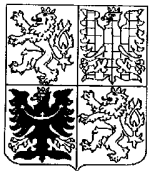


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.01.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **15.01.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/116168**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.10.2001**
(Věstník č. 10/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US00/01044**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/42073**

(21) Číslo dokumentu:

2001 -2548

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 16/28

A 61 K 38/17

A 61 K 39/395

A 61 P 37/06

(71) Přihlašovatel:

BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Původce:

Rennert Paul, Millis, MA, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutické přípravky obsahující činidlo
blokuující protein TWEAK nebo receptor
TWEAK**

(57) Anotace:

Činidla, která modifikují aktivitu TWEAK a dále
farmaceutické přípravky, které obsahují tato činidla a jsou
určeny k léčení imunologických onemocnění.

12.07.01

PV 2001-2548

179 753/HK

1

Farmaceutické přípravky obsahující činidlo blokující protein TWEAK nebo receptor TWEAK

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká přípravků obsahujících činidla, která se váží k novému proteinu TWEAK, a dále použití činidel vázajících TWEAK k blokování rozvoje imunologických onemocnění. K činidlům vázajícím TWEAK patří monoklonální protilátky, které se užívají k blokování rozvoje chronické nemoci reakce štěpu/transplantátu proti příjemci, rozpustné fúzní proteiny TWEAK-receptor-Ig nebo jiné molekuly, které modifikují vazbu proteinu TWEAK s jeho receptorem/receptory. K dalším provedením vynálezu patří činidla, která se váží na receptor/receptory TWEAK, čímž modifikují jejich aktivitu, nebo modifikují intracelulární signalizaci receptoru/receptorů TWEAK.

Dosavadní stav techniky

Imunologická onemocnění se projevují jako široké spektrum různých nemocí a poruch, zahrnující autoimunitní onemocnění, akutní a chronická zánětlivá onemocnění, odvržení orgánového transplantátu, nemoc reakce štěpu proti příjemci (GVHD, „graft versus host disease“), maligní nemoci lymfoidních buněk, septický šok a další formy šoků, ztráta imunologické reaktivity jako např. při onemocnění HIV a SCIDS, a selhání imunitní reakce na nádorový růst.

Mnohá imunologická onemocnění se spouštějí chybnou nebo nekontrolovanou reakcí na antigen. Autoimunitní onemocnění

jsou výsledkem nepřiměřené reakce imunitního systému na vlastní antigeny (self-antigeny), která vede k poškození buněk a tkání. K rozvoji GVHD dochází tehdy, když buňky dárce z transplantátu kostní dřeně (BMT, „bone marrow transplant“) reagují na antigeny příjemce (tj. pacienta). K odvržení orgánového transplantátu dochází tehdy, když pacientův imunitní systém reaguje na antigeny pocházející z transplantovaného orgánu. Akutní zánětlivé poruchy, hyperalergický stav a šok, jsou výsledkem nekontrolované imunitní reakce na spouštěcí antigen.

Imunitní reakce závislá na T lymfocytech vyžaduje rozpoznání antigenu T lymfocyty. Tak např. GVHD je výsledkem komplexní vztahů mezi T lymfocyty dárce a buňkami imunitního systému příjemce. Iniciační událostí je to, že T lymfocyty dárce rozpoznají cizorodé, tj. příjemcovy antigeny. Tyto antigeny jsou označovány alloantigeny. Rozpoznávání alloantigenů T lymfocyty příjemce vede k tvorbě imunoregulačních a zánětlivých cytokinů a chemokinů, které podporují a zesilují imunitní reakci dárce proti příjemci. Tato nemoc se může rozvinout v akutní nebo chronické formě, v závislosti na regulaci velmi složité sítě cytokinů, která kontroluje a řídí to, jaký typ imunitní reakce se vyvine. Imunitní reakce může být charakterizována jako reakce typu Th0, Th1 nebo Th2 v závislosti na 1) povaze cytokinů a chemokinů, které jsou produkovány aktivovanými T lymfocyty v průběhu reakce, 2) povaze cytokinů a chemokinů, které jsou produkovány pomocnými buňkami a dalšími typy buněk v průběhu reakce. Příkladem buněk jiných než jsou T lymfocyty, důležitých pro imunitní reakci, jsou B lymfocyty, dendritické buňky, monocyty a makrofágy, folikulární dendritické buňky a endotelové buňky. Produkované cytokiny společně ovlivňují řadu buněčných typů směrem k diferenciaci, a produkované

chemokiny ovlivňují buněčné transporty („trafficking“) a lokalizaci. Reakce Th0 je charakteristická tím, že dochází ke krátkodobé stimulaci T lymfocytů předtím nestimulovaných (tzv. naivních). T lymfocyty Th0 produkují střední množství různých cytokinů, zejména IL-2 a IFN. Opakovaně nebo chronicky stimulované lymfocyty Th0 s diferencují na lymfocyty Th1 nebo Th2, v závislosti na řadě různých faktorů. K takovým faktorům patří, přičemž tento výčet není vyčerpávající, produkce cytokinů pomocnými buňkami, síla zapojení receptorů T lymfocytů, povaha přijatých sekundárních signálů, např. prostřednictvím kostimulačních receptorů CD28. Zejména expozice aktivovaných T lymfocytů cytokinu IL-2, který je produkován primárně aktivovanými makrofágy, podporuje diferenciaci na Th1 lymfocyty, zatímco expozice IL-4 nebo IL-10 podporuje diferenciaci na lymfocyty Th2.

Lymfocyty Th1 produkují cytokiny jako např. IL-2 nebo IFN- γ , které jsou spojeny se zánětlivou reakcí, cytotoxicitou T lymfocytů a aktivací makrofágů. Lymfocyty Th1 reagují na chemokiny, které atrahují buňky do místa zánětu v tkáni, jako jsou např. Mip-1alfa, Mip-1beta, RANTES, IP-10 a MIG. Jelikož cytotoxické T lymfocyty a aktivované makrofágy působí tak, aby eliminovaly poškozené nebo infikované buňky, reakce typu Th1 je zodpovědná za kontrolu imunitní reakce na intracelulární patogeny. Důležité je, že produkce chemoatraktantů - chemokinů, jako jsou např. IP-10 a MIG makrofágy a endotelovými buňkami, je velmi přísně regulována IFN- γ , který je prototypem chemokinů produkováných T lymfocyty Th1. Zpětnovazebná smyčka se může vyvinout mezi aktivovanými T lymfocyty a jejich okolím, což usnadňuje rozvoj určitého typu reakce v určitém čase a místě.

T lymfocyty Th2 produkují cytokiny jako jsou např. IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10, které podporují rozvoj humorálních

imunitních reakcí včetně takových, které vyžadují produkci IgE, IgA a IgG. Tyto imunoglobulinové (Ig) reakce jsou poháněny T lymfocyty zprostředkovanou aktivací B lymfocytů, které „přepnou“ svůj Ig fenotyp z povrchově vázaných IgM a IgD na secernované Ig. Secernované Ig normálně fungují tak, že kontrolují infekci patogenů v oběhu (IgG), na povrchu sliznic jako např. ve střevu a ústní dutině (IgA) a v dýchacím traktu (IgE). Nadměrná produkce Ig může způsobit onemocnění, např. SLE (IgG a IgA), alergickou přecitlivělost typu I (IgE) a GVHD (IgG, IgA a IgE). T lymfocyty Th2 také podporují aktivaci eosinofilů a mastocytů, které zprostředkovávají akutní reakci na patogeny, např. v dýchacím traktu. T lymfocyty Th2 reagují na chemokiny jako např. eotaxin a MDC, jejichž produkce je regulována Il-4, prototypovým cytokinem, který je tvořen NK1.1 buňkami a aktivovanými T lymfocyty.

Interakce T lymfocytů s B lymfocyty je značně složitý a regulovaný proces. Aby byl proces aktivace zahájen, B lymfocyty musí přijmout antigenní signál prostřednictvím receptoru pro antigen na povrchu B lymfocytu (membránový Ig). Za druhé musí B lymfocyty přijmout specifický, na kontaktu závislý a nezávislý, signál z aktivovaných T lymfocytů. Na kontaktu závislý signál je přenášén prostřednictvím vazby CD40L na T lymfocytech na CD40 na B lymfocytech. Na kontaktu nezávislý signál je přenášén prostřednictvím Il-4 secernovaného aktivovanými T lymfocyty a buňkami NK1.1, který se váže na receptor pro Il-4 na B lymfocytech. Tyto signály se uskutečňují v oblasti T lymfocytů v sekundárních lymfatických orgánech jako je např. slezina. Slezina, lymfatické uzliny, madle, Peyrovy pláty a další sekundární a terciární lymfatické orgány mají oddělené mikroanatomické oblasti, ve kterých se typicky usazují T nebo B lymfocyty.

Všechny lymfocyty migrují z krve nebo lymfy nejdříve do T oblastí v těchto orgánech průchodem skrz vrstvy endotelových buněk jako jsou např. venuly s vysokým endotelem v lymfatických uzlinách a Peyrovy pláty a vrstvy endoteových buněk v *sinus marginalis* ve slezině. Pak se B lymfocyty stěhují do oblastí B lymfocytů známých jako folikuly B lymfocytů. B lymfocyty, které prošly T oblastí, ale nebyly aktivovány, opouštějí folikuly po několika dnech. Aktivované B lymfocyty procházejí procesem diferenciací. Některé aktivované B lymfocyty známé jako plazmacyty secernují velká množství antigenně specifických protilátek IgM nebo IgG s nízkou afinitou. Tyto se typicky objevují časně po indukci imunitní reakce a stěhují se do červené dřeně sleziny a dalších anatomických lokalizací, kde perzistují a secernují protilátky po několik dní. Jiné aktivované B lymfocyty diferencují v oblasti folikulů známé jako sekundární folikuly nebo germinální centra. Germinální centra vytvářejí síť specializovaných buněk uchovávajících „pamatujiících si“ antigen, označovaných jako folikulární dendritické buňky (FDC), které vystavují antigen, aby poháněly nebo upřesňovaly reakci germinálních center. B lymfocyty v germinálních centrech musí přepnout svůj Ig fenotyp a musí projít tzv. afinitním zráním, jehož výsledkem je to, že vykazují vysokou afinitu pro svůj cílový antigen. Normálně je cílovým antigenem cizorodý antigen, ale např. při nemocech jako GVHD a autoimunitní nemocí Ig rozpoznávají vlastní antigeny. Nakonec B lymfocyty opouštějí folikuly, migrují zpět přes oblasti T lymfocytů a opouštějí orgány prostřednictvím eferentních drah do krevního oběhu.

B lymfocyty, které byly plně diferencovány a exprimují vysokoafinitní Ig, známé jako lymfoblasty, opouštějí B folikuly, aby se usadily v jiných prostředích, jako je

např. oblast červeně dřeně ve slezině, kostní dřeň, játra nebo výstelka sliznice střeva nebo respiračního traktu. Některé z těchto plně diferencovaných B lymfocytů jsou známy jako paměťové lymfocyty a přežívají po dlouhou dobu připraveny reagovat na stejný antigen, pokud se s ním znovu setkají.

Když B lymfocyty migrují z místa na místo v lymfatických orgánech, vyžadují specifické signály, které by je vedly a specifické signály, které by zajistily jejich přežívání. Tak např. pro udržení organizace folikulů B lymfocytů ve slezině je potřeba mnoho různých signálů. Patří k nim např. interakce mezi BCA ligandem a chemokinovým receptorem BLR-1, interakce mezi TNF s TNF-R55 a také interakce mezi LTbeta a LTbeta-R (přehled viz Chaplin a Fu, Current Opin. Immunol. 10: 298-297, 1998). Myši, které postrádají kteroukoliv z těchto molekulárních drah ztrácejí integritu folikulů B lymfocytů ve slezině. Kromě toho všechny takové genově deficitní myši ztratily schopnost procházet reakcí germinálních center ve slezině. Přerušení dalších molekulárních drah ovlivňuje jen reakce germinálních center. Tak např. myši deficientní na CD40L zachovávají folikuly B lymfocytů, ale nevytvářejí germinální centra. B lymfocyty v prostředí germinálních center vyžadují pro přežívání, utlumení IgM a přepnutí na Ig expresi signalizaci prostřednictvím CD40.

