

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 980122 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application **980122**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 33/57 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.07.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **20.01.1998**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **19.03.1998**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **19.07.1996 PCT/US1996/012010**
International ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

21.07.1995 US 505606

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Biogen Idec MA Inc., 14 Cambridge Center, CAMBRIDGE, MA 02142, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Browning, Jeffrey L., 02146 MA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Benjamin, Christopher D., 01915 MA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Hochman, Paula S., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Liukoisia lymfotoksiini- -reseptoreita ja anti-lymfotoksiinireseptori ja ligandivasta-aineita terapeuttisina aineina immunologisen taudin hoitoa varten

Lösliga lymfotoxin- -receptorer och anti-lymfotoxinreceptor och ligand antikroppar som terapeutiska medel för behandling av immunologisk sjuk dom

Liukoisia lymfotoksiini- β -reseptoreita ja anti-lymfotoksiinireseptori ja ligandivasta-aineita terapeuttisina aineina immunologisen taudin hoitoa varten

Keksinnön tekninen alue

- 5 Tämä keksintö koskee koostumuksia ja menetelmiä, jotka sisältävät "lymfotoksiini- β -reseptoria blokeeraavia aineita", jotka blokeeraavat lymfotoksiini- β -reseptorin signaloinnin. Lymfotoksiini- β -reseptoria blokeeraavat aineet ovat käyttökelpoisia hoidettaessa lymfosyyttivälitteisiä immunologisia tauteja ja erikoisemmin inhiboitaessa Th1-soluvälitteisiä immuunivasteita. Tämä keksintö
- 10 koskee lymfotoksiini- β -reseptorin solunulkoisen domeenin liukoisia muotoja, jotka toimivat lymfotoksiini- β -reseptoria blokeeraavina aineina. Tämä keksintö koskee myös sellaisten vasta-aineiden käyttöä, jotka on suunnattu joko lymfotoksiini- β -reseptoria tai sen ligandia, pintalymfotoksiinia, vastaan, jotka toimivat lymfotoksiini- β -reseptoria blokeeraavina aineina. Uusi seulontamenetelmä liukoisten reseptorien, vasta-aineiden ja muiden sellaisten aineiden
- 15 valitsemiseksi, jotka blokeeraavat LT- β -reseptorin signaloinnin, on esitetty.

Keksinnön tausta

- Immuunialtistuksen alussa vapautuneiden sytokiinien kuvio voi vaikuttaa siihen seuraavaan valintaan, mitkä immuunieffektorireitit aktivoituvat.
- 20 Valintaa immuunivaikutusmekanismien välillä välittävät CD4-positiiviset auttaja-T-lymfosyytit (T-auttajasolut tai Th-solut). Th-solut reagoivat antigeenia sisältävien solujen (APC-solut) kanssa, jotka sisältävät prosessoidun vieraan antigeenin peptidifragmentit yhdessä MHC luokan II -molekyylien kanssa pinnallaan. Th-solut aktivoituvat, kun ne tunnistavat sellaiset sopivalla APC-pinnalla olevat vieraan antigeenin tietyt epitoopit, joille Th-solut ekspressoivat spesifistä reseptoria. Aktivoituneet Th-solut puolestaan erittävät sytokiineja (lymfokiineja), jotka aktivoivat sopivat immuunieffektorimekanismit.

- Th-solut voivat aktivoida erilaisia effektorimekanismeja sisältäen tappaja-T-solujen aktivaation, B-solujen vasta-ainetuoton ja makrofagien aktivaation. Valinnan effektorimekanismien välillä välittää suurelta osin se, mitä sytokiineja aktivoituneet Th-solut tuottavat.
- 30

- Th-solut voidaan jakaa kolmeen alaryhmään perustuen niiden sytokiineritysominaisuuksiin [Fitch et al., Ann. Rev. Immunol., 11, 29 - 49 (1993)]. Näitä alaryhmiä nimitetään Th0-, Th1- ja Th2-ryhmiksi. Hiirellä stimuloitumattomat "naivit" T-auttajasolut tuottavat IL-2-proteiinia. Lyhytkestoinen stimulaatio
- 35

johtaa Th0-ryhmän esiastesoluihin, jotka tuottavat suurta joukkoa sytokiineja sisältäen IFN- γ -, IL-2-, IL-4-, IL-5- ja IL-10-proteiinit. Kroonisesti stimuloitujen Th0-solujen erilaistua joko Th1- tai Th2-solutyypeiksi, jolloin sytokiini-ekspressio-ominaisuudet muuttuvat.

5 Jotkin sytokiinit vapautuvat sekä Th1- että Th2-soluista (esim. IL-3, GM-CSF ja TNF). Muita sytokiineja tehdään yksinomaan toisessa tai toisessa Th-solualaryhmässä. T-auttajasolualaryhmien erikoistuneet vaikutukset tunnistettiin ensiksi hiireissä. Samanlainen T-auttajasolujen jako alaryhmiin on myös ihmisessä [Romagnani et al., Ann. Rev. Immunol., 12, 227 - 57 (1994)].

10 Th1-solut tuottavat LT- α -, IL-2- ja IFN- γ -proteiineja. Ihmisillä Th1-solujen sytokiini-erityskuvio on yleensä assosioitu soluvälitteiseen immunitettiin ja infektioregistenssiin. Th1-sytokiinit tuntuvat aktivoivan makrofageja ja tiettyjä tulehdusvasteita, kuten tyypin IV "viivästyneen tyypin" yliherkkyyttä (katso alla). Th1-sytokiineilla on tärkeä rooli kudossiirteiden ja elinsiirännäisten soluvälitteisessä hyljinnässä.

Th2-solut tuottavat IL-4-, IL-5-, IL-6- ja IL-10-sytokiineja. Th2-sytokiinit kohottavat eosinofiili- ja syöttösolujen tuottoa ja edistävät B-solujen täyttämisen laajenemista ja kypsymistä [Howard et al., "T cell-derived cytokines and their receptors", Fundamental Immunology, 3. painos, Raven Press, New York
20 (1993)]. Th2-sytokiinit tehostavat myös vasta-aineiden tuottoa sisältäen IgE-vasta-aineet, jotka assosioituvat allergiavasteisiin ja siirteiden vastaisiin vasta-aineisiin. Th2-solut voivat myös ottaa osaa immuunisuppressioon ja pysyvien antigeenien toleranssiin.

Th1- ja Th2-assosioituneilla sytokiineilla on rooli tietyissä yliherkkyyssvasteissa — sopimattomat tai suhteettomat immuunivasteet syntyvät, kun kohdattiin aiemmin tavattu antigeeni. On olemassa neljä tunnistettua yliherkkyyssyyppiä [Roitt et al., Immunology, 19.1 - 22.12 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. painos, 1993)].

Tyypin I "välitön yliherkkyys" sisältää allergeeni-indusoituneiden Th2-solujen aktivaation ja Th2-sytokiinien vapautumisen. Th2-sytokiini IL-4 stimuloi B-soluja niin, että ne käyvät läpi isotyypimuutoksen niin, että ne tuottavat IgE-vasta-ainetta, joka aktivoi syöttösoluja muodostamaan akuutit tulehdusreaktiot, kuten sellaiset, jotka johtavat ihottumaan, astmaan ja nuhaan.

Tyypin II ja III yliherkkyyden aiheuttavat IgG- ja IgM-vasta-aineet, jotka on suunnattu solupinnan antigeeneja tai spesifisiä kudosanigeeneja vas-

taan (tyyppi II) tai liukoisia seerumiantigeeneja vastaan (tyyppi III). Näiden yliherkkyyssreaktiotyyppien ei ole ajateltu olevan Th-solujen välittämiä.

Tyypin IV "viivästyneen tyypin" yliherkkyys (DTH) on Th1-solujen välittämä. DTH-reaktioiden kehittyminen kestää kauemmin kuin 12 tuntia ja niihin viitataan nimellä "soluvälitteiset", koska ne voidaan siirtää hiirten välillä siirtämällä Th1-soluja, mutta ei yksistään seerumia siirtämällä. Tyypin IV DTH-vasteet luokitellaan yleensä kolmeen tyyppiin: kosketus-, tuberkuliinityyppinen ja granulomatoosinen yliherkkyys.

Monet soluvälitteiset vasteet, jotka voivat aiheuttaa tautia, ovat indusoitavissa terveissä hiirissä siirtämällä lymfosyyttejä sairaasta hiirestä (esim. insuliiniriippuvainen sokeritauti ja kokeellinen autoimmuuniaiivotulehdus). Tämä ominaisuus erottaa tyypin IV DTH-reaktion muista kolmesta yliherkkyyss-tyypistä, jotka ovat humoraalisia immuunivasteita, joita aiheuttavat pääasiassa vasta-aineet, jotka voidaan siirtää soluvapaassa seerumissa.

T-auttajasolut osallistuvat myös immunoglobuliinin isotyypin muutoksen säätelyyn de novo. Erilaiset Th-alaryhmät voivat vaikuttaa sen tietyn isotyypin immunoglobuliinien suhteelliseen osuuteen, joita tuotetaan vasteena immuunialtistukseen. Esimerkiksi Th2-sytokiini IL-4 voi muuttaa aktivoituneet B-solut IgG1-isotyypin soluiksi ja suppressoida muut isotyypit. Kuten yllä on keskusteltu, IL-4 aktivoi myös IgE-vasta-aineen ylituotantoa tyypin I yliherkkyyssreaktioissa. Th2-sytokiini IL-5 indusoi IgA-isotyypin. Näitä Th2-sytokiinivaikutuksia isotyyppimuutokseen tasapainottaa IFN- γ -proteiini, jota tuottavat Th1-solut.

Ne erilaiset sytokiinikuviot, joita Th1- ja Th2-solut erittävät, tuntuvat ohjaavan vastetta erilaisia immuunieffektorimekanismeja kohti. Muutos, joka aktivoi joko soluvälitteisen tai humoraalisen vaikutusmekanismin, herkistyy Th1- ja Th2-solujen välisellä ristisuppressiolla: Th1-solujen tuottama IFN- γ inhiboi Th2-solujen lisääntymistä ja Th2-solujen erittämä IL-10 tuntuu alentavan sytokiinieritystä Th1-soluista.

Riippuen sytokiinien suhteellisista affiniteeteista molekyylikohteitaan vastaan negatiiviset Th1- ja Th2-säätelykierrot voivat monistaa niitä vaikutuksia, jotka ovat Th1- ja Th2-sytokiinien pienillä konsentraatioeroilla. Monistunut Th1- tai Th2-sytokiinisignaali voi laukaista muutoksen soluvälitteisten tai humoraalisten vaikutusmekanismien välillä perustuen pieniin muutoksiin Th1- ja Th2-sytokiinien suhteellisissa konsentraatioissa. Kyky säädellä tätä muutosta moduloimalla Th1- ja Th2-sytokiinien suhteellisia konsentraatioita voisi olla

käyttökelpoinen hoidettaessa erilaisten Th1- ja Th2-soluvälitteisten immuunivasteiden epätasapainoja, jotka voivat johtaa immuunihäiriöihin ja -tauteihin.

Patologiset Th1-vasteet assosioituvat useisiin elinspesifisiin ja systeemisiin autoimmuunitiloihin, kroonisiin tulehdustauteihin ja viivästyneen tyyppiin yliherkkyyssreaktioihin. Kuten yllä on keskusteltu, Th1-vasteet ottavat myös osaa soluvasteisiin, jotka johtavat siirretyn kudoksen ja siirrostetun elimen hyljintään.

Tähän mennessä näiden erilaisten Th1-soluihin perustuvien immunologisten tilojen hoito on yleensä käsittänyt immunomodulatoristen ja immunosuppressiivisten aineiden käytön kuin myös useiden sellaisten lääkkeiden käytön, joilla on huonosti karakterisoidut mekanismit (esim. kulta tai penisillamiini). Kolme tällä hetkellä yleisesti käytettyä immunosuppressiivista ainetta ovat steroidit, syklosporiini ja atsatiopriini.

Steroidit ovat pleiotrooppisia tulehduksen vastaisia aineita, jotka suppressoivat aktivoituneita makrofageja ja inhiboivat antigeenia sisältävien solujen aktiivisuutta sellaisilla tavoilla, jotka kääntävät Th1-sytokiinin IFN- γ monet vaikutukset päinvastaisiksi. Syklosporiini — vahva immunosuppressiivinen aine — suppressoii sytokiinituottoa ja alentaa IL-2-reseptorien ekspressiota lymfosyyteissä niiden aktivaation aikana. Atsatiopriini on lisääntymisen vastainen aine, joka inhiboi DNA-synteesiä. Näitä epäspesifisiä immunosuppressiivisia aineita tarvitaan yleensä korkeina annoksina, joka kohottaa niiden myrkyllisyyttä (esim. munuais- ja maksamyrkyllisyyttä) ja aiheuttaa haitallisia sivuvaikutuksia. Näin ollen ne ovat sopimattomia pitkäaikaisiin hoitoihin.

Niiden ongelmien ratkaisemiseksi, joita tavanomaiset hoidot epäspesifisillä immunosuppressiivisilla aineilla aiheuttavat, monissa tällä hetkellä käytettävissä terapeuttisissa strategioissa pyritään suppressoimaan tai aktivoimaan immuunisysteemin valittuja kohtia. Erityisen houkutteleva päämäärä on Th1- ja Th2-sytokiinien välisen tasapainon manipulointi niin, että tasapainoa siirretään soluvälitteisten ja humoraalisten vaikutusmekanismien kesken.

Siirtämisen aikaansaamiseksi soluvälitteisten ja humoraalisten vaikutusmekanismien kesken olisi käyttökelpoista kyetä moduloimaan sellaisen molekyylin aktiivisuutta, joka voi muuttaa Th1- ja Th2-solujen alaryhmien suhteellisia aktiivisuuksia. Ehdokkaat sellaisiksi molekyyleiksi sisältävät sytokiinit ja niiden reseptorit. Viime aikaiset tulokset vihjaavat, että LT- α -, IL-12-, IFN- α - ja IFN- γ -proteiinit suosivat Th1-vasteiden muodostusta, kun taas IL-1- ja IL-4-

proteiinit polarisoivat vasteen Th2-vaikutusmekanismia kohti [Romagnani et al., Ann. Rev. Immunol. 12, 227 - 57 (1994)].

Monet Th-solujen sytokiineista ovat immuunikehityksen ja -toiminnan pleiotrooppisia säätelijöitä ja niiden tuoton inhibitiolla voisi olla tuhoisat vaikutukset vasteisiin, joita välittävät muut kuin T-solut. Haluttua ja tehokasta kohdetta, jonka avulla voitaisiin selektiivisesti moduloida Th1- ja Th2-vaikutusmekanismien välistä valintaa, ei ole tunnistettu.

Keksinnön yhteenveto

Esillä olevassa keksinnössä ratkaistaan ongelmat, joihin yllä on viitattu, esittämällä farmaseuttiset koostumukset ja menetelmät immunologisten tautien hoitamiseksi inhiboimalla lymfotoksiini- β -reseptorin (LT- β -R) signaali käyttämällä lymfotoksiini- β -reseptoria blokeeraavia aineita. Erikoisemmin LT- β -R-proteiinia blokeeraavia aineita sisältävät koostumukset ja menetelmät ovat käyttökelpoisia inhiboitaessa Th1-soluvälitteiset immuunivasteet, kuten esimerkiksi suolistotulehdusoireyhtymä.

Eräässä suoritustavassa esitetään lymfotoksiini- β -reseptorin solunulkoisen domeenin liukoiset muodot, jotka toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina. Tämän suoritustavan mukaiset suositeltavat koostumukset ja menetelmät sisältävät lymfotoksiini- β -reseptorin rekombinanttifuusioproteiinin, jossa on LT- β -R-proteiinin solunulkoinen ligandia sitova domeeni fuusioituna immunoglobuliinin raskasketjun vakiodomeeniin. Suositeltavammin LT- β -R-proteiinin ligandia sitova domeeni on fuusioitu ihmisen IgG Fc -domeeniin.

Toisessa tämän keksinnön mukaisessa suoritustavassa esitetään vasta-aineet, jotka toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina. Tämän suoritustavan mukaiset suositeltavat koostumukset ja menetelmät sisältävät yhden tai useamman lymfotoksiini- β -reseptoria vastaan suunnatun vasta-aiheen. Suositeltavammin vasta-aine on monoklonaalinen vasta-aine. Tämän suoritustavan mukaiset muut suositeltavat koostumukset ja menetelmät sisältävät yhden tai useamman pintalymfotoksiinia vastaan suunnatun vasta-aiheen. Suositeltavammin vasta-aine on monoklonaalinen vasta-aine, joka on suunnattu lymfotoksiini- β -proteiinia vastaan.

Tämä keksintö esittää edelleen uuden seulontamenetelmän LT- β -R-proteiinia blokeeraavien aineiden — kuten LT- β -R-proteiinin liukoisten muotojen, anti-LT-vasta-aineiden ja anti-LT- β -R-vasta-aineiden — valitsemiseksi. Tämä seulontamenetelmä sisältää vaiheen, jossa suoritetaan kasvainsolusytotoksisuustestit, joilla tarkkaillaan LT- β -R-proteiinin signaali. Testissä käyte-

tään hyväksi ihmisen adenokarsinoomasolujen kohonnuttu herkkyyttä ligandilla tai vasta-aineella indusoidun LT- β -R-proteiinin signaloinnin suhteen LT- β -R-proteiinia aktivoivan aineen (kuten LT- α 1/ β 2) läsnä ollessa kasvainsytotoksisuustestissä.

- 5 LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet inhiboivat heteromeeristen LT- α / β -kompleksien (tai muiden LT- β -R-proteiinia aktivoivien aineiden) sytotoxiset vaikutukset kasvainsoluille. Mahdollisia LT- β -R-proteiinia blokeeraavia aineita testaamaan käytetystä menetelmästä esitetään esimerkkinä anti-LT- β -R-vasta-aineiden tapaus (LT- β -R-proteiinia aktivoivien aineiden LT- α 1/ β 2 läsnä ollessa) ja se sisältää seuraavat vaiheet:

- 1) kasvainsoluja (esim. ihmisen HT29-adenokarsinoomasoluja) viljellään useita vuorokausia alustassa, joka sisältää IFN- γ -proteiinia ja puhdistettua LT- α 1/ β 2-proteiinia tietyn testattavan anti-LT- β -R-vasta-aineen läsnä tai poissa ollessa;
- 15 2) soluja käsitellään värillä, joka värjää elävät solut; ja
- 3) värjäytyneiden solujen määrä lasketaan sen kasvainsolufraktion määrittämiseksi, joka kuoli LT- α 1/ β 2-proteiinin, IFN- γ -proteiinin ja anti-LT- β -R-testivasta-aineen läsnä ollessa kussakin näytteessä. Vaihtoehtoisesti eloonjääneiden solujen määrä voidaan määrittää millä tahansa usealla hyvin tun-
- 20 netulla testillä, jotka mittaavat solun elinkykyä, kuten ^3H -tymidiini-inkorporaatiolla DNA:han. Anti-LT- β -R-vasta-aine (tai vasta-aineyhdistelmä), joka alentaa tässä testissä kuolleiden kasvainsolujen prosenttimäärää ainakin 20 %:lla, on LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine, joka kuuluu tämän keksinnön piiriin.

- Tämä sytolyyttinen testi voidaan suorittaa käyttäen heteromeerisiä
- 25 T- α / β -komplekseja ja muita LT- β -R-proteiinia aktivoivia aineita joko yksinään tai yhdistelmänä. Testi voidaan myös adaptoida tarpeen mukaan niin, että sillä tunnistetaan uusia LT- β -R-proteiinia blokeeraavia aineita.

Piirustusten lyhyt kuvaus

- Kuvio 1. Ihmisen LT- β -reseptorin solunulkoisen osan sekvenssi, joka koodittaa ligandia sitovaa domeenia.
- 30

- Kuvio 2. Hiiren liukoinen LT- β -reseptori liitettynä ihmisen IgG1 Fc-domeeniin (mLT- β -R-Fc) blokeeraa LT- β -R-proteiinin signaloinnin hiiren WEHI 164 -soluissa, jotka on indusoitu hiiren liukoisella LT- α / β -ligandilla. WEHI 164 -solut kuolevat kohoavan LT-ligandikonsentraation (mLT- α / β) funktiona. Liukoinen mLT- β -R-Fc (10 $\mu\text{g/ml}$) blokeeraa tämän LT-ligandin indusoidun solukuoleman. Hiiren liukoisella TNF-reseptorifuusioproteiinilla (p55TNF-
- 35

R-Fc) on vähän vaikutusta LT- α/β -aktivoidun solukuoleman blokeeraukseen. Kasvu kvantitoitiin kolmen vuorokauden kuluttua mittaamalla reagoineen MTT:n optinen tiheys (OD 550), joka on verrannollinen solumäärään.

Kuvio 3. Ihmisen LT- β -R-proteiinia vastaan suunnattu vasta-aine (monoklonaalinen vasta-aine BDA8) blokeeraa liukoisen LT-ligandin ja LT- β -R-proteiinin interaktion ihmisen solun pinnalla. WiDr-kasvainsolujen kasvu blokeeraantuu IFN- γ -proteiinin ja liukoisen LT- $\alpha 1/\beta 2$ -ligandin yhdistelmällä. Anti-LT- β -R-vasta-aine BDA8 blokeeraa LT- $\alpha 1/\beta 2$ -ligandin kyvyn inhiboida WiDr-kasvainsolujen kasvua. Mustat symbolit osoittavat solukasvun monoklonaalisen IgG1-verrokkivasta-aineen läsnä ollessa (10 μ g/ml). Valkoiset symbolit osoittavat monoklonaalisen anti-LT- β -R-vasta-aineen BDA8 (10 μ g/ml) vaikutukset.

Kuvio 4. Ihmisen LT- β -proteiinia vastaan suunnattu vasta-aine (monoklonaalinen vasta-aine B9) blokeeraa solun pinnan LT- α/β -ligandin ja liukoisen LT- β -reseptorin (hLT- β -T-Fc; 2 μ g/ml) välisen interaktion. Pintaan sitoutunut LT- β -R-Fc tunnistettiin käyttäen fykoerytriinilla leimattua aasin anti-ihmis-IgG-vasta-ainetta ja FACS-analyysiä. Tuloksena syntyneen piikin keskimääräinen fluoresenssivoimakkuus merkittiin kanavan numeron suhteen. Pisteviiva osoittaa keskimääräisen fluoresenssivoimakkuuden, joka vastaa monoklonaalisen vasta-aineen B9 poissa ollessa sitoutuneen reseptorin määrää.

Kuvio 5. LT- β -R-Fc-proteiinia blokeeraavan aineen (mLT- β -R-Fc) vaikutukset korvan turpoamiseen viivästyneen tyypisessä kosketusyliherkyyksmallissa (DTH) hiiressä. Graafinen esitys osoittaa suurenemisen korvan paksuudessa mitattuna 24 tuntia sen jälkeen, kun herkistettyjen hiirten korvat altistettiin 0,2 % DNFB-antigeenille. Kukin symboli edustaa erillistä koetta. Kaikissa kokeissa käytettiin 7 - 8 eläintä per piste lukuun ottamatta niitä, jotka on merkitty vinoneliöllä, joissa käytettiin ainoastaan neljää eläintä per piste. Hiiret, joita käsiteltiin puskurilla (PBS) ja IgG-fuusioverrokkiproteiinilla (LFA3-Fc), jonka konsentraatio oli 20 mg/kg, toimivat negatiiviverrokkeina. Hiiret, joita käsiteltiin monoklonaalisella anti-VLA4-vasta-aineella (monoklonaalinen vasta-aine PS/2), jonka konsentraatio oli 8 mg/kg, joka inhiboi korvan turpoamisen kosketus-DTH-reaktiota, toimivat positiivisina verrokkeina.

Kuvio 6 on graafinen esitys painon muutoksesta, joka havaittiin hiirissä 14 vuorokautta sen jälkeen, kun niitä käsiteltiin mLT- β R-Ig- ja hLFA3-Ig-fuusioproteiineilla.

Kuvio 7 on graafinen esitys paksusuolen pituuden muutoksesta, joka havaittiin hiirissä 14 vuorokautta sen jälkeen, kun niitä käsiteltiin mLT- β R-Ig- ja hLFA3-Ig-fuusioproteiineilla.

Kuvio 8 on aikakäyrä hiirten kehon painosta sen jälkeen, kun niihin oli injektoitu CD45RB^{low}CD4-positiivisia T-soluja; CD45RB^{high}CD4-positiivisia T-soluja; CD45RB^{high}-soluja ja LT β R-Ig-proteiinia ja CD45RB^{high}-soluja ja hLFA3-Ig-proteiinia.

