



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **328540**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19991926	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.10.24 PCT/US97/19436
(22)	Inng.dag	1999.04.22	(85)	Videreføringsdag	1999.04.22
(24)	Løpedag	1997.10.24	(30)	Prioritet	1996.10.25, US, 29060
(41)	Alm.tilgj	1999.06.25			
(45)	Meddelt	2010.03.15			
(83)	Biol.mat. dep	American Type Culture Collection CRL11965, American Type Culture Collection CRL11964, American Type Culture Collection HB11798, American Type Culture Collection HB11962, American Type Culture Collection HB11963			
(73)	Innehaver	Biogen Idec MA Inc, 14 Cambridge Center, US-MA02142 CAMBRIDGE, USA			
(72)	Oppfinner	Jeffrey L Browning, 250 Concord Avenue, US-MA02138 CAMBRIDGE, USA Paula Susan Hochman, Newton, MA, US-, USA Paul D. Rennert, Holliston, MA, US-, USA Fabienne MacKay, Watertown, MA, US-, USA			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av et lymfotoksin-beta-reseptorblokkerende middel for fremstilling av medikamenter mot autoimmune lidelser			
(56)	Anførte publikasjoner	Normal development of lymph nodes is disrupted by soluble LT beta receptor-Ig fusion protein., Lymphotoxin-beta, lymphotoxin-beta complexes, pharmaceutical preparations and therapeutic uses thereof. Lymphotoxin-beta, lymphotoxin-beta complexes, pharmaceutical preparations and therapeutic uses thereof. Surface complexed lymphotoxin, WO9703687 (NO19989172), WO9703687 (NO19989172), WO9720063			
(57)	Sammendrag				

Sammensetninger og fremgangsmåter omfattende "lymfotoksin- β -receptor-blokkerende midler" som blokkerer lymfotoksin- β -receptorsignaler og er nyttige for å endre immunologiske sykdommer, og spesielt antistoff-medierte immunresponser.

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av "lymfotoksin- β -reseptorblokkerende midler" som blokkerer lymfotoksin- β -reseptorsignalering og som omfatter enten en oppløselig lymfotoksin- β -R med et ligandbindende domene som selektivt kan binde til en LT overflateligand eller til et antistoff rettet mot LT- β -R for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av antistoffmediert autoimmun lidelse i et dyr, hvor det LT- β -R-blokkerende middel inhiberer interaksjonen mellom LT- β og dens reseptor. Lymfotoksin- β -reseptorblokkerende midler er nyttige for behandling av immunologiske sykdommer, nærmere bestemt for å inhibere antistoffmedierte immunresponser, regulere ekspresjonen av adressiner og celletrafikk, og påvirke differensieringen av follikkeldendrittceller. Spesielt kan det anvendes løselige former av lymfotoksin- β -reseptors ekstracellulære domene og antistoffer rettet enten mot lymfotoksin- β -reseptor eller dens ligand, overflatelymfotoksin, som virker som lymfotoksin- β -reseptorblokkerende midler.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Det finnes to typer ervervet immunitet, som selv om de kan samarbeide for å oppnå det felles mål å eliminere antigen, medieres av adskilte deltakere av immunsystemet og med forskjellige virkninger. En type ervervet immunrespons, nemlig humoral immunitet, medieres primært av B-celler og sirkulerende antistoffer. Den andre type, som benevnes cellulær eller cellemediert immunitet, medieres av T-celler, som syntetiserer og utvikler cytokiner som påvirker andre celler.

Aktivering og differensiering av B-celler i respons på de fleste antigener, krever at (1) B-cellene mottar et antigensignal via sin antigenspesifikke reseptor, nemlig membran-Ig, og (2) at B-cellene får kontaktavhengige og -uavhengige signaler fra aktiverte T-celler. Det kontaktavhengige ko-stimulatoriske signal resulterer av en ligering av

CD40-reseptor på B-cellene med CD40-ligand som uttrykkes på aktiverte T-hjelperceller (Laman et al., Crit. Rev. Immunol., 16, s. 59-108 (1996); Van Kooten og Banchereau, Adv. Immunol., 61, s. 1-77 (1996)). Kontakt-uavhengig signalering medieres av cytokiner som syntetiseres og utvikles av aktiverte T-celler. Sammen driver disse kontaktavhengige og -uavhengige signaler B-cellene til å differensiere til enten (1) hukommelses-B-celler som står klare til å mediere en raskere respons ved neste utsettelse for antigenet, eller (2) antistoffutsondrende plasmaceller. Plasmaceller, som er det endelige differensieringsstrinn av B-celler, syntetiserer og utsondrer antistoffer.

T-hjelperceller ("Th") spiller flere vesentlige roller i immunsystemet. Det er blitt vist at cytokiner som utvikles av Th-celler i starten av en immunutfordring, påvirker hvilke immuneffektorbaner som senere aktiveres. Th-cellene aktiveres av vekselvirkningen av deres antigenspesifikke reseptor med antigenpresenterende celler (APC'er) som på sin overflate viser frem peptidfragmenter av prosesserte fremmede antigener i forbindelse med MHC-klasse II-molekyler. Aktiverte Th-celler i sin tur utsondrer cytokiner (lymfokiner) som aktiverer de egnede immuneffektormekanismer.

Th-celler kan deles opp i tre undergrupper Th0, Th1 og Th2 på grunnlag av deres cytokinutsondringsmønstre (Fitch et al., Ann. Rev. Immunol., 11, s. 29-48 (1993)). I mus produserer ikke-stimulerte "naive" T-hjelperceller IL-2. Kortvarig stimulering av Th-celler fører til Th0-forløperceller, som danner et bredt utvalg av cytokiner omfattende IFN- α , IL-2, IL-4, IL-5 og IL-10. Kronisk stimulerte Th0-celler kan differensiere til enten Th1- eller Th2-celletypen, hvoretter cytokinekspresjonsmønsteret endres. Visse cytokiner, for eksempel IL-3, GM-CSF og TNF, frigis av både Th1- og Th2-celler. Andre cytokiner fremstilles utelukkende av kun én Th-celleundergruppe (Romagnani et al., Ann. Rev.

Immunol., 12, s. 227-257 (1994)). Th1-celler fremstiller LT α IL-2 og IFN- γ , som aktiverer makrofager og innflammatoriske responser forbundet med cellulær immunitet og resistens mot intracellulære infeksjoner.

- 5 Th2-celler produserer cytokinene IL-4, IL-5, IL-6 og IL-10, som øker eosinofil- og mastcelleproduksjonen og fremmer en fullstendig ekspansjon og modning av B-celler (Howard et al., "T cell-derived cytokines and their receptors", Fundamental Immunology, 3. utg., Raven Press, New York (1993)).
- 10 Th2-cellene deltar også i å generere B-cellehukommelse, somatisk mutasjon og dermed affinitetsmodning, og å regulere *de novo*-immunoglobulin-isotypeveksling. For eksempel veksler Th2-cytokinet IL-4 aktiverte B-celler til IgG1-isotypen mens den hemmer andre isotyper. IL-4 stimulerer også over-
- 15 produksjonen av IgE i overfølsomhetsreaksjoner av typen I. Th2-cytokinet IL-5 induserer IgA-isotypen, som er viktig ved mukosal immunitet.

- De sekundære lymfevev, så som lymfeknutene (LN), milt og mukosale lymfevev, er høyt virksomme ved innfangning og kon-
- 20 sentrasjon av fremmede substanser, og er hovedplasseringene for antigendrevet aktivering og differensiering av T- og B-lymfocytter. Disse prosesser er avhengige av diversiteten og organisasjonen av celler i disse vev, som gir en ramme for flere aspekter av humorale immunresponser, så som T/B-
- 25 cellevekselvirkninger, dannelselse av germinalsenter (GC), affinitetsmodning, immunoglobulinklasseveksling og celletrafikk (Klein, J., Immunology, John Wiley and Sons (1982)).
- De molekylære mekanismer som er ansvarlige for utviklingen, det strukturelle vedlikehold og funksjonen av perifere lym-
- 30 fevev, forstås enda ikke helt.

Selv om den generelle struktur av de sekundære lymfevev skiller seg markert og viser variasjoner pattedyrarter imellom, har finstrukturen av disse sekundære lymfevev visse felles trekk, så som for eksempel (1) antigentil-

gjengelighet, (2) strukturelle trekk som sikrer en fortsatt kontakt mellom antigen og lymfocytter, (3) T-celleanrikede områder omsluttet av B-celler, (4) B-celleanrikede follikler, (5) marginalsonetypeplasseringer, (6) spesialiserte endotelceller og (7) antistoffproduksjonssteder, slik det skal beskrives i ytterligere detalj i det følgende.

De sekundære lymfevev er tilgjengelige for antigener i systemet. For eksempel har antigener tilgang til milten via sinusoidalblodtilførselen, LN via de tilførende lymfatiske kar, og transporteres over en spesialisert epitel til det mukosale lymfevev.

De sekundære lymfevev i forskjellige arter har også visse strukturelle trekk til felles, så som follikulære dentrittceller (FDC) og interdigiterende celler (IDC), som sikrer det fortsatte nærvær av antigen i lymfocytanrikede områder av vevene.

Et annet felles trekk er nærværet av T-celleanrikede områder omsluttet av B-cellene. T-celleanrikede områder omfatter f.eks. de periarteriolære lymfoide slirer i den hvite pulpa av milten, og det parakortikale område av LN, som inneholder et stort antall resirkulerende T-celler og IDC, som i sin tur virker som aksessoriske celler for T- og B-celler.

I tillegg har lymfevev vanligvis B-celleanrikede primære og sekundære follikler i hvit pulpa av milten og i cortex av LN. Sekundære follikler i slike lymfevev benevnes også germinalsentre (GC), og har et tett FDC-nett for å innfange og presentere antigener.

Marginalsonetypeområder bemerkes også som avgrensede histologiske områder i murin milt og mer diffuse steder i humane sekundære lymfeorganer. Disse områder består hovedsak-

lig av marginalsonemakrofager (MZM), metallofile makrofager (MM), marginalsone-B-celler og retikulære celler, men kan også omfatte T-celler og dendrittceller (Kraal, Int. Rev. Cytol. 132, s. 31-74 (1992)). Innløpet av den arterielle blodstrøm inn i marginalsoneområder gir antigener direkte tilgang til disse celler, og fremmer cellulære reaksjoner mot antigener på dette sted (Kraal, Int. Rev. Cytol. 132, s. 31-74 (1992)). Nærværet av MZM er også nødvendig for en optimal trafikk av B-celler i miltens hvite pulpa (Kraal, 1992; Kraal et al., Immunology, 68, s. 227-232 (1989)).

Vanligvis trer blodlymfocytter inn i de sekundære lymfevev ved å krysse spesialisert endotelium, f.eks. endotelfôringen av venulene av LN (høye endotele venuler - HEV) og endotelfôringen av miltens blodsinus i marginalsonelignende strukturer. Denne endotelium uttrykker adhesjonsmolekyler og adressiner som virker i trafikeringen av celler til sekundære lymfevev. F.eks. er perifere LN-adressiner (PNAd) forskjellige fra mukosal LN-adressin, nemlig MAdCAM-1, som er innblandet i trafikeringen av lymfocytter til mukosale lymfevev, omfattende vev så som mesenterisk LN, Peyer's plakk og lamina propria.

Ikke alle adressiner er klart definert, f.eks. er adressinet for lymfocytters innretning mot milten fortsatt udefinert. De fysiologiske roller av disse adressiner omfatter å forsterke rekrutteringen av egnede sett av antigenspesifikke lymfocytter til en immunrespons og en påfølgende spredning av immunresponsen over hele kroppen.

Til slutt påvises plasmaceller, som er de antistoffproduserende plasmaceller, på forskjellige steder hvorfra forløper-B-cellene aktiveres av antigen. For eksempel forårsakes antistoff som produseres av plasmaceller i miltens røde pulpa, hovedsaklig av en B-celleaktivering i T-cellesoner, og plasmaceller i medulla av LN er avledet fra B-celler som er aktivert i T-cellesoner av den samme knute. På lignende

måte er antistoff som fremstilles av plasmaceller i benmar-
 gen, derivater av B-celler som er blitt aktivert i milten
 og lymfeknuter, og plasmaceller i lamina propria av magen
 er hovedsaklig avledet fra B-celler som er blitt aktivert i
 5 mesenterisk LN eller tarmassosiert lymfevev.

Jfr. f.eks. ICM MacLennan, "The Structure and Function of
 Secondary Lymphoid Tissues" i Clinical Aspects of Immuno-
 logy, 5. utg., utg. P.J. Lachman, Sir D.K. Peters, F.S.
 Rosen, M.J. Walport, Blackwell Scientific Publications, s.
 10 13-30 (1993).

Generelt er de cellulære/histologiske begivenheter som lig-
 ger til grunn for en humoral immunrespons på T-avhengige
 antigener, som følger (Toellner et al., J. Exp. Med., 183,
 s. 2303-2312 (1996)):

15 I den *induktive fase* aktiveres naive B- og T-celler og re-
 krutteres til immunresponsen i dagene umiddelbart etter at
 antigenet har trengt inn i kroppen. I milten for eksempel i
 løpet av 12 timer etter immunisering for en sekundær res-
 pons, treffer hukommelses-B-celler på blodbåret antigen i
 20 marginalsonen, og forlater marginalsonen for å gå til T-
 cellesonene. B-celler kan påvises i T-cellesonene i løpet
 av 24 timer. Immunoglobulin-vekseltranskripsjoner kan påvi-
 ses innen 12 timer etter den sekundære antigenutsettelse,
 hvilket tyder på at T-B-cellevekselvirkningen allerede har
 25 funnet sted. B-cellene migrerer deretter til utgangssonene
 og rød pulpa, hvor de prolifererer for å danne fokus av B-
 celleblaster og differensiere til plasmaceller. B-cellene
 fortsetter også å proliferere i den IDC-anrikede T-celle-
 sone. Innen 4 dager etter immuniseringen, og etter prolife-
 30 rasjon i GC, vil produksjonen av B-hukommelsesceller
 starte. I en primær respons kan godt utviklede GC observe-
 res innen dag 10, og oppnår en toppstørrelse innen dag 14
 etter immuniseringen.

T-celleproliferasjonen i T-cellesonene blir åpenbar 48-72 timer etter immuniseringen, og når en topp på dag 7. Denne T-celleproliferasjon bidrar til en T-celleavhengig B-celleaktivering. Proliferative mengder i T-cellesonen nedsettes idet det dannes GC. T-celleproliferasjon finner også sted i GC, hvor centrocytter (B-celler) i den mørke sone plukker opp antigen fra IDC og presenterer antigenet til T-celler i den lyse sone.

T-celleavhengig antigen kan aktivere marginalsone-B-celler, nylig produserte naive B-celler og resirkulerende lymfocytter som lokkes til og holdes i sekundære lymfeorganer av adressiner og adhesjonsmolekyler. Naive B-celler oppviser den samme kinetikk for å gå til T-cellesonen osv., som de aktiverte B-celler.

15 **Bestemt fase av T-celleavhengige responser**

Den bestemte fase av T-celleavhengige responser vedlikeholdes av den fortsatte aktivering av hukommelses-B-celler i folliklene av sekundære lymfeorganer. Det finner sted meget lite rekruttering av naive B-celler i dette stadium, og responsen drives primært av antigener som holdes på FDC. GC er nødvendige for en optimal hukommelsesgenerering, isotypeveksling, en somatisk mutasjon og dermed en affinitetsmodning av immunoglobuliner.

Utføringen av slike lymfocytteresponser fører til dannelsen av antistoffer som kan sirkulere gjennom hele kroppen ved forskjellige ruter, for eksempel forlater antistoffer milten med blodet og går ut av LN via de efferente lymfekar. Antistoffene treffer dermed på og bindes direkte til det invaderende patogen. Denne gjenkjenningsbegivenhet utløser en kaskade av immuneffektormekanismer, bl.a. aktivering av komplementkaskaden og cellulære reaksjoner for å mediere en beskyttelse av verten mot patogenet.