B lymfocyty se stěhují nejen v rámci folikulů a germinálních center, ale po aktivaci opouštějí folikuly a stěhují se do jiných míst těla. Paměťové B lymfocyty lze najít v kostní dřeni a B lymfocyty exprimující IgA se specificky směřují do výstelky střeva a sliznic jiných míst. Další signály pravděpodobně řídí aktivované T lymfocyty do specifických míst uvnitř a mezi lymfatickými kompartmenty.

Např. cytotoxické T lymfocyty migrují na místo infekce nebo na místo jiné antigenní výzvy („challenge“), aby našly a lyzovaly cíle. Identita všech signálů, které řídí navádění B a T lymfocyty mezi různými mikroanatomickými lokalizacemi není dosud známa. Avšak zdá se, že je to mnoho metabolických/signalizačních drah, které vytvářejí souhru reakce T a B lymfocytů na antigen, a to jak v sekundárních lymfatických orgánech, tak i v místě infekce nebo zánětu.

GVHD je dobře prostudovaným příkladem imunitní reakce vyvolané antigenem. GVHD je často fatálním důsledkem transplantace kostní dřeně (BMT, „bone marrow transplantation“) u lidí. Tato nemoc se vyskytuje jako akutní i chronická forma. Akutní a chronická forma GVHD jsou prototypové příklady antigenně specifické Th1 a Th2 reakce. Akutní forma nemoci se objevuje během prvních dvou měsíců po transplantaci kostní dřeně (BMT) a je charakterizována poškozením kůže, střev, jater a dalších orgánů zprostředkovaným cytotoxickými T lymfocyty dárce. Chronická forma nemoci se projevuje mnohem později, déle než 100 dnů po BMT, a je charakterizována nadměrnou produkcí (hyperprodukcí) imunoglobulinů (Ig), včetně autoprotilátek, a poškozením kůže, ledvin a dalších orgánů, ke kterému dochází v důsledku nadměrného ukládání Ig. Rozvoj akutní GVHD je prediktivní pro následný rozvoj chronické GVHD. Takže u jednoho pacienta se většinou postupně vyvinou obě formy. Přibližně u 50 % všech pacientů po BMT se vyvine buďto akutní nebo chronická GVHD. Téměř u 90 % pacientů s akutní GVHD se vyvine chronická GVHD. Žádná z dnes běžných terapií není u většiny pacientů s chronickou GVHD úspěšná.

GVHD je možné modelovat na myších užitím režimů transplantací rodičovských buněk do F1. V modelu popsáném v předkládané přihlášce byly splenocyty z myší kmene DBA2

injikovány i.v. do myši (DBA2xC57B1/6)F1, které jsou označovány B6D2F1. Injikované splenocyty vytvářejí štěp, myš DBA2 je dárce štěpu. Myš F1, které byly injikovány buňky, tj. štěp, je příjemcem (hostitelem). T lymfocyty dárce přítomné ve štěpu rozpoznávají polovinu MHC markerů (haplotypů) na buňkách příjemce jakožto cizorodé, protože tato polovina pochází z jiného rodiče, tj. C57B1/6. To indukuje reakci T lymfocytů dárce proti příjemci, čímž vzniká GVHD. Když jsou parentální splenocyty DBA/2 injikovány do příjemce B6D2F1, vyvíjí se chronická GVHD. Naproti tomu, když jsou injikovány splenocyty C57B1/6 do příjemce B6D2F1, vyvíjí se akutní GVHD. Přestože dosud není jasné, jaký je mechanismus zodpovědný za vznik těchto dvou odlišných nemocí při užití tohoto protokolu se dvěma injekcemi, má se z to, že cytokiny exprimované buňkami obsaženými ve štěpu DBA/2 splenocytů podporují rozvoj chronické GVHD, zatímco cytokiny exprimované buňkami obsaženými ve štěpu C57B1/6 splenocytů podporují rozvoj akutní GVHD. Činidla, která narušují interakce T lymfocytů s buňkami prezentujícími antigen (jako jsou dendritické buňky, makrofágy, APC B lymfocyty) účinně blokují jak akutní tak i chronickou GVHD.

Řada důkazů podporuje představu, že akutní GVHD je nemoc zprostředkovaná Th1 (Krenger a Ferrara, Immunol. Res. 15: 50-73, 1996, Williamson et al., J. Immunol. 157: 689-699, 1996). Cytotoxická aktivita zprostředkovaná T lymfocyty CD4+ a CD8+, cytotoxickými „zabíječskými“ lymfocyty (NK, „natural killer“) a aktivovanými granulocyty jako jsou např. makrofágy, je dobře definovaným důsledkem reakce T lymfocytů zprostředkované Th1, vykazující typickou závislost na expresi Il-2 a IFN- γ , což jsou typické cytokiny Th1. Tato cytotoxicita je definujícím znakem akutní GVHD. Navíc činidla, která blokují kritické cytokiny podílející se na

diferenciaci T lymfocytů Th1, jako jsou např. monoklonální protilátky (mAb) k Il-2 a k Il-12, blokují rozvoj akutní GVHD. Cytotoxicita může být skutečně přímo buněčná (tj. fagocytóza buněk příjemce) nebo je zprostředkována působením secernovaných cytokinů jako je např. TNF, který indukuje apoptózu neboli buněčnou smrt. Důsledky cytotoxicity dárce proti příjemci se mohou projevit mnoha různými způsoby. Za prvé, lymfocyty příjemce jsou rychle destruovány, takže myši s akutní GVHD mají významně potlačenou imunitu. Za druhé se lymfocyty dárce uchytí a začnou expandovat do sleziny příjemce, přičemž jejich cytotoxická aktivita může být přímo měřena *in vitro* za pomoci buněčných linií, které exprimují antigeny příjemce, které mohou být rozpoznávány jako (jako cizorodé) buňkami dárce. Tak např. buněčné linie exprimující vhodné antigeny mohou být označeny radioaktivním izotopem chromu 51. Uvolňování tohoto radioaktivního izotopu do kultivačního média je pak důkazem odumření označených buněk. A za třetí, nemoc se stává letální, když jsou zničeny další tkáně a buněčné populace, a přežívání je pak měřitelným důsledkem nemoci.

Chronická GVHD se zdá být nemocí zprostředkovanou Th2 (DeWitt et al., J. Immunol. 150: 361-366, 1993). U myšího modelu této nemoci je rozvoj nemoci závislý na Th2 cytokinu Il-4 a může být blokován působením monoklonální protilátky anti-Il-4. Působení anti-Il-4 blokuje expanzi B lymfocytů příjemce a tudíž následnou hyperprodukcii Ig. Rozvoj GVHD je možné sledovat různými způsoby. Expanze T lymfocytů dárce a populací B lymfocytů příjemce se mohou měřit jako tzv. slezinový index, což je poměr hmotnosti sleziny k hmotnosti těla, normalizovaný na hmotnost kontrolní myši (bez onemocnění). Aktivace B lymfocytů u nemocných myší může být měřena užitím aktivačních markerů B lymfocytů. Nakonec

účinky aktivace B lymfocytů mohou být pozorovány jako hladiny Ig v krevním oběhu (např. v séru) a nebo hladiny Ig produkovaných splenocyty příjemce, které se odeberou několik týdnů po indukci nemoci. Ig v krvi nemocných zvířat obsahují také autoprottilátky (proti vlastním antigenům). Nakonec nemocná zvířata zhynou na selhání ledvin nebo jiných orgánů v důsledku ukládání Ig, tudíž míra přežití je vhodným měřítkem nemoci.

V další části přihlášky je ukázáno, že monoklonální prottilátky specifické k TWEAK účinně a specificky blokují rozvoj GVHD, a sice u myšího modelu chronické GVHD. Blokování rozvoje GVHD je demonstrováno redukcí slezinového indexu, ztrátou aktivačních markerů na B lymfocytech příjemce a sníženou produkcí Ig u zvířat léčených anti-TWEAK přípravky.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje přípravky k blokování rozvoje nebo k léčení nebo snižování závažnosti imunologických onemocnění zvířete. Zvířeti se podávají farmaceutické přípravky, které obsahují farmaceuticky účinné množství činidla blokujícího TWEAK a farmaceuticky přijatelný nosič. Činidlem je buďto prottilátka namířená proti ligandu TWEAK, prottilátka namířená proti receptoru TWEAK, činidlo, které modifikuje vazbu ligandu TWEAK na receptor TWEAK, činidlo, které modifikuje shlukování povrchových receptorů nebo činidlo, které ruší intracelulární signalizaci receptor TWEAK. Ve výhodném provedení vynálezu je prottilátka monoklonální prottilátka. Ve výhodnějším provedení je monoklonální prottilátka namířena proti povrchovému ligandu

TWEAK. Živočichem podle vynálezu je savec a může to být i člověk. Činidlo blokující TWEAK je rozpustný receptor TWEAK mající doménu vázající TWEAK, která selektivně váže povrchový ligand TWEAK. V jednom provedení vynálezu rozpustný receptor TWEAK obsahuje doménu lidského imunoglobulinu IgG. Ve výhodném provedení doména lidského imunoglobulinu IgG obsahuje úseky zodpovědné za specifickou vazbu antigenu.

Předkládaný vynález se dále týká způsobu inhibice imunitní reakce u zvířat, který spočívá v tom, že se zvířeti podává farmaceutický přípravek podle vynálezu, který obsahuje účinné množství činidla blokujícího TWEAK a farmaceuticky přijatelný nosič. Imunitní reakce, které se vynález týká, je imunitní reakce zprostředkovaná lymfocyty typu Th1, Th2 nebo oběma typy lymfocytů.

Předkládaný vynález se tedy zejména týká přípravku, který obsahuje terapeuticky účinné množství činidla blokujícího TWEAK a farmaceuticky přijatelný nosič.

Popis obrázků

Obr. 1 ukazuje srovnání sekvencí rozpustného rekombinantního myšího a lidského proteinu TWEAK.

Obr. 2 ukazuje analýzu pomocí FACS (fluorescencí aktivované třídění buněk) vazby křeččích anti-TWEAK monoklonálních protilátek AB.D3 na buňky EBNA293 exprimující myší protein TWEAK nebo lidský protein TWEAK, ve srovnání s vazbou křeččích monoklonálních protilátek, které rozpoznávají irelevantní protein (hemocyanin přílipky, KLH).

Obr. 3 ukazuje FACS analýzu schopnosti monoklonální

protilátky AB.D3 blokovat vazbu rekombinantního lidského TWEAK označeného FLAG na buňky pozitivní na receptor TWEAK.

Obr. 4 ukazuje FACS analýzu aktivačního stavu B lymfocytů u myši s chronickou GVHD, léčených anti-TWEAK monoklonální protilátkou AB.D3, anti-CD40L monoklonální protilátkou MR1, kontrolní monoklonální protilátkou nebo neléčených.

Definice

Aby byl popis vynálezu plně pochopen, následuje podrobný popis vynálezu, přičemž v popis jsou užívány následující termíny.

Termíny „humorální reakce“ a „buněčná reakce“ se týkají imunologických reakcí živočicha na antigen, kdy živočich reaguje tím, že tvoří protilátky k antigenu nebo cytotoxickou reakcí nebo oběma. Třída Th1 pomocných T lymfocytů je důležitá pro indukci buněčné reakce, třída Th2 pomocných T lymfocytů je důležitá pro účinnou tvorbu vysokoafinitních protilátek.

Termín „pomocné T lymfocyty (Th lymfocyty)“ označuje funkční podtřidu T lymfocytů, které pomáhají vytvářet cytotoxické T lymfocyty a spolupracují s B lymfocyty na stimulaci tvorby protilátek. Pomocné T lymfocyty rozpoznávají antigeny asociované s molekulami MHC II. Třídy a poskytují na kontaktu závislé a na kontaktu nezávislé (cytokiny a chemokiny) signály pro efektorové buňky.

Termín „Th1“ se týká podtřidy pomocných T lymfocytů, které produkují TNF, interferon- γ a IL-2 (a další cytokiny), a které vyvolávají zánětlivé reakce spojené s buněčnou, tj. nikoliv imunoglobulinovou reakcí na antigenní provokaci.

Termín „Th2“ se týká podtřidy pomocných T lymfocytů,

které produkují IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a další cytokiny, které jsou spojeny s imunoglobulinovou (humorální) reakcí na imunitní provokaci.