Kuvio 9 on graafinen esitys niiden kehon painojen keskiarvoista ja standardipoikkeamasta, jotka havaittiin sen jälkeen, kun oli tehty kuvioden 8 - 11 mukaiset käsittelyt.

Kuvio 10 esittää jalkatyynyn paksuuden suurenemisen hiirissä, joihin injektointiin negatiiviset ja positiiviset verrokkit ja mLT β R-Ig-proteiinia.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Jotta tässä kuvattu keksintö tulisi täysin ymmärretyksi, on annettu seuraava yksityiskohtainen kuvaus.

Termi "sytokiini" viittaa molekyyliin, joka välittää interaktioita solujen välillä. "Lymfokiini" on sytokiini, jota lymfosyytit vapauttavat.

Termi "T-auttajasolut (Th-solut)" viittaa T-solujen toiminnalliseen alaryhmään, joka auttaa muodostamaan sytotoksisia T-soluja ja joka toimii yhdessä B-solujen kanssa vasta-ainetuoton stimuloimiseksi. Auttaja-T-solut tunnistavat antigeenin, joka on assosioitunut luokan II MHC -molekyylien kanssa.

Termi "Th1" viittaa T-auttajasolujen alaryhmään, joka tuottaa LT- α -, interferoni- γ - ja IL-2-proteiinia (ja muita sytokiineja) ja joka saa aikaan tulehdusreaktiot, jotka assosioituvat soluvälitteiseen vasteeseen, se on, ei immunoglobuliinivasteeseen, vasteena altistukseen.

Termi "Th2" viittaa T-auttajasolujen alaryhmään, joka tuottaa sytokiineja, sisältäen IL-4-, IL-5-, IL-6- ja IL-10-sytokiinit, jotka assosioituvat immunoglobuliinivasteeseen (humoraaliseen vasteeseen) immuunialtistuksessa. Termi "soluvälitteinen" viittaa niihin immunologisiin tapahtumiin, jotka johtuvat T-solujen ja niiden tuotteiden suorista vaikutuksista vasteen tuotossa. Tämän tyyppinen vaste assosioituu yleensä (mutta ei yksinomaan) T-solujen Th1-luokan kanssa. Tähän kategoriaan ei sisälly T-solujen auttaja vaikutukset B-solujen erilaistumiselle ja B-solujen lisääntymiselle, jotka assosioituvat yleensä T-solujen Th2-luokan kanssa.

Termi "viivästyneen tyyppinen yliherkkyys (DTH)" viittaa immunologiseen vasteeseen, jolle on ominaista hidas vaste antigeenille niin, että täysi vaikutus näkyy 1 - 3 vuorokauden ajanjakson kuluttua. Tämä hidas vaste on päinvastainen sille suhteellisen nopealle vasteelle, joka havaitaan immunoglobuliinivälitteisessä (humoraalisessa) allergisessa reaktiossa. On olemassa kolmentyyppisiä DTH-reaktioita: kosketusyliherkkyys, tuberkuliinityyppinen yliherkkyys ja granulomatoosiset reaktiot.

Termit "immunoglobuliinivaste" tai "humoraalinen vaste" viittaavat eläimen immunologiseen vasteeseen vierasta antigeenia vastaan, jolloin eläin tuottaa vasta-aineita vierasta antigeenia vastaan. T-auttajasolujen Th2-luokan solut ovat kriittisiä korkea-affiinisten vasta-aineiden tehokkaaksi tuottamiseksi.

Termi vasta-aineen "Fc-domeeni" viittaa siihen osaan molekyyliä, joka sisältää sarana-, CH2- ja CH3-domeenit, mutta josta puuttuu antigeenia sitovat kohdat. Termin tarkoitetaan myös sisältävän IgM- ja muiden vasta-aineisotyyppien ekvivalentit alueet.

Termi "anti-LT- β -reseptori-vasta-aine" viittaa mihin tahansa vasta-aineeseen, joka sitoutuu spesifisesti ainakin yhteen LT- β -reseptorin epitooppiin.

Termi "anti-LT-vasta-aine" viittaa mihin tahansa vasta-aineeseen, joka sitoutuu spesifisesti ainakin yhteen LT- α -reseptorin, LT- β -reseptorin tai LT- α/β -kompleksin epitooppiin.

Termi "LT- β -R-proteiinin signalointi" viittaa molekyylireaktioihin, jotka assosioituvat LT- β -R-proteiinireittiin ja sen jälkeisiin molekyylireaktioihin, jotka johtuvat siitä.

Termi "LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine" viittaa aineeseen, joka voi pienentää ligandin sitoutumista LT- β -R-proteiiniin, solun pinnan LT- β -R-proteiinin ryhmittymistä tai LT- β -R-proteiinin signalointia tai sellaiseen aineeseen, joka voi vaikuttaa siihen, kuinka LT- β -R-proteiinin signaalia tulkitaan solussa.

LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine, joka toimii ligandi-reseptorin sitoutumisvaiheessa, voi inhiboida LT-ligandin sitoutumista LT- β -R-proteiiniin ainakin 20 %:lla. LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine, joka toimii ligandin-reseptorin sitoutumisvaiheen jälkeen voi inhiboida LT- β -R-proteiinin aktivaation sytotoksisia vaikutuksia kasvainsoluihin ainakin 20 %:lla. Esimerkit LT- β -R-proteiinia blokeeraavista aineista sisältävät liukoiset LT- β -R-Fc-molekyylit ja anti-

LT- α -, anti-LT- β -, anti-LT- α/β - ja anti-LT- β -R-vasta-aineet. Vasta-aineet eivät suositeltavasti ristireagoi LT- α -proteiinin eritetyn muodon kanssa.

Termi "LT- β -R-proteiinin biologinen aktiivisuus" viittaa: 1) LT- β -R-molekyylin tai sen johdannaisen kykyyn kilpailla liukoisen tai pinnan LT-ligandin sitoutumisesta liukoisten tai pinnan LT- β -R-molekyylien kanssa tai 2) kykyyn stimuloida immuunisäätelyvaste tai sytotoksinen aktiivisuus samoin kuin natiivi LT- β -R-molekyyli.

Termit "heteromeerinen LT- α/β -kompleksi" ja "heteromeerinen LT-kompleksi" viittaavat stabiiliin assosiaatioon ainakin yhden LT- α - ja yhden tai useamman LT- β -alayksikön välillä sisältäen yhden tai useamman alayksikön liukoiset, mutatoituneet, muutetut ja kimeeriset muodot. Alayksiköt voivat assosioitua elektrostaattisten, van der Waalsin tai kovalenttisten interaktioiden välityksellä. Suositeltavasti heteromeerisessä LT- α/β -kompleksissa on ainakin kaksi vierekkäistä LT- β -alayksikköä ja siitä puuttuu vierekkäiset LT- α -alayksiköt. Kun heteromeerinen LT- α/β -kompleksi toimii LT- β -R-proteiinia aktivoivana aineena solukasvutestissä, kompleksi on suositeltavasti liukoinen ja sen stokiometria on muotoa LT- α 1/ β 2. Liukoisista heteromeerisistä LT- α/β -komplekseista puuttuu membraaniin läpi menevä domeeni ja sopiva isäntäsolu, joka on manipuloitu ekspressoimaan LT- α - ja/tai LT- β -alayksiköitä, voi erittää niitä [Crowe et al., J. Immunol. Methods, 168, 79 - 89 (1994)].

Termi "LT-ligandi" viittaa heteromeeriseen LT-kompleksiin tai sen johdokseen, joka voi spesifisesti sitoutua LT- β -reseptoriin.

Termi "LT- β -R-proteiinin ligandia sitova domeeni" viittaa LT- β -R-proteiinin osaan tai osiin, jotka ottavat osaa LT-ligandin spesifiseen tunnistukseen ja reaktioon sen kanssa.

Termit "pinnan LT- α/β -kompleksi" ja "pinnan LT-kompleksi" viittaavat kompleksiin, joka sisältää LT- α - ja membraaniin sitoutuneen LT- β -alayksikön — sisältäen yhden tai useamman alayksikön mutatoituneet, muutetut ja kimeeriset muodot — joka esiintyy solun pinnalla. "Pinnan LT-ligandi" viittaa pinnan LT-kompleksiin tai sen johdokseen, joka voi spesifisesti sitoutua LT- β -reseptoriin.

Termi "kohde" viittaa eläimeen tai yhteen tai useampaan soluun, jotka ovat peräisin eläimestä. Eläin on suositeltavasti nisäkäs. Solut voivat olla missä muodossa tahansa sisältäen solut, mutta ei rajoittuen niihin, jotka ovat kudoksessa, ovat soluryhmiä, immortalisoituja, transfektoituja tai transformoi-

tuja soluja, ja solut, jotka ovat peräisin eläimestä, jota on fyysisesti tai fenotyyppisesti muutettu.

Lymfotoksiini- β : TNF-ryhmän jäsen

Kasvaimen nekroositekijän (TNF) sukulaissytokiinit ovat tulleet esiin suurena isännän puolustuksen ja immuunisäätelyn pleiotrooppisten välittäjien ryhmänä. Tämän ryhmän jäsenet ovat membraaniin sitoutuneita muotoja, jotka toimivat paikallisesti solu-solu-kosketuksen välityksellä, tai ne ovat eritettyjä proteiineja, jotka voivat toimia kaukaisilla kohteilla. Rinnakkainen TNF-reseptoriproteiinille sukua oleva ryhmä reagoi näiden sytokiinien kanssa ja laukaisee erilaisia reittejä sisältäen solukuolemavasteen, solun lisääntymisvasteen, kudoksen erilaistumisvasteen ja esitulehdusvasteen.

TNF, lymfotoksiini- α (LT- α , jota kutsutaan myös TNF- β -proteiiniksi) ja lymfotoksiini- β (LT- β) ovat TNF-ligandiryhmän jäseniä, jotka sisältävät myös ligandit Fas-, CD27-, CD30-, CD40-, OX-40- ja 4-1BB-reseptoreita vastaan [Smith et al., Cell, 76, 959 - 62 (1994)]. Signaalointi useiden TNF-ryhmän jäsenten välityksellä — sisältäen TNF-, LT- α -, LT- β - ja Fas-proteiinit — voi indusoida kasvainsolukuoleman nekroosilla tai apoptoosilla (ohjelmoitu solukuolema). Muissa kuin kasvainsoluissa TNF ja monet muut TNF-ryhmän ligandi-reseptori-interaktiot vaikuttavat immuunisysteemin kehittymiseen ja vasteisiin eri immuunialtistuksia vastaan.

Useimmat TNF-ryhmän ligandit esiintyvät membraaniin sitoutuneena muotona solun pinnalla. TNF ja LT- α löytyvät sekä eritettynä että membraaniin sitoutuneina pintamuotoina ihmisillä. Pinnan TNF-proteiinissa on membraanin läpi menevä alue, joka katkaistaan proteolyttisesti eritettävän muodon muodostamiseksi. Tälle päinvastaisesti pinnan LT- α -proteiinista puuttuu membraanin läpi menevä alue. Membraaniin assosioitunut LT- α -proteiini on sitoutunut solun pintaan heteromeerisenä kompleksina LT- β -proteiinin, joka on sukua oleva membraanin läpi menevä polypeptidi, kanssa LT- α / β -kompleksiksi.

Useimmissa membraaniin sitoutuneissa LT- α / β -komplekseissa ("pinnan LT") on stoikiometria LT- α 1/ β 2 [Browning et al., Cell, 72, 847 - 56 (1993); Browning et al., J. Immunol., 154, 33 - 46 (1995)]. Pinnan LT-ligandit eivät sitoudu TNF-R-proteiiniin korkealla affiniteetilla eivätkä ne aktivoi TNF-R-proteiinin signaalointia. Toinen TNF-proteiinille sukua oleva reseptori, jota nimitetään LT- β -reseptoriksi (LT- β -R), sitoutuu näihin pinnan lymfotoksiini-

komplekseihin korkealla affiniteetilla [Crowe et al., Science, 264, 707 - 10 (1994)].

LT- β -R-signaloinnilla, kuten TNF-R-signaloinnilla, on lisääntymisen vastaisia vaikutuksia ja se voi olla sytotoksista kasvainsoluille. Patentinhakijat ovat esittäneet haettavana olevan US-patentin, jonka sarjanumero on 08/378 968, joka esittää koostumukset ja menetelmät, joilla selektiivisesti stimuloidaan LT- β -R-proteiinia käyttäen LT- β -R-proteiinia aktivoivia aineita. LT- β -R-proteiinia aktivoivat aineet ovat käyttökelpoisia inhiboitaessa kasvainsolun kasvua ilman, että samalla aktivoidaan TNF-R-indusoituja esitulehduksellisia tai immuunisäätelyreittejä.

Muissa kuin kasvainsoluissa TNF ja TNF-proteiinille sukua olevat sytokiinit ovat aktiivisia monissa erilaisissa immuunivasteissa. Sekä TNF että LT- α -ligandit sitoutuvat TNF-reseptoreihin ja aktivoivat niitä (p55 tai p60 ja p75 tai p80; tässä kutsutaan nimellä "TNF-R"). TNF- ja LT- α -proteiinia tuotetaan makrofageissa aikaisena ja nopeana vasteena mikrobi-infektiolle, joka tehostaa makrofagien ja neutrofiilien mikrobeja tappavaa aktiivisuutta. Makrofagien tai sytotoksisten T-lymfosyyttien (CTL-solut tai "tappaja-T-solut") tuottama TNF ja LT- α sitoutuu kohdesolujen pinnan TNF-reseptoreihin ja laukaisee herkkien solujen kuoleman.

TNF ja TNF-proteiinille sukua olevat sytokiinit voivat myös aloittaa tulehduskaskadit vasteena infektiolle tai stressille. TNF-, LT- α - ja IFN- γ -proteiinin vapautuminen muuttaa adheesio-ominaisuuksia verisuonten endoteelisolujen ja tiettyjen lymfosyyttityyppien välillä. Kohonnut adheesio auttaa fagosyyttien ja leukosyyttien migraatiota verenkierrosta tulehduskohtaa ympäröiviin kudoksiin. Samanlaiset tulehdusreaktiot pelaavat pääroolia kudossiirteiden ja elinsiirännäisten soluhyljinnässä ja tietyissä immuunihäiriöissä.

Solupinnan lymfotoksiinikompleksit (LT) on karakterisoitu CD4⁺-T-soluhybridoomasoluissa (II-23.D7), jotka ekspressoivat korkeita LT-tasoja [Browning et al., J. Immunol., 147, 1230 - 1237 (1991); Androlewicz et al., J. Biol. Chem., 267, 2542 - 2547 (1992)]. LT- β -R-proteiinin, LT-alayksiköiden ja pinnan LT-kompleksien ekspressiosta ja biologisista rooleista on yhteenveto julkaisussa C.F. Ware et al., "The ligands and receptors of the lymphotoxin system", teoksessa Pathways for Cytolysis, Current Topics Microbiol. Immunol., Springer-Verlag, 175 - 218 (1995).

LT- α -proteiinin ekspressio indusoituu ja LT- α -proteiini eritetään
pääasiassa aktivoituneista T- ja B-lymfosyyteistä ja luonnollisista tappajaso-
luista (NK). T-auttajasolujen alaluokissa LT- α -proteiinia tunnutaan tuotettavan
Th1-soluissa mutta ei Th2-soluissa. LT- α -proteiinia on myös havaittu melano-
5 syyteissä. Pesäkekovettumatutipotilaiden vauriokohtien mikroglia- ja T-solut
voidaan myös värjätä anti-LT- α -antiseerumeilla.

Lymfotoksiini- β -proteiini (jota kutsutaan myös p33-proteiiniksi) on
tunnistettu T-lymfosyyttien, T-solulinjojen, B-solulinjojen ja lymfokiinilla aktivoi-
tujen tappajasolujen (LAK) pinnalla. LT- β -proteiini on patentinhakijoiden haet-
10 tavana olevien kansainvälisten patenttihakemusten PCT/US91/04 588, joka on
julkaistu 9.1.1992 julkaisuna WO 92/00 329, ja PCT/US93/11 669, joka on
julkaistu 23.6.1994 julkaisuna WO 94/13 808, kohteena, jotka on liitetty tähän
viitteiksi.

Pinnan LT-komplekseja ekspressoidaan pääasiassa aktivoituneissa
15 T- ja B-lymfosyyteissä ja luonnollisissa tappajasoluissa (NK) FACS-analyysillä
tai immunohistologialla määritettynä käyttäen anti-LT- α -vasta-aineita tai liukoi-
sia LT- β -R-Fc-fuusioproteiineja. Pinnan LT-proteiini on myös kuvattu ihmisen
sytotoksisissa T-lymfosyyttiklooneissa (CTL), aktivoituissa perifeerisissä mo-
nonukleaarisisissa lymfosyyteissä (PML), IL-2-aktivoituissa perifeerisen veren
20 lymfosyyteissä (LAK-soluissa), kermesmarjan mitogeenilla aktivoituissa tai an-
ti-CD40-aktivoituissa perifeerisissä B-lymfosyyteissä (PBL) ja erilaisissa T- ja
B-solulinjan lymfoidikasvaimissa. Alloantigeenia sisältävien kohdesolujen
osanotto indusoi spesifisesti pinnan LT-ekspression CD8⁺- ja CD4⁺-CTL-
klooneissa.

25 LT- β -reseptori, joka on TNF-reseptorien ryhmän jäsen, sitoutuu
spesifisesti pinnan LT-ligandeihin. LT- β -R-proteiini sitoutuu heteromeerisiin
LT-komplekseihin (pääasiassa LT- α 1/ β 2- ja LT- α 2/ β 1-komplekseihin), mutta ei
sitoudu TNF- tai LT- α -proteiiniin [Crowe et al., Science, 264, 707 - 10 (1994)].
LT- β -R-signaaloinnilla voi olla rooli perifeerisen lymfoidielimen kehityksessä ja
30 humoraalisissa immuunivasteissa.

LT- β -R-proteiinin ekspressiotutkimukset ovat aikaisessa vaiheessa.
LT- β -R-mRNA:ta on havaittu ihmisen pernassa, kateenkorvassa ja muissa
isoissa elimissä. LT- β -R-proteiinin ekspressioominaisuudet ovat samanlaisia
kuin niiden, jotka on julkaistu p55-TNF-R-proteiinille lukuun ottamatta sitä, että
35 LT- β -R-proteiini puuttuu perifeerisen veren T-soluista ja T-solulinjoista.

Liukoisten LT-kompleksien tuotto

Liukoiset heteromeeriset LT- α -kompleksit sisältävät LT- α -alalyksiköt, jotka on muutettu membraaniin sitoutuneesta muodosta liukoiseksi muodoksi. Patentinhakijat ovat kuvanneet nämä kompleksit yksityiskohtaisesti yhtä
 5 aikaa haettavana olevassa kansainvälisessä patenttihakemuksessa (PCT/US93/11 669, joka on julkaistu 23.6.1994 numerona WO 94/13808). Liukoisille LT- α -peptideille on tunnusomaista lymfotoksiini- α -proteiinin aminohapposekvenssi, jossa sekvenssi on katkaistu missä tahansa kohdassa membraanin läpi menevän alueen loppupään (se on, noin aminohapon nro 44 kohdalla) ja
 10 ensimmäisen TNF-homologia-alueen (se on, aminohappo nro 88) välillä numerointisysteemin ollessa sen mukainen, joka on kuvattu julkaisussa Browning et al., Cell, 72, 847 - 856 (1993).

Liukoiset LT- α -polypeptidit voidaan tuottaa lyhentämällä LT- α -proteiinin N-päätä poistamalla sytoplasminen häntä ja membraanin läpi menevä
 15 alue [Crowe et al., Science, 264, 707 - 710 (1994)]. Vaihtoehtoisesti membraanin läpi menevä domeeni voidaan inaktivoida deletoimalla tai substituimalla ne normaalisti hydrofobiset aminohappojäännökset, jotka muodostavat membraanin läpi menevän domeenin, hydrofiilisillä jäännöksillä. Kummassakin tapauksessa muodostetaan suhteellisen hydrofiilinen hydropaattisuusprofiili, joka alentaa lipidiaffiniteettia ja parantaa vesiliukoisuutta. Membraanin läpi menevän domeenin deletio on suositeltavampaa kuin substituutio hydrofiilisilla aminohappojäännöksillä, koska silloin vältetään mahdollisesti immunogeenisten epitooppien muodostuminen.

Deletoitu tai inaktivoitu membraanin läpi menevä domeeni voidaan
 25 korvata tyypin I leader-sekvenssillä tai kiinnittää siihen (esim. VCAM-1-leader) niin, että proteiini eritetään, alkaen sekvenssillä, joka on missä tahansa val40- ja pro88-kohdan välissä. Liukoiset LT- α -polypeptidit voivat sisältää N-päässä minkä tahansa useista hyvin tunnetuista leader-sekvensseistä. Sellainen sekvenssi sallii peptidien ekspression ja kohdentumisen erityisreiteille eukaryoottisysteemeissä. Katso esim. Ernst et al., US-patentti numero 5 082 783 (1992).
 30

Liukoiset heteromeeriset LT- α -kompleksit voidaan tuottaa kotransfektoimalla sopiva isäntäsolu DNA:lla, joka koodittaa LT- α -proteiinia ja liukoista LT- α -proteiinia [Crowe et al., J. Immunol. Methods, 168, 79 - 89 (1994)]. Liukoinen LT- α -proteiini, joka erittyy LT- α -proteiinin poissa ollessa, on erittäin
 35 oligomerisoitunut. Kuitenkin, kun sitä koekspressoitetaan LT- α -proteiinin läsnä ollessa, muodostuu 70 kDa kokoinen trimeerinen rakenne, joka sisältää

molemmat proteiinit. On myös mahdollista tuottaa liukoiset heteromeeriset LT- α 1/ α 2-kompleksit transfektoimalla solulinja, joka normaalisti ekspressoi ainoastaan LT- α -proteiinia (kuten RPMI 1788 -solut, joista on keskusteltu yllä) geenillä, joka koodittaa liukoista LT- β -polypeptidiä.

- 5 LT- α - ja LT- β -polypeptidit voidaan syntetisoida erikseen, denaturoida käyttäen heikkoja detergentejä, sekoittaa yhteen ja renaturoida poistamalla detergentti niin, että muodostuu heteromeeriset LT-sekakompleksit, jotka voidaan erottaa (katso alla).

LT- α 1/ α 2-kompleksien puhdistus

- 10 Liukoiset heteromeeriset LT- α 1/ α 2-kompleksit erotetaan koekspresio-
komplekseista, jotka sisältävät erilaisen alayksikköstoikiometrian, kromato-
grafialla käyttäen TNF- ja LT- β -reseptoreita affiniteettipuhdistusreagensseina.
TNF-reseptorit sitoutuvat ainoastaan LT-kompleksien α / α -rakoihin. LT- β -re-
septori sitoutuu korkealla affiniteetilla β / β -rakoihin ja alemmalla affiniteetilla
15 α / β -rakoihin heteromeerisissä LT- α / β -komplekseissa. Sen mukaisesti LT- α 3-
ja LT- α 2/ β 1-proteiinit sitoutuvat TNF-R-proteiiniin. LT- β -R-proteiini voi myös
sitaa LT- α 2/ β 1-trimeerejä (α / β -rakoihin), mutta ei voi sitaa LT- α 3-proteiinia. Li-
säksi LT- β -R-proteiini (mutta ei TNF-R-proteiini) sitoo LT- α 1/ α 2-proteiinia ja
LT- β -proteiinia (sellaisen valmisteen tarkka koostumus on tuntematon, ne
20 ovat kuitenkin suuria aggregaatteja).

Reseptoriaffiniteettireagenssit voidaan valmistaa joko liukoisena so-
lunulkoisena domeenina [katso esimerkiksi julkaisu Loetscher et al., J. Biol.
Chem., 266, 18324 - 18329 (1991)] tai kimeerisinä proteiineina yhdessä so-
lunulkoisen ligandia sitovan domeenin kanssa, joka on kiinnitetty immuno-
25 globuliinin Fc-domeeniin [Loetscher et al., J. Biol. Chem., 266, 18324 - 29
(1991); Crowe et al., Science, 264, 707 - 710 (1994)]. Reseptorit koplataan
affiniteettimatrikseiin kemiallisella ristikomisella käyttäen rutiinimenetelmiä.