Antistoffer spiller også en rolle i noen patologiske responser så som overfølsomhetsresponser - uegnede eller uproporsjonale immunresponser som utløses etter berøring med et tidligere kjent antigen. Det finnes fire kjente typer overfølsomhet.

Type I, "umiddelbar overfølsomhet", omfatter allergenindusert Th2-celleaktivering og Th2-cytokin-frigivning. Th2-cytokinet IL-4 stimulerer cellene til å gjennomføre isotypeveksling for å danne IgE, som i sin tur aktiverer mastcellene til å produsere akutte inflammatoriske reaksjoner, så som de som fører til eksem, astma og rhinitt.

Overfølsomhet av typene II og III forårsakes av IgG- og IgM-antistoffer som er rettet mot celleoverflateantigener eller bestemte vevantigener (type II) eller løselige serumantigener for å danne sirkulerende immunkomplekser (type III).

Type IV, "sinket type" overfølsomhet (DTH), er en Th1-cellemediert respons, og kan overføres mellom mus ved å overføre Th1-celler, men ikke ved å overføre kun serum. Dette trekk skiller Type IV-DTH fra de andre tre typer overfølsomhet, som krever humorale immunresponser som hovedsaklig forårsakes av antistoffer som kan overføres i cellefritt serum (Roitt et al., Immunology, s. 19.1-22.12 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. utg. 1993))

Patologiske humorale immunresponser er forbundet med et antall organspesifikke og systemiske autoimmune tilstander så som systemisk lupus erythematosus, Wegeners granulomatose, polyartritt nodosa (PAN), "rapidly progressing crescentic glomerulonephritis" og idiopatisk trombocytopenia purpura, samt kroniske inflammatoriske sykdommer så som Graves' og Chagas' sykdommer. Humorale immunresponser kan også bidra til utstøtning av implantert vev og transplanterte organer.

Behandlingen av disse forskjellige immunologiske tilstander har inntil i dag generelt benyttet seg av immunomodulatoriske og immunosuppressive midler. Tre generelle immunosuppressive midler som er i bruk for tiden, er steroider, 5 cyklofosfamid og azatioprin.

Steroider er pleiotropiske antiinflammatoriske midler som hemmer aktiverte makrofager og inhiberer aktiviteten av antigenpresenterende celler på måter som reverserer mange patologiske T-celle-effekter. Cyklofosfamid, et alkyl- 10 ingsmiddel, medierer celledød ved å inhibere DNA-replikasjon og reparasjon. Azatioprin er et antiproliferativt middel som inhiberer DNA-syntesen. Disse ikke-spesifikke immunosuppressive midler er generelt nødvendige i høye doser som øker deres toksisitet (f.eks. nefro- og hepatotoksitet) og forårsaker ugunstige bivirkninger. De er dermed 15 uegnet for langvarig terapi.

Fra artikkelen "Normal development of lymphnodes is disrupted by Soluble LT beta receptor-Ig fusion protein" CP.D. Rennert et al., Eur. Cytokine network, vol. 7 no 2., April 20 - June 1996) er det beskrevet løselig lymfotoksin- β -reseptor CLT- β -R) som administreres til gravide mus, og hvor dette forhindrer utviklingen av lymfoid system i avkommet.

I WO 94/13808 er det beskrevet at bruk av antistoffer mot LT- β (ligand) hemmer interaksjonen mellom LT- β og LT- β -R, 25 og derfor benyttes dette antistoffet terapeutisk for å nedsette immunsystemet og behandle immunologiske sykdommer så som HIV, neoplasia, inflammasjon og inflammatoriske sykdommer.

I EP 536 299 B1 er det beskrevet et protein, p 33, som er 30 det samme som lymfotoksin- β (LT- β). Dette proteinet beskrives brukt som medikament for å modulere immunresponsen i en pasient, og per spesielt mot HIV.

I EP 840 616 er det beskrevet anvendelse av LT- β -R-blokkere for behandling av immunologiske sykdommer så som organavstøtning, multippelsklerose, diabetes, sympatisk oftalmi, uvetitt og psoriasis.

- 5 Fra WO 9703687 er det kjent anvendelse av forbindelser som blokkerer lymfotoksin- β (LT- β) signalisering ved binding til LT- β -ligand eller LT- β -reseptor (LT- β -R) for fremstilling av sammensetninger til behandling av en rekke immunologiske sykdommer.
- 10 Det finnes dermed et utilfredsstilt behov for ytterligere midler og terapier som overvinner problemene forårsaket av konvensjonelle behandlinger.

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

- Foreliggende oppfinnelse løser problemene som ble nevnt ovenfor, ved å tilveiebringe farmasøytiske sammensetninger til behandling av immunologiske sykdommer ved å inhibere signaleringen av lymfotoksin- β -reseptor (LT- β -R) ved bruk av lymfotoksin- β -reseptorblokkerende midler. Nærmere bestemt er sammensetningene omfattende LT- β -R-blokkerende midler nyttige for å inhibere antistoffmedierte immunresponser, for å regulere adressinekspresjonsnivået og celledtrafikken, for å påvirke differensieringen av follikkel-dendrittceller og for å endre den strukturelle organisasjon av sekundære lymfevev og lignede lymfestrukturer som opptrer i patologiske tilstander, så som f.eks. systemisk lupus erythematosus og idiopatisk trombocytopenia purpura. I tillegg er det fremstilte medikamentet i visse utførelser nyttig for å endre assosiasjonen mellom immunkomplekser og B-celler. Nærmere bestemt kan de fremstilte medikamenter forebygge presentasjonen eller avsettingen av antigener på celler, eller alternativt tilnærmet løse opp eller hviske ut antigener som allerede foreligger på celler.

I alternative utførelser velges det LT- β -R-blokkerende middel fra gruppen omfattende løselig lymfotoksin- β -R, et antistoff rettet mot LT- β -R, og et antistoff rettet mot overflate-LT-ligand.

- 5 I én utførelse tilveiebringes løselige former av lymfotoksin- β -reseptorekstracellulær domene som virker som LT- β -R-blokkerende midler. De foretrukne sammensetninger av denne utførelse omfatter et rekombinant lymfotoksin- β -reseptorfusjonsprotein som har LT- β -R-ekstracellulær ligandbindende
10 domene kombinert med en immunoglobulinkonstant tung kjededomene. Mer foretrukket er LT- β -R-ligandbindende domene kombinert med human IgG-Fc-domene.

- I en annen utførelse av denne oppfinnelse tilveiebringes medikamenter med antistoffer som virker som LT- β -R-blokkerende midler. Foretrukne sammensetninger av denne utførelse
15 omfatter ett eller flere antistoffer rettet mot lymfotoksin- β -reseptor. Mer foretrukket er antistoffet et monoklonalt antistoff. Andre foretrukne sammensetninger av denne utførelse omfatter ett eller flere antistoffer rettet mot
20 overflatelymfotoksin. Mer foretrukket er antistoffet et monoklonalt antistoff rettet mot lymfotoksin- β . Foretrukne antistoffer omfatter anti-humant BT- β -R-mAb'et BDA8 og anti-humant LT- β -mAb'et B9.

- I enda andre utførelser kan det dannes medikamenter som er
25 egnet til endring av den humorale immunrespons i et dyr. I visse andre utførelser kan det aktuelle medikament belegge LT- β -R-positive celler i ca. 1-14 dager. Den farmasøytiske sammensetning kan i visse utførelser ytterligere omfatte en farmasøytisk akseptabel bærer eller adjuvans.

- 30 I andre utførelser inhiberer det aktuelle medikament LT- β -R-signaleringsen uten å inhibere TNF-R-signaleringsen, ved bruk av de LT- β -R-blokkerende midler som ble beskrevet ovenfor.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 er en sekvens av det ekstracellulære parti av human LT β -reseptor som koder for det ligandbindende domene.

5 **Figur 2** er en immunohistokjemisk analyse av milten av mus som fikk flere injeksjoner av LT β -R-Ig eller LFA-3-Ig-fusjonsproteiner, og antigen.

10 **Figur 3** er en immunohistokjemisk analyse som viser fraværet av germinale sentre fra milter av mus som var blitt behandlet med LT β -R-Ig og MR-1 (anti-CD40-ligand-antistoff), og nærværet av follikkeldendrittceller i miltene av mus som var blitt behandlet med MR-1, men ikke med LT β -R-Ig. Fusjonsproteiner og SRBC-antigen ble administrert slik det ble beskrevet for figur 2.

15 **Figur 4** er en immunohistokjemisk analyse som viser at adressinekspresjonen er endret i LN av mus som er blitt behandlet med LT β -R-Ig *in utero* og kontinuerlig etter fødselen.

20 **Figur 5** er en immunohistokjemisk analyse av lymfocyttoposisjoneringen og ekspresjonen av makrofagmarkører i mesenterisk LN av mus som (slik som for figur 4) var blitt behandlet med LT β -R-Ig *in utero* og kontinuerlig etter fødselen.

Figur 6 er en immunohistokjemisk analyse som viser at LT β -R-Ig-behandling av mus inhiberer antistoffresponsen mot SRBC.

25 **Figur 7** er en representasjon av immunkompleksinnfanging på FDC'er.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

For at oppfinnelsen som skal beskrives i det følgende skal kunne forstås bedre, bringes den følgende detaljerte beskrivelse.

5 Begrepene "immunoglobulin-respons" eller "humoral respons" slik de brukes her, vedrører den immunologiske respons av et dyr mot et fremmed antigen, hvor dyret produserer antistoffer mot det fremmede antigen. Th2-klassen av T-hjelperceller er viktige for den virksomme produksjon av høyaffinitets antistoffer.
10

Begrepet "germinalt senter" slik det brukes her, viser til en sekundær B-cellefollikkel som dannes etter antigenimmunisering. Utseendet av denne histologiske stilling korrelerer med en optimal hukommelsesgenerering, isotypeveksling, somatisk hypermutasjon og dermed affinitetsmodningen av en antistoffrespons.
15

Begrepet "marginalsone" eller "marginalsonetypeområde" viser til histologisk beskrevne avdelinger av sekundære lymfevev som hovedsaklig består av marginalsonemakrofager (MZM), metallofile makrofager (MM), marginalsone-B-celler og retikulære celler, og også T-celler og dendrittceller. Den arterielle blodstrøm fører til de marginale sinus og gir dermed antigener direkte tilgang til disse celler og fremmer cellulære reaksjoner mot antigen på dette sted.
20

25 Begrepet "adressin" slik det brukes her, viser til et molekyl som er innblandet i målrettingen av lymfocytter mot sekundære lymfeorganer. Slike molekyler uttrykkes på endotelceller, spesielt høyendotelvenulene i lymfeknutene. Miltens adressin er ikke definert. MAdCAM-1 er et mukosalt adressin; PNA_d er et perifert adressin.
30

Begrepet "T-hjelperceller" (Th-celler) slik det brukes her, vedrører en funksjonell undergruppe av T-celler som hjelper med å generere cytotoksiske T-celler og som samvirker med B-celler for å stimulere en antistoffproduksjon. Hjelper-T-celler gjenkjenner antigener i forbindelse med klasse II-MHC-molekyler, og tilveiebringer kontaktavhengige og kontaktuavhengige (cytokin-) signaler til effektorceller.

Begrepet "cytokin" slik det brukes her, vedrører et molekyl som medierer signalering mellom celler. Et "lymfokin" er et cytokin som frigis av lymfocytter.

Begrepet "Th2" viser til en undergruppe av T-hjelperceller som produserer $LT\alpha$, interferon- γ og IL-2 (og andre cytokiner) og som utløser inflammatoriske reaksjoner forbundet med en cellulær, dvs. ikke-immunoglobulin, respons på en utfordring.

Begrepet "Th2" vedrører en undergruppe av T-hjelperceller som danner cytokiner, så som IL-4, IL-5, IL-6 og IL-10, som er forbundet med en immunoglobulin- (humoral) respons mot en immunutfordring.

Begrepet "Fc-domene" av et antistoff viser til en del av molekylet som omfatter hengsel-, CH2- og CH3-domene, men som mangler antigenbindingsstillingene. Begrepet skal også omfatte de likeverdige områder av et IgM eller en annen antistoff-isotype.

Begrepet "anti- $LT\beta$ -reseptorantistoff" viser til hvilket som helst antistoff som spesifikt bindes til i det minste én epitop av $LT\beta$ -reseptor.

Begrepet "anti-LT-antistoff" viser til hvilket som helst antistoff som spesifikt bindes til i det minste én epitop av $LT\alpha$, $LT\beta$ eller et $LT\alpha/\beta$ -kompleks.

Begrepet "LT β -R-signalering" viser til molekylære reaksjoner forbundet med LT β -R-banen og påfølgende molekylære reaksjoner som forårsakes derav.

Begrepet "LT β -R-blokkerende middel" vedrører et middel som
5 kan nedsette ligandens binding til LT β -R, celleflate-LT β -R-opphopning eller LT β -R-signalering, eller som kan påvirke hvordan LT β -R-signalet tydes i cellen.

Et LT β -R-blokkerende middel som virker i trinnet for ligand-reseptorbinding, kan inhibere LT-ligandbinding til
10 LT β -R med minst 20%. Eksempler på LT β -R-blokkerende midler omfatter løselige LT β -R-Fc-molekyler og anti-LT α -, anti-LT β -, anti-LT α / β - og anti-LT β -R-Ab'er. Fortrinnsvis kryss-reagerer antistoffene ikke med den utsondrede form for LT α .

15 Begrepet "LT β -R-biologisk aktivitet" viser til: 1) evnen av LT β -R-molekylet eller derivatet til å konkurrere om den løselige eller overflate-LT-ligands binding med løselige eller overflate-LT β -R-molekyler; eller 2) nativ LT β -aktivitet så som evnen til å stimulere en immunregulatorisk respons
20 eller cytotoxisk aktivitet.

Begrepet "LT-ligand" viser til et LT α / β -heteromert kompleks eller derivat derav som kan bindes spesifikt til LT β -reseptor.

Begrepet "LT β -R-ligandbindende domene" viser til det parti
25 eller de partier av LT β -R som er innblandet i den spesifikke gjenkjenning av og vekselvirkning med en LT-ligand.

Begrepene "overflate-LT" og "overflate-LT-kompleks" viser til et kompleks som omfatter LT α - og membranbundne LT β -underenheter, også mutante, endrede og kimære former av én
30 eller flere av underenhetene, som fremvises på celleoverflaten. "Overflate-LT-ligand" viser til et overflate-LT-

kompleks eller derivat derav som kan bindes spesifikt på LT β -reseptor.

Begrepet "individ" viser til et dyr eller til én eller flere celler avledet fra et dyr. Fortrinnsvis er dyret et pattedyr. Cellene kan foreligge i hvilken som helst form, omfattende celler som holdes fast i vev, celleopphopninger, udødeliggjorte, transfiserte eller transformerte celler, og celler avledet fra et dyr som er blitt fysisk eller fenotypisk endret.

10 **Lymfotoksin β : Et medlem av TNF-familien**

Tumornekrosefaktor (TNF)-relaterte cytokiner fremtrer som en stor familie av pleiotropiske mediatorer av vertforsvar og immunregulering. Medlemmer av denne familie finnes i membranbundne former som virker lokalt ved celle/cellekontakt, eller som utsondrede proteiner som kan virke på fjerne mål. En parallell familie av TNF-relaterte reseptorer reagerer med disse cytokiner og utløser forskjellige baner omfattende celledød, celleproliferasjon, vevdifferensiering og proinflammatoriske responser.