Termín „germinální centra“ se týká folikulů sekundárních B lymfocytů, které se vytvářejí po imunizaci antigenem. Výskyt těchto histologických míst je v korelaci s optimálním vytvářením paměti, izotypového přepínání, somatické hypermutace a tudíž afinitního zrání protilátkové reakce.

Termín „buňky produkující protilátky“ označuje B lymfocyty, které obdržely na kontaktu nezávislý a na kontaktu závislý signál od Th lymfocytů, a secernují imunoglobuliny podtříd IgM, IgG, IgA nebo IgE.

Termín „Fc doména“ protilátky označuje část molekuly obsahující kloubovou oblast, domény H2 a CH3, ale postrádající vazebná místa pro antigen. Termín zahrnuje také ekvivalentní úseky IgM a dalších imunoglobulinových izotypů.

Termín „anti-TWEAK protilátka“ označuje jakoukoliv protilátku, která se specificky váže alespoň na jeden epitop proteinu TWEAK.

Termín „anti-TWEAK-receptor protilátka“ označuje jakoukoliv protilátku, která se specificky váže alespoň na jeden epitop receptoru TWEAK.

Termín „signalizace receptoru TWEAK“ se týká molekulárních reakcí spojených se signální/metabolickou dráhou receptoru TWEAK a následnými molekulárními reakcemi, které z ní vycházejí.

Termíny „činidlo modifikující TWEAK nebo činidlo modifikující TWEAK receptor“ označují jakékoliv činidlo, které modifikuje vazbu ligandu na receptor TWEAK, modifikuje shlukování TWEAK receptorů na buněčném povrchu nebo signalizaci receptoru TWEAK, nebo ovlivňuje to, jak je signál

z receptoru TWEAK vnímán v buňce.

Termín „ligand TWEAK“ nebo „protein TWEAK“ se týká jakéhokoliv monomerního, polymerního nebo heteromerního komplexu TWEAK nebo jejich derivátů, které se specificky váží na receptor TWEAK.

Termín „subjekt“ se týká zvířete nebo jedné či více buněk pocházejících ze zvířete. Výhodně je zvíře savec. Buňky mohou být v jakékoliv formě, včetně buněk tvořících tkáň, shluků buněk, imortalizovaných, transfekovaných nebo transformovaných a buněk pocházejících ze zvířete, které bylo fyzicky nebo fenotypově modifikováno, přičemž tento výčet není omezující.

Ligand TWEAK

TWEAK je nově objevený člen rodiny TNF rodiny proteinů (Chicheportiche et al., J. Biol. Chem. 51: 32401-32410 (1997)). Členové rodiny TNF proteinů se váží na receptory z rodiny TNF-receptorových proteinů (TNF-R). Interakce proteinů TNF rodiny s jejich receptory ovlivňuje široké spektrum funkcí imunitního systému. Ke známým příkladům patří protein CD40L, který se váže na receptor CD40 a tím stimuluje diferenciaci B lymfocytů na lymfocyty produkující protilátky (Grewal and Flavell, Immunol. Res. 16: 59-70 (1997)), ligand lymfotoxin-beta (LT-b), který se váže na receptor lymfotoxinu-beta a tak ovlivňuje humorální imunitní reakci tím, že reguluje diferenciační stav folikulárních dendritických buněk (Mackay a Browning, Nature 395: 26-27 (1998)), a OX40L, který se váže na OX40 receptor a reguluje tak reakci B lymfocytů na signály T lymfocytů (Flynn et al., J. Exp. Med. 188: 297-304 (1998)). Další páry ligand/receptor v rámci rodiny TNF/TNF-R, o kterých je známo,

že hrají kritickou úlohu v imunitní reakci, jsou TNF/TNF-R55, FasL/Fas a CD27/CD70.

Biologie TWEAK je dosud poznána jen částečně. Purifikovaný rozpustný protein TWEAK byl použit k indukci diferenciaci a/nebo smrti některých nádorových buněčných linií, jako např. buňky HT29 adenokarcinomu (buněčná smrt prostřednictvím apoptózy), buňky HeLa cervikálního karcinomu (morfologické změny), a buňky A375 melanomu (anti-proliferace). TWEAK také indukoval buněčné linie HT29 a A375 k sekreci chemokinu IL-8, a stejný účinek se projevil na fibroblastové buněčné linii WI-38 (Chicheportiche et al., J. Biol. Chem. 51: 32401-32410 (1997)). Kromě toho TWEAK indukoval proliferaci řady normálních linií endotelových buněk (Lynch et al., J. Interferon Cytokine Res. 18: A-46 (1998)).

Domnělý receptor pro TWEAK byl také popsán (Marsters et al., Curr. Biol. 8: 525-528 (1998)) 1998). Tento receptor, také známý pod názvy jako TRAMP, Apo3, WSL-1, DR-3, nebo LARD je člen rodiny TNF-R. Aktivace TRAMP může indukovat apoptózu buďto prostřednictvím signalizační dráhy buněčné smrti závislé na kaspáze nebo buněčnou aktivací prostřednictvím NF- κ B signalizační dráhy (Ashkenazi and Dixit, Science 281: 1305-1308 (1998)).

Exprese TWEAK u myši a člověka je všeobecně rozšířena, mRNA (messenger RNA) se vyskytuje kromě jiných tkání také v srdci, mozku, plicích, játrech, a také v sekundárních lymfatických orgánech jako je slezina, lymfatické uzliny a mononukleární buňky periferní krve (PBMC). TWEAK není exprimován v primárních lymfatických orgánech, kde se vyvíjejí buňky imunitního systému, jako je např. brzlík (thymus), kostní dřeň a fetální játra. Takže se zdá, že TWEAK spíše hraje roli v imunitní reakci spíše než ve vývoji imunitního systému.

Interakce proteinových ligandů a jejich receptorů může být modifikována řadou specifických nástrojů. Tak např. monoklonální protilátky (mAb), které specificky rozpoznávají ligand, se mohou použít k prevenci nebo modifikaci vazby ligand/receptor, a sice tím, že rozpoznávají vazebné místo nebo fyzicky narušují interakci. Alternativně protilátky anti-ligand mohou ovlivnit signalizaci receptoru ovlivněním vazby jiných ligandů, pokud pro daný receptor existuje více ligandů. Takové složité účinky byly pozorovány pro mAb k rodině B7 ligandů CD28 (Lenschow et al. J. Exp. Med. 181: 1145-1 155 (1995)). Anti-ligand mAb mohou mít dokonce mnohem „jemnější“ účinky v systému, kde existuje více receptorů pro určitý ligand, např. tím, že modifikují vazbu ligandu k jednomu receptoru a přitom nechávají vazbu k jinému receptoru beze změny. Monoklonální protilátky rozpoznávající receptor mohou být také užity k modifikaci vazby ligandu, nebo mohou samy indukovat nebo modifikovat signalizaci receptoru. Takže anti-receptorové monoklonální protilátky mohou být jak antagonistické, tak i agonistické. Příklady monoklonálních protilátek použitých v myším nebo lidském systému k modifikaci interakce ligand/receptor v rodině TNF/TNF-R jsou např. mAb specifické kromě jiných pro TNF, CD40L, LT- α , Fas-L a TR2/HVEM. Monoklonální protilátky se mohou užít k blokování iniciace nebo rozvoje imunologických a dalších onemocnění. Tak např. anti-CD40L byla použita k léčení systémového lupus erythematoses (SLE) a k zastavení selhávání orgánového transplantátu.

Silné inhibitory interakce ligand/receptor mohou být také připraveny klonováním sekvence, která kóduje extracelulární úsek receptoru se sekvencí, která kóduje těžký řetězec lidského imunoglobulinu (Ig), a následnou expresí hybridního genu za pomoci vhodného promotoru ve vhodné

buněčné linii. Purifikované fúzní proteiny receptor-Ig mohou být použity *in vitro* a *in vivo* k vázaní dostupných proteinových ligandů a tudíž k modifikaci interakce ligandu s nativním, na buňku vázaným receptorem. Modifikace se může uskutečnit mnoha různými mechanismy, podobně jak bylo výše popsáno pro anti-ligandové monoklonální protilátky. Příklady fúzních proteinů receptor-Ig použitých v myším nebo lidském systému k modifikaci interakce ligand/receptor v rodině TNF/TNF-R jsou kromě jiných TNF-R55-Ig, TNF-R75-Ig, LT-b-R-Ig a Ox40-Ig. Fúzní proteiny receptor-Ig se mohou užít k blokování iniciace nebo rozvoje imunologických a dalších onemocnění. Tak např. TNF-R75-Ig byl použit k léčení zánětlivé nemoci střev (IBD).

V předkládaném vynálezu je ukázáno, že monoklonální protilátky, které se specificky váží na myší a lidský TWEAK blokuji rozvoj prototypového antigenem vyvolaného imunologického onemocnění, a sice GVHD, nemoci způsobené reakcí štěpu proti příjemci. Vynález předpokládá použití činidel modifikujících TWEAK nebo receptor TWEAK k léčení různých imunologických onemocnění, která jsou důsledkem vnesení cizorodých antigenů do pacienta, jako je např. GVHD, která je důsledkem transplantace kostní dřeně nebo kmenových buněk, a selhávání orgánových transplantátů v důsledku odvržení štěpu. Kromě toho vynález předpokládá použití činidel modifikujících TWEAK nebo receptor TWEAK k léčení řady dalších autoimunitních onemocnění jako je např. SLE, idiopatická trombocytopenická purpura, Wegenerova granulomatóza, *polyarteritis nodosa*, retinální uveitida, rychle progradující srpkovitá glomerulonefritida, revmatoidní artritida, *sclerosis multiplex*, ulcerativní kolitida a další. K dalšímu předpokládanému využití patří léčení akutních

a chronických zánětlivých stavů, jako jsou alergické záněty, astma, eosinofilie, Gravesova nemoc, Chagasova nemoc a další.

Materiály a metody

Myši

Šest až osm týdnů staré samice myši kmneů DBA/2 a C57B1/6 a potomci křížení v F1 generaci (DBA/2 x C57B1/6)F1 byli získáni z Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Myši byly chovány za obvyklých ochranných opatření a zaházelo se s nimi v souladu s pokyny instituce.

Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky rozpoznávající lidský a myší protein TWEAK byly připraveny v arménských křečcích užitím lidského rozpustného proteinu TWEAK, který byl připraven expresí v bakuloviru a purifikován jak bylo popsáno v Chicheportiche et al., J. Biol. Chem. 51: 32401-32410 (1997). Pro první imunizaci každý křeček dostal 50 µg TWEAK v úplném Freundově adjuvans (CFA) jako i.p. injekci. Pro další imunizaci (14., 28. a 42. den po primární imunizaci) každý křeček dostal 50 µg (14. a 28. den) nebo 33 µg (42. den) TWEAK v neúplném Freundově adjuvans (IFA) jako i.p. injekci. Poslední imunizace před fúzí buněk sleziny pro přípravu hybridomů byla provedena 100 µg TWEAK i.p. bez adjuvans. Hybridomy pak byly připraveny standardní technologií (Lerner, Yale J. Biol. Med. 54: 387-402 (1981)).

Hybridomy produkující anti-myší CD40L monoklonální protilátku MR1 (Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6550-6554 (1992)) byly získány ze sbírky ATCC (Rockville, MD USA). Hybridomy produkující anti-KLH Ha4/8 monoklonální

protilátku byly získány od Dr. Mendricka (Human Genome Sciences, Inc. Rockville, MD USA).

Analýza aktivity monoklonálních protilátek metodou ELISA

Anti-lidské TWEAK monoklonální protilátky byly testovány na schopnost vázat se na myší a lidský TWEAK v různých typech experimentů. Několik monoklonálních protilátek připravených proti lidskému proteinu TWEAK rozpoznávalo také myší TWEAK v počátečním screeningu aktivity monoklonálních protilátek, který byl prováděn testy ve formátu ELISA. Myší protein TWEAK byl připraven rekombinantní technologií v bakuloviru podobným postupem jaký byl popsán pro lidský TWEAK (Chicheportiche et al., J. Biol. Chem. 51: 32401-32410 (1997)). Purifikovaný lidský a myší protein TWEAK byly navázány na 96jamkové destičky a užity k testování různých křeččích monoklonálních protilátek, zda se váží na tyto imobilizované proteiny. Zachycení křeččích monoklonálních protilátek na imobilizované proteiny TWEAK bylo vizualizováno pomocí oslího anti-křeččího IgG s navázanou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA USA), a pak vhodnou enzymatickou, na peroxidáze závislou reakcí.