On kaksi menetelmää, jolla LT- α 1/ α 2-ligandi voidaan puhdistaa
käyttäen reseptoreita ja immunoaffiniteetikromatografiaa. Ensimmäisessä me-
30 netelmässä sopivan ekspressiosysteemin, joka koekspressoi sekä LT- α -prote-
iinimuotoa että lyhennettyä LT- β -proteiinimuotoa, supernatantti viedään TNF-
R-pylvään läpi. TNF-R-pylväs sitoo LT- α 3-proteiinin ja LT- α 2/ β 1-trimeerit.
TNF-R-pylvään läpi virrannut neste sisältää LT- β (n)- ja LT- α 1/ α 2-proteiinit.

Toisessa menetelmässä kaikki LT- β -proteiinia sisältävät muodot
35 [LT- β (n), LT- α 1/ α 2 ja LT- α 2/ β 1] sitoutuvat LT- β -R-pylvääseen ja ne eluoidaan
siitä käyttäen klassisia menetelmiä, kuten kaotrooppia tai pH-muutosta. (LT-

$\alpha 3$ -proteiini virtaa tämän pylvään läpi). Eluaatti neutraloidaan tai kaotrooppi poistetaan ja sitten eluaatti viedään TNF-R-pylvään läpi, joka sitoutuu ainoastaan LT- $\alpha 2/\beta 1$ -trimeereihin. Tämän pylvään läpi virrannut neste sisältää LT- $\alpha(n)$ -proteiinin ja LT- $\alpha 1/\beta 2$ -trimeerit.

- 5 Molemmissa tapauksissa puhtaat LT- $\alpha 1/\beta 2$ -trimeerit voidaan erottaa LT- α -proteiinista sitä seuraavilla alalla tunnetuilla geelisuodatus- ja/tai ioninvaihtokromatografiamenetelmillä.

Vaihtoehtoisesti erilaiset heteromeeriset LT- α/β -kompleksimuodot voidaan erottaa ja puhdistaa erilaisilla tavanomaisilla kromatografisilla tavoilla.

- 10 Voi myös olla suositeltavaa yhdistää sarja tavanomaisia puhdistustapoja yhden yllä kuvatun immunoaffiniteettipuhdistusvaiheen kanssa.

LT- β -R-proteiinia blokeeraavien aineiden seulonta

- Eräässä tämän keksinnön suoritustavassa LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää LT- β -R-proteiinia vastaan suunnatun vasta-aineen (Ab), joka inhiboi LT- β -R-proteiinin signaloinnin. Anti-LT- β -R-vasta-aine on suositeltavasti monoklonaalinen vasta-aine (mAb). Eräs sellainen inhibitorinen monoklonaalinen anti-LT- β -R-vasta-aine on monoklonaalinen vasta-aine BDA8.
- 15

- Inhibitoriset anti-LT- β -R-vasta-aineet ja muut LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet voidaan tunnistaa käyttäen seulontamenetelmiä, joissa tunnistetaan yhden tai useamman aineen kyky joko sitoutua LT- β -R-proteiiniin tai LT-ligandiin tai inhiboida LT- β -R-proteiinin signalointivaikutuksia soluissa.
- 20

- Eräässä seulontamenetelmässä käytetään hyväksi LT- β -R-proteiinin signaloinnin sytotoksisia vaikutuksia kasvainsoluihin, jotka sisältävät LT- β -R-proteiinia. Kasvainsolut altistetaan yhdelle tai useammalle LT- β -R-proteiinia aktivoivalle aineelle LT- β -R-proteiinin signaloinnin indusoimiseksi. LT- β -R-proteiinia aktivoivat aineet sisältävät heteromeeriset LT- α/β -kompleksit (suositeltavasti liukoinen LT- $\alpha 1/\beta 2$) IFN- γ -proteiinin läsnä ollessa tai aktivoivan anti-LT- β -R-vasta-aineen (katso alla; on kuvattu myös patentinhakijoiden yhtä aikaa haettavana olevassa Amerikkalaisessa patenttihakemuksessa, jonka sarjanumero on 08/378 968). Vasta-aineet ja muut aineet, jotka blokeeraavat LT- β -R-proteiinin signaloinnin, valitaan perustuen niiden kykyyn inhiboida LT- β -R-proteiinin signaloinnin sytotoksinen vaikutus kasvainsoluihin seuraavassa testissä, joka sisältää vaiheet, joissa:
- 25
- 30

- 1) kasvainsoluja, kuten HT29-soluja, viljellään 3 - 4 vuorokautta ryhmässä kudosviljelykuoppia, jotka sisältävät alustaa ja ainakin yhtä LT- β -R-
- 35

proteiinia aktivoivaa ainetta niin, että läsnä on testattavan aineen sarjalaimennokset tai ainetta ei ole läsnä;

2) vitaaliväriä, jolla mitataan mitokondrion toimintaa, kuten MTT, lisätään kasvainsoluseokseen ja sen annetaan reagoida useita tunteja;

- 5 3) seoksen optinen tiheys kussakin kuopassa kvantitoidaan valolla 550 nm:n aallonpituudella (OD 550). OD 550 -arvo on verrannollinen niiden kasvainsolujen määrään, jotka jäävät jäljelle LT- β -R-proteiinia aktivoivan aineen ja testattavan LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen läsnä ollessa kussakin kuopassa. Aine tai aineiden yhdistelmä, joka voi alentaa LT- β -R-aktivoitunutta kasvainsolun sytotoksisuutta ainakin 20 %:lla tässä testissä on LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine, joka kuuluu tämän keksinnön piiriin.
- 10

Mitä tahansa ainetta tai aineiden yhdistelmää, joka aktivoi LT- β -R-proteiinin signalointia, voidaan käyttää yllä olevassa testissä LT- β -R-proteiinia blokeeraavien aineiden tunnistamiseksi. LT- β -R-proteiinia aktivoivat aineet, jotka indusoivat LT- β -R-proteiinin signaloinnin (kuten aktivoivat monoklonaaliset anti-LT- β -R-vasta-aineet), voidaan valita perustuen niiden kykyyn — yksin tai yhdessä muiden aineiden kanssa — vahvistaa kasvainsolun sytotoksisuutta käyttäen yllä kuvattua kasvainsolutestiä.

15

Toinen menetelmä LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen valitsemiseksi on tarkkailla mahdollisen aineen kykyä häiritä suoraan LT-ligandi-reseptori-sitoutumista. Aine tai aineiden yhdistelmä, joka voi blokeerata ligandi-reseptori-sitoutumisen ainakin 20 %:lla on LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine, joka kuuluu keksinnön piiriin.

20

Mitä tahansa niistä useista testeistä, joilla mitataan ligandi-reseptori-sitoutumisen voimakkuutta, voidaan käyttää kilpailutestien suorittamiseksi mahdollisten LT- β -R-proteiinia blokeeraavien aineiden kanssa. Sitoutumisen voimakkuus reseptorin ja ligandin välillä voidaan mitata käyttäen entsyymivälitteistä immuunitestiä (ELISA) tai radioimmuunitestiä (RIA). Spesifinen sitoutuminen voidaan mitata myös leimaamalla fluoresoivasti vasta-aine-antigeenikompleksit ja suorittamalla fluoresenssiaktivoitu solulajitteluanalyysi (FACS) tai suorittamalla muut sellaiset immuunitunnistusmenetelmät, jotka kaikki ovat alalla hyvin tunnettuja menetelmiä.

25

30

Ligandi-reseptori-sitoutumisinteraktio voidaan mitata myös BIAcore-laitteella (Pharmacia Biosensor), jossa käytetään plasmoniresonanssitunnistusta [Zhou et al., Biochemistry, 32, 8193 - 98 (1993); Faegerstram ja O'Shannessy, "Surface plasmon resonance detection in affinity technologies",

35

teoksessa Handbook of Affinity Chromatography, 229 - 52, Marcel Dekker, Inc., New York (1993)].

5 BIAcore-menetelmä sallii reseptorin sitomisen kultapintaan ja ligandin kuljettamisen sen yli. Plasmoniresonanssitunnistus antaa suoran kvantitaation pintaan sitoutuneesta massamäärästä reaaliajassa. Tämä menetelmä antaa sekä sitoutumis- että irtoamisvakionopeudet ja näin ollen ligandi-reseptorin dissosiaatiovakio ja affiniteettivakio voidaan määrittää suoraan mahdollisen LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen läsnä ja poissa ollessa.

10 Millä tahansa näillä tai muilla menetelmillä, joilla mitataan reseptoriligandi-interaktioita, voidaan arvioida LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen kyky yksinään tai yhdessä muiden aineiden kanssa inhiboida pinnan tai liukoisten LT-ligandien sitoutumista pinnan LT- β -R- tai liukoisiin LT- β -R-molekyyleihin. Sellaisia testejä voidaan myös käyttää testaamaan LT- β -R-proteiinia blokeeraavia aineita tai sellaisten aineiden johdoksia (esim. fuusioita, ki-

15 meerejä, mutantteja ja kemiallisesti muutettuja muotoja) — yksin tai yhdistelminä — optimoitaessa muutetun aineen kykyä blokeerata LT- β -R-proteiinin aktivaatio.

Liukoisten LT- β -R-molekyylien tuotto

20 LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet sisältävät tämän keksinnön eräässä suoritustavassa liukoiset LT- β -reseptorimolekyylit. Kuvio 1 esittää ihmisen LT- β -R-proteiinin solunulkoisen osan sekvenssin, joka koodittaa ligandia sitovaa domeenia. Käyttäen kuvion 1 sekvenssitietoa ja alalla hyvin tunnettuja yhdistelmä-DNA-menetelmiä voidaan toiminnalliset fragmentit, jotka sisältävät LT- β -R-proteiinin ligandia sitovan domeenin, kloonata vektoriin ja eks-

25 pressoida sopivassa isännässä liukoisen LT- β -R-molekyylin tuottamiseksi. Liukoiset LT- β -R-molekyylit, jotka voivat kilpailla luonnollisten LT- β -reseptorien kanssa LT-ligandin sitomisesta tässä kuvattujen testien perusteella, valitaan LT- β -R-proteiinia blokeeraaviksi aineiksi.

30 Liukoinen LT- β -reseptori, joka sisältää aminohapposekvenssit, jotka valitaan kuviossa 1 esitetyistä sekvensseistä, voidaan kiinnittää yhteen tai useampaan heterologiseen proteiinidomeeniin ("fuusiodomeeniin") reseptorifuusioproteiinin in vivo stabiilisuuden kohottamiseksi tai sen biologisen aktiivisuuden tai sijainnin moduloimiseksi.

35 Suositeltavasti stabiileja plasmaproteiineja — joiden puoli-ikä on tyypillisesti enemmän kuin 20 tuntia verenkierrassa — käytetään reseptorifuusioproteiinien rakentamiseksi. Sellaiset plasmaproteiinit sisältävät, mutta eivät

ole rajoittuneet, immunoglobuliinit, seerumialbumiinin, lipoproteiinit, apolipoproteiinit ja transferriinin. Sekvenssit, jotka voivat kohdentaa liukoisen LT- β -R-molekyylin tiettyyn solu- tai kudostyyppiin, voidaan myös kiinnittää LT- β -R-proteiinin ligandia sitovaan domeeniin spesifisesti sijoitetun liukoisen LT- β -R-fuusioproteiinin muodostamiseksi.

LT- β -R-proteiinin koko solunulkoinen osa (kuvio 1) tai sen toiminnallinen alue, joka sisältää LT- β -R-proteiinin ligandia sitovan domeenin, voidaan fuusioda immunoglobuliinin vakioalueeseen, kuten ihmisen IgG1-proteiinin raskasketjun Fc-domeeniin [Browning et al., J. Immunol., 154, 33 - 46 (1995)]. Liukoiset reseptori-IgG-fuusioproteiinit ovat suositeltavia ja ne ovat yleisiä immunologisia reagensseja, ja menetelmät niiden rakentamiseksi ovat alalla tunnettuja (katso esim. US-patentti numero 5 225 538, joka on lisätty tähän viitteeksi).

Toiminnallinen LT- β -R-proteiinin ligandia sitova domeeni voidaan fuusioda immunoglobuliinin (Ig) Fc-domeeniin, joka on peräisin muusta immunoglobuliiniluokasta tai -alaluokasta kuin IgG1. Vasta-aineiden, jotka kuuluvat eri Ig-luokkiin tai -alaluokkiin, Fc-domeenit voivat aktivoida erilaisia sekundaarieffektoritoimintoja. Aktivaatio tapahtuu, kun yhteenkuuluva Fc-reseptori sitoo Fc-domeenin. Sekundaarieffektoritoiminnot sisältävät kyvyn aktivoida komplementtisysteemi, kulkea istukan läpi ja sitoa erilaisia mikrobiproteiineja. Immunoglobuliinien eri luokkien ja alaluokkien ominaisuudet on kuvattu julkaisussa Roitt et al., Immunology, 4.8 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. painos, 1993).

Komplementtisysteemin aktivaatio aloittaa entsymaattisten reaktioiden kaskadit, jotka välittävät tulehdusta. Komplementtisysteemin tuotteilla on erilaisia toimintoja sisältäen bakteerien sitomisen, endosytoosin, fagosytoosin, sytotoksisuuden, vapaiden radikaalien tuoton ja immuunikompleksien liuottamisen.

Komplementin entsyymikaskadin voi aktivoida antigeeniin sitoutuneiden IgG1-, IgG3- ja IgM-vasta-aineiden Fc-domeenit. IgG2-vasta-aineen Fc-domeeni tuntuu olevan vähemmän tehokas ja IgG4-, IgA-, IgD- ja IgE-vasta-aineiden Fc-domeenit ovat tehottomia komplementin aktivoimisessa. Näin ollen voidaan valita Fc-domeeni perustuen siihen, ovatko siihen assosioituneet sekundaarieffektoritoiminnot LT- β -R-Fc-fuusioproteiinin kanssa toivottavia tietyille immuunivasteelle tai hoidettavalle taudille.

Jos on edullista vaurioittaa tai tappaa LT-ligandia sisältävä kohdesolu, voidaan valita erityisen aktiivinen Fc-domeeni (IgG1) LT- β -R-Fc-fuusio-

proteiinin valmistamista varten. Vaihtoehtoisesti, jos on toivottavaa kohdentaa LT- β -R-Fc-fuusioproteiini soluun ilman, että laukaistaan komplementtisysteemi, voidaan valita inaktiivinen IgG4-Fc-domeeni.

Mutaatiot Fc-domeeneissa, jotka alentavat tai eliminoivat sitoutumisen Fc-reseptoreihin ja komplementin aktivoitumista, on kuvattu [S. Morrison, Annu. Rev. Immunol., 10, 239 - 65 (1995)]. Näitä ja muita mutaatioita voidaan käyttää yksinään tai yhdessä sen Fc-domeenin aktivoimiseksi, jota käytetään LT- β -R-Fc-fuusioproteiinin rakentamiseksi.

Ihmisen liukoisen LT- β -R-fuusioproteiinin, joka sisältää ligandia sitovat sekvenssit fuusioituina ihmisen immunoglobuliinin Fc-domeeniin (hLT- β -R-Fc), tuottaminen on kuvattu esimerkissä 1. Erästä esimerkin 1 mukaisesti tehtyä CHO-linjaa, joka erittää hLT- β -R-Fc-proteiinia, kutsutaan nimellä "hLT β ;R-hG1 CHO#14". Tämän linjan näyte talletettiin 21.7.1995 kokoelmaan American Type Culture Collection (ATCC)(Rockville, MD) Budapestin sopimuksen lausekkeiden mukaisesti ja sille annettiin ATCC-koodinumero CRL11965.

Hiiren liukoisen LT- β -R-fuusioproteiinimolekyylin (mLT- β -R-c) tuotto on kuvattu esimerkissä 2. Esimerkin 2 mukaisesti tehtyä CHO-linjaa, joka erittää mLT- β -R-Fc-proteiinia, kutsutaan nimellä "mLT β ;R-hG1 CHO#1.3BB". Tämän linjan näyte talletettiin 21.7.1995 kokoelmaan American Type Culture Collection (ATCC)(Rockville, MD) Budapestin sopimuksen lausekkeiden mukaisesti ja sille annettiin ATCC-koodinumero CRL11964.

Kaikki yllä olevien ATCC-tallenteiden rajoitukset yleiseen käyttöön poistuvat peruuttamattomasti, kun tämä patenttihakemus saa patentin arvon.

Erilaiset aminohappojäännökset, jotka muodostavat reseptori-Ig-fuusioproteiinin rajakohdan, voivat muuttaa liukoisen LT- β -reseptorifuusioproteiinin rakennetta, stabiilisuutta ja lopullista biologista aktiivisuutta. Yksi tai useampi aminohappo voidaan lisätä valitun LT- β -R-fragmentin C-päähän valitun fuusiodomeenin kanssa muodostuneen rajakohdan modifioimiseksi.

LT- β -R-fuusioproteiinia N-päätä voidaan myös vaihdella muuttamalla sitä kohtaa, josta valittu LT- β -R-DNA-fragmentti katkaistaan 5'-päästään, kun se insertoidaan rekombinanttiekspressiovektoriin. Kunkin LT- β -R-fuusioproteiinin stabiilisuus ja aktiivisuus voidaan testata ja optimoida käyttäen rutiinikokeita ja -testejä, joilla valitaan tässä kuvatut LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet.

Käyttäen kuviossa 1 kuvattuja LT- β -R-proteiinin solunulkoisen domeenin ligandia sitovan domeenin sekvenssejä voidaan aminohapposekvens-

sin variantit rakentaa myös niin, että modifioidaan liukoisen LT- β -R-reseptorin tai fuusioproteiinin affiniteettia LT-ligandia kohtaan. Tämän keksinnön mukaiset liukoiset LT- β -R-molekyylit voivat kilpailla pinnan LT-ligandin sitomisesta endogeenisten solun pinnan LT- β -reseptorien kanssa. Kuvitellaan, että mikä tahansa liukoinen molekyyli, joka sisältää LT- β -R-ligandia sitovan domeenin, joka voi kilpailla solun pinnan LT- β -reseptorien kanssa LT-ligandin sitoutumisesta, on LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine, joka sisältyy esillä olevan keksinnön piiriin.

Liukoiset LT- β -R-molekyylit LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina

10 Ihmisen liukoinen LT- β -reseptori-immunoglobuliinifuusioproteiini (hLT- β -R-Fc) tehtiin esimerkin 1 menetelmien mukaisesti ja se testattiin sen kyvyn suhteen blokeerata LT- β -R-indusoitunut sytotoksisuus ihmisen HT29-kasvainsoluissa. Taulukossa 1 (esimerkki 3) verrataan liukoisen LT- β -reseptori- (hLT- β -R-Fc) ja TNF-reseptorifuusioproteiinien (p55-TNF-R-Fc) kykyä blo-
15 keerata erilaisten TNF- ja liukoisten LT-ligandien inhibitorisia vaikutuksia HT29-kasvainsolun kasvuun.

Taulukon 1 tulokset osoittavat konsentraatiot, joissa liukoinen LT- β -reseptori (hLT- β -R-Fc) voi blokeerata kasvainsolun kuoleman 50 %:lla, joka johtuu interaktiosta LT- α 1/ β 2-ligandin ja solun pinnan LT- β -reseptorien kans-
20 sa. Kyky blokeerata kasvainsolun kasvua ainakin 20 %:lla tunnistaa tämän liukoisen LT- β -reseptorin sellaiseksi, joka on tämän keksinnön mukaisesti LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine. Kuten oli odotettua, liukoinen TNF-R-fuusioproteiini (p55-TNF-R-Fc) blokeerasi täydellisesti TNF-indusoidun kasvun inhibition sitoutumalla TNF-proteiiniin ja estämällä sen interaktion pinnan reseptorin
25 kanssa.

Liukoisella TNF-R-fuusioproteiinilla ei ollut mitään vaikutusta LT-ligandivälitteisiin (LT- α 1/ β 2) kasvun vastaisiin vaikutuksiin. Tälle päinvastaisesti LT- β -R-fuusioproteiini blokeerasi LT-ligandin vaikutukset, mutta ei TNF- tai LT- α -ligandin vaikutuksia. Näin ollen ihmisen liukoiset LT- β -R-fuusioproteiinit eivät
30 häiritse TNF- ja LT- α -ligandien aiheuttamaa TNF-R-proteiinin aktivaatiota.

Sen määrittämiseksi, onko LT- β -R-signaali myös sytotoksinen kasvainsoluille hiirissä ja sen määrittämiseksi, voivatko liukoiset LT- β -R-fuusioproteiinit blokeerata LT- β -R-indusoidun sytotoksisuuden, samanlainen koe suoritettiin käyttäen hiiren kasvainsoluja. Liukoinen hiiren LT- β -R-Fc-fuusioproteiini (mLT- β -R-Fc; katso esimerkki 2) testattiin sen kyvyn suhteen blokeerata
35

sellaisten hiiren WEHI 164 -solujen kuolema, joita käsiteltiin LT-ligandilla (esimerkki 4).

Kuviossa 2 esitetään hiiren liukoisen LT- β -R-proteiinin (mLT- β -R-Fc) vaikutukset LT-ligandilla indusoituneeseen LT- β -R-signalointiin hiiren WEHI 164 -soluissa. Kuten tämä koe osoittaa, WEHI 164 -solut kuolevat käsiteltäessä niitä liukoisella LT- α 1/ β 2-ligandilla. mLT- β -R-Fc-proteiinin lisäys blokeeraa LT-ligandin aktivoiman solukuoleman. TNF-reseptorifuusioverrokkiproteiinilla (p55TNF-R-Fc) on vain vähän vaikutusta solukuoleman blokeerukseen.

Nämä tulokset osoittavat, että liukoinen LT- β -R-fuusioproteiini voi kilpailla tehokkaasti pinnan LT- β -R-molekyylien kanssa LT-ligandin sitomisesta. Näin ollen liukoinen mLT- β -R-Fc-fuusioproteiini toimii LT- β -R-proteiinia blokeeravana aineena hiirissä.

Anti-ihmis-LT- β -R-vasta-aineiden lähde

Toisessa tämän keksinnön mukaisessa suoritustavassa vasta-aineet, jotka on suunnattu ihmisen LT- β -reseptoria (anti-LT- β -R-vasta-aineet) vastaan, toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina. Tämän keksinnön mukaiset anti-LT- β -R-vasta-aineet voivat olla polyklonaalisia tai monoklonaalisia (mAb) ja ne voivat olla modifioituja niin, että niiden kyky blokeerata LT- β -R-signalointi, niiden biologinen in vivo saatavuus, stabiilisuus tai muut ominaisuudet on optimoitu.

Ihmisen LT- β -reseptoria vastaan olevat polyklonaaliset vasta-aine-seerumit valmistetaan käyttäen tavanomaisia menetelmiä injektoidulla eläimellä, kuten vuohella, kanilla, rotalla, hamsterilla tai hiirellä, ihonalaisesti ihmisen LT- β -reseptori-Fc-fuusioproteiinilla (esimerkki 1) täydellisessä Freundin adjuvantissa, jota seuraa vatsaontelon sisäinen tai ihonalainen tehosteannos epätäydellisessä Freundin adjuvantissa. Polyklonaaliset antiseerumit, jotka sisältävät halutut vasta-aineet, jotka on suunnattu LT- β -reseptoria vastaan, seulotaan tavanomaisin immunologisin menetelmin.

Hiiren monoklonaaliset vasta-aineet (mAb), jotka on suunnattu ihmisen LT- β -reseptori-Fc-fuusioproteiinia vastaan, valmistetaan esimerkin 5 kuvauksen mukaisesti. Hybridoomasolulinja (BD.A8.AB9), joka tuottaa hiiren monoklonaalista anti-ihmis-LT- β -R-vasta-ainetta BDA8, talletettiin 12.1.1995 kokolemaan American Type Culture Collection (ATCC)(Rockville, MD) Budapestin sopimuksen lausekkeiden mukaisesti ja sille annettiin ATCC-koodinumero HB11798. Kaikki yllä olevien ATCC-tallenteiden rajoitukset yleistä saata-

vuotta varten poistetaan peruuttamattomasti, kun esillä oleva patenttihakemus saa patentin arvon.

Erilaisia anti-LT- β -R-vasta-aineiden muotoja voidaan myös tehdä käyttäen standardeja yhdistelmä-DNA-menetelmiä [Winter ja Milstein, Nature, 5 349, 293 - 299 (1991)]. Voidaan esimerkiksi rakentaa "kimeeriset" vasta-aineet, joissa antigeenia sitova domeeni eläimen vasta-aineesta liitetään ihmisen vakiodomeeniin [esim. Cabilly et al., US 4 816 567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851 - 55 (1984)]. Kimeeriset vasta-aineet alentavat havaittuja immunogeenisia vasteita, jotka eläimen vasta-aineet saavat aikaan, 10 kun niitä käytetään kliinisissä ihmiskokeissa.