20 TNF, lymfotoksin α (LT α , også benevnt TNF β) og lymfotoksin β (LT β) er elementer av TNF-ligandfamilien, som også omfatter ligandene til Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 og 4-1BB-reseptorer (Smith et al., Cell, 76, s. 959-962 (1994)). Signaler av flere medlemmer av TNF-familien, omfattende
25 TNF, LT α , LT β og Fas, kan indusere svulstcelledød ved nekrose eller apoptose (programmert celledød). I ikke-svulstceller, påvirker TNF og mange av TNF-familiens ligandreseptor-vekselvirkninger immunsystemutviklingen og responser på forskjellige immunutfordringer.

30 De fleste membranbundne LT α / β -komplekser ("overflate-LT") har LT α 1/ β 2-støkiometri (Browning et al., Cell, 72, s. 847-856 (1993); Browning et al., J. Immunol., 154, s. 33-46

(1995)). Overflate-LT-ligander trenger ikke å binde TNF-R med høy affinitet, og aktiverer ikke TNF-R-signalering. LT β -reseptor (LT β -R) binder imidlertid disse overflatelymfotoksinkomplekser med høy affinitet (Crowe et al.,
 5 Science, 264, s. 707-710 (1994)).

LT β -R-signalering, liksom også TNF-R-signalering, har anti-proliferative virkninger og kan være cytotoksiske på svulstceller. I Søkers samtidig svevende US-patentsøknad 08/378.968 beskrives sammensetninger og fremgangsmåter for
 10 å selektivt stimulere LT β -R ved bruk av LT β -R-aktiverende midler. LT β -R-aktiverende midler er nyttige for å inhibere svulstcellevekst uten å ko-aktivere TNF-R-induserte proinflammatoriske eller immunoregulatoriske baner.

Nylige genmålrettingsundersøkelser tyder på at LT α / β spiller en rolle i utviklingen av sekundære lymfeorganer (Banks et al., J. Immunol., 155, s. 1685-1693 (1995); De Togni et al., Science, 264, s. 703-706 (1994)). Faktisk mangler LT α -manglende mus lymfeknuter (LN) og Peyers plakk (PP). Videre har deres milter en avbrutt arkitektur, og ekspressjonen av funksjonelle markører på celler av miltens marginalsone er endret (Banks et al., 1995; De Togni et al.,
 20 Science, 264, s. 703-706 (1994); Matsumoto et al., Science, 271, s. 1289-1291 (1996)). Ingen av disse kjennetegn er blitt beskrevet for noen av musene hvor TNF-reseptor er
 25 blitt slått ut (Erickson et al., Nature, 372, s. 560-563 (1994); Pfeffer et al., Cell, 73, s. 457-467 (1993); Rothe et al., Nature, 364, s. 798-802 (1993)). Søker har nylig oppdaget en rolle for membran-LT α / β -komplekser i utviklingen av sekundære lymfeorganer ved å vise at avkommet av mus som under graviditeten hadde fått injisert en løselig form
 30 for muse-LT β -R smeltet sammen med humant IgG1-Fc-parti (Lt β -R-Ig), manglet de fleste lymfeknuter og oppviste en avbrutt miltarkitektur (Rennert et al., 1996, "Surface Lymphotoxin alpha/beta complex is required for the
 35 development of peripheral lymphoid organs", J. Exp. Med.,

184: 1999-2006). I en annen undersøkelse viste seg mus som var transgene for en lignende LT β -R-Ig-konstruksjon som begynner å uttrykkes tre dager etter fødselen, å ha LN. Imidlertid var deres miltarkitektur avbrutt, og flere markører av milt-marginalsoneceller ble ikke uttrykt (Ettinger et al., "Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble LT β -R/IgG1 fusion protein", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13102-13107). Sammen tyder denne data på at det finnes et temporalt krav på membran-LT-funksjoner for å mediere virkninger på utviklingen av sekundære lymfeorganer, men ikke for virkningen på miltens arkitektur.

TNF-systemet kan også fungere i utviklingen av milten. Miltmarginalsoneceller av TNF-manglende mus uttrykker hverken makrofagmarkører eller MAdCAM-1 (Alexopoulou et al., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, s. 228 (1996); Pasparakis et al., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, s. 239 (1996)). TNF-R55-manglende mus mangler også MAdCAM-1-flekking (men ikke MOMA-1-flekking) i miltens marginalsone (Neumann et al., J. Exp. Med., 184, s. 259-264 (1996); Matsumoto et al., Science, 271, s. 1289-1291 (1996)). Ekspresjonen av disse markører som observeres i milten av TNF-R75-manglende mus, virker normal (Matsumoto et al., Science, 271, s. 1289-1291 (1996)).

Lymfelignende vev dannes ikke bare som en del av utviklingsprosessen, men opptrer også under visse patologiske omstendigheter så som kronisk betennelse, en prosess som nylig har fått navnet neolymphoorganogenese (Picker og Butcher, Annu. Rev. Immunol., 10, s. 561-591 (1992), Kratz et al., J. Exp. Med., 183, s. 1461-1471 (1996)). Slike prosesser påvirkes tydeligvis av TNF-familiemedlemmer. Mus som var transgene for LT α -genet som drives av rotte-insulin-promoter (RIP-LT), utviklet LT-indusert kroniske inflammatoriske lesjoner med egenskaper av organiserte lymfevev (Kratz et al., J. Exp. Med., 183, s. 1461-1471 (1996); Pi-

carella et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, s. 10036-10040 (1992)).

- Bedømmelsen av LT-funksjonen under en T-celleavhengig immunrespons ved bruk av LT α -manglende mus, viste at LT var
 5 nødvendig for GC-dannelsen, eventuelt for å vedlikeholde en organisert follikkeldendrittcelle (FDC)-struktur og for humorale responser (Banks et al., J. Immunol., 155, s. 1685-1693 (1995); Matsumoto et al., Science, 271, s. 1289-1291 (1996); Matsumoto et al., Nature, 382, s. 462-466 (1996)).
- 10 TNF-R55-manglende mus mangler også FDC'er, utvikler ingen GC og utvikler ingen optimal antistoffrespons på røde blodceller fra sau (SRBC). Dette tyder på at TNF-R55 kunne utløses av signaler fra løselig LT eller TNF for de fleste av disse responser (Le Hir et al., J. Exp. Med., 183, s. 2367-2372 (1996), Alexopoulou et al., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, s. 228 (1996); Pasparakis et al.,
 15 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, s. 239 (1996)). En funksjonell rolle for overflate-LT/LT β -R-banen i de humorale immunresponser er pr. idag udefinert.
- 20 LT β -reseptor, et medlem av TNF-familien av reseptorer, bindes spesifikt til overflate-LT-ligander. LT β -R binder LT-heteromere komplekser (hovedsaklig LT α 1/ β 2 og LT α 2/ β 1), men binder hverken TNF eller LT α (Crowe et al., Science, 264, s. 707-710 (1994)). LT β -R-mRNA finnes i human milt, thymus
 25 og generelt organer med immunsysteminnblanding. Selv om undersøkelsene av LT β -R-ekspresjonen befinner seg i et tidlig stadium, virker LT β -R-ekspresjonsmønstrene å ligne hva som er blitt beskrevet for TNF-R55, unntatt at LT β -R mangler på perifere blod-T- og B-celler og T- og B-cellelinjer.
- 30 Celleflatelymfotoksin (LT)-komplekser er blitt karakterisert i CD4⁺-T-celle-hybridomaceller (II-23.D7), som uttrykker høye mengder LT (Browning et al., J. Immunol., 147, s. 1230-1237 (1991); Androlewicz et al., J. Biol. Chem., 267, s. 2542-2547 (1992). Ekspresjonen og de biologiske roller

av $LT\beta$ -R, LT-delenheter og overflate-LT-komplekser er blitt beskrevet av C.F. Ware et al., "The ligands and reseptors of the lymphotoxin system", i Pathways for Cytolysis, Current Topics Microbiol. Immunol., Springer-Verlag, s. 175-
 5 218 (1995).

$LT\alpha$ -ekspresjon induseres, og $LT\alpha$ utsondres, primært av aktiverte T- og B-lymfocytter og naturlige dreperceller (NK). Blant T-hjelpercellene virker $LT\alpha$ å produseres av Th1-,
 10 men ikke Th2-celler. $LT\alpha$ er også blitt påvist i melanocytter. Mikrogli- og T-celler i lesjoner av multippel sklerosepasienter kan også flekkes med anti- $LT\alpha$ -antisera (Selmaj et al., J. Clin. Invest., 87, s. 949-954 (1991)).

Lymfotoksin β (også benevnt p33) uttrykkes på overflaten av humane og murine T-lymfocytter, T-cellelinjer, B-cellelinjer og lymfoksinaktiverte dreperceller (LAK). $LT\beta$ er gjen-
 15 standen for Søkers samtidig svevende internasjonale søknader PCT/US91/04588, publisert den 9. januar 1992 som WO 92/00329; og PCT/US93/11669, publisert den 23. juni 1994 som WO 94/13808.

20 Overflate-LT-komplekser uttrykkes primært av aktiverte T-celler (hjelperceller, Th1 og dreperceller) og B-lymfocytter og naturlige dreperceller (NK) slik det bestemmes ved FACS-analyse eller immunohistologi ved bruk av anti- $LT\alpha$ -antistoffer eller løselige $LT\beta$ -R-Ig-fusjonsproteiner. I Sø-
 25 kers samtidig svevende US-patentsøknad 08/505.606, innlevert den 21. juli 1995, beskrives sammensetninger og fremgangsmåter ved bruk av løselige $LT\beta$ -reseptorer og anti- $LT\beta$ -reseptor- og ligandspesifikke antistoffer som terapeutiske midler for behandling av immunologiske sykdommer som medie-
 30 res av Th1-celler. Overflate-LT er også blitt beskrevet på humane cytotoksiske T-lymfocyttkloner (CTL), aktiverte perifere mononukleære lymfocytter (PML), IL-2-aktiverte perifere blodlymfocytter (LAK-celler), kermesbær-mitogen-aktiverte eller anti-CD40-aktiverte perifere B-lymfocytter

(PBL) og forskjellige lymfesvulster av T- og B-celleopphav. Anvendelse av alloantigenbærende målceller inducerer spesifikt overflate-LT-ekspresjon av CD8⁺- og CD4⁺-CTL-kloner.

Søker har heri beskrevet flere immunologiske funksjoner for overflate-LT og viser virkningene av LT α / β -bindende reagenser på genereringen og kjennetegnene av immunoglobulinresponser, vedlikeholdet av den cellulære organisasjon av sekundære lymfevev, omfattende virkninger på differensieringstilstanden av follikkeldendrittceller og dannelsen av germinalsentre, og adressinekspresjonsnivåer, som påvirker celledtrafikken. Dermed definerer Søker terapeutiske applikasjoner for overflate-LT α / β - og LT β -reseptorbindende midler.

Inntil foreliggende oppfinnelse, har imidlertid betydningen av LT- β -R-signaleringsen på humorale eller immunogene responser ikke vært fullstendig forstått. Oppfinnerne har for første gang oppdaget at blokkering av LT-banen, enten LT- β eller LT- β -R, kan endre den humorale immunrespons i et dyr.

Hvilket som helst blokkerende middel kan brukes i det aktuelle medikament, og en fagmann kan lett bestemme hvilke midler som blokkerer LT- β -R. F.eks. kan slike blokkerende midler omfatte småmolekylære inhibitorer av reseptoren, løselig lymfotoksin β -reseptor, antistoffer rettet mot LT- β -R og antistoffer rettet mot overflate-LT-ligand. I foretrukne utførelser omfatter de blokkerende midler en løselig LT- β -R som har en ligandbindende domene som selektivt kan bindes på en overflate-LT-ligand, og mer foretrukket hvor den løselige LT- β -R omfatter en human immunoglobulin FC-domene.

I andre utførelser omfatter foretrukne blokkerende midler monoklonale antistoffer rettet mot LT- β -R, fortrinnsvis omfattende anti-humant LT- β -R-mAb'et BDA8 og anti-humant LT- β -mAb'et B9. Mer foretrukne antistoffer omfatter A1.D5.18 og AO.D12.10 og BB-F6. I visse tilfeller kan det

være ønskelig å bruke et monoklonalt antistoff som er rettet mot en murin overflate-LT-ligand.

En langvarig presentasjon av antigen med FDC'er er sannsynligvis viktig i autoimmune sykdommer hvor en kontinuerlig
5 aktivering av immunsystemet med endogene eller autoantigener gjør sykdommen varig. Immunkompleksinnfangning på FDC'er illustreres på figur 7. Evnen til å fjerne disse immunkomplekser fra FDC ville tjene til å nedsette styrken av immunaktiveringen og dempe sykdommen eller t.o.m. stanse sykdommens fremskridning. Autoimmunsykdommer som omfatter avvikende antistoffresponser, er åpenbare mål for LT-bane-inhibitorer, selv om andre mer "klassisk" T-cellemedierte autoimmunsykdommer kan ha ubemerkede humorale komponenter og derfor også kan påvirkes gunstig.

15 Likeledes i transplantasjonsfeltet krever en transplantatutstøtning, dvs. "host vs. graft disease" og "graft vs. host disease", en presentasjon av antigen for å holdes ved like. Mekanismene som beskrives heri for å manipulere FDC, kan også gjelde for problemer forbundet med gjenkjenningen
20 av ikke-selv, dvs. transplantasjon.

I tillegg kan den fortsatte presentasjon av antigen eller vedlikeholdet av antigenhukommelse spille en rolle i autoimmune sykdommer som forårsakes av molekylær mimikring. F.eks. fører immunreaksjonen mot infeksjonsmidlet av Lyme-
25 sykdommen, nemlig *Borrelia burgdorferi*, til en artrittliggende sykdom, antakelig fordi et antigenepitop på denne bakterie ligner en normal hengselkomponent. Fjerning av det FDC-bevarte lymebakterieantigen kan lindre Lyme-sykdom-indusert artritt. En slik terapi ville også være relevant for
30 andre tilfeller av mimikring forbundet med infeksjonsmidler.

Søker har overraskende funnet at administrasjon av blokkerende midler mot LT- β -R har evnen til å forstyrre presenta-

sjonen og/eller oppsamlingen av antigener på follikkeldendrittceller. Vanligvis gjenkjenner B-cellene antigener som immunkomplekser bundet på overflaten av follikkeldendrittceller. Follikkeldendrittceller kan beholde antigenene over et ikke definert tidsrom. En periodisk kontakt med antigenene som er igjen på FDC, kan dermed være forbundet med B-cellenes hukommelsesbevaring. Dermed omfatter de aktuelle autoimmune lidelser tallrike sykdomstilstander som er avhengige av presentasjonen av antigen på dendrittceller. Administrasjon av blokkerende midler kan utføres før innføringen av antigen til et dyr, i hvilket tilfelle de blokkerende midler vil forebygge all eller en del av avsettelsen av antigenet på follikkeldendrittceller, hvorved den forventede immunogene respons forebygges eller svekkes. Alternativt kan de blokkerende midler administreres til et dyr i et stadium etter at follikkeldendrittcellene er forbundet med antigen. De aktuelle medikamenter kan forstyrre denne forbindelse, slik at den forventede immunogene respons da svekkes eller unngås. Dermed kan det bli oppnådd en fullstendig eller delvis eliminasjon av immunkompleksene som allerede er fanget i B-cellefolliklene, eller en fullstendig eller delvis forebyggelse av innfangingen av immunkomplekser på B-cellefollikler.