Analýza aktivity monoklonálních protilátek metodou FACS

Rozpustný protein TWEAK indukuje apoptózu u buněk HT29, což ukazuje, že tyto buňky exprimují receptor TWEAK (Chicheportiche et al., J. Biol. Chem. 51: 32401-32410 (1997)). Purifikované monoklonální protilátky (10 µg/ml) byly testovány na schopnost blokovat vazbu FLAG-značeného myšího nebo lidského TWEAK na buňky HT29, což bylo detekováno biotinylovanou anti-FLAG protilátkou, streptavidin-peroxidázou a vhodným enzymovým substrátem.

Indukce chronické GVHD

Šest až osm týdnů staré samice myší kmenů DBA/2 a C57B1/6 byly utráceny a sleziny byly sterilně vyjmuty. Jemným rozdrcením orgánu pomocí drsných skleněných destiček byla připravena suspenze jednotlivých buněk, a po usazení buněčného debrisu byl supernatant peletován. Pelet byl potom resuspendován v Geyově pufrovaném hypertonickém roztoku a inkubován na ledu 3 minuty, aby se lyzovaly červené krvinky. Na rozrušení každé sleziny bylo použito 5 ml Geyova roztoku. Buněčná suspenze byla znovu peletována, resuspendována ve sterilním PBS bez pyrogenů, peletována a resuspendována znovu ve sterilním PBS bez pyrogenů. Počet buněk byl stanoven pomocí hemocytometru a hustota buněk byla upravena na $2 \times 10^8/\text{ml}$. Tento roztok byl přefiltrován přes sterilní 70 μm filtr a až do použití ponechán na ledu. Jako příjemce byly užity šest až osm týdnů staré samice myší kmene B6D2F1. Každá myš dostala injekci 500 μl (tj. 1×10^8) buněk do žíly ocasu. Experimentální skupiny dostaly štěp DBA/2 (DBA/2>F1), zatímco skupina kontrolních zvířat dostala štěp B6D2F1 (F1>F1). 14 dní po injekci byla zvířata vyšetřena na rozvoj chronické GVHD.

Blokování chronické GVHD

Myši obdržely dávku monoklonální protilátky anti-TWEAK AB.D3, anti-CD40L MR1, kontrolní monoklonální protilátky Ha4/8 nebo byly bez ošetření. Schéma dávek bylo 250 μg monoklonální protilátky 4 hodiny před injekcí štěpu a pak 2, 4 a 6 dnů po injekci.

Testování rozvoje nemoci

14. den experimentu byly myši utráceny a zváženy. Pak byla asepticky vyjmuta slezina a zvážena. Byl vypočten

slezinový index jako poměr hmotnosti sleziny a tělesné hmotnosti pro každé zvíře kontrolní F1>F2 skupiny a pak byla vypočtena jeho průměrná hodnota. Průměrná hodnota slezinového indexu ostatních skupin byla normalizována vzhledem k této hodnotě kontrolní skupiny. Ze slezin pak byly izolovány splenocyty, jak již bylo popsáno výše, a naředěny na koncentraci 1×10^7 buněk/ml ve sterilním PBS. Pro FACS analýzu bylo 100 μ l buněk obarveno na následující buněčné povrchové markery. Všechny monoklonální protilátky byly zakoupeny od firmy Pharmingen (San Diego, CA, USA). Streptavidinové činidlo bylo zakoupeno od Southern Biotechnology Corp. (Birmingham, AL, USA). Splenocyty byly obarveny biotinylovaným anti-H-2K^b haplotypovým markerem, který rozlišuje donorové buňky (H-2K^b-) od buněk příjemce (H-2K^b+) v různých kombinacích s přímo konjugovanými anti-CD4, anti-CD8, antiB220, anti-CD69, anti-I-A^d, anti-L-selektin a anti-H2D^d značenými FITC nebo PE v roztoku PBS/0,5% BSA/0,1% azid sodný (FACS pufru) obsahujícím 10 μ g/ml FcBlockTM (Pharmingen) pro přerušování nespecifických vazeb k Fc receptorům. Buňky byly inkubovány s monoklonálními protilátkami jednu hodinu na ledu. Každý vzorek byl pak resuspendován ve 2 ml FACS pufru, aby se promyl, a pak byly buňky peletovány centrifugací. Pak byly buňky resuspendovány ve FACS pufru obsahujícím streptavidin značený CyChrome, který se váže na biotinylovanou monoklonální protilátku, aby se vytvořil třetí kanál ve FACS, pak naposledy propláchnuty a analyzovány pomocí zařízení FACSScan a softwaru Cellquest (Becton Dickenson, San Jose, CA, USA).

Pro *in vitro* analýzu byly buňky secernující Ig peletovány a resuspendovány v DMEM obsahujícím 10% fetální hovězí albumin (FBS)/4mM glutamin na koncentraci 1×10^7 buněk/ml. Na 6jamkové destičky bylo nanášeno po 1 ml na

každou jamku. Supernatanty z buněk byly odebrány po 24 hodinách.

Zdroj protilátek anti-TWEAK

V jednom provedení předkládaného vynálezu protilátky namířené proti TWEAK fungují jako činidlo blokující TWEAK. Protilátky lze připravit proti monomerní, dimerní nebo trimerní formě proteinu TWEAK, buďto s nebo bez heterologní podjednotky, pokud existuje. Kromě toho protilátka může být připravena proti rozpustné, mutované, pozměněné nebo chimérické formě proteinu TWEAK. Protilátka anti-TWEAK podle předkládaného vynálezu může být monoklonální nebo polyklonální protilátka a může být modifikována, aby se optimalizovala její schopnost blokovat vazbu TWEAK na jeho receptor, její biologická dostupnost *in vivo*, stabilita nebo jiné požadované vlastnosti.

Polyklonální protilátkové sérum namířené proti TWEAK se připravuje standardním způsobem tak, že se zvíře jako je např. koza, králík, potkan, křeček nebo myš injikuje subkutánně lidským TWEAK v úplném Freundově adjuvans (CFA) a pak znovu zesilovací intraperitoneální nebo subkutánní injekcí TWEAK v neúplném Freundově adjuvans (IFA). Polyklonální antisérum obsahující požadované protilátky namířené proti TWEAK se testuje standardními imunologickými postupy.

Křeččí monoklonální protilátky proti lidskému TWEAK byly připraveny v oboru známými postupy, a sice injikováním rekombinantního rozpustného lidského TWEAK v CFA do arménského křečka a opakováním zesilovací injekce TWEAK v IFA intraperitoneálně. Hybridomová buněčná linie (AB.D3.7.2) produkující křeččí monoklonální protilátku anti-TWEAK AB.D3 byla uložena v Americké sbírce mikroorganismů ATCC

(Rockville, MD) v souladu s Budepeštskou smlouvou. Jakmile bude na základě této přihlášky udělen patent, pomínou všechna omezení přístupu k uloženému materiálu.

Různé formy protilátek anti-TWEAK mohou být také připraveny metodami rekombinantní DNA (Winter a Milstein, Nature, 349, pp. 293-99 (1991)). Tak např. mohou být zkonstruovány "chimérické" protilátky, ve kterých je doména vázající antigen z protilátky zvířete spojena s lidskou konstantní protilátkovou doménou (viz např. Cabilly et al., US 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, pp. 6851-55 (1984)). Chimérické protilátky redukuji imunitní reakci vyvolanou zvířecími protilátkami, když se užijí u člověka.

Kromě toho rekombinantní "humanizované protilátky", které rozpoznávají TWEAK, mohou být připraveny syntézou. Humanizované protilátky jsou chiméry, které obsahují většinu lidských sekvencí IgG, do kterých byly vloženy úseky zodpovědné za specifickou vazbu antigenu (viz např. Mezinárodní přihláška WO 94/04679). Zvířata se imunizují požadovaným antigenem, izolují se odpovídající protilátky a odstraní se část variabilního úseku zodpovědná za specifickou vazbu antigenu. Úseky vázající antigen pocházející ze zvířecí protilátky se pak klonují do vhodných míst genů lidské protilátky, ze kterých byly úseky pro vazbu antigenu deletovány. Humanizované protilátky minimalizují potřebu heterologních (mezidruhových) sekvencí v lidských protilátkách a jsou méně náchylné k vyvolání imunitní reakce u léčeného pacienta.

Konstrukce různých tříd rekombinantních anti-TWEAK protilátek se může realizovat také přípravou chimérických nebo humanizovaných protilátek obsahujících anti-TWEAK

variabilní domény a lidské konstantní domény (CH1, CH2, CH3) izolované z různých tříd imunoglobulinů. Tak např. protilátka anti-TWEAK IgM se zvýšenou valencí vazebných míst může být rekombinantně připravena klonováním místa vázajícího antigen do vektoru obsahujícího konstantní úseky těžkého řetězce lidského IgM (Arulanandam et al., J. Exp. Med., 177, pp. 1439-50 (1993); Lane et al., Eur. J. Immunol., 22, pp. 2573-78 (1993); Traunecker et al., Nature, 339, pp. 68-70 (1989)).

Kromě toho lze užít standardní techniky rekombinantní DNA a změnit vazebnou afinitu rekombinantních protilátek pro antigen tím, že se zamění některé aminokyselinové zbytky v blízkosti vazebných míst pro antigen. Afinita vazby k antigenu u humanizovaných protilátek může být zvýšena mutagenézí založenou na molekulárním modelování (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, pp. 10029-33 (1989); WO 94/04679).

Může být potřebné zvýšit nebo snížit afinitu anti-TWEAK protilátek pro TWEAK v závislosti na typu cílové tkáně nebo na předpokládaném léčebném režimu. Tak např. může být výhodné léčit pacienta konstantní hladinou anti-TWEAK protilátek se sníženou schopností modifikovat dráhu TWEAK při semiprofylaktické léčbě. Podobně anti-TWEAK protilátky se zvýšenou afinitou pro TWEAK mohou být výhodné pro krátkodobé léčení.

Příprava křeččích anti-lidských TWEAK protilátek je ilustrována v příkladu 1.

Použití monoklonálních protilátek anti-TWEAK k blokování rozvoje chronické GVHD, imunologického onemocnění vyvolaného antigenem

Byl ukázán účinek činidla blokujícího TWEAK, monoklonální protilátky AB.D3, na rozvoj imunitní reakce u

myšího modelu chronické nemoci vyvolané reakcí štěpu proti příjemci (GVHD). Ke schopnosti blokovat GVHD patří také účinky na aktivaci a proliferaci B lymfocytů, a na vyvolání sekrece IgG. Myši byly ošetřeny intraperitoneálně (i.p.) 250 μ g anti-TWEAK monoklonální protilátky AB.D3, kontrolní anti-KLH monoklonální protilátky Ha4/8, anti-CD40L monoklonální protilátky MR1 a nebo byly ponechány bez ošetření. Po 4 hodinách dostaly myši 0,5 ml intravenózní (i.v.) injekci obsahující 1×10^8 splenocytů izolovaných z myši DBA/2. Tyto i.v. injikované DBA/2 splenocyty představovaly alloštěp (cizorodý štěp). 2, 4 a 6 dnů po přenesení byly myši znovu ošetřeny 250 μ g anti-TWEAK monoklonální protilátky AB.D3, kontrolní anti-KLH monoklonální protilátky Ha4/8, anti-CD40L monoklonální protilátky MR1. Kontrolní skupina myší dostala 1×10^8 splenocytů izolovaných z myši B6D2F1, které nemohou vyvolat imunitní reakci u myši B6D2F1. Jako kontroly byly alternativně užity myši B6D2F1, které nedostaly žádný štěp ani nebyl nijak ošetřeny. 14 dnů po podání štěpu byly myši utraceny a vyšetřeny na výskyt nemoci.