Lisäksi voidaan syntetisoida "humanisoidut rekombinanttivasta-aineet", jotka tunnistavat LT- β -R-proteiinin. Humanisoidut vasta-aineet ovat kimeerejä, jotka sisältävät pääasiassa ihmisen IgG-sekvenssejä, joihin on insertoitu alueet, jotka ovat vastuussa spesifisestä vasta-ainesitoutumisesta 15 (esim. WO 94/04 679). Eläimet immunisoidaan halutulla antigeenilla, vastaavat vasta-aineet eristetään ja se osa variaabelin alueen sekvensseistä, joka on vastuussa spesifisestä antigeenin sitoutumisesta, poistetaan. Sitten eläimestä peräisin olevat antigeenia sitovat alueet kloonataan sopivaan kohtaan ihmisen vasta-ainegeeneissä, joista antigeenia sitovat alueet on poistettu. Humanisoidut vasta-aineet minimoivat heterologisten sekvenssien (lajien välisten) käytön 20 ihmisen vasta-aineissa ja niillä on pienempi todennäköisyys saada aikaan immuunivasteet käsitellyssä potilaassa.

Eri LT- β -R-rekombinanttivasta-aineiden luokkien rakennus voidaan myös saada aikaan tekemällä kimeeriset tai humanisoidut vasta-aineet, jotka 25 sisältävät anti-LT- β -R-variaabelit domeenit ja ihmisen vakiodomeenit (CH1, CH2, CH3), jotka on eristetty eri immunoglobuliiniluokista. Esimerkiksi anti-LT- β -R-IgM-vasta-aineet, joilla on kohonneet antigeenia sitovan kohdan valenssit, voidaan tuottaa yhdistelmä-DNA-menetelmin kloonamalla antigeenia sitova kohta vektoreihin, joissa on ihmisen μ -ketjun vakioalueet [Arulanandam et al., 30 J. Exp. Med., 177, 1439 - 50 (1993); Lane et al., Eur. J. Immunol., 22, 2573 - 2578 (1993); Traunecker et al., Nature, 339, 68 - 70 (1989)].

Lisäksi standardeja yhdistelmä-DNA-menetelmiä voidaan käyttää muuttamaan rekombinanttivasta-aineiden sitomisaffiniteetteja niiden antigeeneihin muuttamalla antigeenia sitovien kohtien läheisyydessä olevia amino- 35 happojäännöksiä. Humanisoidun vasta-aineen antigeenia sitovaa affiniteettia

voidaan kohottaa mutageneesilla perustuen molekyylimallitukseen [Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 10029 - 10033 (1989); WO 94/04 679].

Voi olla toivottavaa kohottaa tai alentaa anti-LT- β -R-vasta-aineiden affiniteettia LT- β -R-proteiinia vastaan riippuen kohdennetusta kudostyypistä tai tietystä kuvitellusta käsittelysuunnitelmasta. Esimerkiksi voi olla edullista käsitellä potilasta, jolla on alentunut kyky signaloida LT- β -reitin välityksellä, anti-LT- β -R-vasta-aineiden vakiotasoilla niin, että saadaan aikaan semiprofylaktinen hoito. Samalla tavalla inhibitoriset anti-LT- β -R-vasta-aineet, joilla on kohonnut affiniteetti LT- β -R-proteiinia kohtaan, voivat olla edullisia lyhytaikaisia hoitoja varten.

Anti-LT- β -R-vasta-aineet LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina

Anti-LT- β -R-vasta-aineet, jotka toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina, voidaan valita testaamalla niiden kyky inhiboida LT- β -R-indusoitu sytotoksisuus kasvainsoluissa (esimerkki 5).

Tämän keksinnön mukaisessa suositeltavassa suoritustavassa koostumukset ja menetelmät sisältävät hiiren monoklonaalisen anti-ihmis-LT- β -R-vasta-aineen BDA8. Kuviossa 3 esitetään, että monoklonaalinen vasta-aine BDA8 toimii LT- β -R-proteiinia blokeeraavana aineena tämän keksinnön mukaisesti. WiDr-kasvainsolut lopettavat kasvamisen IFN- γ -proteiinin ja liukoisen LT- α 1/ β 2-ligandin läsnä ollessa. Verrokkivasta-aineilla (IgG1) ei ole mitään vaikutusta tähän kasvun inhibitioon. Tälle päinvastaisesti monoklonaalinen anti-LT- β -R-vasta-aine BDA8 blokeeraa liukoisen LT- α 1/ β 2-ligandin kyvyn inhiboida WiDr-solun kasvu. Näin ollen vasta-aine, joka on suunnattu ihmisen LT- β -R-proteiinia vastaan, voi toimia LT- β -R-proteiinia blokeeraavana aineena esillä olevan keksinnön mukaisesti.

Testaamalla muita vasta-aineita, jotka on suunnattu ihmisen LT- β -reseptoria vastaan odotetaan, että anti-LT- β -R-lisävasta-aineita, jotka toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina ihmisillä, voidaan tunnistaa käyttäen rutiinikokeita ja tässä kuvattuja kokeita.

30 Anti-pinta-LT-ligandi-vasta-aineiden lähde

Toinen tämän keksinnön mukainen suoritustapa sisältää koostumukset ja menetelmät, jotka sisältävät LT-ligandia vastaan suunnatut vasta-aineet, jotka toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina. Kuten yllä on kuvattu anti-LT- β -R-vasta-aineille, anti-LT-ligandi-vasta-aineet, jotka toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina, voivat olla polyklonaalisia tai mono-

klonaalisia ja ne voidaan modifioida rutiinimenetelmin niiden antigeenia sitovien ominaisuuksien ja niiden immunogeenisyyden moduloimiseksi.

Tämän keksinnön mukaiset anti-LT-vasta-aineet voidaan muodostaa joko yhtä tai kahta LT-alayksikköä vastaan erikseen sisältäen liukoiset, mutantti- ja kimeeriset LT-alayksikkömuodot. Jos LT-alayksikköjä käytetään antigeenina, ne ovat suositeltavasti LT- β -alayksikköjä. Jos käytetään LT- α -alayksikköjä, on suositeltavaa, että tuloksena syntyvät LT- α -vasta-aineet sitoutuvat pinnan LT-ligandiin ja eivät ristireagoi eritetyn LT- α -proteiinin kanssa tai moduloi TNF-R-proteiinin aktiivisuutta (esimerkissä 3 kuvattujen kokeiden mukaan).

Vaihtoehtoisesti vasta-aineet, jotka on suunnattu homomeeristä (LT- β) tai heteromeeristä (LT- α/β) kompleksia vastaan, joka sisältää yhden tai useamman LT-alayksikön, voidaan muodostaa ja ne voidaan seuloa niiden aktiivisuuden suhteen LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina. Suositeltavasti LT- $\alpha 1/\beta 2$ -komplekseja käytetään antigeenina. Kuten yllä on keskusteltu, on suositeltavaa, että tuloksena syntyneet anti- $\alpha 1/\beta 2$ -vasta-aineet sitoutuvat pinnan LT-ligandiin ilman sitoutumista eritettyyn LT- α -ligandiin ja ilman, että niillä on vaikutusta TNF-R-aktiivisuuteen.

Polyklonaalisten anti-ihmis-LT- α -vasta-aineiden tuottaminen on kuvattu patentinhakijoiden haettavan olevassa patenttihakemuksessa (WO 94/138 08). Monoklonaaliset anti-LT- α - ja anti-LT- β -vasta-aineet on myös kuvattu [Browning et al., J. Immunol., 154, 33 - 46 (1995)].

Hiiren anti-ihmis-LT- β -vasta-aineet valmistettiin kuten on kuvattu esimerkissä 6. Hybridoomasolulinja (B9.C9.1), joka tuottaa hiiren monoklonaalista anti-ihmis-LT- β -R-vasta-ainetta B9, talletettiin 21.7.1995 kokoelmaan American Type Culture Collection (ATCC)(Rockville, MD) Budapestin sopimuksen lausekkeiden mukaisesti ja sille annettiin ATCC-koodinumero HB11962.

Monoklonaaliset hamsterin anti-hiiri-LT- α/β -vasta-aineet valmistettiin kuten on kuvattu esimerkissä 7. Hybridoomasolulinja (BB.F6.1), joka tuottaa hamsterin monoklonaalista anti-hiiri-LT- α/β -vasta-ainetta BB.F6, talletettiin 21.7.1995 kokoelmaan American Type Culture Collection (ATCC)(Rockville, MD) Budapestin sopimuksen lausekkeiden mukaisesti ja sille annettiin ATCC-koodi HB11963.

Kaikki yllä olevien ATCC-tallenteiden rajoitukset yleiseen saatavuuteen poistuvat peruuttamattomasti, kun tämä patenttihakemus saa patentin arvon.

Anti-LT-ligandi-vasta-aineet LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina

5 Fluoresenssiaktivoitu solulajittelutesti (FACS) kehitettiin sellaisten vasta-aineiden seulomiseksi, jotka on suunnattu sellaisia LT-alayksiköitä ja LT-komplekseja vastaan, jotka voivat toimia LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina (esimerkit 6 ja 7). Tässä testissä ihmisen liukoinen LT- β -R-Fc-fuusioproteiini lisätään PMA-aktivoituihin II-23-soluihin — jotka ekspressoivat
10 pinnan LT-komplekseja [Browning et al., J. Immunol., 154, 33 - 46 (1995)] — kohoavan testivasta-ainemäärän läsnä ollessa. Vasta-aine, joka inhiboi LT- β -reseptori-ligandi-interaktiota ainakin 20 %:lla, valitaan LT- β -R-proteiinia blokeeraavaksi aineeksi.

Tämän testin, joka suoritettiin hiiren monoklonaalisen anti-ihmis-LT-
15 β -vasta-aineen B9 testaamiseksi, tulokset on esitetty kuviossa 4. Kuviossa 4 esitetään, että monoklonaalinen anti-LT- β -vasta-aine B9 voi selektiivisesti blokeerata liukoisten LT- β -R-Fc-fuusioproteiinien sitoutumisen pinnan LT-ligandeihin, jotka on indusoitu aktivoituihin soluihin. Nämä tulokset varmistavat, että vasta-aineet, jotka on suunnattu LT-ligandin alayksikköä vastaan, toimivat LT-
20 β -R-proteiinia blokeeraavina aineina.

Yllä kuvattua FACS-testiä käytettiin myös testaamaan monoklonaalisia vasta-aineita, jotka muodostettiin hamsterissa liukoista hiiren LT- α/β -kompleksia vastaan (esimerkki 7). Tämä testi, joka suoritettiin hamsterin monoklonaalisen anti-hiiri-LT- α/β -vasta-aineen BB.F6 testaamiseksi, on esitetty taulukossa 2 (esimerkki 7). Taulukko 2 esittää, että monoklonaalinen anti-LT- α/β -vasta-aine BB.F6 voi tehokkaasti blokeerata liukoisten mLT- β -R-Fc-fuusioproteiinien (esimerkki 2) sitoutumisen pinnan LT-ligandeihin, joita ekspressoidaan hiiren T-solulymfoomassa, ja on näin ollen LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine esillä olevan keksinnön mukaisesti.

30 LT- α/β -kompleksin käyttö antigeenina eläimen immunisoimiseen mieluummin kuin LT-alayksikön käyttö voi johtaa tehokkaampaan immunisaatioon tai se voi johtaa sellaisten vasta-aineiden muodostumiseen, joilla on korkeammat affiniteetit pinnan LT-ligandeille. On mahdollista, että immunisoimalla LT- α/β -kompleksilla voidaan eristää vasta-aineet, jotka tunnistavat aminohappojäännökset sekä LT- α -että LT- β -alayyksiköissä (esim. jäännökset, jotka
35 muodostavat LT- α/β -raon). Testaamalla sellaiset vasta-aineet, jotka on suunn-

nattu ihmisen heteromeerisia LT- α/β -komplekseja vastaan odotetaan, että anti-LT-lisävasta-aineita, jotka toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina ihmisillä, voidaan tunnistaa käyttäen rutiinikokeita ja tässä kuvattuja kokeita.

LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet inhiboivat Th1-soluvälitteistä kosketusyliherkkyyttä hiiressä

Tämän keksinnön mukaiset LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet voivat inhiboida Th1-soluvälitteisiä immuunivasteita. Yksi sellainen Th1-soluvälitteinen vaste on viivästyneen tyyppinen yliherkkyys [DTH; Cher ja Mosmann, J. Immunol., 138, 3688 - 3694 (1987); katso yleiskatsausta varten myös I. Roitt et al., Immunology, 22.1 - 22.12, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. painos (1993)]. DTH-reaktio syntyy, kun antigeenilla herkistyneet Th1-solut erittävät sytokiineja sen jälkeen, kun ne joutuvat toisen kerran kosketukseen saman antigeenin kanssa. Th1-sytokiinit vetävät puoleensa ja aktivoivat makrofageja, jotka vapauttavat lisäeffektorimolekyylejä, jotka laukaisevat tulehdusreaktiot.

DTH-reaktiot luokitellaan kolmeen eri tyyppiin: kosketusyliherkkyys, tuberkuliinityyppinen yliherkkyys ja granulomatoosiset reaktiot. Yliherkkyys (HS) kolme tyyppiä voidaan erottaa vierasta antigeenia vastaan olevan vasteen nopeudella ja luonteella, kun se lisätään suoraan tai injektoidaan herkistyneen potilaan ihon alle. DTH-reaktiota tarkkaillaan mittaamalla sitä nopeutta ja määrää, jolla iho paksune.

Tuberkuliinityypin HS-reaktiot ovat ihoreaktioita, jotka tapahtuvat sellaisen mikro-organismista peräisin olevan vieraan antigeenin injektiokohdalla, jolle potilas on aiemmin altistettu (esim. Mycobacterium tuberculosis tai M. leprae). Tätä ihoreaktiota, joka on suurin 48 ja 72 tunnin välissä, käytetään usein diagnostisten herkkyystestien perustana, joilla määritetään aiempi altistus mikro-organismeille (esim. tuberkuliini-ihotesti). Kun tuberkuliinityyppinen vaurio syntyy, se voi tulla granulomatoosiseksi reaktioksi, jos antigeeni säilyy kudoksessa.

Granulomatoosiset reaktiot ovat kliinisesti vakavimpia DTH-reaktioita, koska ne voivat johtaa moniin niistä patologisista vaikutuksista, jotka assioituvat Th1-soluvälitteisiin tauteihin. Granulomatoosiset reaktiot tapahtuvat, kun antigeenit tai immuunikompleksit eivät onnistu poistumaan makrofageista ja jatkavat Th1-sytokiinierityksen stimulaatiota. Krooninen tulehdus ja aktivoituneiden makrofagien aggregaatio stimuluskohdalla ovat ominaisia granulomatoosisille reaktioille.

Epiteelisolujen ja makrofagien ydin, joka voi myös olla lymfosyyttien ja fibroottisten saostumien ympäröimä, muodostaa kovettuneen rakenteen, jota kutsutaan granuloomaksi. Joskus granulooman ytimessä tapahtuu laajaa solutuhhoa (esim. tuberkuloottisessa keuhkokudoksessa). Kovettuminen granulomatoosisen reaktion kohdekudoksessa tapahtuu noin neljässä viikossa.

Aineet, jotka vaikuttavat granulooman muodostumisen frekvenssiin, voidaan tunnistaa käyttäen halkiomadolla infektoiduja hiiriä [Amiri et al., Nature, 356, 604 - 607 (1992)]. Halkiomadot (verimadot) voivat aiheuttaa loistaudin, joka johtaa granulooman muodostumiseen niiden halkiomadon munien ympärille, jotka sijaitsevat infektoiduneen maksan porttilaskimoissa. Aineet, jotka inhiboivat tätä Th1-soluvälitteistä DTH-vastetta, voivat alentaa granulooman kokoa tai granulooman muodostumisen frekvenssiä tai nopeuttaa halkiomadolla infektoiduneen hiiren maksassa. Solureaktio halkiomadon munia vastaan voidaan määritellä kvantitoimalla niiden granuloomien määrä ja koko, jotka muodostuvat hiiriin, joita käsitellään ajan funktiona kohoavilla konsentraatioilla mahdollista LT- β -R-proteiinia blokeeravaa ainetta.

Kosketusyliherkkyys (CHS) on DTH-luokan reaktio, jossa iho on kohde-elin. CHS-reaktiossa tulehdusreaktio aiheutetaan lisäämällä reaktiivista hapteneita paikallisesti iholle. Allergeenit sisältävät yleensä ainakin yhden haptteenimolekyylin, joka on tavallisesti liian pieni, jotta se olisi antigeeninen yksistään. Haptteeni tunkeutuu epidermin läpi ja reagoi normaalin proteiinin kanssa ihon alla tuottaen uuden antigeenisen kompleksin.

Herkistyneen potilaan uudelleen altistuminen haptteenille laukaisee DTH-vasteen. Haptteeni-kantajaproteiini-konjugaatti aktivoi yhdessä antigeenia sisältävien solujen kanssa efektorimekanismit, jotka laukaisevat sytokiiniin (sisältäen IL-2-, IL-3-, IFN- γ - ja GM-CSF-proteiinit) vapautumisen. Vapautuneiden sytokiiniin kaskadi aiheuttaa CD4+-T-solujen lisääntymisen, eri solupinta-adheesiomolekyylien ekspressiokuvioiden muutoksen ja T-solujen ja makrofagien houkuttelemisen iholle tulehduskohtaan. Sytokiiniinikaskadi ja tuloksena syntyvä vasodilataatio, soluinfiltraatio ja dermoksen ja epidermoksen turvotus johtavat kohdekudoksen turpoamiseen ja tulehdukseen, joka on vastuussa mitattavasta ihon paksuuntumisesta, joka on vaste DTH-reaktioille.

Se taso, jolla tietty haptteeni voi herkistää yksilön, riippuu eri tekijöistä. Nämä tekijät sisältävät sen, kuinka hyvin haptteeni kykenee tunkeutumaan ihon läpi ja reagoimaan isännän kantajaproteiinin kanssa konjugaatin muodos-

tamiseksi. Eräs haptenei, joka herkistää lähes kaikki yksilöt, on 2,4-dinitro-fluoribentseeni (DNFB).

Ihon CHS-vaste sellaiselle hapteneille, kuten DNFB, on klassinen eläinmalli soluvälitteisestä immunitetista. Tämän CHS-vasteen paikantuminen herkistyneen hiiren korvaan sallii tämän soluvälitteisen immuunivasteen helpon, tarkan ja toistettavan kvantitaation *in vivo* niin, että mitataan korvan paksuus. Yksityiskohdat hiiren CHS-reaktiosta ja DNFB-indusoidun tulehdusvasteen histopatologiasta on julkaistu [Chisholm et al., Eur. J. Immunol., 23, 682 -688 (1993)].

- 10 DNFB-yhdisteen kykyä indusoida kosketusyliherkkyysvaste useimmissa yksilöissä voidaan käyttää tunnistamaan sellaiset aineet, jotka alentavat tai poistavat ne tulehdusvasteet, jotka assosioituvat Th1-soluvälitteisiin DTH-reaktioihin. Hiiren liukoinen LT- β -R-Fc-fuusioproteiini inhiboi tehokkaasti DNFB-indusoituja kosketusyliherkkyysvasteita hiirissä (esimerkki 8). Hiiret
15 herkistettiin aluksi lisäämällä DNFB-yhdistettä kunkin takajalan pohjaan kahtena peräkkäisenä päivänä. Viisi vuorokautta alkuherkistymisen jälkeen lisättiin vasemman korvan pinnalle ei-ärsyttävä annos DNFB-yhdistettä kantajaliuoksessa. Kantajaliuosta yksinään lisättiin oikeaa korvaan verrokiksi.

- Kohoavat konsentraatiot LT- β -R-proteiinia blokeeravaa ainetta
20 mLT- β -R-Fc (esimerkki 2) injektioitiin sitten laskimonsisäisesti hiiriin (esimerkki 8). Injektiot PBS-puskurilla yksinään tai ihmisen IgG-fuusioproteiinilla (LFA3-Fc) toimivat negatiiviverrokkeina ja injektio anti-VLA4-spesifisellä monoklonaalisella vasta-aineella (monoklonaalinen PS/2-vasta-aine), jonka tiedetään inhiboivan CHS-reaktiota, toimi positiivisena verrokkina. 24 tuntia altistuksen jälkeen kunkin korvan (DNFB-yhdisteelle altistetun ja altistamattoman) paksuus mitattiin. Korvan turpoamisen inhibiovaste LT- β -R-proteiinia blokeeraavalla aineella pääteltiin vertaamalla käsittelyryhmiä niiden negatiiviverrokkiryhmään.

- Kuvio 5 esittää, että mLT- β -R-Fc-proteiini aiheuttaa merkittävän alenemisen korvan turpoamisvasteessa DNFB-käsitellyissä hiirissä verrattuna inhiboimattomiin DNFB-käsiteltyihin verrokkieläimiin (PBS ja LFA3-Fc). Liukoinen LT- β -R-proteiini voi blokeerata tämän CHS-reaktion yhtä tehokkaasti kuin anti-VLA4-spesifinen monoklonaalinen vasta-ainehiittäjä (monoklonaalinen PS/2-vasta-aine), joka toimii blokeeraamalla T-solujen virtaamisen altistuskoh-
30 taan [Chisholm et al., Eur. J. Immunol., 23, 682 - 88 (1993)].

- 35 Nämä tulokset osoittavat, että liukoinen LT- β -R-fuusioproteiini, joka toimii LT- β -R-proteiinia blokeeraavana aineena *in vitro*, voi myös tehokkaasti

inhiboida Th1-soluvälitteisen immuunivasteen, kun sitä annetaan eläimelle. Tämän keksinnön mukaiset LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet, jotka on tunnistettu in vitro, voidaan testata käyttäen tätä korvan turpoamistestiä tai muita DTH-testejä, kuten niitä, jotka on kuvattu yllä, sellaisten LT- β -R-proteiinia blokeeraavien lisäaineiden selektoimiseksi, jotka ovat käyttökelpoisia Th1-soluun assosioituneiden immuunivasteiden vakavuuden alentamiseksi in vivo.

LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet eivät inhiboi Th2-soluvälitteistä (humoraalista) immuunivastetta

Kuten yllä on esitetty, tämän keksinnön mukaiset LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet voivat inhiboida Th1-soluvälitteistä effektorimekanismia, kuten viivästyneen tyyppistä kosketusyliherkkyyttä (kuvio 5). Tämä Th1-soluvälitteinen vaste inhiboituu ilman merkittävää vaikutusta Th2-soluvälitteisiin vasteisiin. LT- β -R-proteiinia blokeeraavien aineiden erilainen vaikutus Th1-soluvälitteisiin immuunivasteisiin osoitettiin tarkkailemalla Th2-solusta riippuvaista immuunivastetta — kuten primaarista vasta-ainevastetta ja isotyypin vaihtumista — LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen läsnä ollessa.

Hiiret injektoidiin viisi kertaa kymmenen vuorokauden ajanjakson aikana joko liukoosella LT- β -R-fuusioproteiinilla (mLT- β -R-Fc; esimerkki 2) tai IgG-verrokkifuusioproteiinilla (LFA3-Fc) tai niitä ei käsitelty. Toisen injektion jälkeen kaikki hiiret injektoidiin hännän tyveen 100 μ l:lla Freundin täydellistä adjuvanttia, joka sisälsi 100 μ g ovalbumiinia. 11 vuorokauden jälkeen analysoidiin primaariset seerumin anti-ovalbumiinispesifiset vasta-ainetiitterit käyttäen ELISA-testiä, joka oli spesifinen IgG1-, IgG2a- ja IgM-isotyypeille.

Kuvio 6 esittää hiiren LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen mLT- β -R-Fc vaikutuksen seerumin anti-ovalbumiinivasta-ainetuotolle hiirissä, jotka immunisoitiin ovalbumiinilla (esimerkki 9). LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen anto ei merkittävästi vaikuta primaarisiin vasta-ainetiittereihin ovalbumiini-immunisaation jälkeen. Vertailun vuoksi CD40-ligandin indusoiman CD40-reseptorisignaloinnin häirintä blokeeraa täydellisesti antigeenispesifisen IgG-vasteen hiirissä [Renshaw et al., J. Exp. Med., 180, 1889 - 1900 (1994)]. CD40 on toinen ligandi/reseptoripari TNF-ryhmässä.