Evnen til å forstyrre bindingen mellom disse antigenpresenterende follikkeldendrittceller og immunkompleksene, virker å være ensartet for LT- β -banen. F.eks. er anti-CD40L (MR-1) et annet medlem av TNF-familien, og uttrykkes også på follikkeldendrittceller. Liksom også LT- β -R/Ig, har MR-1 vist seg å forebygge germinalcelledannelse, men påvirker imidlertid ikke ekspresjonen av FDC-markører. Anti-CD40-L, til forskjell fra LT- β -R, forebygger ikke immunkompleksinnfanging på follikkeldendrittceller, og har heller ikke evnen til å fjerne immunkomplekser som tidligere er blitt fanget på follikkeldendrittceller. I tillegg har Søker vist at anti-CD40-L ikke påvirker overlevelsen/vedlikeholdet av tidligere genererte hukommelses-B-celler.

Selv om det nøyaktige grunnlag for forskjellene mellom virkningen av anti-CD40L og LT- β -R-blokkerende midler ikke er kjent, tror man at CD40 kan gi overlevelsessignaler til B-cellene. Imidlertid er LT-systemet vesentlig for å vedli-
5 keholde follikkeldendrittceller i en fullstendig differensiert og funksjonell tilstand, en tilstand som virker å være nødvendig for germinalsenterreaksjon og generering og vedlikehold av hukommelses-B-celler. Dermed kan en blokkering av CD40/CD40L-banen forebygge genereringen av hukommelses-B-celler, men vil ikke påvirke samlingen av allerede
10 opprettede hukommelses-B-celler. Blokkering av LT-banen på den andre side, forebygger ikke bare genereringen og vedlikeholdet av hukommelses-B-celler, men påvirker også vedlikeholdet av tidligere genererte hukommelses-B-celler.

15 En ytterligere anvendelse av inhiberingen av LT-banen ligger i behandlingen av virus som danner beholdninger i follikkeldendrittcelle (FDC)-avdelingen. HIV-virus er et godt eksempel på et slikt tilfelle. Etter en viral infeksjon holder store mengder smittende virus til på FDC'er i
20 B-cellefollikler av de sekundære lymfeorganer (Heath et al., 1995, "Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity", *Nature* 377: 740-744). Viruset antas å være kompleksdannet med komplement eller immunoglobulin, og bundet til enten Fc-reseptorer eller komplement-
25 reseptorer eller begge deler. Dermed utnytter viruset de normale mekanismer av immunsystemet for å bevare antigenhukommelse over lange tidsrom. I løpet av sykdommen forekommer en aktiv infeksjon av lymfocytter primært på disse steder. Man har beregnet at under den asymptomatiske fase
30 av infeksjonen, er samlingen av virus i denne avdeling over 10 ganger større enn hva som foreligger i T-celler og monocytter (Cavert et al., 1997, "Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection", *Science* 276: 960-964). I dagens HIV-behandlingsformer kombineres flere antivirale midler for å redusere den
35 virale belastning og unngå at resistente varianter unnsli-

per. En sannsynlig begrensning av denne terapi ligger i at
terapien ikke følges og at under slike intervaller, kan
restvirus mutere fritt, hvilket muliggjør utviklingen av
resistente varianter og dermed unngåelsen av terapiforlø-
5 pet. Mens den virale belastning i FDC-avdelingen forstyrres
dramatisk under flerlegemiddelterapi, er legemidlene i og
for seg stort sett rettet mot det virale replikasjonsmaski-
neri, og dermed ikke på den ikke-repliserende virus på FDC-
overflater. Dermed kan den virale beholdning på FDC'er
10 tjene som en gjensmitte etter avslutning av legemiddeltera-
pien. Videre kan FDC'ene omdanne nøytralisert virus til en
smittsom form, hvilket ytterligere understreker betydningen
av disse celler for HIV-patogenesen.

Fordi en inhibering av LT-banen kan gjøre at FDC'er slipper
15 løs immunkomplekser fra celleoverflaten, kunne HIV i form
av et immunkompleks også frigis. Det ville være ønskelig å
frigi hele HIV-belastningen i denne avdeling umiddelbart
før starten av flerterapitypekurer, fordi det frigitte vi-
rus enten bør behandles og fjernes fra kroppen fordi det
20 ellers etter smitte ville være følsomt for legemiddeltera-
pi. En slik kombinasjon ville nedsette restvirusbelastnin-
gen til meget lave nivåer og eventuelt føre til en helbred-
ning. I dette tilfelle ville enten LT β -R/Ig eller blokke-
rende antistoffer mot enten liganden eller reseptoren være
25 nyttige. En potensiell behandlingskur ville omfatte å ini-
tiere legemiddelterapi og deretter i løpet av flere dager,
frigi alt bundet virus med én eller flere behandlinger med
LT-baneinhibitorer. Så snart den virale belastning var ned-
satt, ville det ikke lenger være nødvendig med noen ytter-
30 ligere behandling med LT-rettete midler.

Selv om HIV er et spesielt godt undersøkt eksempel, er det
sannsynlig at andre virus holder til eller gjemmer seg på
FDC'er i en hviletilstand mens de venter på inntreden av en
begivenhet så som en immunologisk forstyrrelse, som fører
35 til store mengder av ytterligere antigenbelastning og der-

etter frigivningen av bundet virus fra FDC'er og virus-gjenopptreden.

Denne oppdagelse har vesentlige implikasjoner for et antall sykdommer som avhenger av presentasjonen av antigen på dendrittceller og responser som genereres av hukommelses-B-celler. LT α 1/ β 2-signalering virksomt og tjener som et eksempel på en terapeutisk nyttig signalblokkering med anti-LT β -blokkerende antistoff. I tillegg kunne et anti-humant LT-alfa-rettet monoklonalt antistoff som benevnes AOD12, blokkere LT α 1/ β 2-signaleringen godt, men i motsetning til de fleste anti-humant LT-alfa-monoklonale antistoffer, hadde det kun dårlig virkning mot kun LT α . Disse monoklonale antistoffer ble erholdt etter immunisering av mus med løselig LT α 1/ β 2-ligand, hvilket førte til oppdagelsen av monoklonale antistoffer med en ensartet spesifisitet. Videre hevder vi at anti-LT α -monoklonale antistoffer med spesifisitet som er foretrukket rettet mot LT α 1/ β 2-komplekset, kun vil finnes etter denne form for immunisering, og ikke ved immunisering med kun LT-alfa, og omfatter dermed en ensartet klasse anti-LT α -antistoffer.

EKSEMPLER**Materialer og fremgangsmåter****Mus**

- 5 Tidsovervåkede gravide Balb/c-mus ble ervervet fra Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), plassert under konvensjonell gitterbeskyttelse og håndtert i henhold til institusjonelle retningslinjer. Reseptor-Ig-proteiner eller mAb'er ble injisert i halevenen (iv) av gravide mus. Avkommet fra disse
- 10 mus og 5 uker gamle Balb/c-mus av hunnkjønn (ervervet fra Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) fikk injisert fusjonsproteiner via den intraperitoneale (ip) rute.

Fusjonsproteiner og antistoffer

- 15 Fusjonsproteiner som omfattet det ekstracellulære domene av enten murint LT β -R, humant TNF-R55 eller humant LFA-3 (som ikke binder murint CD2) sammensmeltet med hengsel-, C_H2- og C_H3-domene av humant IgG1, ble fremstilt som beskrevet (Force et al., J. Immunol., 155, s. 5280-5288 (1995); Miller et al., J. Exp. Med., 178, s. 211-222 (1993)). Renset
- 20 humant IgG1 som ble brukt som kontroll, ble ervervet fra Protos Immunoresearch (San Francisco, CA). MR1, anti-muse-CD40-ligand-antistoff, ble ervervet fra Pharmingen (San Diego, CA).
- 25 Antistoffer (MOMA-1, ED3) som er spesifikke for markører som uttrykkes av muse-metallofile makrofager (MM) (ED3 gjenkjenner sialoadhesin), eller spesifikke for muse-retikulære fibroblaster (ER-TR-7), ble ervervet fra Serotec (Oxon, UK). Antistoffer som er spesifikke for muse-B220,
- 30 CD4 og MAdCAM-1 (MECA 367), ble ervervet fra Pharmingen (San Diego, CA). Et antistoff (ER-TR-9) som er spesifikt for en markør som uttrykkes av muse-marginalsone-makrofager, ble stilt til rådighet av Dr. Reina Mebius (Vrije Universiteit, Amsterdam). Antistoffer (FDC-M1 og FDC-M2) som

er spesifikke for muse-follikeldendrittcelle (FDC), er blitt beskrevet tidligere (Maeda et al., J. Immunol., 148, s. 2340-2347 (1992)). Anti-muse-CR1-antistoff (som også flekker FDC) ble vennlig stilt til rådighet av Dr. Randolph J. Noelle (Dartmouth Medical School). Påvisning av perifert lymfeknuteadressin (PNAd) benyttet seg av antistoffet MECA 79 (cellekultursupernatant avledet fra celler som ble ervervet fra ATCC, Rockville, MD).

Antigener og immuniseringer

10

Mus ble immunisert ip med 100 μ l 10% suspensjon av SRBC (ervert fra Colorado Serum Company). Dette er likeverdig med $1-5 \times 10^8$ SRBC pr. immunisering.

Immunohistokjemi

15

Milt og lymfeknuter ble fryst ned i OCT-innesluttingsmedium (Miles, Elkhart, IN) og montert for kryostat-snitting. 7-10 mm tykke snitt ble tørket og fiksert med aceton. Snittene ble deretter inkubert med konjugerte antistoffer i 1 time ved romtemperatur i en fuktet boks etter fortynning i Tris-bufret saltvannbuffer A (TBS-A, 0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,05% Tween 20 (vol/vol), 0,25% bovint serumalbumin (BSA)), skylt i TBS-B (0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,05% Tween 20) og fiksert i 1 minutt i metanol før initiering av den enzymatiske reaksjon. Pepperrotperoksidase (HRP)- og alkalifosfatase (AP)-aktivitetene ble utviklet ved bruk av DAB-tablettsubstratsettet (Sigma, St. Louis, MO) hhv. 5-brom-4-klor-3-indolylfosfatase/nitro-blå-tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma). Vevsnitt ble fiksert i 5 minutter i metanol og kon-
traflekket med Giemsa (Fluka, Buchs, Sveits).

30

Fluorescens-bildeanalyse

For immunofluorescensflekking ble frosne snitt fiksert i aceton, lufttørket og forhåndsblokkert med 5 μ g/ml anti-

CD16/CD32-Fc-blokkerer (Pharmingen, San Diego CA) i Tris-bufret saltvann med 0,25% BSA, 0,05% Tween 20 og 10% varme-aggregert kaninserum. Snittene ble flekket i samme buffer ved bruk av de følgende mAb'er og påvisningsreagenser: 10
 5 µg/ml biotinylert anti-B220-mAb (Pharmingen) etterfulgt av 20 µg/ml streptavidin-FITC (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL); 10 µg/ml MECA 367 etterfulgt av 10 µg/ml PE-geite-F(ab')₂-anti-rotte-IgG (Southern Biotechnology Associates); kultursupernatant av MECA79 etterfulgt av
 10 20 µg/ml FITC-muse-anti-rotte-IgM (Pharmingen); 20 µg/ml anti-sialoahesin-mAb etterfulgt av 10 µg/ml PE-geite-F(ab')₂-anti-rotte-IgG (Southern Biotechnology Associates), 50 µg/ml biotinylert PNA (Vector Laboratories, Burlingame, CA) etterfulgt av 10 µg/ml streptavidin-PE (Southern Bio-
 15 technology Associates); 1:5-fortynning av mAb-MOMA-1-celle-kultursupernatant etterfulgt av 20 µg/ml FITC-muse-anti-rotte-IgM (Pharmingen). Noen snitt ble flekket med flere mAb'er samtidig for å muliggjøre en bildeoverlappingsanalyse. Alle snitt ble observert under 50X optika og fotogra-
 20 fert ved bruk av Ektachrome P1600 (Kodak, Rochester, NY) eller innhentet som adskilte røde og grønne bildefiler slik som beskrevet (Rennert et al., J. Exp. Med. (november 1996, i trykk)).

Hemagglutinasjonsassayer

25

Serielle fortynninger av sera ble utført i 96 brønners mikrotiterplater (Costar, Cambridge, MA) i PBS/1% glukose. Den SRBC-spesifikke IgM-titer ble bestemt ved å sette til
 25 µl 10% SRBC-suspensjon til hver brønn og inkubere platen
 30 i 1 time i en fuktet 37°C inkubator. For SRBC-spesifikt IgG ble sera inkubert i 30 minutter ved 37°C med 20 µl/brønn 1% 2-merkapttoetanol (vol/vol) (Bio-Rad, Richmond, CA) for å fjerne IgM-pentamerer. Deretter ble det satt til 25
 µl/brønn 10% SRBC-suspensjon, etterfulgt av 25 µl/brønn 10
 35 mg/ml-oppløsning (i PBS/1% glukose) geite-anti-muse-IgG (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) som fornetnings-

middel for hemagglutinasjon. Titeren ble bestemt som resiproken av den siste serumfortynning som hemagglutinasjonen er klart synlig for.

ELISA-assayer

5

Analyser for reseptor-Ig i plasma benyttet mAb'er som er spesifikke for murint LT β -R (Browning et al., manuskript under forberedelse), LFA-3 (Miller et al., J. Exp. Med., 178, s. 211-222 (1993)) eller CH3-domene av humant IgG
 10 (CDG5, fremstilt av Biogen) direkte immobilisert (10 μ g/ml) på 96-brønners plater for innfanging, og esels antihumant IgG₁-pepperrotperoksidase (HRP) for påvisning (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, 1:4000-fortynning).

Fremstilling av løselige LT β -R-molekyler

15

De LT β -R-blokkerende midler omfatter i én utførelse av foreliggende oppfinnelse løselige LT β -reseptormolekyler. Figur 1 viser sekvensen av det ekstracellulære parti av humant LT β -R, som koder for det ligandbindende domene. Ved
 20 bruk av sekvensinformasjonen på figur 1 og rekombinante DNA-teknikker som er velkjent innen faget, kan funksjonelle fragmenter som koder for LT β -R-ligandbindende domene klones inn i en vektor og uttrykkes i en egnet vert for å danne et løselig LT β -R-molekyl. Løselige LT β -R-molekyler som kan
 25 konkurrere med native LT β -reseptorer om LT-ligandbinding i henhold til assayene som beskrives i Søkers samtidig svedende US-søknad 08/505.606, innlevert den 21. juli 1995, velges som LT β -R-blokkerende midler.

En løselig LT β -reseptor som omfatter aminosyresekvenser
 30 valgt fra dem som vises på **figur 1**, kan festes på én eller flere heterologe proteindomener ("fusjonsprotein") for å øke *in vivo*-stabiliteten av reseptorfusjonsproteinet eller modulere dens biologiske aktivitet eller lokalisering.

Fortrinnsvis brukes stabile plasmaproteiner, som vanligvis har en halveringstid på over 20 timer i sirkulasjonen, for å konstruere reseptorfusjonsproteinene. Slike plasmaproteiner omfatter: immunoglobuliner, serumalbumin, lipoproteiner, apolipoproteiner og transferrin. Sekvenser som kan målrette det løselige $LT\beta$ -R-molekyl mot en bestemt celle- eller vevstype, kan også festes på $LT\beta$ -R-ligandbindende domene for å danne et spesifikt lokalisert løselig $LT\beta$ -R-fusjonsprotein.

- 10 Hele eller et funksjonelt parti av det $LT\beta$ -R-ekstracellulære parti (**figur 1**) omfattende $LT\beta$ -R-ligandbindende domene, kan kombineres med et immunoglobulin-konstant parti så som Fc-domene av humant IgG1-tung kjede (Browning et al., J. Immunol., 154, s. 33-46 (1995)). Løselig reseptor/IgG-fusjonsproteiner foretrekkes og er vanlige immuno-
- 15 logiske reagenser, og fremgangsmåter ved deres fremstilling er kjent innen faget (jfr. f.eks. US-patent 5.225.538).