U neošetřených myší se po podání štěpu projevila řada různých symptomů ukazujících na rozvoj GVHD. Splenomegalie neboli zvětšení sleziny je důkazem, že T lymfocyty dárce a B lymfocyty příjemce se aktivovaly a procházejí procesem polyklonální expanze, při kterém se dramaticky zvětšuje počet buněk. Objevení se povrchových proteinů, jako jsou např. CD69 na podskupině B lymfocytů, je indikací aktivace B lymfocytů. Ztráta molekul L-selektinu z CD4+ a CD81 T lymfocytů je důkazem aktivace T lymfocytů. Sekrece imunoglobulinových molekul, jako jsou imunoglobuliny třídy IgG, IgA a IgE, buďto do séra, nebo v testu s *in vitro* buňkami, ukazuje, že B lymfocyty byly aktivovány a došlo k "přepnutí" třídy Ig.

V takovém případě výskyt anti-vlastních Ig v séru nebo v *in vitro* buněčném testu ukazuje, že produkované Ig nepřiměřeně rozpoznávají autoantigeny. Přežívání je nakonec hodnoceno jakožto výsledek různých léčebných režimů.

Kontrolní myši byly srovnány s neléčenými myši, které také obdržely alloštěp, aby byl vyšetřen rozsah splenomegalie, aktivace B lymfocytů a sekrece Ig v průběhu GVHD. Monoklonální protilátky anti-CD40L MR1 byly použity jako pozitivní kontrola v těchto experimentech, neboť bylo již dříve ukázáno, že blokování interakce CD40L/CD40 je účinným prostředkem narušení rozvoje chronické GVHD (Durie et al., J. Clin. Invest. 94: 1333-1338 (1994)). Křeččí monoklonální protilátky Ha4/8 proti hemocyaninu z přílipky (KLH) byly použity v kontrolním ošetření. Výsledky ze dvou pokusů jsou ukázány v tabulce 2. V obou pokusech ošetření monoklonální protilátkou anti-TWEAK AB.D3 snížilo rozsah splenomegalie (ve srovnání s neošetřenými příjemci alloštěpu) přibližně o 33 %. Ošetření negativní kontrolou, tj. monoklonální protilátkou Ha4/8, nemělo žádný účinek, zatímco ošetření anti-CD40L monoklonální protilátkou MR-1 snížilo splenomegalii o téměř 70 %. Aby se prozkoumaly populace buněk, které byly zasaženy vlivem ošetření anti-TWEAK monoklonální protilátkou AB.D3, byly provedeny FACS analýzy splenocytů odebraných z myší-příjemců 14 dnů po injekci štěpu. Buňky ze sleziny ze 3 až 4 myší ve skupině byly izolovány a sloučeny. Aktivace B lymfocytů příjemce je definujícím znakem chronické GVHD. Neošetřené myši a myši ošetřené kontrolní protilátkou měly malý, ale zřetelný podíl B lymfocytů B200+ exprimujících aktivační marker CD69 (obrázek 4 a tabulka 3). Naproti tomu prakticky žádné B200+ M lymfocyty u myší ošetřených MR1 nebo AD.B3 neexprimovaly CD69. Nepřítomnost měřitelné aktivace B lymfocytů ve slezině

myši po podání AB.D3 může být způsobena jedním nebo více mechanismy, jako je selhání aktivace T lymfocytů, selhání aktivace B lymfocytů nebo buněčná smrt (apoptóza). Dále byla měřena celková hladina IgG v kultuře splenocytů myši po různých způsobech ošetření, aby se určilo, zda ztráta aktivačního markeru CD69 z populací B lymfocytů koreluje s funkčním výstupem, tj. produkcí IgG. Neléčené kontrolní myši, myši léčené MR1 a myši léčené AB.D3 produkovaly významně nižší množství celkových IgG než myši, které obdržely alloštěp a buďto nebyly léčeny nebo byly léčeny Ha4/8 (viz tabulka 4). Tyto výsledky ukazují, že sekrece Ig aktivovanými B lymfocyty, definující znak chronické GVHD, je blokována podáním anti-TWEAK monoklonální protilátky. Použití anti-TWEAK monoklonální protilátky k blokování rozvoje chronické GVHD je ilustrováno v příkladu 2.

Další nemoci zprostředkované protilátkami

Mnoho orgánově specifických a systémových autoimunitních onemocnění zahrnuje patologickou protilátkovou reakci. K takovým nemocem patří např. *myasthenia gravis*, autoimunitní hemolytická anémie, Chagasova nemoc, Greveho nemoc, idiopatická trombocytopenia purpura (ITP), systémový *lupus erythematoses* (SLE), Wegenerova granulomatóza, *polyarteritis nodosa* a rychle progradující srpkovitá glomerulonefritida (viz Benjamini et al., Immunology, A short Course, 3rd Ed., Willey-Liss, New York, 1996).

Ačkoliv je etiologie SLE neznámá, je dostatečně znám imunologický mechanismus, který je zodpovědný za pozorované patologické příznaky. Z neznámých důvodů pacienti trpící SLE produkují protilátky proti jaderným složkám v těle (protijaderné protilátky, ANA) zejména proti dvouřetězcové DNA. Klinicky přítomnost těchto protilátek koreluje nejlépe

s patologickým stavem ledvin, který se rozvíjí při SLE. Protilátky vytvářejí komplexy s DNA zjevně pocházející z poškozené normální tkáně, a stejně jako u mnohých imunoagregujících nemocí, tyto komplexy vytvářejí depozity na bazální membráně glomerulů, na stěnách arterií a v synoviálních dutinách kloubů. Tyto komplexy aktivují kaskádu komplementu a přitahují granulocyty. Následující zánětlivá reakce, charakterizovaná jako glomerulonefritida, vede k poškození ledvin ústící až v proteinurii a hematurii.

SLE byl zkoumán na myším modelu po desetiletí. Rozvoj SLE může být blokován užitím činidla jako jsou fúzní proteiny CTLA4-Ig a anti-CD40L, které narušují kritické kroky (Grewal a Flavell, Immunol. Rev. 153: 85-106 (1996)). V současné době byla hodnocena terapeutická účinnost činidla specifických pro myší ligand CD40 na několika modelech (Mohan, et al., J. Immunol., 154, pp. 1470-1480 (1995)). Bylo ukázáno, že akcelerace lupusu přenosem buněk, které indukují tvorbu patogenních protilátek *in vivo*, byla inhibována podáním monoklonálních protilátek, které blokovaly interakci CD40/CD40-ligand. Kromě toho krátkodobé léčení myší s lupusem podáváním protilátky anti-CD40L mělo trvalý prospěšný účinek na spontánní onemocnění i dlouho po té, co protilátka vymizela z oběhu. Pokusy ukázaly, že patogenní B lymfocyty nemohly tvořit protilátky dokonce ani 9 měsíců po léčení, což ukazuje na to, že zde bylo zpoždění mezi expanze autoimunitních paměťových B lymfocytů, což vedlo k dlouhodobému léčebnému účinku. A navíc léčení anti-CD40L bylo schopné zdržet nebo zpozdit progresi SLE u myšího modelu spontánního SLE (Kalled, et al., J. Immunol. 160: 2158-2165 (1998)). Bylo ukázáno, že činidla modifikující interakce TWEAK/TWEAK-receptor(y) *in vivo* inhibují aktivaci B lymfocytů

a produkci Ig, a tudíž činidla podle předkládaného vynálezu jsou užitečná k léčení a prevenci SLE.

Normální imunitní reakce na některá patogenní infekční agens vyvolá autoprotilátkovou reakci, která se stane nadměrnou a představuje tudíž medicínský problém. Jedním příkladem je Chagasova nemoc, zánětlivá kardiomyopatie, která se vyvíjí u člověka a experimentálních zvířat po chronické infekci *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Nedávno byly v několika studiích identifikovány anti-vlastní protilátky v séru pacientů trpících Chagasovou nemocí (Bach-Elias et al., Parasitol. Res. 84: 796-799 (1998)). Kromě toho byla nedávno významně experimentálně podpořena představa o tom, že indukce pro srdce specifické autoimunitní reakce je možným mechanismem podílejícím se na patogenezi Chagasovy kardiomyopatie u lidí. V nedávných studiích (Tibbetts, et al., J. Immunol., 152, pp. 1493-1499 (1994)) bylo zjištěno, protilátky specifické k srdečním antigenům jsou tvořeny u myši C57Bl/6 se srdečním onemocněním po infekci *T. cruzi*. Po infekci brazilským kmenem *T. cruzi* se u myši C57Bl/6 vyvine kardiomyopatie, která je histologicky podobná kardiomyopatii pozorované u chronicky infikovaných lidí. Antiséra z těchto myši reagovala se třemi srdečními antigeny, zatímco myši infikované kmenem Guayas *T. cruzi*, u kterých se nevyvinula kardiomyopatie, netvořily takové protilátky. Tyto výsledky ukazují, že tyto protilátky jsou specifickými markery kardiomyopatie. Schopnost činidel modifikujících TWEAK blokovat aktivaci B buněk a produkci Ig je užitečná také k blokování poškození srdce, ke kterému dochází u pacientů s Chagasovou nemocí.

Dalším příkladem destrukce buněk autoprotilátkami vzniklými po některých infekčních nemocech nebo z jiných neznámých důvodů, je idiopatická trombocytopenia purpura

(ITP). Při této nemoci protilátky namířené proti destičkám způsobují destrukci destiček (buďto pomocí komplementu nebo fagocytujících buněk s Fc nebo C3b receptory), což vede ke krvácení. Léčivé přípravky, které by inhibovaly tuto protilátkami způsobenou autoimunitní reakci, jako jsou např. TWEAK modifikující činidla podle vynálezu, jsou užitečné k léčení nebo prevenci také této autoimunitní nemoci.

Normální imunitní reakce na některé patogenní infekce může hypersenzitivní reakci (přecitlivělost), která při nadměrném rozsahu představuje také medicínský problém. Nejrozšířenějším příkladem hypersenzitivní reakce typu I je alergická reakce. Tato reakce je zprostředkovaná protilátkami IgE, které se svým úsekem Fc váží na receptory na žírných buňkách a basofilech, čímž spouštějí produkci farmakologicky aktivních látek zprostředkovávajících anafylaxi. ITP a Goodpastureův syndrom jsou někdy považovány za reakce typu II, které se objevují, když se protilátky IgG nebo IgM váží na antigen na buněčném povrchu a aktivují kaskádu komplementu. Na místo aktivace jsou přitahovány granulocyty a poškození způsobené uvolňováním lytických enzymů z jejich granulí způsobuje destrukci buněk. Revmatoidní artritida se považuje za důsledek hypersenzitivní reakce typu III zprostředkované imunitními komplexy antigenu (v tomto případě revmatickým faktorem, protilátkou IgM), který se váže na Fc úsek normálního IgG. Tyto imunitní komplexy se podílejí na vyvolání zánětů v kloubech a poškození charakteristických pro tuto nemoc. Jelikož tyto nemoci jsou alespoň částečně způsobeny protilátkami, léčiva, která inhibují produkci protilátek, jako jsou např. činidla modifikující TWEAK podle předkládaného vynálezu, jsou užiteční k prevenci a léčení i těchto nemocí.

K dalším příkladům nemocí, které způsobují pacientům vážná poškození zprostředkovaná protilátkami, patří Gravesova nemoc a akutní hemolytická anemie. Lze předpokládat, že činidla modifikující TWEAK bodu užitečná k prevenci a léčení i těchto nemocí.

Inhibice buněčné imunitní reakce

Bylo ukázáno, že podávání činidel, která modifikují aktivitu proteinu TWEAK *in vivo*, blokuje rozvoj nemocí zprostředkované protilátkovou (humorální) imunitní reakcí, a sice GVHD. K dalším účinným činidlům modifikujícím imunitní systém, která jsou schopna blokovat rozvoj GVHD, patří anti-CD40L a fúzní proteiny CTLA4-Ig. Tato činidla blokují kritické kroky v aktivaci T a B lymfocytů (Grewal a Flavell, Immunol. Rev. 153:85-106 (1996)). Tudiž terapeutické ovlivnění těchto drah imunitního systému není omezeno jen na humorální imunitní reakci. Tak např. anti-CD40L a CTLA4-Ig byly použity jak samostatně tak společně k zastavení reakce odvržení orgánového transplantátu na zvířecím modelu (Kirk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 :87898794 (1997)). Velká část imunitní reakce na transplantovaný orgán je zprostředkována T lymfocyty Th1 a spočívá v cytotoxické buněčné reakci. Tato buněčná imunitní reakce je zodpovědná za buňkami zprostředkované poškození při mnohých imunologických onemocněních jako je např. zánětlivá nemoc střev, revmatoidní artritida, *sclerosis multiplex*, *diabetes*, ulcerativní kolitida a Crohnova nemoc. Vzhledem ke schopnosti blokovat rozvoj chronické GVHD, lze předpokládat, že činidla modifikující TWEAK nebo receptor TWEAK podle předkládaného vynálezu budou užitečná i pro léčení poruch buněčné imunity.