Totaali-immunoglobuliinituotanto ja kypsyminen on selvästi Th2-soluriippuvaista. On myös kuitenkin todisteita siitä, että Th1-sytokiini IFN- γ ottaa osaa, mutta sitä ei ehdottomasti tarvita, vaihtumiseen IgG2a-alaluokaksi [Huang et al., Science, 259, 1742 - 45 (1993)]. LT- β -R-proteiinia blokeeraava

aine mLT- β -R-Fc ei inhiboinut IgG2a-vaihdosta näissä kokeissa. On mahdollista, että tämän keksinnön mukaiset LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet eivät blokeeraa tätä humoraalista puolta Th1-soluvälitteisessä vasteessa. Lisäksi mLT- β -R-Fc-proteiinilla käsiteltyjen hiirten lymfosyyttien lisääntymiseen
 5 vaikuttavat vasteet eivät alentuneet (esimerkki 10; kuvio 7).

Nämä kokeet osoittavat, että hoito, joka perustuu tämän keksinnön mukaisten LT- β -R-proteiinia blokeeraavien aineiden antoon, ei vaikuta haitallisesti Th2-riippuvaisiin vasta-ainetuottotoimintoihin immuunivasteessa. Kuviossa 6 kuvattu vasta-ainevasteen normaalikuvio osoittaa myös, että intensiivinen hoito liukoisella mLT- β -R-Fc-proteiinilla ei ollut toksista hiirille, joka edelleen osoittaa tässä keksinnössä kuvattujen koostumusten ja menetelmien
 10 käyttökelpoisen hoitoluonteen.

T-auttajasoluvälitteiset taudit

Moniin elinspesifisiin autoimmuunitauteihin tuntuu sisältyvän patologinen Th1-vaste. Näistä tuloksista on julkaistu yhteenvetoja [Modlin ja Nutman, Current Opinion in Immunol., 5, 511 - 517 (1993); Romagnani et al., Ann. Rev. Immunol., 12, 227 - 257 (1994)]. Nämä elinspesifiset autoimmuunitaudit sisältävät pesäkekovettumataudin, insuliiniriippuvaisen sokeritaudin, sympaattisen silmätulehduksen, silmän keskikalvontulehduksen ja psoriasiken.
 15

Insuliiniriippuvainen diabetes mellitus on autoimmuunitauti, jossa insuliinia tuottavat haiman beetasolut tuhoutuvat sellaisten leukosyyttien toimesta, jotka tunkeutuvat Langerhansin saarekkeisiin. Sokeritauti voidaan indusoida nopeasti juurisyntyneissä ei-liikalihavissa sokeritautisissa (NOD) hiirissä siirtämällä aktivoituja esidiabeettisia splenosyyttejä. Äskettäin siirrettiin Th1- tai
 20 Th2-solujen kaltaisia soluja, jotka muutoin olivat geneettisesti samanlaisia, juurisyntyneisiin NOD-hiiriin. Vain Th1-solut indusoivat nopeasti sokeritaudin — ja lähes kaikissa vastaanottajissa [Katz et al., Science, 268, 1185 - 88 (1995)]. Tämä osoittaa, että tämän keksinnön mukaiset LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet — jotka voivat inhiboida Th1-soluvälitteisen immuunivasteen vaikutuksia in vivo — ovat käyttökelpoisia hoidettaessa tai ehkäistäessä
 25 insuliiniriippuvaista sokeritautia.

Useat systeemiset autoimmuunitaudit, sisältäen erilaiset niveltulehdukset, ovat Th1-soluun liittyviä. Nivelreuma ja Sjorgrenin oireyhtymä tuntuvat molemmat sisältävän Th0- ja Th1-soluja. Tälle päinvastaisesti systeeminen punahukka (SLE) tuntuu sisältävän poikkeavan Th0/Th2-dominoidun vasteen.
 30
 35

Jotkin krooniset tulehdustaudit tuntuvat myös sisältävän poikkeavan Th1-tyyppisen vasteen, sisältäen suolistotulehdusoireyhtymän, keuhkojen sarkoidoosin ja allograftihyljinnän. Ihmisillä suolistotulehdusoireyhtymä (IBD) sisältää ainakin kaksi kategoriaa, haavaisen paksusuolentulehduksen ja Crohnin taudin. Molempien tautien uskotaan johtuvan immunopatologisista autoimmuuniuden kaltaisista häiriöistä. Joissakin IBD-hiirimalleissa on selvää, että jotkin aineet, jotka blokeeraavat Th1-vasteet, voivat blokeerata taudin kehittymisen tai kulun [F. Powrie et al., *Immunity*, 1, 553 (1994)]. On mahdollista, että immuunivasteen Th1-komponentin inhibitiolla olisi edulliset vaikutukset ihmisen IBD-taudissa. Monia IBD-malleja on kuvattu ja niistä on julkaistu yhteenveto [C. Elson et al., *Gastroenterology*, 109, 1344 (1995)]. On olemassa ainakin kolme malliryhmää, kemiallisesti indusoitu, polymeeri/mikrobi-indusoitu ja immunologiset tyypit, joissa käytetään mutanttihiiriä.

Eräässä yleisesti käytetyssä polymeeri/mikrobi-indusoidussa mallissa lisätään hiirten juomaveteen dekstraanisulfaattiliuosta ja nielemisen aikana suolen epiteelikerros ärtyy, joka johtaa huomattavaan immuunivasteeseen vauriota kohtaan. Eläimille kehittyy paksusuolentulehdus, joka ilmenee ripulina, veriulosteina, kehon painon menetyksenä ja paksusuolen pituuden lyhentymisenä, joka johtuu paksusuolen seinämän laajenemisesta. Tämä malli indusoi vasemmanpuolisen paksusuolentulehduksen ja epiteelin kasvuhäiriön, jotka voivat johtaa syöpään, jotka ovat ominaisia haavaiselle paksusuolentulehdukselle.

Toinen malli sisältää CD4 T -solujen valitun ryhmän siirrostamisen scid-hiireen, se on hiireen, jolta puuttuu T- ja B-solut [F. Powrie et al., *International Immunology*, 5, 1461 - 1471 (1993); Morrissey et al., *J. Exp. Med.*, 178: 237 (1993)]. Kun valitut solut, joita kutsutaan CD45RB^{hi}-soluiksi, lisääntyvät ja muodostavat uudelleen scid-hiiren, normaalit mekanismit, jotka estävät autoreaktiivisten T-solujen ilmaantumisen, ovat toiminnallisesti häiriintyneet ja autoreaktiivisia soluja ilmestyy. Rotissa havaitaan monia sellaisia soluja, jotka reagoivat monien elinten kanssa, kun taas hiirissä reaktiivisuus tapahtuu pääasiassa suolistossa. Aineet, jotka joko muuttavat autoreaktiivisten solujen lisääntymis- ja kehittymistä, tai aineet, jotka voivat blokeerata solujen kyvyn hyökätä suolta vastaan, ovat tehokkaita tässä mallissa. Lisäksi kun tämä malli ainakin osittain matkii autoreaktiivisen immuunisysteemin solujen patologista kehittymistä käsittelyillä, jotka blokeeraavat tämän mallin, voi todellisuudessa olla tautia modifioiva käyttäytyminen ihmisissä. Tässä mallissa

vasta-aineet TNF-proteiinia vastaan voivat blokeerata taudin [F. Powrie et al., Immunity, 1, 552 (1994)] ja näiden vasta-aineiden on havaittu olevan tehokkaita ihmisen taudin hoidossa [H.M. van Dullemen et al., Gastroenterology, 109, 109 (1995)]. Näin ollen tällä mallilla voidaan ennustaa, mitkä aineet voivat olla

5 terapeuttisesti käyttökelpoisia IBD-taudissa. Lisäksi koska CD45RB-malli on esimerkki Th1-välitteisestä tautiprosessista ja koska malli todellakin rotissa johtaa tautiin monissa elimissä, LT- β -R-Ig-proteiinin tehokkuus tässä systeemissä osoittaa, että LT- β -R-Ig-proteiini tai muut keinot, joilla LT- β -R-proteiinin interaktiot ligandinsa kanssa blokeerataan, voivat olla edullisia suuressa jou-

10 kossa immunologisia sukulaistauteja.

Yleisesti auto-vasta-aineiden tarkkaa roolia verrattuna spesifisiin T-soluihin näissä autoimmuunitaudeissa ei ole kuvattu. Soluvasteet voivat olla pääasiallisena syynä patogeenisuuteen niissä systeemisissä autoimmuunitaudeissa, joiden ajatellaan olevan pääasiassa vasta-aineen aiheuttamia,

15 esim. erilaisissa niveltulehduksissa.

Normaali immuunivaste joitakin patogeenisiä infektioaineita vastaan synnyttää myös Th1-vasteen, joka voi tulla liian suureksi ja aiheuttaa itse terveysongelman. Esimerkit sellaisista granulomatoosisista reaktioista (yllä kuvattu DTH-vasteluokka), jotka johtavat vakaviin terveysongelmiin, sisältävät lepran, granuloomien muodostumisen tuberkuloosipotilaiden keuhkoihin, sarkoidoosin ja halkiomatotaudin [Roitt et al., Immunology, 22.5 - 6 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. painos, (1993)]. Psoriasis on myös todennäköisesti Th1-solujen välittämä.

20

Sytolyttiset T-solut, se on CTL-solut (CD8-positiiviset T-solut), voivat myös jakautua Th1- ja Th2-tyyppisiin populaatioihin. Sen vuoksi on mahdollista, että suuri osa siitä, mitä tiedetään Th-ryhmistä, pitää paikkansa myös CD8+-solujen suhteen, jotka ottavat pääasiassa osaa viruksen vastaisiin ja siirretyn kudoksen hyljintävasteisiin.

25

Hoidot LT- β -R-proteiinia blokeeraavilla aineilla

Tämän keksinnön mukaiset koostumukset annetaan tehokkaana annoksena tietyn tutkittavan kliinisen tilan hoitamiseksi. Suositeltavan farmaseuttisen koostumuksen ja terapeuttisesti tehokkaan annosohjelman määrittäminen tietyllä sovellukselle on alan asiantuntijoiden tiedossa, kun otetaan huomioon esimerkiksi potilaan kunto ja paino, halutun hoidon laajuus ja potilaan toleranssi hoidolle. Annoksien, jotka ovat noin 1 mg/kg liukoista LT- β -R-proteiinia, odotetaan olevan sopivia aloitusannoksia hoitoannosten optimoimiseksi.

30

35

Terapeuttisesti tehokkaan annoksen määrittäminen voidaan suorittaa myös suorittamalla *in vitro* kokeet, joilla mitataan LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen se konsentraatio, joka tarvitaan kohdesolujen (LT- β -R-proteiini- tai LT-ligandiposiitivisten solujen riippuen blokeeraavasta aineesta) päällystämiseksi 1 - 14 vuorokaudeksi. Tässä kuvattuja reseptori-ligandisitomiskokeita voidaan käyttää solupäällystysreaktion tarkkailemiseksi. LT- β -R-proteiini- tai LT-ligandiposiitiviset solut voidaan erottaa aktivoituneista lymfosyyttipopulaatioista käyttäen FACS-analyysiä. Näiden *in vitro* sitomiskokeiden tulosten perusteella voidaan valita LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen konsentraatioarajat, joilla testataan eläimet tässä kuvattujen testien mukaisesti.

Tämän keksinnön mukaisten liukoisten LT- β -R-molekyylien, anti-LT-ligandi-vasta-aineiden ja anti-LT- β -R-vasta-aineiden anto yksinään tai yhdistelmänä, jotka sisältävät vasta-aineiden tai kompleksien, niiden suolojen tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien johdosten eristetyt ja puhdistetut muodot, voidaan suorittaa käyttäen mitä tahansa tavanomaisesti hyväksyttyä sellaisten aineiden antotapaa, joilla on immunosuppressiivista aktiivisuutta.

Näissä hoidoissa käytettävät farmaseuttiset koostumukset voivat myös olla erilaisissa muodoissa. Nämä sisältävät esimerkiksi kiinteät, puolikiinteät ja nestemäiset annosmuodot, kuten tabletit, pillerit, jauheet, nestemäiset liuokset tai suspensiot, peräpuikot ja injektoitavat ja infusoitavat liuokset. Suositeltava muoto riippuu ajatellusta antotavasta ja terapeuttisesta sovelluksesta. Antotavat voivat sisältää suun kautta annon, parenteraalisen annon, ihonalaisen annon, laskimoon annon, vaurionsisäisen annon tai paikallisen annon.

Tämän keksinnön mukaiset liukoiset LT- β -R-molekyylit, anti-LT-ligandi- ja anti-LT- β -R-vasta-aineet voidaan esimerkiksi laittaa steriileihin isotonisiin formulaatioihin yhdessä sellaisten kofaktorien kanssa, jotka stimuloivat ottoa tai stabiilisuutta, tai ilman niitä. Formulaatio on suositeltavasti nestemäinen tai se voi olla lyofilisoitua jauhetta. Tämän keksinnön mukaiset liukoiset LT- β -R-molekyylit, anti-LT-ligandi- ja anti-LT- β -R-vasta-aineet voidaan esimerkiksi laimentaa formulaatiopuskurilla, joka sisältää 5,0 mg/ml sitruunahappomonohydraattia, 2,7 mg/ml trinitriumsitraattia, 41 mg/ml mannitolia, 1 mg/ml glysiiniä ja 1 mg/ml polysorbaatti 20 -yhdistettä. Tämä liuos voidaan lyofilisoida, varastoida jääkaapissa ja liuottaa uudelleen ennen antoa steriiliin Water-for-Injection-liuokseen (USP).

Koostumukset sisältävät myös suositeltavasti tavanomaisia alalla hyvin tunnettuja farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia (katso esimerkiksi Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. painos, 1980, Mac Publishing Company). Sellaiset farmaseuttisesti hyväksyttävät kantajat voivat sisältää
 5 muita lääkeaineita, kantajia, geneettisiä kantajia, adjuvantteja, täyteaineita jne., kuten ihmisen seerumialbumiinia tai plasmavalmisteita. Koostumukset ovat suositeltavasti yksittäisannosmuodossa ja ne annetaan tavallisesti yhden tai useamman kerran vuorokaudessa.

Tämän keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset voidaan
 10 myös antaa käyttäen mikropallosia, liposomeja, muita mikropartikkeliantosysteemejä tai jatkuvavapautteisia formulaatioita, jotka asetetaan vaurioituneisiin kudoksiin, lähelle niitä tai kudokseen, joka on muuten niihin yhteydessä, tai verenkiertoon. Sopivat esimerkit jatkuvavapautteisista kantajista sisältävät puoliläpäisevät polymeerimatriksit, jotka ovat muotoiltujen tuotteiden muo-
 15 dossa, kuten peräpuikkoina tai mikrokapseleina. Istutettavat tai mikrokapseli-muotoiset jatkuvavapautteiset matriksit sisältävät polylaktidit (US-patentti nro 3 773 319; EP 58 481), L-glutamiinihapon ja etyyli-L-glutamaatin kopolymeerit [Sidman et al., Biopolymers, 22, 547 - 556 (1985)]; poly(2-hydroksietyyli-metakrylaatin) tai etyleenivinyylisetaatin [Langer et al., J. Biomed. Mater.
 20 Res., 15, 167 - 277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12, 98 - 105 (1982)].

Liposomit, jotka sisältävät tämän keksinnön mukaisia liukoisia LT- β -R-molekyyliä, anti-LT-ligandi- ja anti-LT- β -R-vasta-aineita yksinään tai yhdistelminä, voidaan valmistaa hyvin tunnetuilla menetelmillä [katso esim. DE 3 218 121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3688 - 92 (1985);
 25 Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4030 - 4034 (1980); US-patentit nro 4 485 045 ja 4 544 545]. Liposomit ovat tavallisesti pientä (noin 200 - 800 Å) unilamellaarista tyyppiä, jossa lipidimäärä on suurempi kuin noin 30 mooli-% kolesterolia. Kolesterolin osuus valitaan liukoisen LT- β -R-molekyylin, anti-LT-ligandi- ja anti-LT- β -R-vasta-aineen optimaalisen vapautumis-
 30 nopeuden kontrolloimiseksi.

Tämän keksinnön mukaiset liukoiset LT- β -R-molekyylit, anti-LT-ligandi- ja anti-LT- β -R-vasta-aineet voidaan myös kiinnittää liposomeihin, jotka sisältävät muita LT- β -R-proteiinia blokeeraavia aineita, immunisuppressiivisia aineita tai sytokiineja LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aktiivisuuden moduloimi-
 35 seksi. LT- β -R-molekyylien, anti-LT-ligandi- ja LT- β -R-vasta-aineiden kiinnittäminen liposomeihin voidaan suorittaa millä tahansa tunnetulla ristositoja-ai-

neella, kuten heterobifunktionaalisilla ristositoja-aineilla, joita on laajasti käytetty toksiinien tai kemoterapeuttisten aineiden koplaamiseksi vasta-aineisiin kohdennettua kuljetusta varten. Konjugaatio liposomeihin voidaan suorittaa myös käyttäen hiilihydraattiohjattua ristositoja-ainetta 4-(4-maleimidofenyylivoihapohydratsidia (MPBH)[Duzgunes et al., J. Cell. Biochem., Abst. Suppl. 16E 77 (1992)].

LT- β -R-proteiinia blokeeraavia aineita sisältävien terapeuttisten koostumusten edut

10 Tämän keksinnön mukaiset LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet kykenevät selektiivisesti inhiboimaan Th1-soluriippuvaisia, mutta ei Th2-soluriippuvaisia, immuuniefektorisysteemejä. LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet ovat käyttökelpoisia hoidettaessa tiloja, jotka pahentuvat Th1-tyyppisten sytokiinien (esim. IL-2- ja IFN- γ -sytokiinien) toimesta. Koska Th1-sytokiinit voi-
15 vat inhiboida Th2-soluriippuvaiset vasteet, LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet voivat myös epäsuorasti stimuloida tiettyjä Th2-soluriippuvaisia vasteita, joita normaalisti inhiboi Th1-indusoidut sytokiinikaskadit.

Kyky selektiivisesti suppressoida Th1-soluvasteet (tai epäsuorasti stimuloida Th2-soluriippuvaiset vasteet) on käyttökelpoinen hoidettaessa epä-
20 normaaliuksia erilaisissa soluvälitteisissä immuunivasteissa, jotka sisältävät erilaiset autoimmuuni- ja krooniset tulehdustilat, antigeenin toleranssin ja kudossiirteiden ja elinsiirrännäisten soluhyljinnän.

Kuten yllä on kuvattu, Th1-soluperusteisten immuunitilojen hoitoon käytetään yleensä immunomodulatorisia ja immunosuppressiivisia aineita, joil-
25 la on pleiotrooppiset vaikutukset suureen joukkoon erilaisia solutyyppejä ja immunologisia vasteita. Näitä epäspesifisiä immunosuppressiivisia aineita tarvitaan yleensä korkeina ja usein sytotoksisina annoksina, jotka aiheuttavat haitallisia sivuvaikutuksia.

Kykyä muuttaa immunologisen vasteen ominaisuutta tukee äs-
30 kettäin tehty hiiren sokeritaudin tutkimus, josta on keskusteltu yllä [Katz et al., Science, 268, 1185 - 1188 (1995)], ja allogeenisiirrännäismalli [Sayegh et al., J. Exp. Med., 181, 1869 - 1874 (1995)]. Jälkimmäisessä tutkimuksessa fuusio-
proteiinin, joka blokeeraa CD28-B7 T -solun kostimulatorisen reitin, osoitettiin indusoivan munuaissiirrännäistoleranssin. Toleranssi korreloi Th1-sytokiinien
35 alenemisen ja Th2-sytokiinien nousemisen kanssa *in vivo*. Nämä tulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaiset LT- β -R-proteiinia blokeeraavat ai-

neet ovat käyttökelpoisia suppressoitaessa kudossiirteiden ja elinsiirrännäisten soluhyljintää inhiboimalla Th1-soluvälitteinen sytokiinivapautus.

Tämän keksinnön mukaisten koostumusten ja menetelmien sisältämiä LT- β -R-proteiinia blokeeraavia aineita voidaan modifioida niin, että saadaan haluttu LT- β -T-proteiinin signaalintitaso hoidettavasta tilasta, häiriöstä tai taudista riippuen. Ajatellaan, että LT- β -R-proteiinin signaloinnin absoluuttista tasoa voidaan hienosäätää manipuloimalla LT- β -R-proteiinia blokeeraavien aineiden konsentraatioita ja affiniteetteja niiden vastaavia molekyylikohteita vastaan.

10 Esimerkiksi eräässä tämän keksinnön mukaisessa suoritustavassa koostumukset, jotka sisältävät liukoisia LT- β -R-molekyyliä, annetaan potilaalle. Liukoinen LT- β -R-reseptori voi tehokkaasti kilpailla solun pinnan LT- β -reseptorien kanssa sitoutumisesta pinnan LT-ligandeihin. Kyky kilpailla pinnan LT-ligandien kanssa riippuu liukoisten ja solupinnan LT- β -R-molekyylien suhteellisista konsentraatioista ja niiden suhteellisista affiniteeteista ligandin sitoutumisen suhteen.

Liukoiset LT- β -R-molekyylit, jotka sisältävät mutaatiot, jotka kohottavat tai alentavat sen liukoisen LT- β -R-mutanttiproteiinin sitoutumisaffiniteettia pinnan LT-ligandiin, voidaan tehdä käyttäen standardeja yhdistelmä-
20 DNA-menetelmiä, jotka alan asiantuntijat hyvin tuntevat. Suuri määrä molekyyliä, joissa on kohdennetut tai umpimähkäiset mutaatiot, voidaan testata niiden kyvyn suhteen toimia LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina käyttäen rutiineja kokeita ja tässä kuvattuja menetelmiä.

Samalla tavalla toisessa tämän keksinnön mukaisessa suoritustavassa vasta-aineet, jotka on suunnattu joko LT- β -reseptoria tai yhtä tai useampaa LT-ligandialayksikköä vastaan, toimivat LT- β -R-proteiinia blokeeraavina aineina. Näiden vasta-aineiden kykyä blokeerata LT- β -reseptorin signaali voidaan modifioida mutatoimalla, kemiallisella modifikaatiolla tai muilla menetelmillä, jotka voivat vaihdella sitä vasta-aineen tehokasta konsentraatiota tai
30 aktiivisuutta, joka potilaalle annetaan.

Kyky pienentää LT- β -R-proteiinin signaaliota ilman että sitä täysin inhiboidaan, voi olla tärkeää sellaisten LT- β -R-proteiinin signaloinnin alentuneiden tasojen aikaansaamiseksi tai säilyttämiseksi, jotka tukevat normaalia immuunitoimintaa niin, että samalla inhiboidaan Th1-soluvälitteiset vasteet,
35 jotka ovat liioiteltuja tai epänormaaleja.

LT- α -geenin hajotus hiiressä johtaa epänormaaliin perifeerisen lymfoidielimen kehitykseen [De Togni et al., Science, 264, 703 - 707 (1994)]. Sellaisilta hiiriltä puuttuu imusolmukkeet ja niiden pernoista puuttuu yleensä selvä follikkelien välinen T- ja B-solurikkaiden alueiden raja. Uskomme, että
 5 tämä fenotyyppi assosioituu pinnan LT-indusoidun LT- β -R-proteiinin signa-
 loinnin häviämiseen, koska samanlaisia fenotyyppisiä ei ole havaittu TNF-R-
 proteiinin aktiivisuutta moduloimalla. Kyky selektiivisesti tai osittain blokeerata
 LT- β -R-reitti voi näin ollen olla käyttökelpoinen hoidettaessa epänormaalia
 lymfoidielimen kehitystä, joka assosioituu LT- β -R-reitin signaaloinnin epänor-
 10 maaliin tai yliekspressioon.

Jotkin Th1-assosioituneet reaktiot ovat kriittisiä komponentteja useissa soluvälitteisissä immuunivasteissa [Romagnani, S., Ann. rev. Immunol., 12, 227 - 257 (1994)] ja Th1-soluaktiivisuuden täydellinen inhibitio ei ehkä ole toivottavaa tietyissä tapauksissa. Esimerkiksi hiiri voi tehokkaasti
 15 vastustaa loisinfektiota, kun saadaan aikaan hyvä Th1-vaste. Infektiiviset
 organismit, kuten Listeria ja Toxoplasma, saavat myös aikaan vahvat Th1-
 tyyppiset vasteet. Ihmisillä Mycobacterium tuberculosis -bakteeria vastaan
 olevat vasteet tuntuvat olevan Th1-perusteisia. Leishmaniaasin patogeneesi
 korreloi vasteisiin, jotka ovat samanlaisia kuin Th1-vasteet, jotka on karak-
 20 terisoitu hiiressä [Reed ja Scott, Current Opinion in Immunol., 5, 524 - 531
 (1993)].