- Et funksjonelt $LT\beta$ -R-ligandbindende domene kan kombineres med et immunoglobulin (Ig)-Fc-domene avledet fra en annen
- 20 immunoglobulinklasse eller underklasse enn IgG1. Fc-domener av antistoffer som tilhører forskjellige Ig-klasser eller underklasser, kan aktivere diverse sekundære effektorfunksjoner. Aktivering finner sted når Fc-domene bindes av en cognat Fc-reseptor. Sekundære effektorfunksjoner om-
- 25 fatter evnen til å aktivere komplementsystemet, å krysse placenta og å binde forskjellige mikrobielle proteiner. Egenskapene av de forskjellige klasser og underklasser av immunoglobuliner beskrives i Roitt et al., Immunology, s. 4.8 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. utg., 1993).

- 30 Aktivering av komplementsystemet initierer kaskader av enzymatiske reaksjoner som medierer betennelse. Produktene av komplementsystemet har forskjellige funksjoner, omfattende binding av bakterier, endocytose, fagocytose, cytotoxisi-

tet, dannelselse av frie radikaler og løseliggjøring av immun-komplekser.

Komplementenzymkaskaden kan aktiveres av Fc-domener av antigenbundet IgG1, IgG3 og IgM-antistoffer. Fc-domene av
5 IgG2 virker å være mindre effektiv, og Fc-domene av IgG4, IgA, IgD og IgE kan ikke aktivere komplementet. Dermed kan man velge et Fc-domene på grunnlag av om dens forbundne sekundære effektorfunksjoner er ønskelige for den bestemte immunrespons eller sykdom som skal behandles med LT β -R-Ig-
10 fusjonsproteinet.

Hvis det ville være fordelaktig å skade eller drepe den LT-ligandbærende målcelle, kunne man velge et spesielt aktiv Fc-domene (IgG1) for å fremstille LT β -R-Ig-fusjonsproteinet. Alternativt, hvis det ville være ønskelig å målrette LT β -R-
15 Fc-fusjonsproduktet mot en celle uten å utløse komplementsystemet, bør en inaktiv IgG4-Fc-domene velges.

Mutasjoner i Fc-domener som nedsetter eller fjerner bindingen til Fc-reseptorer og komplementaktivering, er blitt beskrevet (S. Morrison, Annu. Rev. Immunol., 10, s. 239-265
20 (1992)). Disse eller andre mutasjoner kan brukes for seg selv eller i kombinasjon, for å optimere aktiviteten av Fc-domenet som brukes for å konstruere LT β -R-Ig-fusjonsproteinet.

Produksjonen av et løselig humant LT β -R-fusjonsprotein som
25 omfatter ligandbindingssekvenser kombinert med et humant immunoglobulin-Fc-domene (hLT β -R-Ig), beskrives i eksempel 1. En CHO-linje som ble fremstilt i henhold til eksempel 1 og som utsondrer hLT β -R-Fc, benevnes "hLT β -R;hG1 CHO#14". En prøve av denne linje ble deponert den 21. juli 1995 hos
30 American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) i henhold til bestemmelsene i Budapest-avtalen, og fikk ATCC-tilgangsnummeret CRL11965.

Produksjonen av et løselig $\text{LT}\beta$ -R-fusjonsmolekyl ($\text{LT}\beta$ -R-Ig) beskrives i eksempel 2. En CHO-linje som ble fremstilt i henhold til eksempel 2 og som utsondrer $\text{LT}\beta$ -R-Ig, benevnes "m $\text{LT}\beta$;R-hG1 CHO#1.3.BB". En prøve av denne cellelinje ble
5 deponert den 21. juli 1995 hos American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) i henhold til bestemmelsene i Budapest-avtalen, og fikk ATCC-tilgangsnummeret CRL11964.

Forskjellige aminosyreresiduer som danner koblingspunktet av reseptor-Ig-fusjonsproteinet, kan endre strukturen, stabiliteten og den endelige biologiske aktivitet av det løselige $\text{LT}\beta$ -reseptorfusjonsprotein. Én eller flere aminosyrer
10 kan settes til C-terminus av det valgte $\text{LT}\beta$ -R-fragment for å modifisere koblingspunktet med det valgte fusjonsdomene.

N-terminus av $\text{LT}\beta$ -R-fusjonsproteinet kan også varieres ved å endre posisjonen i hvilken det valgte $\text{LT}\beta$ -R-DNA-fragment
15 spaltes i sin 5'-ende for innføyelse i den rekombinante ekspresjonsvektor. Stabiliteten og aktiviteten av hvert $\text{LT}\beta$ -R-fusjonsprotein kan testes og optimeres ved rutinemessig eksperimentering og assayene for seleksjon av $\text{LT}\beta$ -R-blokkerende midler som beskrives heri.
20

Ved bruk av $\text{LT}\beta$ -R-ligandbindende domenesekvensene i det ekstracellulære domene som vises på **figur 1**, kan aminosyresekvensvarianter også konstrueres for å modifisere affiniteten av den løselige $\text{LT}\beta$ -reseptor eller fusjonsproteinet
25 for LT-ligand. De løselige $\text{LT}\beta$ -R-molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse kan konkurrere om LT-ligandbinding med endogene celleoverflate- $\text{LT}\beta$ -reseptorer. Det er Søkernes oppfatning at hvilket som helst løselig molekyl som omfatter et $\text{LT}\beta$ -R-ligandbindende domene som kan konkurrere med
30 leoverflate- $\text{LT}\beta$ -reseptorer om LT-ligandbindingen, er et $\text{LT}\beta$ -R-blokkerende middel som faller innen rammen for foreliggende oppfinnelse.

Kilde for anti-LT β -R-antistoffer

I en annen utførelse av foreliggende oppfinnelse virker antistoffer som er rettet mot human LT β -reseptor (anti-LT β -R-Ab'er), som LT β -R-blokkerende midler. De anti-LT β -R-Ab'er
 5 ifølge foreliggende oppfinnelse kan være polyklonale eller monoklonale (mAb'er) og kan modifiseres for å optimere deres evne til å blokkere LT β -R-signalering, deres *in vivo*-biotilgjengelighet, stabilitet eller andre ønskelige trekk.

Polyklonale antistoffsera rettet mot human LT β -reseptor
 10 fremstilles ved bruk av konvensjonelle teknikker ved å subkutant injiseres til dyr så som geit, kanin, rotte, hamster eller mus, et humant LT β -reseptor-Ig-fusjonsprotein (eksempel 1) i fullstendig Freund's adjuvans, etterfulgt av en intraperitoneal eller subkutan boosterinjeksjon i ufullstendig Freund's. Polyklonale antisera som inneholder de ønskede
 15 antistoffer rettet mot LT β -reseptor, velges ut i henhold til konvensjonelle immunologiske prosedyrer.

Muse-monoklonale antistoffer (mAb'er) rettet mot et humant LT β -reseptor-Ig-fusjonsprotein fremstilles slik det beskrives i Søkers samtidig svevende US-søknad 08/505.606, innlevert den 21. juli 1995. En hybridomacellelinje
 20 (BD.A8.AB9) som danner muse-anti-humant LT β -R-mAb'et BDA8, ble deponert den 12. januar 1995 hos American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) i henhold til bestemmelse i Budapest-avtalen, og fikk ATCC-tilgangsnummeret
 25 HB11798.

Forskjellige former for anti-LT β -R-antistoffer kan også fremstilles ved bruk av standard rekombinante DNA-teknikker (Winter og Milstein, Nature, 349, s. 293-299 (1991)). For
 30 eksempel kan chimeriske antistoffer konstrueres, hvor det antigenbindende domenet fra et dyreantistoff bindes til et humant konstant domene (f.eks. Cabilly et al., US 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81,

s. 6851-6855 (1984)). Chimeriske antistoffer nedsetter den observerte immunogene respons som utløses av dyreantistoffer når de brukes i klinisk behandling av mennesker.

I tillegg kan rekombinante "humaniserte antistoffer" som gjenkjenner LT β -R, syntetiseres. Humaniserte antistoffer er chimeriske antistoffer som til største del omfatter humane IgG-sekvenser, hvor regionene som er ansvarlige for den spesifikke antigenbinding er blitt innføyd i (f.eks. WO 94/04679). Dyr immuniseres med det ønskede antigen, de tilsvarende antistoffer isoleres og det parti av de variable partisekvenser som er ansvarlig for den spesifikke antigenbinding, fjernes. De dyreavledede antigenbindende partier klones deretter inn i den tilsvarende posisjon av humane antistoffgener hvor de antigenbindende partier er blitt fjernet. Humaniserte antistoffer minimerer bruken av heterologe (inter-art) sekvenser i humane antistoffer, og vil mindre sannsynlig utløse immunresponser i individet som behandles.

Konstruksjon av forskjellige klasser av rekombinante anti-LT β -R-antistoffer kan også oppnås ved å fremstille chimeriske eller humaniserte antistoffer som omfatter de anti-LT β -R-variable domener og humane konstante domener (CH1, CH2, CH3) isolert fra forskjellige immunoglobulinklasser. For eksempel kan anti-LT β -R-IgM-antistoffer med økt antigenbindingsstillingsvalens produseres rekombinant ved å klonе antigenbindingsstillingen inn i vektorer som bærer human μ -kjedekonstante partier (Arulanandam et al., J. Exp. Med., 177, s. 1439-1450 (1993); Lane et al., Eur. J. Immunol., 22, s. 2573-2578 (1993); Traunecker et al., Nature, 339, s. 68-70 (1989)).

I tillegg kan standard rekombinante DNA-teknikker brukes for å endre bindingsaffinitetene av rekombinante antistoffer med sine antigener ved å skifte ut aminosyreresiduer i nærheten av antigenbindingsstillingene. Antigenbindingsaf-

finiteten av et humanisert antistoff kan økes ved mutagenese basert på molekylær modellering (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, s. 10029-10033 (1989); WO 94/04679).

- 5 Det kan være ønskelig å øke eller nedsette affiniteten av anti-LT β -R-Ab'er for LT β -R'en avhengig av den tilsiktede vevtype eller den bestemte behandlingsplan som er planlagt. F.eks. kan det være fordelaktig å behandle en pasient med konstante mengder anti-LT β -R-Ab'er med en nedsatt evne til
10 å signalere gjennom LT β -banen, for semiprofylaktiske behandlinger. På samme måte kan inhibitoriske anti-LT β -R-Ab'er med en økt affinitet for LT β -R'en være fordelaktige for kortvarige behandlinger.

Kilde for anti-overflate-LT-ligandantistoffer

- 15 En annen foretrukket utførelse av foreliggende oppfinnelse anvendes sammensetninger omfattende antistoffer rettet mot LT-ligand som virker som LT β -R-blokkerende midler. Slik det ble beskrevet ovenfor for anti-LT β -R-Ab'ene, kan anti-LT-ligandantistoffer som virker som LT β -R-blokkerende midler,
20 være polyklonale eller monoklonale, og kan være modifisert i henhold til rutineprosedyrer for å modulere deres anti-genbindingsegenskaper og deres immunogenisitet.

- Anti-LT-antistoffene kan utvikles mot én av de to LT-delenheter hver for seg, omfattende løselige, mutante, endrede
25 og chimeriske former av LT-delenheten. Hvis LT-delenheter brukes som antigen, er de fortrinnsvis LT β -delenheter. Hvis LT α -delenheter brukes, foretrekkes det at de dannede anti-LT α -antistoffer bindes til overflate-LT-ligand og ikke kryssreagerer med utsondret LT α eller modulerer TNF-R-
30 aktiviteten (i henhold til assayene som beskrives i Søkers samtidig svevende US-søknad 08/505.606, innlevert den 21. juli 1995).

Alternativt kan antistoffer rettet mot et homomert ($LT\beta$) eller heteromert ($LT\alpha/\beta$) kompleks omfattende én eller flere LT-delenheter utvikles og testes for sin aktivitet som $LT\beta$ -R-blokkerende midler. Fortrinnsvis brukes $LT\alpha 1/\beta 2$ -komplekser som antigen. Slik det ble beskrevet ovenfor, foretrekkes det at de dannede anti- $LT\alpha 1/\beta 2$ -antistoffer bindes på overflate-LT-ligand uten å bindes til utsondret $LT\alpha$ og uten å påvirke TNF-R-aktiviteten.

Fremstillingen av polyklonale antihumane $LT\alpha$ -antistoffer beskrives i Søkers samtidig svevende søknad (WO 94/13808). Monoklonale anti- $LT\alpha$ - og anti- $LT\beta$ -antistoffer er også blitt beskrevet (Browning et al., J. Immunol., 154, s. 33-46 (1995)).

Muse-anti-humant $LT\beta$ -antistoffer ble fremstilt slik det beskrives i Søkers samtidig svevende US-søknad 08/505.606, innlevert den 21. juli 1995. En hybridomacellelinje (B9.C9.1) som produserer muse-anti-humant $LT\beta$ -R-mAb'et B9, ble deponert den 21. juli 1995 hos American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) i henhold til bestemmelsene i Budapest-avtalen, og fikk ATCC-tilgangsnummeret HB11962.

Monoklonale hamster-anti-muse- $LT\alpha/\beta$ -antistoffer ble fremstilt slik det beskrives i Søkers samtidig svevende US-søknad 08/505.606, innlevert den 21. juli 1995. En hybridomacellelinje (BB.F6.1) som produserer hamster-anti-muse- $LT\alpha/\beta$ -mAb'et BB.F6, ble deponert den 21. juli 1995 hos American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) i henhold til bestemmelsene i Budapest-avtalen, og fikk ATCC-tilgangsnummeret HB11963.

Anvendelse av løselig LT β -R-Ig for å inhibere de immunologiske funksjoner av overflate-LT-kompleks

Vi skal nå demonstrere effekten av et overflate-LT-binding-
dagsreagens, et fusjonsprotein omfattende det ekstracellu-
lære domene av murint LT β -R og hengsel-, CH2- og CH3-domene
5 av humant IgG1 (LT β -R-Ig), på genereringen og kjennetegnene
av immunoglobulinresponser, på vedlikeholdet av den cellu-
lære organisasjon av sekundære lymfevev omfattende virknin-
gene på differensieringstilstanden av follikkeldendrittcel-
10 ler og germinalsenterdannelse, og på adressinekspresjons-
nivået, som påvirker celletrafikken.

Flere injeksjoner til mus av LT β -R-Ig endrer organisasjonen av miltlymfocytter og ekspresjonen av funksjonelle markører av miltmarginalsoneceller

15 Virkningen av overflate-LT-blokkering på strukturen av mil-
ten ble undersøkt ved å gi mus seks suksessive ukentlige
injeksjoner av LT β -R-Ig. Musene ble deretter immunisert med
SRBC og fikk en ytterligere injeksjon av LT β -R-Ig 4 dager
senere. Musene ble avlivet på dag 10 etter SRBC-injeksjo-
20 nen. En immunohistokjemisk farging av frosne miltsnitt
viste flere histologiske endringer. Folliklene, som
omfatter miltens B-celleavdeling i normale mus, er ikke
lenger klart avgrenset etter LT β -R-Ig-behandlingen.
Istedenfor er B-cellene nå organisert i et diffust bånd
25 omkring T-celleområdene (**figur 2B**), og grensen mellom T- og
B-cellesonene er avbrutt (**figur 2B**). Derimot er miltens B-
cellefollikler i kontrollmus som ble behandlet med LFA-3-
Ig, klart avgrenset, og det finnes en klar grense mellom T-
og B-celleområdene (**figur 2A**).

