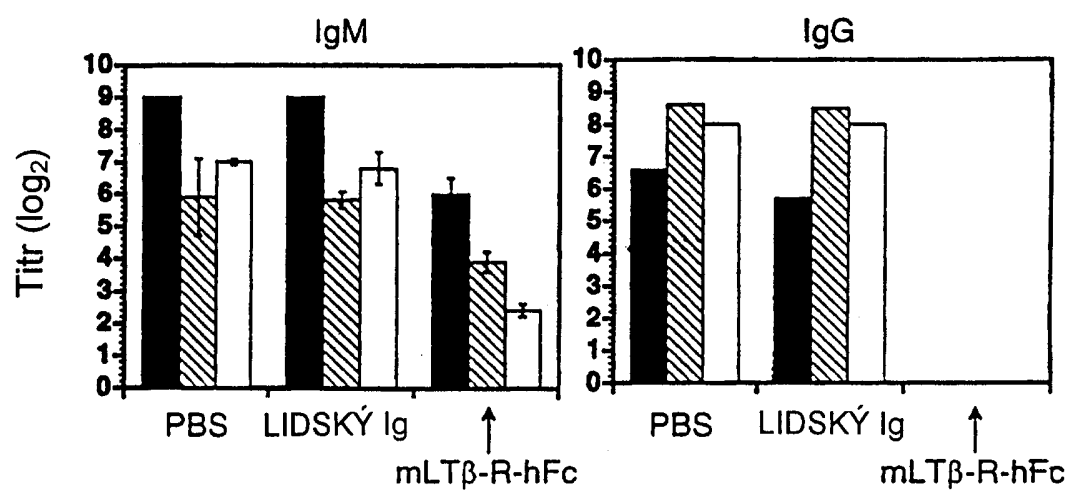
Obr. 5H



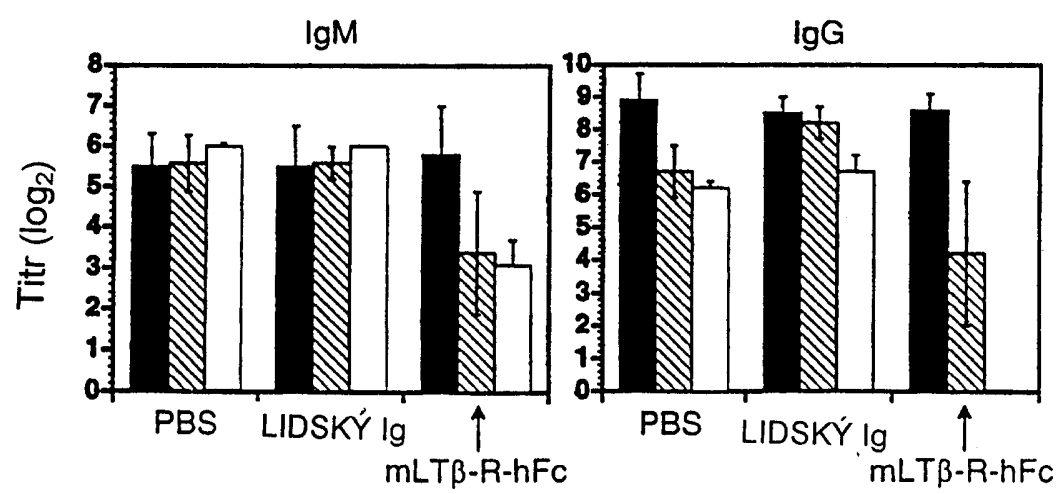
Obr. 5G



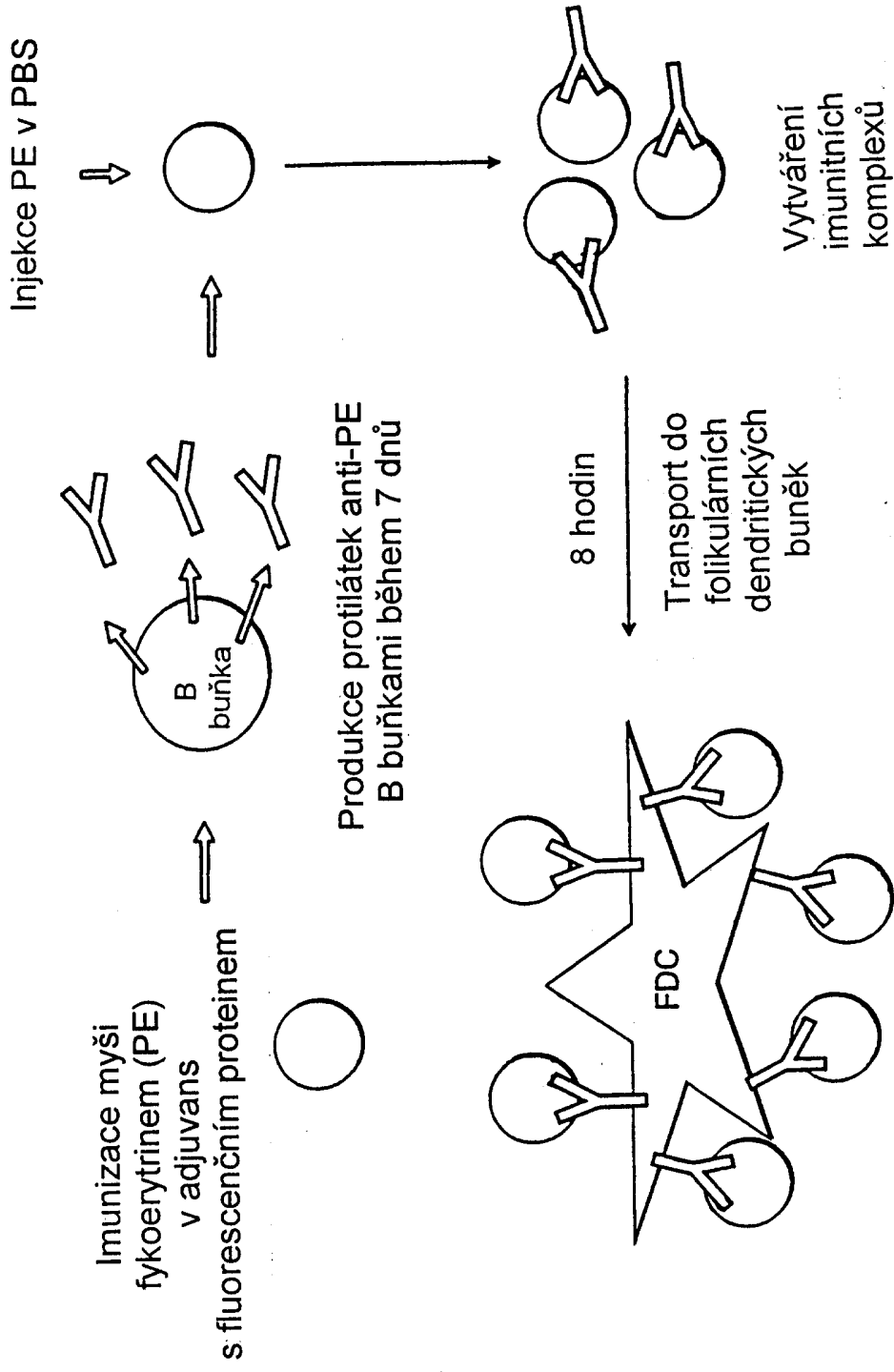
Obr. 6A



Obr. 6B



Obr. 6C



Imunitní komplexy zachycené na FDC
Přímé pozorování fluorescence

Obr. 7