Kyky vaikuttaa Th1-inhibition tasoon blokeeraamalla LT- β -R-protei-
 nin signaointi voi olla tärkeää maksimoitaessa ne edulliset vaikutukset, jotka
 voidaan saada aikaan hoidettaessa tämän keksinnön mukaisilla LT- β -R-pro-
 25 teiinia blokeeraavilla aineilla.

Seuraavat ovat esimerkkejä, jotka kuvaavat tämän keksinnön mu-
 kaisia liukoisia LT- β -reseptoreita, anti-LT-ligandeja ja anti-LT- β -R-vasta-aineita
 ja menetelmiä, joita käytetään niiden karakterisoimiseksi. Näitä esimerkkejä ei
 tule pitää rajoittavina: esimerkit on sisällytetty kuvaavia tarkoituksia varten ja
 30 esillä olevaa keksintöä rajoittavat vain patenttivaatimukset.

Esimerkki 1

Ihmisen liukoisten LT- β -reseptorien valmistus immunoglobuliini-Fc-fuusioproteiineina

Ihmisen cDNA-kloonin sekvenssi, joka eristettiin ihmisen trans-
 35 kriptoitujen 12p-sekvenssien kirjastosta, joka oli peräisin somaattisten solujen

hybridistä [Baens et al., Genomics, 16, 214 - 218 (1993)], vietiin GenBank-kirjastoon ja tunnistettiin myöhemmin sekvenssiksi, joka koodittaa ihmisen LT- β -R-proteiinia. Tämän ihmisen täyspitkän LT- β -R-cDNA-kloonin sekvenssi on ollut saatavissa vuodesta 1992 lähtien GenBank-koodinumerolla L04270.

- 5 LT- β -R-proteiinin solunulkoinen domeeni membraanin läpi menevään alueeseen asti (kuvio 1) amplifioitiin PCR-menetelmällä cDNA-kloonista käyttäen alukkeita, joihin oli lisätty NotI- ja Sall-restriktioentsyymikohdat niiden 5'- ja 3-päihin, vastaavasti [Browning et al., J. Immunol., 154, 33 - 46 (1995)]. Amplifioitu tuote katkaistiin NotI- ja Sall-entsyymeillä, puhdistettiin ja ligoitiin
- 10 NotI-entsyymillä linearisoituun vektoriin pMDR901 yhdessä sellaisen Sall-NotI-fragmentin kanssa, joka kooditti ihmisen IgG1-proteiinin Fc-alueen. Tuloksena syntynyt vektori sisälsi dihydrofolaattireduktaasigeenin ja LT- β -R-fuusioproteiinin, joita ohjasi kaksi erillistä promootoria.

- Vektori elektroporoitiin CHO dhfr⁻-soluihin ja metotreksaattiresistens-
- 15 tit kloonit eristettiin standardimenetelmin. LT- β -R-Fc-proteiinia eritettiin alustaan ja ELISA-testiä käytettiin sellaisten solulinjojen selektioimiseksi, jotka tuottivat korkeimman reseptorifuusioproteiinin tason. Korkeatuottoista solulinjaa kasvatettiin suurina määrinä ja käytetty alusta kerättiin. Puhdas LT- β -reseptorifuusioproteiini eristettiin Proteiini A Sepharose Fast Flow -affiniteetikromatografialla (Pharmacia).
- 20

Esimerkki 2

Hiiren liukoisten LT- β -reseptorien tuotto immunoglobuliini-Fc-fuusioproteiineina

- mLT- β -R-proteiinin täydellinen cDNA-klooni valmistettiin ligoimalla
- 25 5' NotI/ApaLI ja 3' ApaLI/NotI -fragmentit kahdesta osittaisesta cDNA-isolaatista NotI-kohtaan pCDNA3-vektoriin (InVitrogen, San Diego, CA). Tämän cDNA-kloonin sekvenssi on saatavissa GenBank-koodinumerolla U29173. Mitään koodittavan alueen sekvenssieroja ei havaittu, kun niitä verrattiin toiseen mLT- β -R-sekvenssiin, joka löytyy GenBank-koodinumerolla L38423.

- 30 Liukoinen mLT- β -R (hIgG1) -fuusioproteiini valmistettiin amplifioimalla PCR-menetelmällä käyttäen templaattina täyspitkää mLT- β -R-cDNA-kloonin alukkeita 5' AACTGCAGCGGCCCGCCATGCGCCTGCCC 3' JA 5' GACTTTGTGCGACCATGCTCCTGGCTCTGGGGG 3'. Amplifioitu tuote puhdistettiin ja katkaistiin NotI- ja Sall-entsyymeillä ja ligoitiin ihmisen IgG1-Fc-
- 35 DNA:n Sall/NotI-fragmentin kanssa NotI-linearisoituun ja fosfataasilla käsitel-

tyyn vektoriin SAB132 plasmidin JLB 122 muodostamiseksi. Stabiilia ekspres-
 siota varten NotI-kasetti, joka sisälsi mLT- β -R-Fc-fragmentin, siirrettiin NotI-
 kohtaan vektorissa pMDR901 plasmidin PSH001 muodostamiseksi ja vektori
 transfektoitiin CHO-soluihin, kuten on kuvattu [Browning et al., J. Immunol.,
 5 154, 33 -46 (1995)]. Solukloonit, jotka erittivät mLT- β -R-Fc-proteiinia,
 tunnistettiin ELISA-analyysillä. Puhdistettu reseptorifuusioproteiini eristettiin
 CHO-solujen supernatanteista Protein A Sepharose Fast Flow -kromatografial-
 la (Pharmacia).

Esimerkki 3

10 Ihmisen liukoisen LT- β -R-Fc-proteiinin käyttö LT- β -reseptori-ligandi-in- teraktioiden blokeeraamiseksi

Liukoista hLT- β -R-Fc-proteiinia testattiin sen kyvyn suhteen blokee-
 rata LT-ligandin sitoutuminen LT- β -reseptoriin kasvainsolusytotoksisuustestis-
 sä, joka on kuvattu yllä. Tässä testissä LT-ligandin liukoista muotoa (hLT-
 15 α 1/ β 2), joka aktivoi LT- β -R-proteiinin signaloinnin, käytetään tappamaan ihmi-
 sen kasvainsolut. LT- β -R-proteiinin signaloinnin inhibiittorit voivat alentaa LT-
 β -R-proteiinin indusoimaa kasvainsolusytotoksisuutta.

Liukoiset LT- α 1/ β 2-ligandit sisältävät lyhennetyt tai modifioituneet LT-
 β -alaisyksiköt, joista puuttuu toiminnallinen membraanin läpi menevä domeeni.
 20 Liukoiset LT- α 1/ β 2-ligandit sitoutuvat LT- β -R-proteiiniin ja stimuloivat sen sig-
 naloinnin yhtä hyvin kuin LT-ligandin pintamuodot [Browning et al., J.
 Immunol., 154, 33 - 46 (1995)].

hLT- α 1/ β 2-, hNTF- tai hLT- α -proteiinien sarjalaimennokset valmis-
 tettiin 0,05 ml:n 96-kuoppaisille levyille ja lisättiin 5 000 trypsinoitua HT29-
 25 solua (ATCC) 0,05 ml:ssa alustaa, joka sisälsi 80 U/ml (viruksen vastaista
 yksikköä) ihmisen IFN- γ -proteiinia. Neljän vuorokauden kuluttua MTT-väriä mi-
 tokondriaalinen pelkistyminen mitattiin seuraavasti: 10 μ l MTT-väriä lisättiin ja
 kolmen tunnin kuluttua pelkistynyt väri liuotettiin 0,09 ml:lla isopropanolia niin,
 että läsnä oli 10 mM HCl:ia, ja mitattiin OD-arvo 550 nm:ssa. Liukoiset resep-
 30 torimuodot tai ihmisen puhdas IgG-proteiini lisättiin 10 μ l:ssa ennen solujen
 lisäämistä niin, että niiden loppukonsentraatioksi tuli 5 μ g/ml.

Taulukossa 1 verrataan hLT- β -R-Fc- ja p55-TNF-R-Fc-kimeerien
 (käyttäen ihmisen IgG-proteiinia verrokkina) kykyä blokeerata erilaisten liu-
 koisten TNF- ja LT-ligandien inhibitorisia vaikutuksia HT29-kasvainsolun kas-
 35 vuun.

Taulukko I

LT- β -R- ja p55-TNF-R-immunoglobuliinifuusioproteiinien kyky blokeerata erilaisten TNF- ja LT-ligandien inhibitoriset vaikutukset HT29-solujen kasvuun

5

Sytotoksisen aineen konsentraatio (ng/ml), joka johtaa 50 %:n kasvun inhibitioon			
Kun läsnä on ^a			
Sytotoksinen aine	Ihmisen verrokki-IgG	p55-TNF-R-Fc	LT- β -R-Fc
TNF	0,08	> 10 ^b	0,08
LT- α	3	> 1 000	3
LT- α 1/ β 2	5	5	> 200

^aKukin sytotoksinen aine sekoitettiin ensin Ig-fuusioproteiinien kanssa 10 minuutiksi ennen solujen lisäämistä. Fuusioproteiinin loppukonsentraatio oli 5 μ g/ml.

^bKorkeampia konsentraatioita ei testattu.

10

Taulukon 1 tulokset osoittavat, että ihmisen liukoinen LT- β -R-fuusioproteiini (hLT- β -R) voi tehokkaasti blokeerata interaktion LT-ligandin (LT- α 1/ β 2) ja solupinnan LT- β -reseptorien välillä ja on näin ollen tämän keksinnön mukainen LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine.

15

Kuten odotettua, liukoinen TNF-R-fuusioproteiini (p55-TNF-R-Fc) blokeerasi täydellisesti TNF-proteiinin indusoiman kasvuninhibition sitoutumalla TNF-proteiiniin ja estämällä tämän interaktion pinnan TNF-reseptorien kanssa. Tällä liukoisella TNF-reseptorilla ei ollut mitään vaikutusta LT-ligandivälitteisiin lisääntymisen vastaisiin vaikutuksiin. Tälle päinvastaisesti LT- β -R-Fc blokeerasi LT-ligandin indusoimat sytotoksiset vaikutukset, mutta eivät TNF- tai LT- α -proteiinin indusoimia. Näin ollen ihmisen liukoiset LT- β -R-fuusioproteiinit eivät häiritse TNF- ja LT- α -ligandien aiheuttamaa TNF-R-proteiinin aktivaatiota.

20

Esimerkki 4

25

Hiiren liukoisen LT- β -R-Fc-proteiinin käyttö hiiren LT- β -reseptori-ligandi-interaktioiden blokeeraamiseksi

Ihmisen IgG1-Fc-domeeniin koplattu hiiren liukoinen LT- β -reseptori (mLT- β -R-Fc; katso esimerkki 2) testattiin sen kyvyn suhteen blokeerata LT- β -

reseptori-ligandi-interaktio hiiressä käyttäen sytotoksisuustestiä hiiren soluissa (kuvio 2). Sytotoksisuustesti suoritettiin WEHI 164 -soluissa käyttäen oleellisesti samaa menetelmää, jota käytettiin esimerkissä 3 kuvatussa HT29-solutestissä [katso myös Browning ja Ribolini, J. Immunol., 143, 1859 - 1867 (1989)].

Kuvio 2 esittää mLT- β -R-Fc-proteiinin vaikutukset ligandin indusoimaan LT- β -R-proteiinin signalointiin hiiren WEHI 164 -soluissa. Kuten tämä testi osoittaa, WEHI 164 -solut kuolevat, kun niitä käsitellään LT- α/β -ligandikonsentraatioilla, jotka vaihtelevat välillä, joka on noin 1 - 100 ng/ml. Liukoinen mLT- β -R-Fc-proteiini (10 μ g/ml) blokeeraa LT-ligandin aktivoiman solukuoleman. Hiiren liukoisen p55-TNF-R-Fc-fuusioproteiinin tai IgG-verrokkivasta-aineiden lisäyksellä (kutakin 10 μ g/ml) oli vain vähän vaikutusta solukuoleman blokeeraamiseen tai vaikutusta ei ollut ollenkaan. Nämä tulokset osoittavat, että mLT- β -R-Fc-fuusioproteiini voi kilpailla tehokkaasti pinnan LT- β -R-molekyylien kanssa LT-ligandin sitoutumisesta. Nämä tulokset osoittavat myös, että LT- α/β -indusoima sytotoksisuus on LT- β -R-proteiinivälitteinen ja että se voidaan inhiboida liukoisella mLT- β -R-Fc-proteiinilla, joka toimii esillä olevan keksinnön mukaisena LT- β -R-proteiinia blokeeraavana aineena.

Esimerkki 5

20 Anti-ihmis-LT- β -R-vasta-aineiden käyttö LT- β -reseptori-ligandi-interaktioiden blokeeraamiseksi

Hiiren monoklonaaliset vasta-aineet (mAb), jotka oli suunnattu ihmisen LT- β -reseptoria vastaan, valmistettiin immunisoimalla RBF-hiiret toistuvasti vatsaontelonsisäisesti adjuvantin poissa ollessa CHO-soluista peräisin olevalla hLT- β -R-Fc-fuusioproteiinilla, joka oli kiinnitetty Protein A Sepharose-helmiin. Eläimille annettiin lopuksi tehosteannos liukoisella hLT- β -R-Fc-proteiinilla, sekä i.p. että i.v., pernasolut fuusioitiin klassisin menetelmin ja hybridoomasupernatantit seulottiin ELISA-menetelmällä [Ling et al., J. Interferon and Cytokine Res., 15, 53 - 59 (1995)]. Hybridoomasupernatantit seulottiin edelleen niiden kyvyn suhteen blokeerata aktivoitujen IL-23-hybridoomasolujen — jotka ekspressoivat pinnan LT- α 1/ β 2-kompleksia — sitoutuminen LT- β -R-Fc-proteiinilla päällystettyihin levyihin soluhuuhtomamenetelmällä. Puhtaat monoklonaaliset vasta-aineet valmistettiin IgG-proteiinien Protein A Sepharose -puhdistuksella (Pharmacia) viljelysupernatanteista.

Sen määrittämiseksi, voisiko monoklonaalinen anti-LT- β -reseptori-vasta-aine blokeerata LT- β -R-proteiinin signalointi, jonka aloittaa liukoisen LT-proteiinin sitoutuminen, suoritettiin kasvainsolusytotoksisuustesti käyttäen ihmisen WiDr-karsinoomasoluja. Sytotoksisuustesteissä valmistettiin sarjalai-

5 mennokset LT- α 1/ β 2-kompleksista 0,05 ml:aan 96-kuoppaisissa levyissä ja lisättiin 10 μ l liuosta, jonka konsentraatio oli 100 μ g/ml, joka sisälsi joko verrokkihiiren monoklonaalista IgG1-vasta-ainetta tai monoklonaalista anti-LT- β -reseptori-vasta-ainetta. Sitten kuhunkin kuoppaan lisättiin 5000 trypsinoitua WiDr-solua (ATCC) 0,05 ml:ssa alustaa, joka sisälsi 50 U/ml (viruksen vastai-

10 sia yksiköitä) ihmisen IFN- γ -proteiinia. Neljän vuorokauden kuluttua MTT-väriin mitokondriaalinen pelkistyminen mitattiin seuraavasti: 10 μ l MTT-väriä lisättiin ja kolmen tunnin kuluttua pelkistynyt väri liuotettiin 0,09 ml:lla isopropanolia niin, että läsnä oli 10 mM HCl:a, ja mitattiin OD-arvo 550 nm:ssa. Purppura-väriin määrä on verrannollinen solukasvun määrään.

15 Kuvio 3 esittää, että monoklonaalinen anti-LT- β -R-vasta-aine BDA8 toimii tämän keksinnön mukaisena LT- β -R-proteiinia blokeeraavana aineena. Ihmisen WiDr-karsinoomasolut lopettivat kasvamisen IFN- γ -proteiinin ja liukoisen LT- α 1/ β 2-ligandin läsnä ollessa (noin 0,05 - 50 ng/ml). IgG1-verrokivasta-aineella (10 μ g/ml) ei ollut mitään vaikutusta tähän kasvuinhibitioon.

20 Tälle päinvastaisesti, monoklonaalinen anti-LT- β -R-vasta-aine BDA8 (10 μ g/ml) palauttaa WiDr-solujen kasvukyvyyn liukoisen LT- α 1/ β 2-ligandin läsnä ollessa.

Esimerkki 6

Anti-ihmis-LT- β -vasta-aineiden käyttö reseptori-ligandi-interaktioiden blo-

25 **keeraamiseksi**

Monoklonaaliset anti-ihmis-LT- β -vasta-aineet valmistettiin immuni-soimalla RBF-hiiret pestyillä Protein A Sepharose-9E10-rLT- β -helmillä, jotka sisälsivät noin 1 - 2 μ g ihmisen LT- β -rekombinanttiproteiinia CFA:ssa, ja antamalla yksi tehosteannos samaa materiaalia IFA:ssa. Kahdeksan viikkoa

30 viimeisen tehosteen jälkeen hiirille annettiin i.v. 30 μ g puhdistettua liukoista rLT- β -proteiinia (eluoitu hapolla 9E10-resiinistä) ja 20 μ g samaa liukoista materiaalia kaksi vuorokautta myöhemmin. Vuorokausi toisen i.v. tehosteen jälkeen pernasolut fuusioitiin käyttäen klassisia menetelmiä monoklonaalisten vasta-aineiden muodostamiseksi. Hybridoomasupernatantit seulottiin suoraan

35 ELISA-menetelmällä tai PMA-aktivoitujen II-23-solujen FACS-värjäyksellä.

Puhtaat monoklonaaliset vasta-aineet valmistettiin IgG-proteiinien Protein A Sepharose Fast Flow -puhdistuksella viljelysupernatanteista (Pharmacia).

FACS-testiä käytettiin selektoimaan sellaiset LT- β -proteiinia vastaan suunnatut vasta-aineet, jotka kykenivät tehokkaasti blokeeraamaan liu-
 5 koisen LT- α/β -ligandin sitoutumisen LT- β -reseptoreihin solun pinnalla — näin
 matkien kahden solun välistä interaktiota *in vivo*. Tässä testissä ihmisen
 liukoisen LT- β -R-Fc-proteiinin (2 $\mu\text{g/ml}$) annettiin sitoutua pinnan LT-ligandiin
 PMA-aktivoiduissa II-23-soluissa [Browning et al., J. Immunol., 154, 33 - 46
 (1995)] niin, että läsnä oli kohoavat konsentraatiot testattavaa monoklonaalista
 10 anti-LT- β -vasta-ainetta (0,02 -20 $\mu\text{g/ml}$). Solut pestiin ja sitoutunut LT- β -R-Fc
 tunnistettiin antamalla reagoida aasin fykoerytriinileimatun anti-ihmis-IgG-
 proteiinin kanssa. Sitoutuneen fluoresoivan leiman määrä määritettiin FACS-
 analyysillä ja fluoresenssivoimakkuuden keskiarvo merkittiin.

Kuvio 4 esittää FACS-testin tulokset, jossa mitattiin monoklonaali-
 15 sen anti-LT- β -vasta-aineen B9 kykyä blokeerata LT- β -reseptori-ligandi-inter-
 aktio, kuten yllä on kuvattu. Tämä koe osoittaa, että monoklonaalinen anti-LT-
 β -vasta-aine B9 (0,02 - 5 $\mu\text{g/ml}$) voi spesifisesti ja tehokkaasti kilpailla solu-
 pinnan LT-ligandin sitoutumisesta liukoisen LT- β -R-fuusioproteiinin (2 $\mu\text{g/ml}$)
 kanssa ja näin ollen se on esillä olevan keksinnön mukainen LT- β -R-proteiinia
 20 blokeeraava aine.

Esimerkki 7

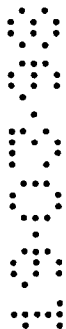
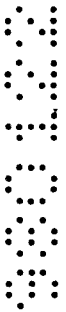
Anti-hiiri-LT- α/β -vasta-aineiden käyttö reseptori-ligandi-interaktioiden blo- keeraamiseksi

Hiiren liukoiset LT- α/β -kompleksit valmistettiin kuten yllä on kuvattu
 25 ihmisen liukoisille LT- α/β -komplekseille. Hiiren liukoinen LT- α -alayksikkö val-
 mistettiin perustuen aiemmin kuvattuun sekvenssi-informaatioon [Lawton et
 al., J. Immunol., 154, 239 - 246 (1995)]. Hiiren liukoisia LT- α/β -komplekseja
 ekspressoitiin käyttäen baculovirus/hyönteissoluekspressiosysteemiä ja LT-
 α/β -kompleksit eristettiin affiniteettikromatografialla käyttäen ihmisen p55 TNF-
 30 R ja LT- β -R-pylväitä oleellisesti, kuten on kuvattu yllä, ihmisen LT- α/β -
 kompleksien ekspressoimiseksi ja puhdistamiseksi. Armenianhamsterit immu-
 nisoitiin puhdistetulla liukoisella hiiren LT- α/β -kompleksilla oleellisesti, kuten
 on kuvattu esimerkissä 6. Hamsterin pernasolut fuusioitiin hiiren P3X-hybri-
 doomasolulinjaan, kuten on kuvattu [Sanchez-Madrid et al., Methods of
 35 Enzymology, 121, 239 - 244 (1986)]. Hybridoomat ryhmitettiin anti-mLT- α - tai

anti-mLT α -ryhmiin sen perusteella, minkälaiset niiden sitoutumisominaisuudet joko LT- α -kompleksiin tai LT- α -proteiiniin yksinään, vastaavasti, olivat. Hybridomasoluja laajennettiin ja vasta-aineet puhdistettiin viljelysupernatantista käyttäen Protein A -affiniteettikromatografiaa (Pharmacia).

- 5 Sen määrittämiseksi, voivatko hamsterin monoklonaliset anti-hiiri-LT- α - ja -LT- β -vasta-aineet blokeerata LT-ligandin sitoutumisen mLT- α -R-proteiiniin, käytimme TIMI-4-soluja (ATCC), joka on hiiren T-solulinja, joka ekspressoii pinnan LT-ligandia, kun oli aktivoitu PMA:lla 7 tuntia. Hamsterin monoklonalisia anti-mLT- α - tai anti-mLT- β -vasta-aineita esi-inkuboitiin solujen kanssa 30 minuuttia 4 °C:ssa ja sitten ne pestiin kahdesti. Pestyjä soluja
10 inkuboitiin 4 °C:ssa mLT- β -R-Fc-proteiinin kanssa, jonka konsentraatio oli 1 μ g/ml. 30 minuutin kuluttua solut pestiin vapaaksi sitoutumattomasta mLT- β -R-Fc-proteiinista ja sitten niitä inkuboitiin 30 minuuttia niin, että läsnä oli 10 μ g/ml aasin fykoerytriinileimattua anti-ihmis-IgG-proteiinia sitoutuneen mLT- β -
15 R-c-proteiinin havaitsemiseksi. Sitoutuneen fluoresenssileiman määrä määritettiin FACS-analyysillä ja laskettiin fluoresenssivoimakkuuden keskiarvo.

- Tätä analyysiä käyttäen havaittiin, että hamsterin monoklonaalinen anti-mLT- α -vasta-aine kykeni blokeeraamaan tehokkaasti liukoisen LT- β -reseptorin sitoutumisen T-solun pinnan LT-ligandiin. Tulokset on esitetty taulu-
20 kossa 2.



Taulukko 2

Monoklonaalisen anti-hiiri-LT- β -vasta-aineen kyky inhiboida mLT- β -R-Fc-proteiinin sitoutuminen hiiren LT-pintaligandiin

Monoklonaalisen vasta-aineen konsentraatio ($\mu\text{g/ml}$)	Anti-mLT- β (BB.F6)		Anti-mLT- α (AF. B3)	
	MFCI ^b	Inhibiitio-% ^c	MFCI ^b	Inhibiitio -% ^c
0 ^a	6	-	6	-
0	85	0	85	0
0,01	71	18	84	2
0,03	67	23	86	0
0,1	51	44	86	0
0,3	36	62	84	2
1,0	29	71	89	0
3,0	17	86	88	0
10,0	11	94	95	0
30,0	10	95	94	0
100,0	8	98	92	0

^aReseptoria ei lisätty.