30 Ekspresjonen av celleoverflatemarkører som gjenkjennes av
de monoklonale antistoffer ER-TR-9 og MOMA-1, mangler fra
to atskilte makrofagpopulasjoner som befinner seg i miltens
marginalsone i LT β -R-Ig-behandlede mus. ER-TR-9 er kjent

for å farge en markør på MZM (Dijkstra et al., Immunol., 55, 23-30 (1985)), og MOMA-1 farger en markør på metallofile makrofager (Kraal og Janse, Immunol., 58, 665-669 (1986)) (**figur 2D hhv. F**). Disse markører uttrykkes på celler i kontrollmus som ble behandlet med LFA-3-Ig (**figur 2C og E**). Ekspresjonen av sialoadhesin, en annen markør av MOMA-1⁺-makrofager i murin miltmarginalsone, mangler også i LTβ-R-Ig-behandlede mus (data ikke vist).

Antistoffet MECA-367 binder adhesjonsmolekylet og mukosalt adressin MAdCAM-1, opprinnelig beskrevet på endotelceller i Peyers plakk, mesenteriske lymfeknuter, tarmmukosa og lamina propria (Briskin et al., Nature, 363, s. 461-464 (1993); Nakache et al., Nature, 337, s. 179-181 (1989)). MAdCAM-1-ekspresjonen er også blitt beskrevet i miltens marginalsone (antakelig uttrykt på endotelceller av de små terminale arterioler som fører til marginal sinus) og på det retikulære bindevev i germinalsentrene (Kraal et al., Am. J. Pathol., 147, s. 763-771 (1995)) (**figur 2G**). MECA 367-flekking av snitt fra LTβ-R-Ig-behandlede mus viser at MAdCAM-1-ekspresjonen er blitt stanset i milten (**figur 2H**).

På lignende måte er flekkingen av ER-TR-7-antistoffet (Van Vliet et al., Cytochem., 34, s. 883-890 (1986)), som avbilder en populasjon av retikulære fibroblaster i marginalsonen (**figur 2I**), abnormalt fordelt og sterkere i hvit pulpa av LTβ-R-Ig-behandlede enn i LFA-3-Ig-behandlede dyr (**figur 2J**). Endringene som observeres i LTβ-R-Ig-behandlede mus, var uavhengige av antigenutsettelsen, fordi mønstret for farging var identisk i LTβ-R-Ig-behandlede, uimmuniserte mus (data ikke vist).

Germinalsenterdannelsen er eliminert, og follikkeldendrittceller påvises ikke i milten av LTβ-R-Ig-behandlede mus

For å bestemme på histologisk nivå om flere injeksjoner til mus av LTβ-R-Ig påvirker immunresponsen mot SRBC, ble det

utført en analyse av germinalsenter (GC)-dannelsen og follikeldendrittcelle (FDC)-fordelingen som respons på anti-genpriming. Frosne miltsnitt fra mus som var blitt forhåndsbehandlet flere ganger med $LT\beta$ -R-Ig eller LFA-3-Ig slik det ble beskrevet for figur 2, ble flekket med peanøttagglutinin (PNA) for å avbilde GC'ene og med FDC-M1-antistoff for å påvise FDC, en cellulær komponent som er nødvendig for GC-dannelse (Schriever og Nadler, Adv. Immunol., 51, s. 243-284 (1992); Tew et al., Immunol. Rev., 117, s. 185-211 (1990)). CD40-CD40-ligandvekselvirkning er også blitt vist å være nødvendig for GC-dannelsen (Foy et al., J. Exp. Med., 180, s. 157-163 (1994)). For sammenligning ble derfor en gruppe mus behandlet med MR1, et anti-muse-CD40-ligandantistoff, ved å følge en injeksjonsprotokoll som tidligere har vist seg å inhibere GC-dannelsen (Han et al., J. Immunol., 155, s. 556-567 (1995)). Ti dager etter SRBC-behandlingen hadde mus som var blitt behandlet med LFA-3-Ig-kontrollproteinet, utviklet flere GC i milten som ble tydelig farget med PNA (**figur 3A**). GC ble ikke påvist i milten av $LT\beta$ -R-Ig- eller MR1-behandlede mus (**figur 3B hhv. C**). Imidlertid kan virkningen av MR1 og $LT\beta$ -R-Ig atskilles ved to ytterligere observasjoner. Fargingen for FDC'er (FDC-M1) innen GC (**figur 3D**) mangler i milten av $LT\beta$ -R-Ig-behandlede mus (**figur 3E**), men observeres fortsatt i milten av MR1-behandlede mus (**figur 3F**). Lignende observasjoner ble gjort ved bruk av FDC-M2-antistoff for å farge FDC'er (data ikke vist). Dermed fører $LT\beta$ -R-Ig-behandling til en fenotypisk endring av FDC i milten og til en sviktende dannelse av GC.

I tillegg til å farge GC, farger PNA også marginalsonen i milten av normale mus. En slik farging ble også bemerket i LFA-3-Ig-behandlede mus (**figur 3A**) og MR1-behandlede mus (**figur 3C**), men manglet i milten av $LT\beta$ -R-Ig-behandlede mus (**figur 3B**).

Ekspresjonen av sialoadhesin, MOMA-1, ER-TR-9, ER-TR-7 og MAdCAM-1 i milten av MR1-behandlede mus viste seg også å være normal (data ikke vist), hvilket ytterligere skilte mellom de molekylære virkninger ved å forstyrre CD40- og
 5 LT β -R-signaleringsen.

Kinetikken av LT β -R-Ig-induserte endringer av miltens lymfocytorganisasjon og ekspresjonen av marginalsonecellemarkører

Antallet LT β -R-Ig-injeksjoner som er nødvendige for å påvirke lymfocytorganisasjonen og ekspresjonen i marginalsonecellemarkører i milten, ble analysert. Mus fikk injisert ip LT β -R-Ig enten én eller flere ganger, slik det angis i **tabell 1**. Noen mus ble deretter også immunisert med SRBC på dagen for den siste LT β -R-Ig-injeksjon. B220- og
 15 CD4-ekspresjonen på B- hhv. T-celler og farging med PNA (for GC) og MECA367 (for MAdCAM-1), MOMA-1, ER-TR-9 og FDC-M1 ble bedømt på frosne miltsnitt av behandlede mus. Kinetikken av forsvinningen for farging av metallofile makrofager, marginalsonemakrofager, MAdCAM-1, GC'er og FDC'er
 20 viser seg å være tydelig.

En injeksjon av LT β -R-Ig er tilstrekkelig for å fjerne MAdCAM-1-fargingen en uke senere. Etter tre ukentlige LT β -R-Ig-injeksjoner, påvises ingen farging for GC'er og FDC'er, og T/B-lymfocytavdelingene er avbrutt. Minst fire LT β -R-Ig-injeksjoner er nødvendige for å fjerne fargingen for metallofile makrofager. Seks LT β -R-Ig-injeksjoner fjerner ikke fullstendig fargingen av marginalsonemakrofager med ER-TR-9-antistoff (også vist på **figur 2D**).
 25

En mer nøyaktig analyse av den raske inhibering av MOMA-1-, MAdCAM-1-, FDC-M1-, FDC-M2- og CR1-farging etter en enkelt injeksjon av LT β -R-Ig ble utført i fravær av antigen (**tabell 2**).
 30

Tabell 1: Virkning av LTβ-R-Ig på miltenes organisasjon og germinalsenterdannelsen i respons på SRBC i voksne mus

	Antall LTβ-R-Ig-injeksjoner	T/B-celle-organisasjon	Metallofile makrofager*	Marginalsone-makrofager*	MAdCAM-1-ekspresjon*	Germinal-sentre§	FDC*
0		normal	+++	+++	+++	+++	+++
1		normal	++	+++	-	+	+
2		noe abnormal	+	+++	-	+	+/-
3 ⁺		avbrutt	+	++	-	ND	ND
4 ⁺		avbrutt	+/-	++	-	ND	ND
5 ⁺		avbrutt	-	+	-	ND	ND
6		avbrutt	-	+/-	-	-	-

Mus fikk injisert ip 100 µg LTβ-R-Ig hver uke i 1-5 uker og ble deretter avlivet. LTβ-R-Ig ble administrert før SRBC-ip-injeksjon (100 µl 10% suspensjon) hvis intet annet er angitt, og den siste LTβ-R-Ig-injeksjon ble gitt på samme dag som antigenet. Dyrene ble avlivet 10 dager etter SRBC-injeksjonen. Frosne miltsnitt ble dobbelt-farget med biotinylert rotte-anti-mus-B220 og rotte-anti-mus-CD4, etterfulgt av streptavidin-alkalifosfatase hhv. muse-anti-rotte-Ig-peroksidase. Miltsnitt ble også farget med de følgende anti-mus-antistoffer: rotte-anti-marginalsonemakrofager (ER-TR9), rotte-anti-metallofilmakrofager (MOMA-1), rotte-anti-MAdCAM-1 (MECA 367) og rotte-anti-FDC (FDC-M1), etterfulgt av et muse-anti-rotte-Ig-peroksidase. En ytterligere gruppe frosne snitt ble farget med biotinylert peanøtt-agglutinin (PNA-biotin), etterfulgt av farging med streptavidinperoksidase for å påvise germinale sentre. Observasjoner ble gjort på snitt fra minst 3 dyr pr. gruppe.

* Intensiteten av fargingen ble bedømt med øyet: normal farging +++, redusert farging ++, svak farging + og ingen farging -. Intensiteten av fargingen på snittene fra ikke-behandlede dyr og dyr som var blitt behandlet med LFA-3-Ig, ble tatt som referanseverdi for normal farging.

§ Antallet germinalsentre pr. miltsnitt registreres som følger: >10: +++, 5-10: ++, 1-5: +, ingen: -.

+ Dyr fra disse grupper fikk ikke SRBC.

ND: Ikke utført.

Tabell 2: Nøyaktig tidtaking for LT β -R-Ig-virkningene på MOMA-1-, MAdCAM-1-, CR1-, FDC-M1- og FDC-M2-farging

	DAGER ETTER EN ENKELT INJEKSJON AV LT β -R-Ig						
	0	1	3	5	7	10	14
MOMA-1*	+++	+++	+++	+++	++	++	+
MAdCAM-1*	+++	+/-	-	-	-	-	-
CR1*	+++	+++	++	++	++	++	+
FDC-M1*	+++	+/-	-	-	-	-	-
FDC-M2*	+++	+/-	-	-	-	-	-

Balb/c-mus, 5-6 uker gamle, fikk én ip-injeksjon av 100 μ g LT β -R-Ig eller humant Ig. Mus fra hver gruppe ble avlivet på dag 0, 1, 3, 5, 7, 10 og 14. Frosne miltsnitt ble farget med de følgende antistoffer: rotte-anti-mus-metallofile makrofager (MOMA-1), rotte-anti-mus-MAdCAM-1 (MECA 367), rotte-anti-muse-FDC (FDC-M1), rotte-anti-muse-FDC (FDC-M2) og biotin-merket rotte-anti-muse-CR1 etterfulgt av et muse-anti-rotte-Ig-peroksidase (MOMA-1, MAdCAM-1, FDC-M1 og FDC-M2) eller peroksidase-merket streptavidin (CR1).

* Intensiteten av fargingen ble bedømt med øyet: normal farging: +++, nedsatt farging: ++, svak farging: + og ingen farging: -. Fargingsintensiteten på snitt fra ubehandlede dyr og dyr som var blitt behandlet med humant Ig, ble tatt som referanseverdi for den normale farging. Snitt fra minst 2 dyr pr. gruppe ble analysert.

Balb/c-mus som fikk én enkelt ip-injeksjon av LT β -R-Ig, ble avlivet hver dag i fjorten dager etter injeksjonen, og deres milter ble fjernet og frosset. Frosne miltsnitt ble farget med MOMA-1, anti-MAdCAM-1 (MECA-367) og FDC-spesifikke reagenser: FDC-M1, FDC-M2 og anti-CR1-antistoffer. Én dag etter LT β -R-Ig-injeksjonen var fargingen med anti-MAdCAM-1-, FDC-M1- og FDC-M2-reagensene sterkt nedsatt (**tabell 2**). Den raskere inhibering av FDC-M1-fargingen i dette eksperiment sammenlignet med resultatene som ble vist i tabell 1, kan skyldes intensiteten av FDC-M1-fargingen, som er sterkere i immuniserte dyr. Farging for CR1 kunne fortsatt påvises på dag 14, hvilket tydet på FDC'ene fortsatt forelå på dag 3 etter behandling med LT β -R-Ig, men at ekspresjonen av markører som påvises med FDC-M1 og FDC-M2, var fjernet. Dermed endret LT β -R-Ig-behandlingen FDC-fenotypen. Til

slutt var MOMA-1-fargingen nedsatt men fortsatt påvisbar på dag 14.

Flere LT β -R-Ig-behandlinger inhiberer adressinekspresjonen i LN

5 Vi undersøkte adressinekspresjonen i LN av avkommet fra tidsovervåkede gravide Balb/c-mus som på dagene 14 og 17 av graviditeten fikk iv-injisert 200 μ g reseptor-Ig-proteiner. Etter fødselen ble avkommet enten ikke behandlet, eller fikk én gang pr. uke injisert 100 μ g LT β -R-Ig, TNF-R55-Ig
10 eller LFA-3-Ig ip. Fusjonsproteinnivåene holdt seg ved eller over 10 μ g/ml under hele livet ifølge ELISA (data ikke vist).

Immunohistokjemisk farging med MECA367 og MECA79 viste at MadCAM-1 og perifere LN-adressiner manglet fullstendig i
15 mesenterisk LN fra mus som var blitt behandlet hele sitt liv med LT β -R-Ig (**figur 4A og B**). Sakral LN fra disse mus manglet også ekspresjon av alle adressiner, og cervical og ilium-LN viste ingen perifer lymfeknute (PNAd)-farging (data ikke vist). Nedreguleringen av adressinekspresjonen
20 var reversibel, fordi ekspresjonen steg til normale nivåer i dyr som kun ble behandlet *in utero* (**figur 4G og H**). I mus som ble behandlet hele sitt liv med 100 μ g/uke TNF-R55-Ig eller LFA-3-Ig, var adressinekspresjonen i LN sammenlignbar med ubehandlede mus (**figur 4C, D, E og F**).

B-lymfocyttoposisjonering og makrofagmarkør ekspresjon er endret i LN av LT β -R-Ig-behandlede mus

Antistoffer som binder markører på makrofagpopulasjoner i LN-subkapsulær sinus (analogt med miltens marginalsone), ble brukt for å utføre en immunohistokjemisk analyse av LN
30 tatt fra mus som var blitt behandlet under graviditeten og kontinuerlig etter fødselen slik det ble beskrevet for figur 4 ovenfor, med LT β -R-Ig, TNF-R55-Ig eller LFA-3-Ig.

Fluorescensavbildninger ble analysert ved bruk av bildeanalyseprogramvare. Sialoadhesinekspresjonen viser seg å være nedsatt i LN av mus som er blitt behandlet med løselig LT β -R-Ig (**figur 5B**), men ikke i LN av TNF-R55-Ig- eller LFA-3-Ig-behandlede mus (**figur 5E og H**). MOMA-1-ekspresjonen på makrofager i subkapsulær sinus ble fortsatt påvist i LN av mus som var blitt behandlet med LT β -R-Ig (**Figur 5C**).

Virkningen av en kontinuerlig LT β -R-Ig-behandling på lymfocytorganisasjonen i LN ble også bedømt. LN-snitt ble merket med mAb'er som var spesifikke for B-cellemarkører B220 og T-cellemarkøren CD4. Bildeanalyse ble utført for å identifisere områder med overlappende T- og B-cellesoner. Behandling med LT β -R-Ig forårsaket en oppløsning av B-cellefollikler, slik at B-cellene forelå i et diffust bånd på den ytre kant av T-celleområdet (**figur 5A**). Til tross for oppløsningen av deres follikkelstruktur, forelå B-celler ikke innen T-celleområdene av LN, men opptrådte istedenfor i områder som normalt ikke inntas av lymfocytter. Et meget lignende mønster av T- og B-cellefarging ble observert i mus som var blitt behandlet hele sitt liv med 100 μ g/uke TNF-R55-Ig, men ikke i LFA-3-Ig-behandlede mus (**figur 5D**). Igjen var B-cellefolliklene fjernet og B-cellene forelå i områder av LN som vanligvis ikke inneholder lymfocytter. Overlapping av B-celler med T-celler ble ikke observert.