Léčení užitím činidel modifikujících TWEAK nebo receptor TWEAK

Přípravky podle vynálezu se podávají v dávce, která je účinná k léčení uvedených nemocí a poruch. Stanovení výhodné farmaceutické formulace a vhodného terapeuticky účinného dávkovacího režimu je rutinní záležitostí v kompetenci odborníka, když vezme v úvahu např. stav a hmotnost pacienta, rozsah požadovaného léčení a toleranci pacienta k léčení.

Dávky činidla modifikujícího TWEAK nebo receptor TWEAK velikosti přibližně 5 mg/kg jsou vhodným výchozím bodem pro optimalizaci léčebných dávek.

Stanovení terapeuticky účinných dávek může být také provedeno na základě *in vitro* experimentů, ve kterých se změří koncentrace činidla nutná k navázání na cílové buňky (buňky pozitivní na TWEAK nebo receptor TWEAK, v závislosti na typu modifikujícího činidla) po vhodné dobu léčení. Testy FACS a ELISA na vazbu ligandu s receptorem popsané v předložené přihlášce mohou být užity k monitorování reakce navazování činidla na buňky. Na základě takových *in vitro* testů lze stanovit vhodný rozsah koncentrací modifikujícího činidla, který se pak testuje na zvířatech.

Podávání vhodných modifikujících činidel podle předkládaného vynálezu, samotných nebo v kombinaci, včetně izolovaných a purifikovaných forem protilátek anti-TWEAK a anti-TWEAK-R, fúzních proteinů receptor-Ig a dalších činidle modifikujících TWEAK nebo receptor TWEAK včetně přirozeně se vyskytujících nebo chemicky připravených činidel a jejich solí nebo farmaceuticky přijatelných derivátů, lze provádět jakýmkoliv farmaceuticky přijatelným způsobem vhodným pro činidla, která projevují imunosupresivní aktivitu.

Farmaceutické přípravky použité k takovému léčení mohou být v různých formách. Patří k nim např. tuhé, polotuhé nebo

kapalné lékové formy, jako jsou např. tablety, pilulky, prášky, roztoky nebo suspenze, čípky a roztoky pro injekce nebo pro infúze. Výhodná léková forma závisí na zamýšleném způsobu podávání a terapeutické aplikaci. Ke způsobům podávání patří např. perorální, parenterální, subkutánní, intravenózní, podávání do léze nebo topické podávání.

Činidla modifikující TWEAK nebo receptor TWEAK podle předkládaného vynálezu mohou být vneseny do sterilních izotonických přípravků s nebo bez kofaktorů, které stimulují příjem nebo stabilitu přípravku. Přípravky jsou výhodně kapalné, nebo jsou ve formě lyofilizovaného prášku. Činidla modifikující TWEAK nebo receptor TWEAK podle vynálezu mohou být ředěna např. pufrem obsahujícím 5,0 mg/ml monohydrátu kyseliny citronové, 2,7 mg/ml citrátu sodného, 41 mg/ml manitolu, 1 mg/ml glycinu a 1 mg/ml polysorbat 20. Roztok se může lyofilizovat, uskladnit v zamraženém stavu a před podáním rekonstituovat přidáním sterilní vody pro injekce (podle lékopisu USA).

Přípravky také výhodně obsahují obvyklé farmaceuticky přijatelné nosiče v oboru známé (viz například Remington s Pharmaceutical Sciences, 16. vydání, 1980, Mac Publishing Company). Tyto farmaceuticky přijatelné nosiče mohou zahrnovat další léčivé přípravky, nosiče, genetické nosiče, adjuvans, excipienty apod., jako je například lidský sérový albumin nebo přípravky z plazmy. Přípravky jsou výhodně v jednotkové lékové formě a jsou obvykle podávány jednou nebo vícekrát denně.

Farmaceutické přípravky podle tohoto vynálezu mohou být také podávány s použitím mikrosfér, lipozomů, jiných mikročasticových aplikačních systémů nebo přípravků s prodlouženým uvolňováním, které jsou umístěny v postižených tkáních nebo v krevním oběhu, v jejich blízkosti či jinak

v kontaktu. Vhodné příklady nosičů s prodlouženým uvolňováním zahrnují semipermeabilní polymerové matrice ve formě tvarovaných předmětů, jako jsou například čípky nebo mikrotobolky. Implantovatelné nebo mikrotobolkové matrice s prodlouženým uvolňováním obsahují polylaktidy (patent USA č. 3 773 319, EP 58 481), kopolymery kyseliny L-glutamové a ethyl-L-glutamátu (Sidman et al., Biopolymers, 22, 547-56, 1985), poly(2-hydroxyethyl-methakrylát) nebo ethylenvinyl-acetát (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15, 167-277, 1981, Langer, Chem. Tech., 12, 98-105, 1982).

Výhody terapeutických přípravků obsahujících činidla modifikující TWEAK nebo TWEAK receptor

Přípravky modifikující TWEAK nebo receptor TWEAK podle tohoto vynálezu jsou schopné inhibovat imunitní reakce, jak je ukázáno inhibicí aktivace B lymfocytů a produkce Ig v modelu chronické GVHD. Schopnost selektivně inhibovat tyto imunitní zprostředkované reakce je užitečná pro léčení imunitních poruch včetně různých autoimunitních chorob, rejekce transplantovaného orgánu a akutních a chronických zánětlivých stavů. Léčba těchto patologických imunitních poruch obecně používá imunomodulační a imunosupresivní přípravky, které mají pleiotropní účinek na celou řadu buněčných typů a imunologických reakcí.

Tyto nespecifické imunosupresivní přípravky jsou nutné ve vysokých a často cytotoxických dávkách, které vyvolávají nežádoucí vedlejší účinky. Například ke třem hlavním imunosupresivním přípravkům používaným v současnosti patří steroidy, cyklofosfamid a azathioprin. Steroidy jsou pleiotropní protizánětlivé přípravky, které tlumí aktivované makrofágy a inhibují aktivitu buněk prezentujících antigen způsobem, který ruší mnoho patologických účinků T lymfocytů.

Cyklofosfamid, alkylační přípravek, zprostředkovává buněčnou smrt inhibicí replikace a oprav DNA. Azathioprin je antiproliferační přípravek, který inhibuje syntézu DNA. Tyto nespecifické imunosupresivní přípravky jsou obvykle nutné ve vysokých dávkách, což zvyšuje jejich toxicitu (např. nefrotoxicitu a hepatotoxicitu) a vyvolává nežádoucí vedlejší účinky. Pro dlouhodobou léčbu jsou tudíž nevhodné.

Existuje tedy stálá potřeba dalších přípravků a terapií, které překonávají problémy způsobené obvyklou léčbou.

Následují příklady, které ilustrují monoklonální protilátky (mAb) anti-TWEAK podle tohoto vynálezu, způsoby použité při charakterizaci těchto mAb a použití těchto mAb při bloádě imunologické poruchy vyvolané antigenem. Tyto příklady mají jen ilustrativní účel a vynález, který je definován připojenými patentovými nároky, nijak neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Produkce monoklonální protilátky k proteinu TWEAK

Monoklonální protilátky, které rozpoznávají lidský a myší protein TWEAK, byly pěstovány v arménských křečcích při použití rozpustného lidského proteinu TWEAK, který byl pěstován v bakulovirech, jak popsáno (Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 51, 32401-32410, 1997). Při první imunizaci dostal každý křeček 50 g TWEAK v kompletním Freundově adjuvans (CFA) v i.p. injekci. Při následných imunizacích (dny 14, 28 a 42 po primární imunizaci) dostal každý křeček

50 g (dny 14 a 28) nebo 33 g (den 42) TWEAK v neúplném Freundově adjuvans (IFA), i.p. Konečná imunizace před fúzí splenických buněk pro vytvoření hybridomu byla 100 g TWEAK bez adjuvans, i.p. Příprava hybridomu byla prováděna podle standardních postupů (Lemer, Yale J. Biol. Med., 54, 387-402, 1981).

Výchozí screening aktivity mAb byl prováděn s použitím testů ELISA. Myší protein TWEAK byl pěstován v bakulovirech užitím podobných metod, jak byly popsány pro lidský protein TWEAK (Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 51, 32401-32410, 1997). Purifikované lidské a myší proteiny TWEAK byly navázány na 96-jamkové destičky a byla testována schopnost různých křeččích mAb vázat se na tyto imobilizované proteiny. Vychytávání křeččí mAb imobilizovanými proteiny TWEAK bylo vizualizováno při použití oslího anti-křeččího IgG spojeného s HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA USA) a příslušné enzymové reakce. Osm z 23 mAb rozpoznávalo oba proteiny TWEAK, myší i lidský (tabulka 1).

Tabulka 1

Klon	ELISA lidského TWEAK	ELISA myšího TWEAK	FACS blokuující ligand	Vazba k hTWEAK/ 293 FACS	Vazba k mTWEAK/ 293 FACS
AB.D3.7.2	+++	+++	+	+	+
AA.DB5	+++	-	+/-	+	-
AC.H5.24	+++	+++	-	nd	nd
AA.G9	+++	-	+/-	+	-
AB.H12.1	+++	+++	-	-	-
BA.F5.35.2*	+++	+++	+	+	-
BG.A12.5*	++	+++	+	+	-
BE.D5	++	-	+/-	+	-

AF.D4	++	-	+	+	-
AB.G11.1*	+++	+++	+	+	+
BE.B3.6.1*	++	-	-	+	-
AA.AC2.3.2	+++	-	+/-	nd	nd
BB.B12.1.31.3	++	-	+/-	+	-
AA.DG7.14*	+++	+++	+	+	+
BD.A3	++	-	-	-	-
BC.B10.21*	+++	+++	+	+	+
BG.E8	+++	-	+/-	+	-
AE.C10.4*	+++	-	+	+	-
AA.BB4.2*	+++	-	+	+	-
AA.EC10.2*	+++	-	+	+	-
AD.B5.9*	+++	-	-	-	-
AB.D4.67.19	+++	-	-	-	-

ELISA lidského TWEAK: byla hodnocena schopnost mAb vázat se na destičku s navázaným lidským TWEAK.

ELISA myšího TWEAK: byla testována zkřížená reaktivita mAb na destičce s navázaným myším TWEAK.

FACS blokující ligand: byla testována schopnost mAb blokovat vazbu značeného lidského TWEAK na buňky HT29.

FACS analýza transfektant EBNA293: lidská a myší cDNA TWEAK byly použity k transfekci buněk EBNA293 a 3 dny později byla testována zkřížená reaktivita mAb.

Konzervativnost antigenních epitopů mezi liniemi živočišných druhů nebyla překvapivá při rozsahu proteinové homologie pozorované mezi myší a lidskou formou TWEAK (obrázek 1). Pro zjištění, zda se anti-TWEAK mAb mohou vázat na proteiny TWEAK exprimované na povrchu buňky byly použity analýzy FACS. Lidská a myší TWEAK cDNA sekvence byly klonovány do expresního vektoru CH269 (Chicheportiche et al.,

J. Biol. Chem., 51, 32401-32410, 1997) a tyto konstrukty byly použity pro transfekce za vzniku přechodné exprese proteinu v buňkách EBNA293. Čtyři mAb, včetně AB.D3, se vážaly dobře na buňky EBNA293 exprimující myší TWEAK (obrázek 2). Tyto 4 mAb byly také schopné zabránit vazbě lidského TWEAK na buňky HT29, o kterých je známo, že exprimují jeden nebo více receptorů TWEAK (např. obrázek 3). Tyto FACS analýza dohromady ukazují, že anti-TWEAK mAb specificky rozpoznávaly proteiny TWEAK a byly schopné modifikovat schopnost proteinů TWEAK vázat se na jeden nebo více receptorů TWEAK.