5 ^bKeskiarvofluoresenssin kanavan numero.

^cInhibitioprosentti.

Esimerkki 8

10 **LT- β -R-proteiinia blokeeraavat aineet inhiboivat Th1-välitteistä kosketus-yliherkkyyttä hiiressä**

20 g:n painoiset naaraspuoliset Balb/c-hiiret (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) herkistettiin aluksi lisäämällä 25 μl liuosta, joka oli 0,5 % 2,4-dinitrofluoribentseeni (DNFB) liuoksessa, joka oli 4:1 v/v asetoni:oliiviöljy, kummankin takajalan pohjaan. 24 tuntia alkuherkistyksen jälkeen herkistimme jälleen kunkin hiiren 25 μl :lla samaa liuosta. Herkistykset suoritettiin samalla, kun nukuttamattomia hiiriä pideltiin paikoillaan. Vuorokautena 5 (120 tuntia alkuherkistyksen jälkeen) nukutimme hiiret ketamiini:ksylatsiinilla (i.p.) niin, että määrä oli 90:10 mg/kg, ja annoimme ei-ärsyttävän 10 μl annoksen 0,2 % DNFB-yhdistettä vasemman korvan selkä- ja sisäpinnoille. Oikeaan korvaan

annettiin samanlainen lisäys asetoni:oliiviöljyvehikkeliä niin, että määrä oli 4:1 v/v.

Neljä tuntia immuunivasteen herätyksen jälkeen annoimme hiirille kohoavat konsentraatiot mLT- β -R-Fc-proteiinia (0,08 - 5,0 mg/kg; esimerkki 2)
 5 0,1 ml:ssa fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta (PBS) laskimonsisäisellä injektioilla. Injektiot pelkällä PBS-puskurilla tai ihmisen IgG-fuusioproteiinilla (LFA3-Fc)[Miller et al., J. Exp. Med., 178, 211 - 222 (1993)], jonka konsentraatio oli 20 mg/kg, toimivat negatiiviverrokkeina. Injektio monoklonaalisella anti-VLA4-spesifisellä vasta-aineella, jonka konsentraatio oli 8 mg/kg (monoklonaalinen
 10 vasta-aine PS/2; Chisolm et al., Eur. J. Immunol., 23, 682 - 688 (1993)) — jonka tiedetään inhiboivan CHS:ää blokeeraamalla T-solujen virtauksen altistuskohtaan — toimi positiivisena verrokkina. 4 - 8 hiiren ryhmiä käsiteltiin kullakin vasta-ainekonsentraatiolla.

24 tuntia altistuksen jälkeen hiiret nukutettiin uudelleen ke-
 15 tamiini:ksylatsiinilla ja molempien korvien paksuus mitattiin insinöörimikrometrillä 10^{-4} tuuman tarkkuudella. Kunkin hiiren korvan turpoamisvaste oli ero sen verrokki- ja DNFB-altistetun korvan paksuuden välillä. Tyypilliset inhiboimattomat korvan turpoamisvasteet olivat $95 - 100 \times 10^{-4}$ tuumaa. Korvan turpoamisvasteen inhibitio määritettiin vertaamalla käsiteltyjä ryhmiä niiden negatiivisen verrokkiryhmän kanssa. Käsiteltyjen ryhmien tilastollisen merkittävyyden ero arvioitiin käyttäen yksisuuntaista varianssianalyysiä, jonka jälkeen suoritettiin Tukey-Kramer Honestly Significant Difference -tietokoneanalyysi (JMP, SAS Institute) käyttäen arvoa $< 0,05$.

Kuvio 5 esittää, että kohoavien mLT- β -R-Fc-proteiinin konsentraa-
 25 tioiden anto aiheuttaa merkittävän alenemisen korvan turpoamisvasteessa DNFB-käsitellyissä hiirissä verrattuna inhiboimattomiin DNFB-käsiteltyihin verrokkieläimiin (PBS ja LFA3-Fc). Liukoinen LT- β -R-proteiini (noin 1 - 5 mg/kg) voi blokeerata tämän kosketus-DTH-reaktion yhtä tehokkaasti kuin monoklonaalinen anti-VLA4-spesifinen vasta-aineinhibiittori. Se osa tässä korvan
 30 turpoamistestissä, joka ei inhiboidu, johtuu luultavasti "epäspesifisestä" granulosyyttien tunkeutumisesta.

Esimerkki 9

Dekstraanisulfaattiliuos-IBD-malli (DSS)

Hiiriä käsiteltiin vatsaontelonsisäisellä injektioilla, kuten on määritelty
 35 hLFA3-Ig-kuvion tekstissä, se tarkoittaa Ig-fuusioproteiiniverrokillä tai mLT β -R-

Ig-proteiinilla. Vuorokautena 0 juomavesi vaihdettiin 5 % dekstraanisulfaattiliuokseksi ja hiiret jätettiin tälle nesteelle yhdeksi viikoksi. Viikkoa myöhemmin, se on kaksi viikkoa DSS-annon jälkeen, hiiret lopetettiin ja niiden painon muutos ja paksusuolen pituus (peräaukosta umpisuoleen) mitattiin.

- 5 Kuvio __ esittää painon muutokset ja suolen pituudet eri käsittelyjen jälkeen. Lyhentynyt suolen pituus kuin myös painon menetys on osoitus IBD:stä. Havaittiin, että mLT β R-Ig-käsittely estää dramaattisesti paksusuolen lyhenemisen ja painon menetyksen, joka on osoitus tehokkuudesta.

- 10 Kuvio 6: Painon muutos, joka havaittiin 14 vuorokautta juomavedessä olevan DSS-annon aloituksen jälkeen, jota seurasi eri käsittelyt. Veh = vehikkeli, LTBr ja LFA3 viittaavat mLT β R-Ig- ja hLFA3-Ig-fuusioproteiineihin, jotka annettiin vatsaontelonsisäisellä injektioilla, joka oli 100 μ g, yhtä viikkoa ennen DSS-lisäystä, DSS-annon kohdalla ja yhtä viikkoa myöhemmin (se on, kolme injektioita viikkoina -1, 0 ja 1). Kussakin ryhmässä oli kymmenen hiirtä.

- 15 Kuvio 7: Paksusuolen pituus 14 vuorokautta DSS-annon jälkeen, jota seurasi ne eri käsittelyt, jotka on kuvattu 6:ssa.

Esimerkki 10

IBD:n CD45RB^{hi}/scid-malli

- CD4-positiiviset T-solut eristettiin naaraspuolisista C.B-17-hiiristä käyttäen magneettihelmimenetelmää, kuten on kuvattu aiemmin [F. Powrie et al., International Immunology, 5, 1461 - 1471 (1993)]. CD4-solut, joista puuttui CD8-positiiviset T-solut, B-solut ja monosyytit, lajiteltiin sitten fluoresenssiaktivoitulla solulajittelulla CD45RB^{high}- ja CD45RB^{low}-populaatioiksi myöskin, kuten on kuvattu yllä. 5 x 10⁵ CD45RB-solua injektioitiin laskimonsisäisesti naaraspuolisiin C.B-17-scid-hiiriin ja hiirten kehon painoa seurattiin. Havaittiin, että eläimet, joihin lisättiin CD45RB^{low}-soluja, muodostivat kehon painonsa normaalilla tavalla. Tälle päinvastaisesti eläimet, joille annettiin CD45RB^{high}-soluja, lopulta menettivät painoaan ja viikon 10 kohdalla olivat lähellä kuolemaa. Kun verrokkihiiret olivat menettäneet karkeasti 20 % alkupainostaan, hiiret lopetettiin ja eri elimet analysoitiin histologisesti. Sairastuneet eläimet näyttivät tyypillisesti riutuneilta, niillä oli ripuli ja niillä oli dramaattisesti laajentuneet paksusuolet ja umpisuolet. Eläimet, joita käsiteltiin kuten on kuvattu hLFA3-Ig-proteiinin kuvion tekstissä, olivat samanlaisia kuin käsittelemättömät eläimet, kun taas eläimet, joita käsiteltiin mLT β R-Ig-proteiinilla, eivät olleet menettäneet painoaan, niillä oli suhteellisen normaalin

kokoiset paksusuolet ja niiltä puuttui massiiviset tulehdusinfiltraatiot, jotka havaittiin tyypillisesti paksusuolessa. Kuvio 8 esittää painon menetyksen aikakäyrän CD45RB^{high}-injektoiduissa eläimissä, joita oli käsitelty eri tavoin, ja kuvio 9 esittää lopulliset kehon painot kahdeksan viikkoa injektion jälkeen.

- 5 mLTβR-Ig-proteiinin tehokkuus kahdessa hyvin erilaisessa IBD-mallissa, se tarkoittaa CD45RB- ja DSS-malleissa, on vahva todiste tämän käsittelyn syvällisestä vaikutuksesta immuunisysteemille.

- Kuvio 8: Kehon painon aikakäyrä sen jälkeen, kun injektoidiin CD45RB CD4 -positiiviset T-solut scid-hiiriin. Kukin käyrä edustaa yhtä eläintä ja kirjoitukset paneeleissa viittaavat siihen, mitkä solut injektoidiin, se tarkoittaa 10 CD45RB^{high} tai ^{low}, ja käsittelyn luonnetta. Eläimiä käsiteltiin viikoittain 100 µg:lla proteiinia, joka injektoidiin vatsaontelonsisäisesti. Käsittely alkoi kaksi viikkoa ennen solujen injektiota ja sitä jatkettiin koko kokeen ajan.

- Kuvio 9: Niiden kehon painojen keskiarvot ja standardipoikkeamat, 15 jotka havaittiin eri käsittelyjen jälkeen 10 viikkoa siirrostensa jälkeen (5 - 6 eläintä ryhmässä).

Esimerkki 11

Viivästyneen tyyppisen yliherkkyyden SRBC-malli

- Naaraspuoliset Balb/c-hiiret herkistetään ihonalaisella injektioilla, 20 jossa käytetään 2×10^7 PBS:ssä olevaa pestyä lampaan punasolua (SRBC). Viiden vuorokauden kuluttua hiiret altistetaan injektioimalla 1×10^8 SRBC-solua PBS:ssä oikeaan jalkatyynyyn (jalkapohjanalainen injektio). Jalkatyynyn pak-
suus mitataan eri aikoina jalkatyynyyn tapahtuneen injektion jälkeen mittahar-
pilla. Kuvio 10 esittää jalkatyynyn turpoamisvasteen hiirissä, joita käsiteltiin jo-
25 ko vatsaontelonsisäisellä mLT225R-Ig-proteiinin injektioilla. Käsittely mLTβR-
Ig-proteiinilla joko herkistysaikana tai sekä herkistys- tai altistusaikana
inhiboivat SRBC-solujen aiheuttaman DTH-vasteen.

- Kuvio 10: Tässä on esitetty jalkatyynyn paksuuden kohoaminen mitattuna 18 tuntia sen jälkeen, kun injektoidiin SRBC-altistuksella. Käsittelyt 30 olivat joko negatiivinen verrokki-injektio PBS:llä, positiivisella verrokkivasta-
aineella PS/2, joka blokeeraa VLA4-interaktiot ja sen vuoksi soluliikenteen,
mLTβR-Ig-proteiinilla (100 µg laskimonsisäiset injektiot), jotka annettiin joko
välittömästi ennen herkistämistä ihonalaisella SRBC-injektioilla, altistusaikapis-
teessä tai molempina aikoina.

Sekvenssilistaus

(1) YLEISET TIEDOT:

- 5 (i) HAKIJA: Browning, Jeffrey L.
Benjamin, Christopher D.
Hochman, Paula S.
- 10 (ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Liukoisia lymfotoksiini- β -reseptoreita ja anti-lymfotoksiinireseptori ja ligandivasta-aineita terapeuttisina aineina immunologisen taudin hoitoa varten
- (iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 1
- 15 (iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:
(A) VASTAANOTTAJA: James F. Haley, Jr.
(B) KATU: 1251 Avenue of the Americas
(C) KAUPUNKI: New York
(D) OSAVALTIO: New York
(E) MAA: USA
20 (F) POSTINUMERO: 10020
- (v) KONEKODIMUOTO:
(A) VÄLINETYYPPI: Levyke
(B) TIETOKONE: IBM PC -yhteensopiva
25 (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, versio #1.30
- (vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO:
30 (B) JÄTTÖPÄIVÄMÄÄRÄ: sama kuin tässä
(C) LUOKITUS:
- (vii) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: 08/505 606
35 (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 21.7.1995

(viii) ASIAMIESTÄ KOSKEVAT TIEDOT:

(A) NIMI: Haley, Jr., James F.

(B) REKISTERINUMERO: 27 794

(C) VIITE/LUETTELONUMERO: B191CIP PCT

5

(ix) TIETOLIIKENNEYHTEYSTIEDOT:

(A) PUHELIN: (212) 596-9000

(B) TELEFAX: (212) 596-9090

(C) TELEX: 14-8367

10

(2) SEKVENSSIN NRO 1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

15

(A) PITUUS: 197 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

20

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 1:

25

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

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

30

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

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

35

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

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

5

10

15

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

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

Glu Met Ser Gly Thr
195

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä immunologisen taudin edistymisen, vakavuuden tai vaikutusten hoitamiseksi tai vähentämiseksi eläimessä, **tunnettu** siitä, että se sisältää vaiheen, jossa annetaan farmaseuttista koostumusta, joka sisältää terapeuttisesti hyväksyttävän kantajan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine valitaan ryhmästä, joka sisältää liukoisien lymfotoksiini- β -reseptorin, joka sisältää sellaisten aminohappojen toiminnallisen sekvenssin, joka valitaan sekvenssin nro 1 aminohapoista, LT- β -reseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen ja pinnan LT-ligandia vastaan suunnatun vasta-aineen.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eläin on nisäkäs.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että nisäkäs on ihminen.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää liukoisien lymfotoksiini- β -reseptorin, jolla on ligandia sitova domeeni, joka voi selektiivisesti sitoutua pinnan LT-ligandiin.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että liukoinen lymfotoksiini- β -reseptori edelleen sisältää ihmisen immunoglobuliinin Fc-domeenin.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu LT- β -reseptoria vastaan.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että koostumus annetaan määränä, joka on riittävä peittämään LT- β -reseptori-positiiviset solut 1 - 14 vuorokaudeksi.

9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen anti-ihmisen LT- β -R-vasta-aineen BDA8.

10. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu pinnan LT-ligandia vastaan.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että koostumus annetaan määränä, joka on riittävä peittämään pinnan LT-ligandi-positiiviset solut 1 - 14 vuorokaudeksi.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** 5 siitä, että vasta-aine suunnataan LT-ligandin alayksikköä vastaan.

13. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen anti-ihmis-LT- β -vasta-aineen B9.

14. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** 10 siitä, että nisäkäs on hiiri ja LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu hiiren LT-pintaligandia vastaan.

15. Menetelmä Th1-välitteisen immuunivasteen inhiboimiseksi eläimessä, **tunnettu** siitä, että se sisältää vaiheen, jossa annetaan farmaseuttinen koostumus, joka sisältää tehokkaan määrän LT- β -R-proteiinia 15 blokeeraavaa ainetta ja farmaseuttisesti tehokkaan kantajan.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine valitaan ryhmästä, joka sisältää liukoisen lymfotoksiini- β -reseptorin, LT- β -reseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen ja pinnan LT-ligandia vastaan suunnatun vasta-aineen.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** 20 siitä, että eläin on nisäkäs.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että nisäkäs on ihminen.

19. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** 25 siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää liukoisen lymfotoksiini- β -reseptorin, jolla on ligandia sitova domeeni, joka voi selektiivisesti sitoutua pinnan LT-ligandiin.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, **tunnettu** 30 siitä, että liukoinen lymfotoksiini- β -reseptori edelleen sisältää ihmisen immunoglobuliinin Fc-domeenin.

21. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu LT- β -reseptoria vastaan.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, **tunnettu** 35 siitä, että koostumus annetaan määränä, joka on riittävä peittämään LT- β -reseptoriposiitiviset solut 1 - 14 vuorokaudeksi.

23. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen anti-ihmis-LT- β -R-vasta-aineen BDA8.

24. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu pinnan LT-ligandia vastaan.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että koostumus annetaan määränä, joka on riittävä peittämään pinnan LT-ligandi-positiiviset solut 1 - 14 vuorokaudeksi.

26. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vasta-aine suunnataan LT-ligandin alayksikköä vastaan.

27. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen anti-ihmis-LT- β -vasta-aineen B9.

28. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että nisäkäs on hiiri ja LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu hiiren LT-pintaligandia vastaan.

29. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että Th1-soluvälitteinen immuunivaste ottaa osaa viivästyneen tyyppiseen yliherkkyyssreaktioon.

30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että viivästyneen tyyppinen yliherkkyyssreaktio on kosketusyliherkkyys.

31. Patenttivaatimuksen 29 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että viivästyneen tyyppinen yliherkkyyssreaktio on tuberkuliinityyppinen yliherkkyys.

32. Patenttivaatimuksen 29 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että viivästyneen tyyppinen yliherkkyyssreaktio on granulomatoosinen reaktio.

33. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että Th1-soluvälitteinen immuunivaste ottaa osaa kudoksen soluhyljintään eläimessä sen jälkeen, kun eläin saa kudossiirroksen.

34. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että Th1-soluvälitteinen immuunivaste ottaa osaa elinhyljintään eläimessä sen jälkeen, kun eläin saa elinsiirännäisen.

35. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että Th1-soluvälitteinen immuunivaste ottaa osaa autoimmuunihäiriöön eläimessä.

36. Patenttivaatimuksen 35 mukainen menetelmä, **tunnettu** 5 siitä, että autoimmuunihäiriö valitaan ryhmästä, joka sisältää pesäkekovettumataudin, insuliiniriippuvaisen sokeritaudin, sympaattisen silmätulehduksen, silmän keskikalvontulehduksen ja psoriasiksen.

37. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** 10 siitä, että Th1-soluvälitteinen immuunivaste inhiboituu ilman, että Th2-soluriippuvainen immuunivaste inhiboituu.

38. Farmaseuttinen koostumus, **tunnettu** siitä, että se sisältää farmaseuttisesti tehokkaan määrän LT- β -R-proteiinia blokeeraavaa ainetta ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa.

39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen koostumus, **tunnettu** 15 siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine valitaan ryhmästä, joka sisältää liukoisien lymfotoksiini- β -reseptorin, LT- β -reseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen ja pinnan LT-ligandia vastaan suunnatun vasta-aineen.

40. Patenttivaatimuksen 38 mukainen koostumus, **tunnettu** 20 siitä, että liukoinen lymfotoksiini- β -reseptori sisältää LT- β -R-proteiinin ligandia sitovan domeenin, joka voi selektiivisesti sitoutua pinnan LT-ligandiin.

41. Patenttivaatimuksen 40 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että liukoinen lymfotoksiini- β -reseptori sisältää edelleen ihmisen immunoglobuliinin Fc-domeenin.

42. Patenttivaatimuksen 38 mukainen koostumus, **tunnettu** 25 siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu LT- β -reseptoria vastaan.

43. Patenttivaatimuksen 42 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on monoklonaalinen anti-ihmis-LT- β -R-vasta-aine BDA8.

44. Patenttivaatimuksen 38 mukainen koostumus, **tunnettu** 30 siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu pinnan LT-ligandia vastaan.

45. Patenttivaatimuksen 44 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että vasta-aine on suunnattu LT-ligandin alayksikköä vastaan.

46. Patenttivaatimuksen 45 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on monoklonaalinen anti-ihmis-LT- β -vasta-aine B9.

47. Patenttivaatimuksen 38 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu hiiren LT-pintaligandia vastaan.

48. Patenttivaatimuksen 42 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että vasta-aine on läsnä määränä, joka on riittävä peittämään LT- β -reseptoriposiitiiviset solut 1 - 14 vuorokaudeksi.

49. Patenttivaatimuksen 44 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että vasta-aine on läsnä määränä, joka on riittävä peittämään LT-ligandiposiitiiviset solut 1 - 14 vuorokaudeksi.

50. Menetelmä LT- β -R-proteiinia blokeeraavan aineen selektoimiseksi, **tunnettu** siitä, että se sisältää vaiheet, joissa:

a) viljellään kasvainsoluja niin, että läsnä on tehokas määrä ainakin yhtä LT- β -R-proteiinia aktivoivaa ainetta ja mahdollista LT- β -R-proteiinia blokeeraavaa ainetta; ja

b) määritetään se, alentaako mahdollinen LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine LT- β -R-proteiinia aktivoivan aineen kasvaimen vastaista aktiivisuutta.

51. Patenttivaatimuksen 50 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia aktivoiva aine sisältää heteromeerisen LT- α/β -kompleksin.

52. Patenttivaatimuksen 51 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että heteromeerisella LT- α/β -kompleksilla on LT- $\alpha 1/\beta 2$ -stoikiometria.

53. Patenttivaatimuksen 50 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia aktivoiva aine sisältää anti-LT- β -R-vasta-aineen, joka stimuloi LT- β -R-signaalia.

54. Menetelmä LT- β -R-signaalin inhiboimiseksi ilman, että inhiboidaan TNF-R-signaalia, **tunnettu** siitä, että se sisältää vaiheen, jossa potilaalle annetaan tehokas määrä LT- β -R-proteiinia blokeeraavaa ainetta.

55. Patenttivaatimuksen 54 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine valitaan ryhmästä, joka sisältää liukoisen lymfotoksiini- β -reseptorin, LT- β -reseptoria vastaan suunnatun vasta-aineen ja pinnan LT-ligandia vastaan suunnatun vasta-aineen.

56. Patenttivaatimuksen 54 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että potilas sisältää yhden tai useamman solun nisäkkästä.

57. Patenttivaatimuksen 56 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että nisäkäs on ihminen.

5 58. Patenttivaatimuksen 54 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää liukoisen lymfotoksiini- β -reseptorin, jossa on ligandia sitova domeeni, joka voi selektiivisesti sitoutua pinnan LT-ligandiin.

10 59. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että liukoinen lymfotoksiini- β -reseptori sisältää edelleen ihmisen immunoglobuliinin Fc-domeenin.

60. Patenttivaatimuksen 54 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu LT- β -reseptoria vastaan.

15 61. Patenttivaatimuksen 57 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen anti-ihmis-LT- β -R-vasta-aineen BDA8.

20 62. Patenttivaatimuksen 54 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu pinnan LT-ligandia vastaan.

63. Patenttivaatimuksen 62 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vasta-aine on suunnattu LT-ligandin alayksikköä vastaan.

25 64. Patenttivaatimuksen 57 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen anti-ihmis-LT- β -vasta-aineen B9.

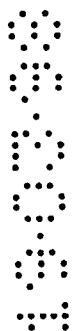
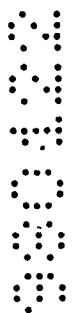
65. Patenttivaatimuksen 56 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että nisäkäs on hiiri ja että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine sisältää monoklonaalisen vasta-aineen, joka on suunnattu hiiren LT-pintaligandia vastaan.

30 66. Patenttivaatimuksen 60 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine annetaan määränä, joka on riittävä peittämään LT- β -reseptoriposiitiiviset solut 1 - 14 vuorokaudeksi.

35 67. Patenttivaatimuksen 62 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että LT- β -R-proteiinia blokeeraava aine annetaan määränä, joka on riittävä peittämään LT-pintaligandiposiitiiviset solut 1 - 14 vuorokaudeksi.

68. Menetelmä suolistotulehdusoireyhtymän hoitamiseksi, **tunnettu** siitä, että se sisältää vaiheen, jossa annetaan terapeuttisesti tehokas määrä LT- β -R-fuusioproteiinia.

69. Patenttivaatimuksen 68 mukainen menetelmä, **tunnettu** 5 siitä, että fuusioproteiini on LT- β -R-proteiinin ja immunoglobuliinin Fc-domeenin fuusio.