25 **LT β -R-Ig-behandling av mus inhiberer IgM- og IgG-antistoff-responsen**

Den sviktende dannelse av GC etter SRBC-priming av mus som var blitt behandlet flere ganger med LT β -R-Ig (som på figur 3), tydet på endringer i den humorale immunrespons i disse mus. For å teste dette direkte, fikk voksne mus seks injeksjoner, én i uken, av LT β -R-Ig eller LFA-3-Ig, og ble deretter primet med SRBC. Man tok blodprøver av musene på dagene 7 og 14 etter immuniseringen, og nærværet av SRBC-spesifikt IgM og IgG i sera ble analysert ved bruk av hem-

- agglutinasjonsassayer. Syv dager etter SRBC-immuniseringen er IgM-titeren normal, men IgG-responsen er sterkt nedsatt i LT β -R-Ig-behandlede mus sammenlignet med mus som ble behandlet med humant Ig eller PBS (**figur 6A**). På dag 14 etter immuniseringen kan SRBC-spesifikt IgG fortsatt ikke påvises i sera fra LT β -R-Ig-behandlede mus, og titeren av SRBC-spesifikt IgM i disse mus er også nedsatt med over halvparten sammenlignet med mus som ble behandlet med humant Ig eller PBS (**figur 6A**).
- 10 Ti dager etter SRBC-primingen påvises GC'er i milten av mus som var blitt behandlet én eller to ganger med LT β -R-Ig, men antallet GC'er er imidlertid sterkt nedsatt sammenlignet med kontrolldyrene (tabell 1). Når musene fikk to injeksjoner av LT β -R-Ig, den første injeksjon en uke før SRBC-primingen og den andre injeksjon på samme dag som SRBC-injeksjonen, er inhiberingen av IgM- og IgG-responsen mot SRBC på dag 7 og dag 14 (**figur 6B**) lignende som hva som ble påvist når mus fikk flere LT β -R-Ig-injeksjoner (**figur 6A**). På dag 30 etter immuniseringen påvises intet SRBC-spesifikt IgG, og IgM-nivåene er nedsatt med over 80% sammenlignet med kontrolldyrene (**figur 6B**). Dermed førte disse LT β -R-Ig-behandlingskontroller til en fullstendig inhibering av IgG-responsene og en forkortet/nedsatt IgM-respons i forhold til kontrolldyrene.
- 25 Når mus fikk en enkelt injeksjon av LT β -R-Ig på samme dag som SRBC-primingen, var nivået av IgG- og IgM-responsene mot SRBC på dag 7 sammenlignbar med responsen i kontrollgruppene (**figur 6C**). På dag 24 etter immuniseringen, var imidlertid IgM- og IgG-titerne begge nedsatt med 30%. På dag 34 etter SRBC-primingen var titeren av SRBC-spesifikt IgM nedsatt med 50% sammenlignet med kontrollgruppene, og SRBC-spesifikt IgG kunne ikke påvises (**figur 6C**). Denne data viser at denne LT β -R-Ig-behandlingsprotokoll førte til en markert forkortelse/nedsettelse av styrken av både en pågående IgM- og IgG-respons, dvs. at LT β -R-Ig-behandling

kan inhibere en humoral respons som allerede er blitt initiert.

Antistoff-medierte sykdommer

Mange organspesifikke og multisystemautoimmune tilstander
 5 omfatter patologiske antistoffresponser. Slike tilstander
 omfatter: myasthenia gravis, autoimmun hemolytisk anemi,
 Chagas' sykdom, Grave's sykdom, idiopatisk thrombocytopenia
 purpura (ITP), systemisk lupus erythematosus (SLE), Wegeners
 granulomatose, polyartritt nodosa og "rapidly progressing
 10 crescentic glomerulonephritis" (fra Benjamini et al., Immu-
nology. A Short Course, Wiley-Liss, New York, 3. utg.
 (1996)).

Selv om etiologien av SLE er uklar, er det kjent en god del
 om den immunologiske mekanisme som er ansvarlig for patolo-
 15 gien som observeres. Av ukjente grunner produserer pasien-
 ter med SLE antistoffer mot nukleære komponenter av kroppen
 (antinukleære antistoffer (ANA)), spesielt mot nativt dob-
 beltkjedet DNA. Klinisk korrelerer nærværet av disse anti-
 stoffer best med patologien av renal innblanding i SLE.
 20 Disse antistoffer danner komplekser med DNA som tydeligvis
 er avledet fra nedbrytningen av normalt vev, og slik det er
 tilfellet i hvilken som helst immunaggregat-sykdom, danner
 slike komplekser avsetninger som er fanget mot bunnmembra-
 nen av glomeruli, i arteriolare vegger og i felles synovi-
 25 ale rom. Disse komplekser aktiverer komplementkaskaden og
 trekker til seg granulocytter. Den følgende inflammatoriske
 reaksjon kjennetegnes som glomerulonefritt med en følgende
 skade på nyren som fører til proteinuria og hematuria.

Lupus nefritt er blitt undersøkt i murine modeller i årti-
 30 ender. Nylig ble den terapeutiske effekt av en reagens som
 var spesifikk for murin CD40-ligand, bedømt i en slik mo-
 dell (Mohan et al., J. Immunol., 154, s. 1470-1480 (1995)).
 Aksellerasjonen av lupus ved overføringen av celler som in-

duserer produksjonen av patogene antistoffer *in vivo*, ble vist å inhiberes ved en administrasjon av et monoklonalt antistoff som blokkerer CD40/CD40-ligand-vekselvirkninger. Videre hadde en kort behandling av lupusmus med anti-CD40-ligand-antistoff en vedvarende gunstig virkning på deres spontane sykdom, lenge etter at antistoffet var rensket ut av deres systemer. Eksperimenteringen tydet på at patogene B-celler ikke kunne fremstille antistoff selv 9 måneder etter terapien, hvilket tydet på at det var en forsinkelse i ekspansjonen av autoimmune hukommelses-B-celler som førte til langvarige terapeutiske fordeler. Fordi vi har vist at reagenser som blokkerer $LT\alpha/\beta/LT\beta$ -R-vekselvirkninger *in vivo*, inhiberer genereringen av antistoffresponser, endrer fenotypen av FDC og dannelsen av germinale sentre som er innblandet i en optimal generering av B-cellehukommelse, vil $LT\alpha/\beta/LT\beta$ -R-blokkerende midler anvendt ifølge foreliggende oppfinnelse være nyttige for behandling eller forebyggelse av SLE.

Den normale immunrespons på enkelte patogene smittende midler utløser også autoantistoffresponser som kan bli for sterke og utgjøre et medisinsk problem. Ett eksempel er Chagas' sykdom, som er en inflammatorisk kardiomyopati som utvikles i mennesker og prøvedyr med kronisk *Trypanosoma cruzi*-infeksjon. Blant de mulige mekanismer som er innblandet i patogenesen av human Chagas' kardiomyopati, har teorien om en induksjon av hjertespesifikke autoimmune responser nylig fått kraftig støtte fra eksperimenter. En nylig undersøkelse (Tibbetts et al., J. Immunol., 152, s. 1493-1499 (1994)) viste at hjerteantigenspesifikke antistoffer dannes i *T. cruzi*-infiserte C57B1/6-mus med hjertesykdom. Etter infeksjon med Brasil-stammen av *T. cruzi*, utvikler C57B1/6-mus en kardiomyopati som er histologisk lignende som hva som observeres i kronisk infiserte mennesker. Antiser fra disse mus reagerer med tre hjerteantigener, mens C57B1/6-mus som var infisert med Guayas-stammen av *T. cruzi*, som ikke utvikler kardiomyopati, ikke produserte

slike antistoffer. Denne data tyder på at disse antistoffer er spesifikke markører for kardiomyopati. Dermed kan evnen av $LT\beta$ -R-blokkerende midler til å inhibere skaden som medieres av autoantistoffer, bedømmes i en slik gnagermodell.

5 Et annet eksempel på celleødeleggelse forårsaket av autoantistoffer som genereres som en følge av visse smittelige sykdommer eller av andre ukjente grunner, er idiopatisk thrombocytopenia purpura (ITP). I denne lidelse fører antistoffer som er rettet mot blodplater, til en ødeleggelse av
10 blodplater (av komplement- eller fagocytiske celler med Fc- eller C3b-reseptor), hvilket kan føre til blødning. Terapeutiske midler som inhiberer slike antistoffmedierte autoimmune reaksjoner *in vivo*, så som $LT\beta$ -R-blokkerende midler, som inhiberer antistoffdannelsen, vil være nyttige for
15 å behandle eller forebygge også disse autoimmune sykdommer.

Den normale immunrespons på enkelte patogene smittestoffer utløser også overfølsomhetsreaksjoner som kan bli for sterke og utgjøre et medisinsk problem. Det fremste eksempel på type I-overfølsomhet er allergiske reaksjoner. Disse
20 medieres av IgE-antistoffer som via sitt Fc-parti bindes på reseptorer på mastceller og basofiler for å utløse frigivningen av farmakologisk aktive midler som medierer anafylakse. ITP og Goodpasture's syndrom antas iblant å være type II-reaksjoner som finner sted når IgM- eller IgG-antistoffer bindes på antigen på celleoverflaten og aktiverer
25 komplementkaskaden. Granulocytter tiltrekkes deretter til aktiveringsstedet, og skaden fra frigivningen av lytiske enzymer fra deres granuler fører til ødeleggelsen av celler. Rheumatisk artritt antas å forårsakes av en overfølsomhetsreaksjon av type III som medieres av immunkomplekser
30 av antigen (i dette tilfelle rheumatoid faktor, et IgM-autoantistoff), som bindes på Fc-partiet av normalt IgG. Disse immunkomplekser deltar i å forårsake betennelse av ledd og skaden som er karakteristisk for denne sykdom.
35 Fordi disse patologier til dels medieres av antistoffer,

vil terapeutiske midler som inhiberer genereringen av anti-stoff, så som LT- β -R-blokkerende midler, være nyttige for behandling eller forebygging av også disse sykdommer.

Behandlinger ved bruk av LT β -R-blokkerende midler

- 5 Sammensetningene som fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse vil administreres i en effektiv dose for å behandle den bestemte kliniske tilstand. Bestemmelse av en foretrukken farmasøytisk formulering og en terapeutisk virksam dosekur for en gitt anvendelse ligger vel innen
- 10 teknikkens stand, i betraktning av f.eks. tilstanden og vekten av pasienten, utstrekningen av den ønskede behandling og pasientens toleranse for behandlingen.

Doser på rundt 1 mg/kg av en løselig LT β -R forventes å være egnede utgangspunkter for å optimere behandlingsdosene.

- 15 Bestemmelse av en terapeutisk virksam dose kan også bedømmes ved å utføre *in vitro*-eksperimenter som måler konsentrasjonen av LT β -R-blokkerende middel som er nødvendig for å belegge målceller (LT β -R eller LT-ligandpositive celler, avhengig av det blokkerende middel) i 1-14 dager. Reseptor-
- 20 ligandbindingsassayer som ble beskrevet tidligere i Søkers samtidig svevende US-søknad 08/505.606, innlevert den 21. juli 1995, kan også brukes for å overvåke cellebelegningsreaksjonen. LT β -R eller LT-ligandpositive celler kan adskilles fra aktiverte lymfocyttopulasjoner ved bruk av
- 25 FACS. På grunnlag av slike *in vitro*-bindingsassayer, kan et område for egnede konsentrasjoner av LT β -R-blokkerende middel velges for testing på dyr.

- Administrasjon av de løselige LT β -R-molekyler, anti-LT-ligand og anti-LT β -R-Ab'er, hver for seg eller i kombinasjon
- 30 omfattende isolerte og rensede former av antistoffene eller kompleksene, deres salter eller farmasøytisk akseptable derivater derav, kan oppnås ved bruk av hvilken som helst av

de konvensjonelt aksepterte administrasjonsmåter for midler som oppviser immunosuppressiv aktivitet.

De farmasøytiske sammensetninger som brukes i disse terapier, kan også anta diverse former. Disse omfatter f.eks.
5 faste, halvfaste og flytende doseringsformer så som tabletter, piller, pulvere, flytende oppløsninger eller suspensjoner, suppositorier og injiserbare og infuserbare oppløsninger. Den foretrukne form avhenger av den tenkte administrasjonsmåte og den terapeutiske anvendelse. Administra-
10 sjonsmåter kan omfatte oral, parenteral, subkutan, intravenøs, intralesjonal eller topisk administrasjon.

De løselige $LT\beta$ -R-molekyler, anti-LT-ligand- og anti- $LT\beta$ -R-Ab'er kan for eksempel plasseres i sterile isotoniske formuleringer med eller uten kofaktorer som stimulerer opptaket eller stabiliteten. Formuleringen er fortrinnsvis flytende eller kan være et lyofilisert pulver. F.eks. kan de løselige $LT\beta$ -R-molekyler, anti-LT-ligand- og anti- $LT\beta$ -R-Ab'er fortynnes med en formuleringsbuffer omfattende 5,0 mg/ml sironsyremonohydrat, 2,7 mg/ml trinatriumcitrat, 41
20 mg/ml mannitol, 1 mg/ml glycin og 1 mg/ml polysorbat 20. Denne oppløsning kan lyofiliseres, lagres under kjøling og rekonstitueres før administrasjonen med sterilt vann for injeksjon (USP).

Sammensetningene vil fortrinnsvis også omfatte konvensjonelle farmasøytisk akseptable bærere som er velkjent innen
25 faget (jfr. f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. utg., 1980, Mac Publishing Company). Slike farmasøytisk akseptable bærere kan omfatte andre medisinske midler, bærere, genetiske bærere, adjuvanter, eksipienser osv., så
30 som humant serumalbumin eller plasmapreparater. Sammensetningene foreligger fortrinnsvis i form av en enhetsdose, og vil vanligvis administreres én eller flere ganger daglig.

De farmasøytiske sammensetninger kan også administreres ved bruk av mikrosfærer, liposomer, andre mikropartikkelformede leveringssystemer eller formuleringer med vedvarende frigivning plassert i, nær eller på annen måte i kommunikasjon med rammede vev eller blodstrømmen. Egnede eksempler på bærere med vedvarende frigivning omfatter semipermeable polymermatrikser i form av formede gjenstander så som suppositorier eller mikrokapsler. Implanterbare eller mikrokapselformede matrikser med vedvarende frigivning omfatter polylaktider (US-patent nr. 3.773.319; EP 58.481), kopolymerer av L-glutamsyre og etyl-L-glutamat (Sidman et al., Biopolymers, 22, s. 547-556 (1985)), poly(2-hydroksyetylmetakrylat) eller etylenvinylacetat (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15, s. 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12, s. 98-105 (1982)).

Liposomer som inneholder løselige $LT\beta$ -R-molekyler, anti-LT-ligand og anti-LT β -R-Ab'er hver for seg eller i kombinasjon, kan fremstilles ved velkjente fremgangsmåter (jfr. f.eks. DE 3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, s. 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, s. 4030-4034 (1980); US-patentene 4.485.045 og 4.544.545). Vanligvis er liposomene av den lille (ca. 200-800 Å) unilamellære type hvor lipidinnholdet er større enn ca. 30 mol% kolesterol. Andelen av kolesterol velges for å regulere den optimale rate av løselig $LT\beta$ -R-molekyl-, anti-LT-ligand- og anti-LT β -R-Ab-frigivningen.