Příklad 2

Použití anti-TWEAK mAb AB.D3 pro blokádu vývoje splenomegalie, aktivace B lymfocytů a produkce Ig v myším modelu chronické GVHD

Chronická GVHD byla indukována u samic myší kmene B6D2F1 starých 6 až 8 týdnů při použití štěpů splenocytů DBA/2, jak popsáno v metodách. Každý recipient dostal injekci 500 μ l (1×10^8) buněk do ocasní žíly. Pokusné skupiny dostaly štěp DBA/2 (DBA/2>F1), zatímco skupina kontrolních zvířat dostala štěp B6D2F1 (F1>F1). Myši dostaly anti-TWEAK mAb AB.D3, anti-CD40L mAb MR1, kontrolní mAb Ha4/8, nebo nedostaly žádné ošetření. Zvířata dostala dávky 250 g mAb i.p. 4 hodiny před injekcí štěpu a 2, 4 a 6 dnů poté. V den 14 pokusu byly myši utraceny a byl vypočítán index sleziny jako poměr hmotnosti sleziny k tělesné hmotnosti pro každé zvíře v kontrolní skupině F1>F1 zprůměrnován za vzniku jedné hodnoty. Průměrný index sleziny pro všechny další skupiny je normalizován na kontrolní hodnotu. Výsledky ze 2 nezávislých

pokusů jsou ukázány v tabulce 2. U zvířat, která dostávala štěp DBA/2 (DBA/2>F1) a byla ponechána bez ošetření nebo byla ošetřena kontrolní mAb Ha4/8, byl prokázán dramatický nárůst hmotnosti sleziny ve srovnání s kontrolami se štěpem F1>F1. Tento výsledek je vyjádřen v indexu sleziny, který vykazoval nárůst proti normalizované kontrolní hodnotě od 1,0 do 2,6. Ošetření myši s anti-CD40L mAb MR1 snížilo index sleziny téměř na kontrolní hladinu (1,1) a ošetření s anti-TWEAK mAb AB.D3 zmenšilo splenomegalii o 35 % na 1,7 (tabulka 2).

Tabulka 2

Ošetření	Pokus 1	Pokus 2	Průměr
F1>F1 (kontrola)	1,0	1,0	1,0
DBA/2>F1 (neošetřené)	2,7	2,6	2,65
DBA/2>F1, ošetřené Ha4/8	2,9	2,6	2,75
DBA/2>F1, ošetřené MR1	1,1	1,1	1,1
DBA/2>F1, ošetřené AB.D3	1,8	1,7	1,75

14. den pokusu byly myši utráceny a zváženy. Pak byla asepticky odstraněna slezina a zvážena. Byl vypočten index sleziny jako poměr hmotnosti sleziny k tělesné hmotnosti pro každé zvíře v kontrolní skupině F1>F1, zprůměrnován za vzniku jedné hodnoty. Průměrný index sleziny pro všechny další skupiny byl normalizován na kontrolní hodnotu.

Byl použit FACS pro analýzu stádia aktivace populace lymfocytů ve slezinách kontrolních a nemocných myši, které představovaly skupiny s různým ošetřením. Zpočátku původci analyzovali stupeň osídlení dárcovskými buňkami v různých skupinách myši. Dárcovské buňky byly detekovány ve slezinách

hostitelských myší v přibližně stejném procentu (průměr = 6,2%) ve všech skupinách s ošetřením DBA/2 > F1 (tabulka 3). Tento výsledek ukazoval, že ošetření odlišnými mAb neovlivnilo osídlení dárcovskými buňkami.

Tabulka 3

Ošetření	% H-2K ^b negativní (dárcovské) buňky
F1>F1 (kontrola)	0,2
DBA/2>F1 (neošetřené)	5,9
DBA/2>F1, ošetřené Ha4/8	9,9
DBA/2>F1, ošetřené MR1	5,5
DBA/2>F1, ošetřené AB.D3	4,3

Pro analýzu FACS byly splenocyty z každé skupiny myší barveny na ledu 1 hodinu s antiH2K^b konjugovanou s PE a anti-H-2D^d konjugovanou s FITC pro měření exprese alel MHC. Hostitelské splenocyty byly pozitivní na oba markery, ale dárcovské splenocyty byly H-2K^b negativní. Procentuální hodnoty vyjadřují jevy v populaci lymfocytů, jak bylo určeno pomocí předních a postranních rozptylových charakteristik.

Dále byly použity dva markery aktivace lymfocytů: exprese CD69 na B lymfocytech B220+ a exprese L-selektinu na T lymfocytech CD4+ a CD8+. Když byly srovnávány kontrolní a neošetřené myši DBA/2>F1, pozorovali původci zvýšení B lymfocytů CD69+ z 2,5% na 6,2% (tabulka 4). Tomuto nárůstu počtu B lymfocytů CD69+ bylo zabráněno ošetřením s buď MR1 (3,3%) nebo AB.D3 (2,1%), ale ne ošetřením s Ha4/8 (6,5%) (obrázek 4 a tabulka 3). Data ze 2 pokusů jsou ukázána v tabulce 4.

Tabulka 4

Ošetření ve skupině	%B220+/CD69+ (dvojitě pozitivních) buněk		
	Pokus 1	Pokus 2	Průměr
F1>F1 (kontrola)	2,5	2,0	2,25
DBA/2>F1 (neošetřené)	6,2	5,5	5,9
DBA/2>F1, ošetřené Ha4/8	6,5	4,7	5,6
DBA/2>F1, ošetřené MR1	3,3	nd	3,3
DBA/2>F1, ošetřené AB.D3	2,1	3,2	2,65

Splenocyty byly barveny anti-B220 značenou PE a anti-CD69 značenou FITC 1 hodinu na ledu, promyty pufrem FACS, a pak analyzovány. Procenta jsou na základě jevů sebraných v populaci lymfocytů, jak určeno jak bylo určeno pomocí předních a postranních rozptylových charakteristik.

Pro analýzu *in vitro* sekrece Ig byly prováděny testy ELISA na supernatantech z tkáňové kultury splenocytů pocházejících ze slezin odebraných v různě ošetřených skupinách. Výsledky v tabulce 5 jsou z druhého pokusu, průměr výsledků od 3 myší ve skupině. Ošetření s MR1 nebo AB.D3 zabránilo 4 až 6 násobnému nárůstu spontánní produkce Ig pozorované u neošetřené skupiny DBA/2>F1 a skupiny DBA/2>F1 ošetřené Ha4/8.

Tabulka 5

Ošetření	<i>In vitro</i> spontánní produkce IgG
F1>F1 (kontrola)	125 ng/ml +/- 20 ng/ml
DBA/2>F1 (neošetřené)	750 ng/ml +/- 65 ng/ml
DBA/2>F1, ošetřené Ha4/8	500 ng/ml +/- 150 ng/ml
DBA/2>F1, ošetřené MR1	0
DBA/2>F1, ošetřené AB.D3	125 ng/ml +/- 20 ng/ml

Pro *in vitro* analýzu sekrece Ig byly buňky peletovány a resuspendovány v DMEM obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (FBS)/4mM glutamin, v koncentraci 1×10^7 buněk/ml. Na 6jamkové destičky bylo nanášeno po 1 ml na jamku. Buněčné supernatanty byly získávány po 24 hodinách. Hodnoty představují průměr ze 2 jamek na myš, 3 myši zastupovaly každou ošetřenou skupinu.

SEZNAM SEKVENCÍ

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 225

<212> PRT

<213> Myš

<400> 1

Val Leu Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Val Val Ser Leu Gly Ser Trp Ala Thr Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ser
 20 25 30

Gln Glu Glu Leu Thr Ala Glu Asp Arg Arg Glu Pro Pro Glu Leu Asn
 35 40 45

Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp Val Val Pro Phe Leu Glu Gln Leu
 50 55 60

Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg
 65 70 75 80

Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp
 85 90 95

Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Thr
 100 105 110

Lys Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Ile Gly Glu
 115 120 125

Phe Thr Val Ile Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His
 130 135 140

Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asn
 145 150 155 160

12.07.01

44

Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Pro Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu
180 185 190

Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala
195 200 205

His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val
210 215 220

His
225

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg Gly Glu Pro
1 5 10 15

Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly Leu Ala Leu
20 25 30

Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly Ser Arg Ala
35 40 45

Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val Ala Glu Glu
50 55 60

Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp
65 70 75 80

Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro
85 90 95

12.07.01

45

Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu
100 105 110

Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly
115 120 125

Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu
130 135 140

Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu
145 150 155 160

Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr
165 170 175

Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu
180 185 190

Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg
195 200 205

Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu
210 215 220

Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
245

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. 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 TWEAK a farmaceuticky přijatelný nosič, a je určen pro použití k blokování rozvoje nebo k léčení nebo ke zmírnění závažnosti či účinků imunologických onemocnění u zvířete.
2. 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 TWEAK a farmaceuticky přijatelný nosič, a je určen pro použití k inhibici imunitní reakce u zvířete.
3. Farmaceutický přípravek podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující TWEAK je vybráno ze skupiny obsahující:
 - a) protilátku namířenou proti ligandu TWEAK,
 - b) protilátku namířenou proti receptoru TWEAK,
 - c) činidlo, které modifikuje vazbu ligandu TWEAK na receptor,
 - d) činidlo, které modifikuje shlukování receptorů na povrchu buňky,
 - e) činidlo, které přerušuje intracelulární signalizaci receptoru TWEAK.
4. Farmaceutický přípravek podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zvíře je savec.
5. Farmaceutický přípravek podle nároku 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že savec je člověk.

6. Farmaceutický přípravek podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující TWEAK obsahuje rozpustný receptor TWEAK mající vazebnou doménu pro ligand, která může selektivně vázat povrchový ligand TWEAK.
7. Farmaceutický přípravek podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpustný receptor TWEAK obsahuje doménu lidského imunoglobulinu IgG.
8. Farmaceutický přípravek podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že doména lidského imunoglobulinu IgG obsahuje úsek zodpovědný za specifickou vazbu antigenu.
9. Farmaceutický přípravek podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka namířená proti receptoru TWEAK obsahuje monoklonální protilátku.
10. Farmaceutický přípravek podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující TWEAK obsahuje monoklonální protilátku namířenou proti povrchovému ligandu TWEAK.
11. Farmaceutický přípravek podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka je namířená proti podjednotce ligandu TWEAK.
12. Farmaceutický přípravek podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní reakce je imunitní reakce zprostředkovaná lymfocyty Th1.

13. Farmaceutický přípravek podle nároku 2
v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní reakce je
imunitní reakce zprostředkovaná lymfocyty Th2.
14. Farmaceutický přípravek podle nároku 2
v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní reakce
obsahuje imunitní reakci zprostředkovanou jak lymfocyty
Th1 tak i Th2.
15. Farmaceutický přípravek podle nároku 2
v y z n a č u j í c í s e t í m, že činidlo blokující
TWEAK obsahuje monoklonální protilátku namířenou proti
receptoru TWEAK.
16. 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 TWEAK a farmaceuticky přijatelný nosič.
17. Farmaceutický přípravek podle nároku 6
v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpustný receptor
TWEAK obsahuje doménu lidského imunoglobulinu IgG, do
které byly vloženy úseky zodpovědné za specifickou vazbu
antigenu.