1	SQPQAVPPYA	SENQTCRDQE	KEYYEPQHRI	CCSRCPPGTY	VSAKCSRIRD	50
51	TVCATCAENS	YNEHWNLYTI	CQLCRPCDPV	MGLEEIAPCT	SKRKTQCRCQ	100
101	PGMFCAAWAL	ECTHCELLSD	CPPGTEAELK	DEVGKGNHNC	VPCKAGHFQN	150
151	TSSPSARCQP	HTRCENQGLV	EAAPGTAQSD	TTCKNPLEPL	PEMSGT	197

FIG. 1

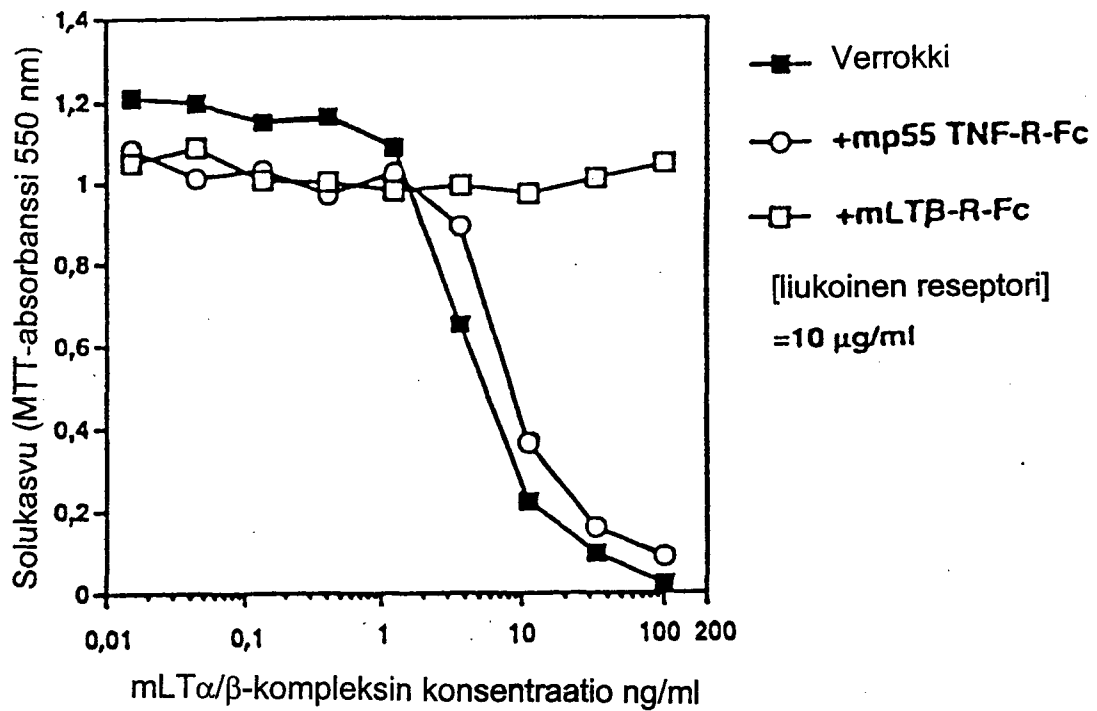


FIG. 2

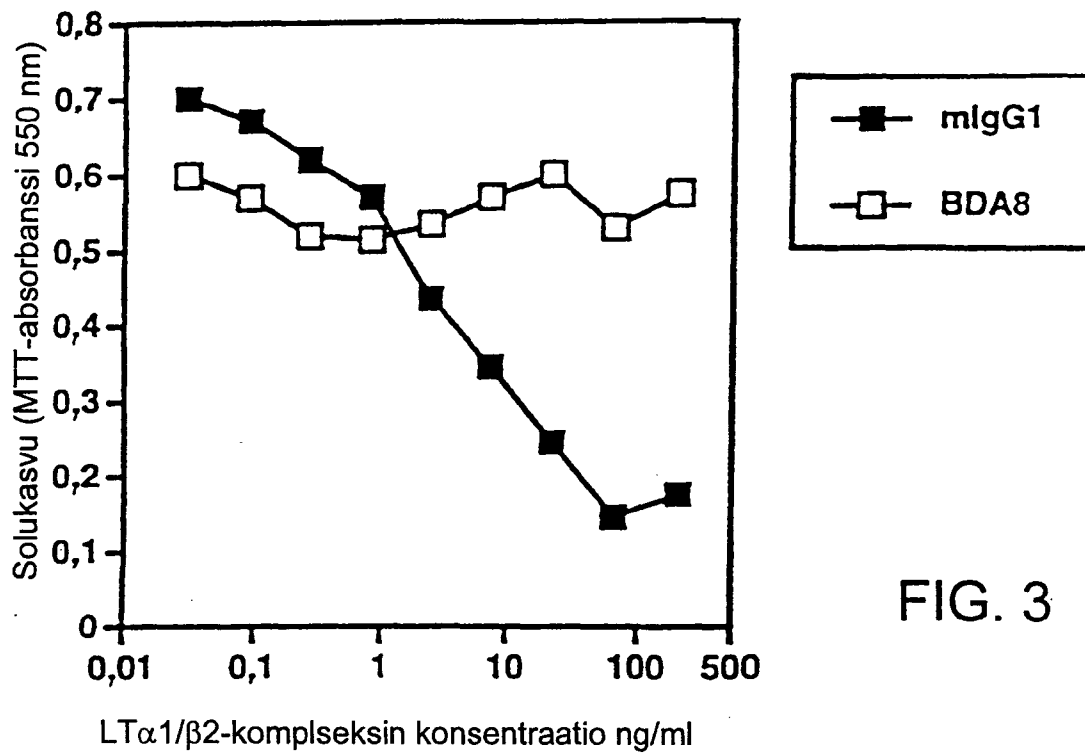


FIG. 3

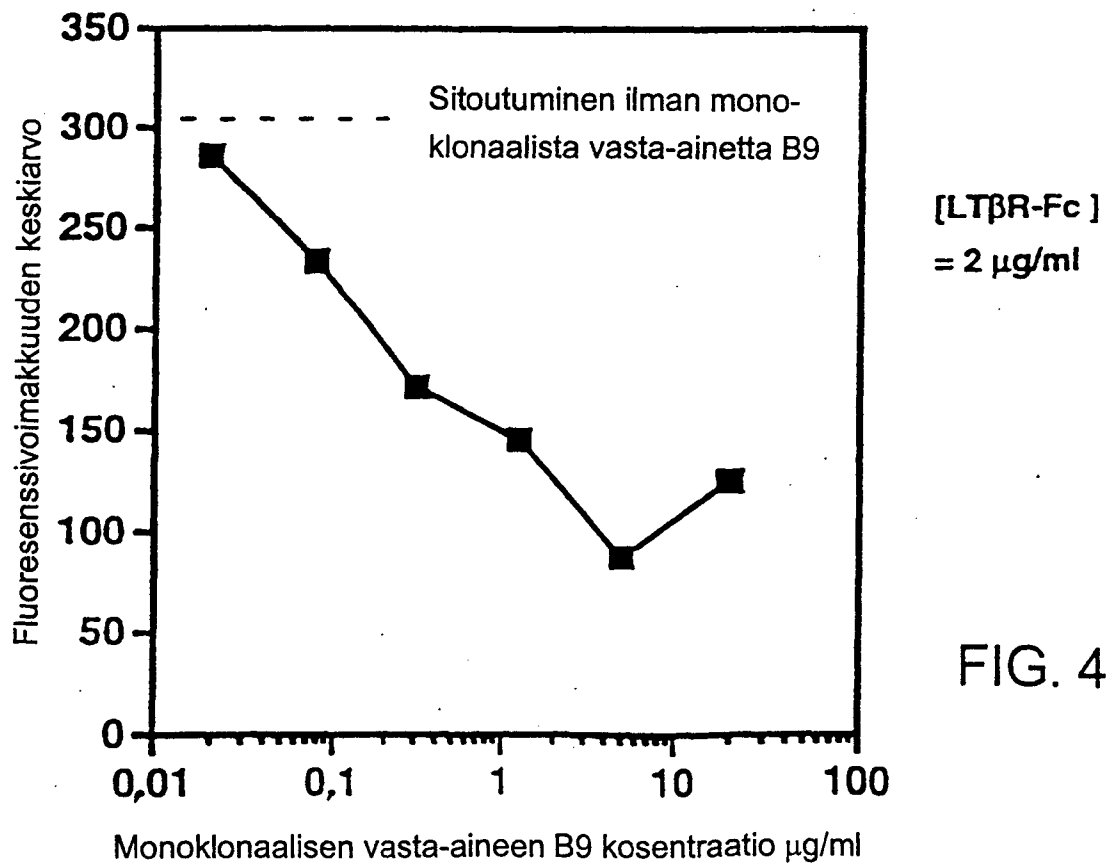


FIG. 4

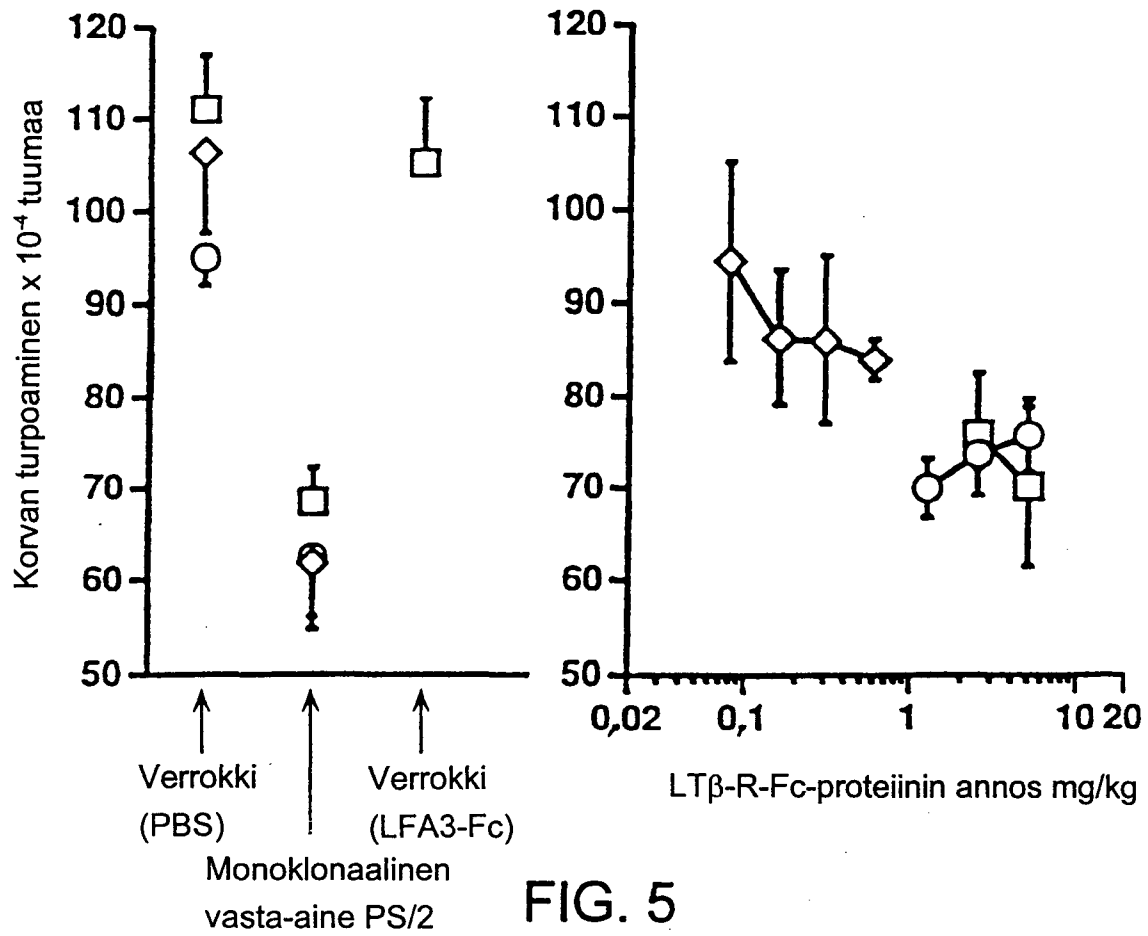


FIG. 5

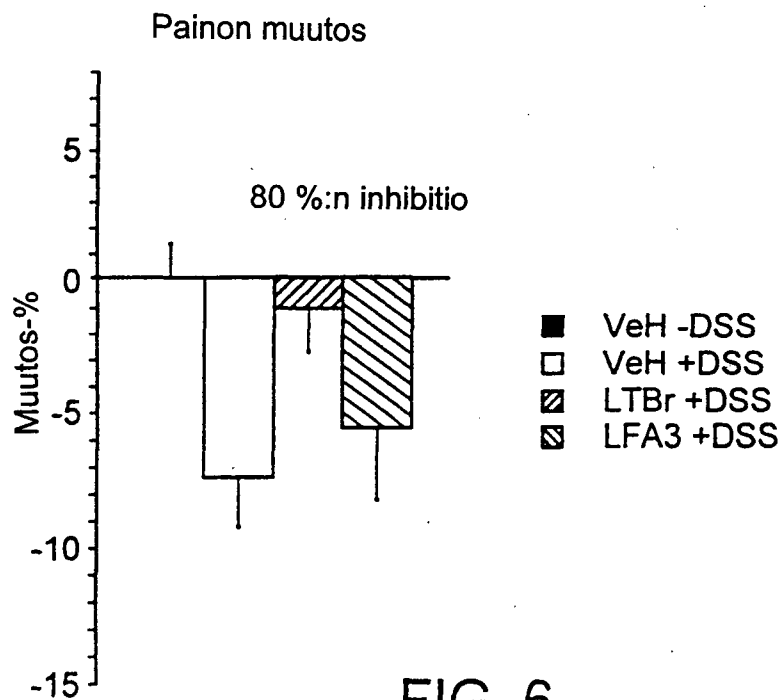


FIG. 6

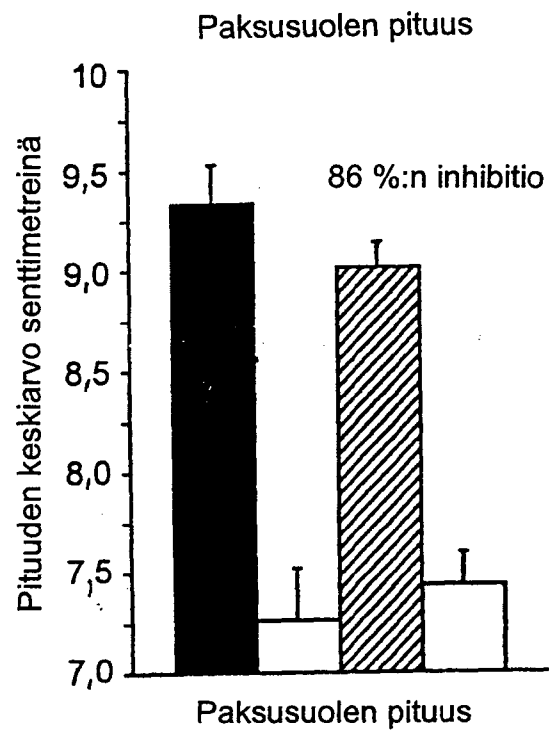


FIG. 7

mLT β R-Ig-proteiinin suojaava vaikutus hiiren CD45RB high -IBD-mallissa

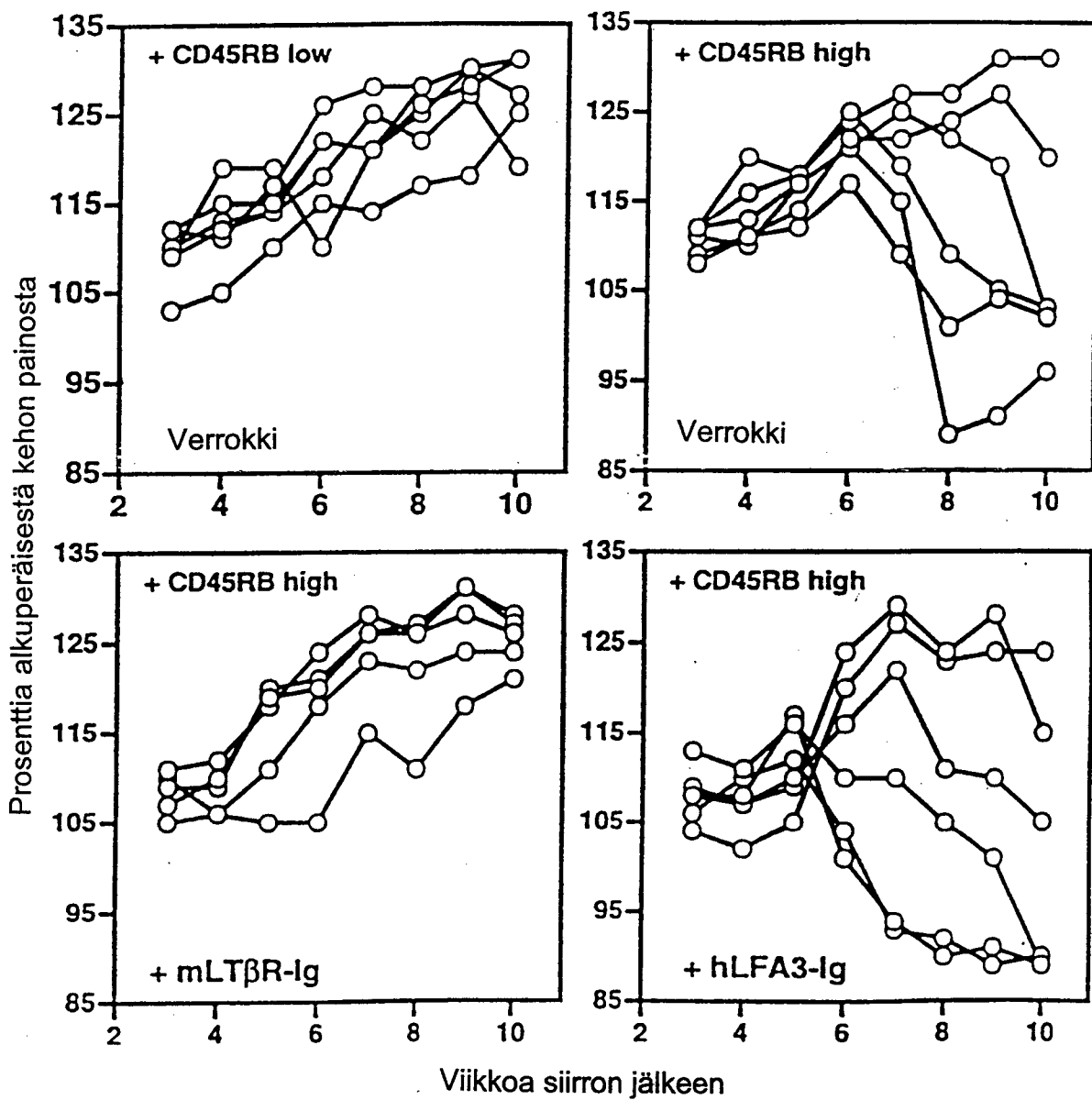


FIG. 8

mLTBR-Ig-proteiinin vaikutus hiiren kehon painoon
10 viikkoa CD45RBhi-solujen siirron jälkeen

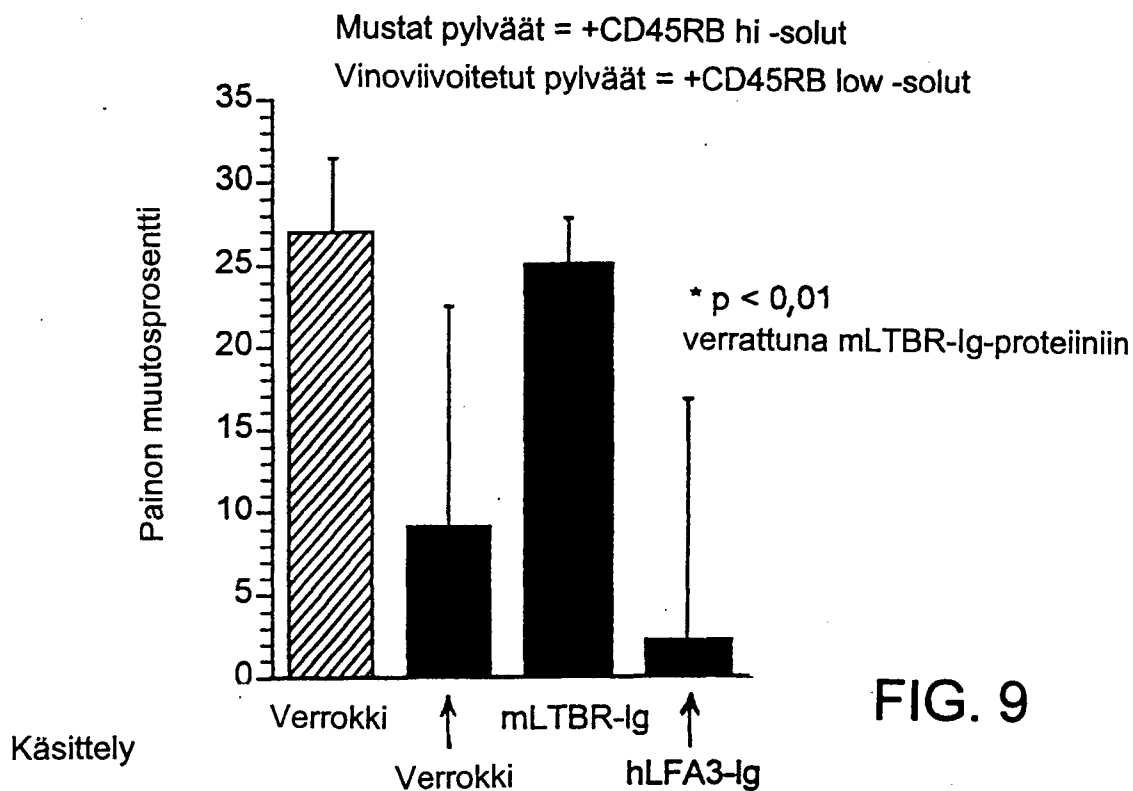


FIG. 9

mLTBR-higG1-proteiinin vaste sRBC DTH -hiirimallissa
käyttäen naaraspuolisia BALB/c-hiiriä

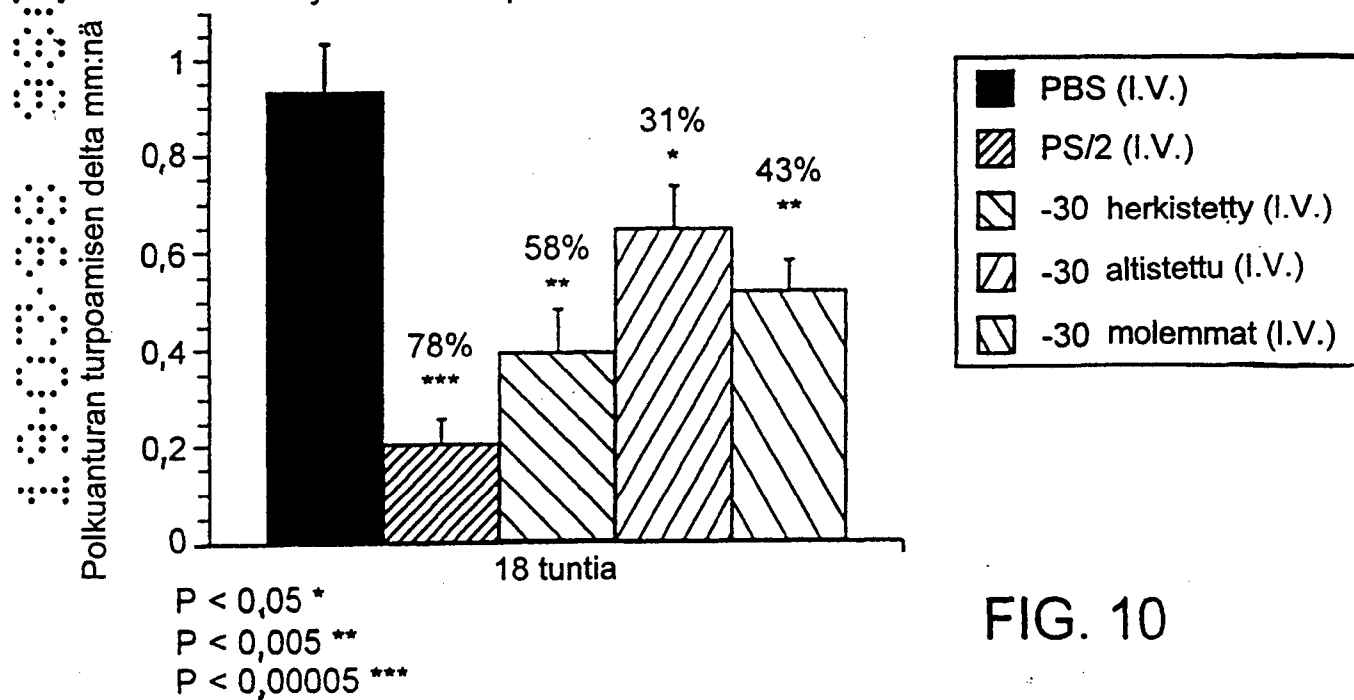


FIG. 10