100701

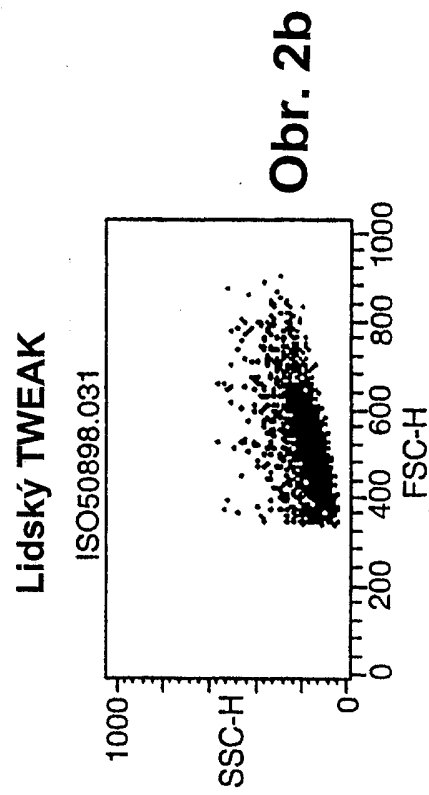
PV 2001-2548

Člověk	1	MAARRSQRRRRRGEPGTALLVPLALGLGLALACLGLLAVVSLGSRASL
Mýš	1	-----VLSGLALACLGLLVVSLSGWATL
Člověk	51	SAQEPAQEELVAEEDQDPSELNPQTEESQDPAPFLNRLVRRPRRSAPKGRK
Mýš	27	SAQEPSQEELTAEDRRREPPPELNPQTEESQDVVPFLEQLVRRPRRSAPKGRK
Člověk	101	TRARRAIAAHYEVHPRPGQDGAQAQAGVDGTVSGWEEARINSSSPLRYNRQI
Mýš	77	ARPRRAIAAHYEVHPRPGQDGAQAQAGVDGTVSGWEEKINSSSPLRYDRQI
Člověk	151	GEFIVTRAGLYLYLCQVHFDEGKAVYKLDLLVDGVLALRCLEEFSAATAA
Mýš	127	GEFTVIRAGLYLYLCQVHFDEGKAVYKLDLLVNGVLAALRCLEEFSAATAA
Člověk	201	SSLGPQLRLCQVSGLLALRPGSSLRIRTLPPWAHLKAAPFLTYFGLFQVH
Mýš	177	SSPGPQLRLCQVSGLLPLRPGSSLRIRTLPPWAHLKAAPFLTYFGLFQVH

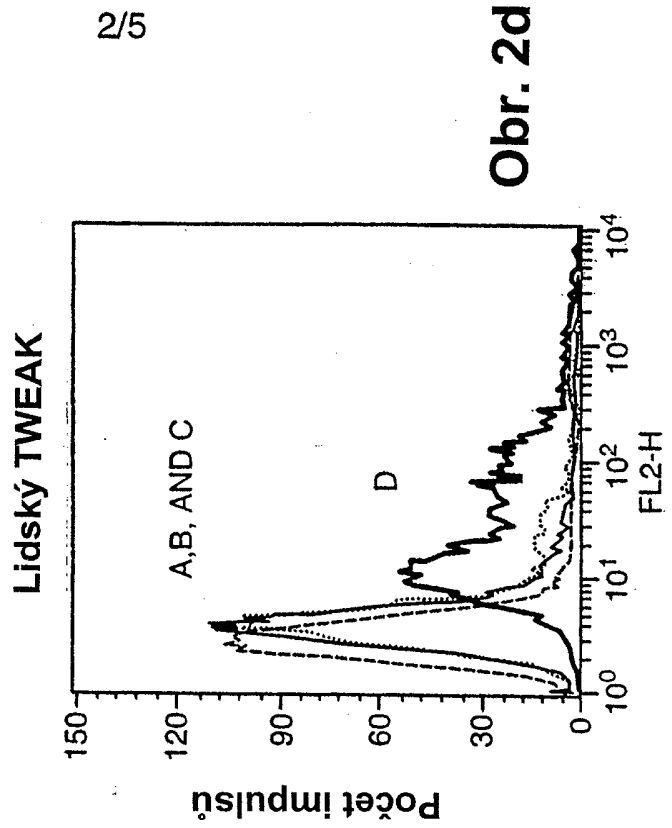
Obr. 1

12.07.01

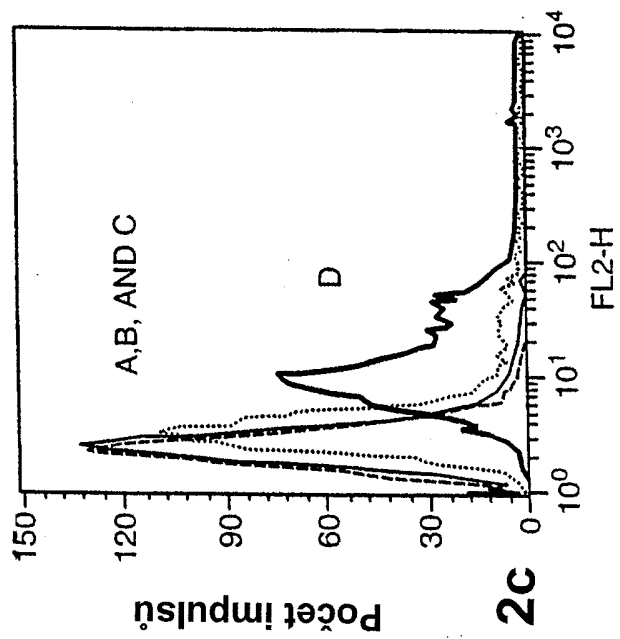
PV 2001-2548



Obr. 2a



Obr. 2d

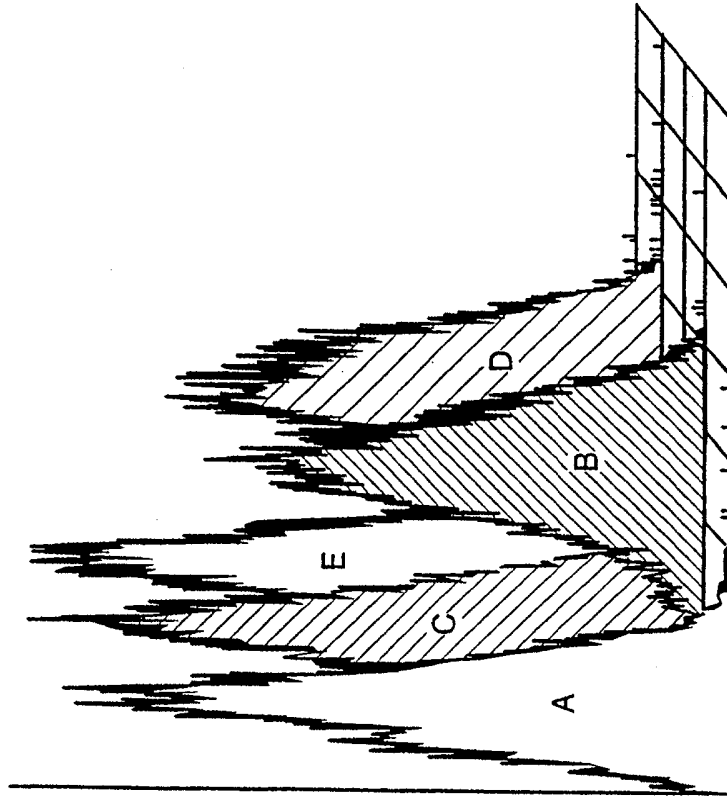


Obr. 2c

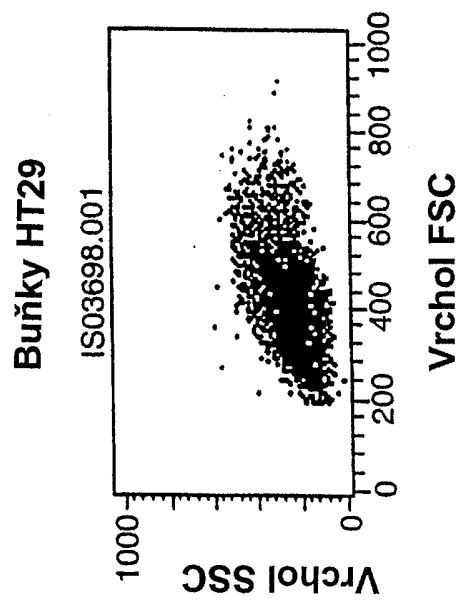
12.07.01

PV 2007-2548

3/5



Obr. 3b



Obr. 3a

12.07.01

PV 2001 - 2548

4/5



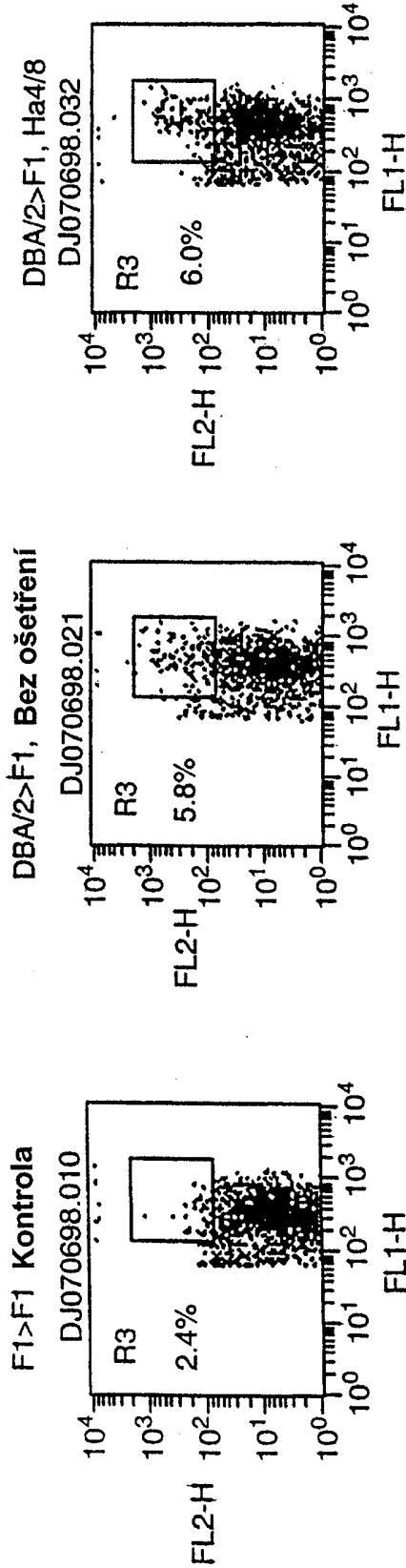
Obr. 4a

Obr. 4b

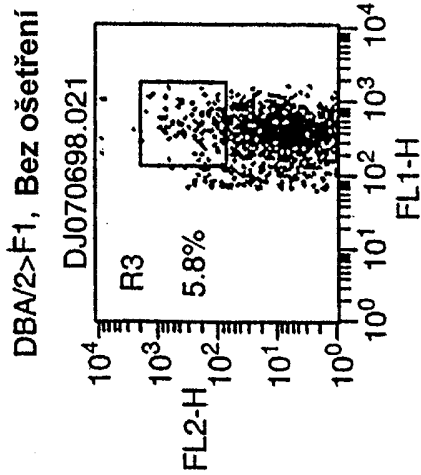
12.07.01

PV 2007-2548

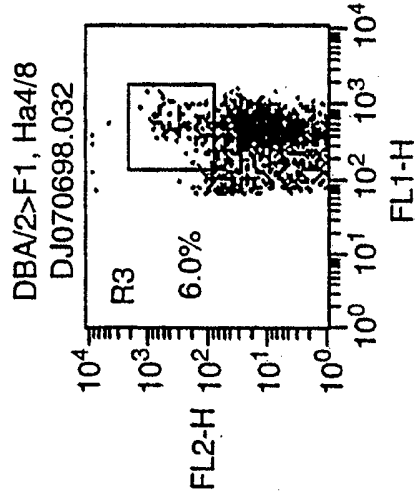
5/5



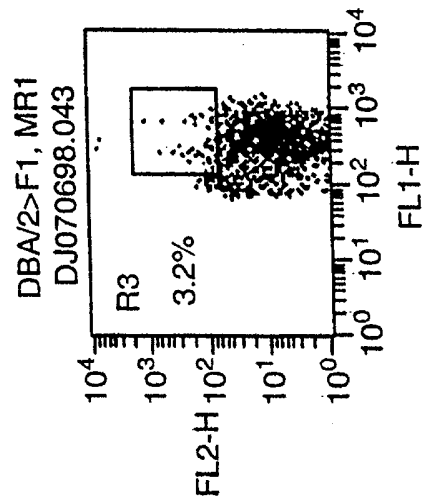
Obr. 4c



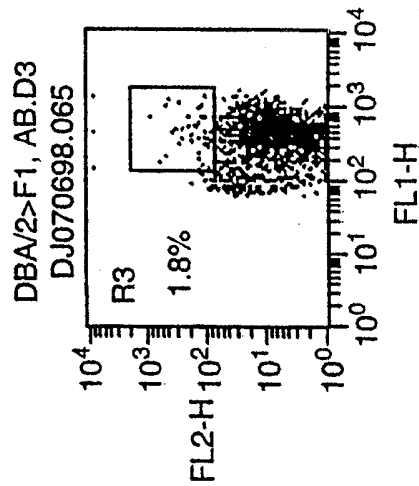
Obr. 4d



Obr. 4e



Obr. 4f



Obr. 4g