De løselige $LT\beta$ -R-molekyler, anti-LT-ligand- og anti-LT β -R-Ab'er kan også festes på liposomer som inneholder andre $LT\beta$ -R-blokkerende midler, immunosuppressive midler eller cytokiner for å modulere den $LT\beta$ -R-blokkerende aktivitet. Festing av $LT\beta$ -R-molekyler, anti-LT-ligand- og anti-LT β -R-Ab'er på liposomer kan utføres ved hjelp av hvilket som helst kjent fornetningsmiddel så som heterobifunksjonelle fornetningsmidler som har vært omfattende brukt for å koble toksiner eller kjemoterapeutiske midler med antistoffer for

en målrettet levering. Konjugering av liposomer kan også oppnås ved bruk av det karbohydrat-rettede fornetningsmiddel 4-(4-maleimidofenyl)smørsyrehydrazid (MPBH) (Duzgunes et al., J. Cell. Biochem. Abstr. Suppl. 16E 77 (1992)).

5 **Fordel med terapeutiske sammensetninger omfattende LT β -R-blokkerende midler**

De LT β -R-blokkerende midler ifølge foreliggende oppfinnelse har evnen til å selektivt inhibere immuneffektormekanismer. Inhiberingen av antistoffmediert immunitet inhiberes ved
 10 flere mekanismer, omfattende reguleringen av GC-dannelsen ved å påvirke FDC-funksjonen. Både antistoff- og cellemediert immunitet inhiberes til dels ved å regulere ekspressjoner av adressiner og dermed påvirke lymfocytt-trafikken. Dermed vil LT β -R-blokkerende midler være nyttige ved be-
 15 handling av tilstander som forverres av antistoffers aktivitet, eller en forstyrret ekspresjon av adressiner. Evnen til å selektivt inhibere slike immunmedierte responser vil være nyttig for å behandle abnormaliteter omfattende forskjellige autoimmune og kronisk inflammatoriske tilstander.
 20 Slik det ble beskrevet ovenfor, benytter seg en behandling av slike patologisk immunmedierte tilstander, generelt av immunomodulatoriske og immunosuppressive midler som har pleiotropiske virkninger på et bredt utvalg av celletyper og immunologiske responser. Disse ikke-spesifikke immunosuppressive midler er generelt nødvendige i høye og ofte
 25 cytotoksiske doser som forårsaker ugunstige bivirkninger.

Evnen av et reagens som inhiberer antistoffresponser, til å svekke en patologisk immunologisk respons, støttes i den nylige undersøkelse av muselupus nefritt. I den sistnevnte
 30 undersøkelse viste seg en administrasjon av et antistoff som blokkerer CD40/CD40L-banen, å inhibere aksellerasjonen av lupus nefritt som danes etter overføring av celler som induserer produksjonen av patogene antistoffer *in vivo*, og har en vedvarende gunstig virkning på spontan sykdom lenge

etter at antistoffet er rensset ut av systemet. Denne data tyder på at de $LT\beta$ -R-blokkerende midler ifølge foreliggende oppfinnelse vil være nyttige ved hemming av cellulær utstøtning av vevtransplantater og organtransplantater ved
5 å inhibere prosessene som fører til genereringen av anti-stoffresponser.

De $LT\beta$ -R-blokkerende midler kan modifiseres for å oppnå en ønsket styrke av $LT\beta$ -R-signalerings, avhengig av tilstanden, forstyrrelsen eller sykdommen som behandles. Det er
10 tenkt at den absolutte styrke av $LT\beta$ -R-signalerings kan finjusteres ved å manipulere konsentrasjonen og affinitetene av de $LT\beta$ -R-blokkerende midler for sine respektive molekylære mål.

For eksempel administreres sammensetninger omfattende løselige $LT\beta$ -R-molekyler til et individ. Den løselige $LT\beta$ -reseptor kan virksomt konkurrere med celleoverflate- $LT\beta$ -reseptorer om bindingen av overflate-LT-ligander. Evnen til å konkurrere med overflate-LT-ligander avhenger av den relative konsentrasjon av de løselige og de celleoverflatebundne $LT\beta$ -R-molekyler og av deres relative affiniteter for li-
20 gandbinding.

Løselige $LT\beta$ -R-molekyler som bærer mutasjoner som øker eller nedsetter bindingsaffiniteten av det mutante løselige $LT\beta$ -R med overflate-LT-ligand, kan fremstilles ved bruk av
25 standard rekombinante DNA-teknikker som er velkjent for fagmannen. Store antall molekyler med posisjonsrettede eller vilkårlige mutasjoner kan testes for sin evne til å virke som $LT\beta$ -R-blokkerende midler ved bruk av rutinemessig eksperimentering og teknikkene som beskrives heri.

30 På lignende måte virker antistoffer rettet mot enten $LT\beta$ -Reseptor eller én eller flere av LT-liganddelenhetene, som $LT\beta$ -R-blokkerende midler. Evnen av disse antistoffer til å blokkere $LT\beta$ -reseptorsignalerings kan modifiseres ved mu-

tasjon, kjemisk modifikasjon eller ved andre fremgangsmåter som kan variere den virksomme konsentrasjon eller aktivitet av antistoffet som leveres til individet.

5 Evnen til å nedsette $LT\beta$ -R-signaleringsen uten å fullstendig inhibere denne, kan være viktig for å oppnå eller vedlikeholde nedsatte nivåer av $LT\beta$ -R-signaleringsen som støtter en normal immunfunksjon mens den inhiberer antistoff- eller cellemedierte responser som er for sterke eller abnormale.

10 En fjerning av $LT\alpha$ -genet i en mus, fører til en forstyrret utvikling av perifere lymfeorganer (De Togni et al., Science, 264, s. 703-707 (1994)). Slike mus manglet lymfeknuder, og deres milt manglet den vanligvis klare markering mellom T- og B-celleanrikede områder i folliklene. Vi tror at denne fenotype er forbundet med tapet av overflate-
15 LT -indusert $LT\beta$ -R-signaleringsen, fordi lignende fenotyper ikke er blitt observert ved å modulere TNF -R-aktiviteten. Evnen til å selektivt eller delvis blokkere $LT\beta$ -R-banen kan derfor være nyttig ved behandling av abnormal utvikling av lymfelignende strukturer som et resultat av kronisk beten-
20 nelse forbundet med feil- eller overekspresjon av signalering i $LT\beta$ -R-banen.

Antistoffer er nødvendige mediatorer av immunresponser mot patologiske midler. Dermed er en absolutt inhibering av antistoffresponser kanskje ikke ønskelig i alle omstendigheter. F.eks. er antistoffer nødvendige for å mediere resis-
25 tens mot infeksjoner av ekstracellulære bakterier så som pneumokokker og hemofilus.

Evnen til å påvirke mengden av antistoff som genereres, ved å blokkere $LT\beta$ -R-signaleringsen, kan være viktig for å maksimere de gunstige resultater som kan oppnås ved behandling
30 med $LT\beta$ -R-blokkerende midler.

De terapeutiske fremgangsmåter omfatter å selektivt inhibere responser som er helt eller delvis avhengige av LT- β -banen. De bestemte terapeutiske anvendelser avhenger av den relevante etiologiske mekanisme av enten prosessen som skal inhiberes, eller den medisinsk ønskelige prosess som skal fremmes, slik det vil være åpenbart for fagmannen. Dermed kan fremgangsmåtene i visse utførelser omfatte å administrere en terapeutisk virksom mengde av et blokkerende middel mot LT- β -R eller LT- β . Proteinet som brukes i disse fremgangsmåter, kan være enten hellengdes protein, fragmenter av proteinet eller fusjonsfragmenter. I andre utførelser administreres et løselig fragment, så som en løselig lymfotoksin- β -reseptor. I andre foretrukne utførelser administreres antistoffer mot LT- β -R eller LT- β . De blokkerende midler kan administreres sammen med en terapeutisk virksom mengde av en annen forbindelse som utøver en medisinsk ønskelig virkning.

For eksempel ved behandling av AIDS og/eller HIV, kan det være ønskelig å ko-administrere ytterligere antivirale midler som er kjent innen faget, for eksempel AZT eller protease-inhibitorer. Spesielt foretrukket kan det være å administrere LT- β -R-blokkerende midler, mer foretrukket LT- β -R/IgG-fusjonsprotein, i kombinasjon med en "cocktail"-terapi mot AIDS. Disse legemiddel-"cocktailer" omfatter administrasjonen av flere legemidler til pasienten for å nedsette mengden av virus i pasientens systemer.

De aktuelle sammensetningene kan formuleres i henhold til standard praksis, så som i et bærervehikkel. Begrepet farmasøytisk akseptabel bærer vedrører én eller flere organiske eller uorganiske ingredienser, naturlige eller syntetiske, som kan forenkle administrasjonen av de blokkerende midler ifølge oppfinnelsen til en pasient. Egnede bærere er kjent for personer med alminnelige kunnskaper innen faget.

Hvilke som helst av de aktuelle sammensetningene kan administreres på hvilken som helst måte som er medisinsk akseptabel. Dette kan omfatte injeksjoner ved parenterale ruter, så som intravenøs, intravaskulær, inatraarteriell, subkutan, intramuskulær, intrasvulst, intraperitonealt, intraentrikulært, intraepiduralt eller annet, samt oral, nasal, oftalmisk rektal eller topisk. Administrasjon med vedvarende frigivning kan oppnås ved hjelp av anordninger så som depotinjeksjonsinnretninger eller implantater. Lokalisert levering kan også være ønskelig. Administrasjonsmåter kan lett defineres av en fagmann.

De blokkerende midler mot LT-banen skal omfatte funksjonelle derivater av de løselige LT- β -R-antistoffer. Funksjonelle derivater omfatter fragmenter, varianter, analoger eller kjemiske derivater av et molekyl. Et fragment av et molekyl så som hvilket som helst av antigenene skal vise til hvilket som helst polypeptiddelsett av molekylet. En variant av et slikt molekyl skal vise til et naturlig forekommende molekyl som tilnærmet ligner enten hele molekylet eller et fragment derav. En analog av molekylet viser til et ikke-naturlig molekyl som tilnærmet ligner enten hele molekylet eller et fragment derav.

Varianter av de LT- β -R-blokkerende midler skiller seg fra naturlig forekommende midler i aminosyresekvensen eller på måter som ikke omfatter sekvensen, eller både og. Varianter i aminosyresekvensen dannes når én eller flere aminosyrer i de naturlig forekommende molekyler erstattes med en forskjellig naturlig aminosyre, et aminosyrederivat eller en ikke-nativ aminosyre. Spesielt foretrukne varianter omfatter de naturlig forekommende proteiner eller biologisk aktive fragmenter av de naturlig forekommende proteiner, hvis sekvenser skiller seg fra villtypesekvensen med én eller flere konservative aminosyresubstitusjoner. Slike substitusjoner er velkjent av fagmannen, og har vanligvis en mini-

mal innvirkning på den sekundære struktur og hydrofobe natur av det blokkerende middel.

I andre utførelser kan varianter med aminosyresubstitusjoner som er mindre konservative, også føre til ønskede derivater, f.eks. ved å forårsake endringer i ladningen, konformasjonen og andre biologiske egenskaper. Slike substitusjoner ville f.eks. omfatte substitusjon av hydrofile residuer for hydrofobe residuer, substitusjon av et cystein eller protein for et annet residuum, substitusjon av et residuum som har en liten sidekjede, for et residuum som har en stor sidekjede, eller substitusjon av et residuum som har en positiv nettoladning, for et residuum som har en negativ nettoladning. Når resultatet av en gitt substitusjon ikke kan forutsies med sikkerhet, kan derivatene lett testes ifølge fremgangsmåtene som beskrives heri, for å bestemme nærværet eller fraværet av de ønskede kjennetegn.

Varianter som ligger innen rammen for oppfinnelsen, omfatter proteiner og peptider med aminosyresekvenser som har minst 80% homologi med de aktuelle LT- β -R-blokkerende midler. Mer foretrukket er sekvenshomologien minst 90%, eller minst 95%. For å bestemme homologien vil lengden av sammenligningssekvenser generelt være minst 8 aminosyreresiduer, vanligvis minst 20 aminosyreresiduer. Varianter omfatter også hvilket som helst blokkerende middel som 1) har en aminosyresekvens som er minst 40% homolog med sekvensen av det blokkerende middel og som også 2) etter å ha blitt plassert i en optimal linjestilling med sekvensen av det blokkerende middel har minst 80% av sine cysteinresiduer linjestilt med cysteinene av blokkeringsmidlet.

Også innbefattet er midler som spesifikt bindes til de blokkerende midler, omfattende ligander og antistoffer.

I det følgende bringes eksempler som illustrerer de løselige LT β -reseptorer, anti-LT-ligand- og anti-LT β -R-anti-

stoffer og fremgangsmåtene som ble brukt for å karakterisere dem.

EKSEMPEL 1

Fremstilling av løselige humane $LT\beta$ -reseptorer

5 som immunoglobulin-Fc-fusjonsproteiner

Sekvensen av en human cDNA-klon som ble isolert fra en samling av humane 12p-transkriberte sekvenser avledet fra en somatisk cellehybrid (Baens et al., *Genomics*, 16, s. 214-218 (1993)), ble gitt inn i GenBank og ble senere identifi-
 10 sert som den sekvens som koder for humant $LT\beta$ -R. Sekvensen av denne hellengdes humane $LT\beta$ -R-cDNA-klon har vært tilgjengelig siden 1992 som GenBank-inngivelse L04270.

Det ekstracellulære domene av $LT\beta$ -R frem til transmembranpartiet (**figur 1**) ble amplifisert ved PCR fra en cDNA-klon
 15 ved bruk av primere som innlemmet NotI- og SalI-restriksjonsenzymstillinger i sin 5'- hhv. 3'-ende (Browning et al., *J. Immunol.*, 154, s. 33-46 (1995)). Det amplifiserte produkt ble spaltet med NotI og SalI, rensset og ligert inn i en NotI-linearisert vektor pMDR901 sammen med et SalI-
 20 NotI-fragment som kodet for Fc-parti av humant IgG1. Den dannede vektor inneholdt dihydrofolatreduktase-genet og $LT\beta$ R-IgG-fusjonsproteinet, drevne av adskilte promotere.

Vektoren ble elektroporert inn i CHO-dhfr⁻-celler, og metotreksatresistente kloner ble isolert ved standardprosedy-
 25 rer. $LT\beta$ -R-Ig ble utsondret i mediet, og et ELISA-assay ble brukt for å velge cellelinjer som produserte den største mengde av reseptorfusjonsproteinet. En sterkt produserende cellelinje ble dyrket til store antall, og det kondisjonerte medium ble samlet. Det rene $LT\beta$ -reseptorfusjonsprotein
 30 ble isolert ved Protein A-sepharose rask flyt-affinitets-kromatografi (Pharmacia).

EKSEMPEL 2**Fremstilling av løselige murine LT β -reseptorer som immunoglobulin-fusjonsproteiner**

En fullstendig cDNA-klon av murin LT β -R ble fremstilt ved å
 5 ligere 5' NotI/ApaLI- og 3' ApaLI/NotI-fragmenter fra to
 partielle cDNA-isolater inn i NotI-stillingen av pCDNA3
 (Invitrogen, San Diego, CA). Sekvensen av denne cDNA-klon
 er tilgjengelig som GenBank-inngivelse U29173. Ingen for-
 skjeller i kodesekvensen ble notert sammenlignet med en an-
 10 nen sekvensinngivelse for murint LT β -R som ble funnet i
 GenBank-inngivelse L38423.

Et løselig murint LT β -R/humant IgG1-fusjonsprotein ble
 fremstilt ved PCR-amplifikasjon av hellengdes mLT β -R-cDNA-
 klon som templat og primerne
 15 5'-AACTGCAGCGGCCGCCATGCGCCTGCCC-3' og
 5'-GACTTTGTCGACCATGCTCCTGGCTCTGGGGG-3'. Det amplifiserte
 produkt ble rensset og spaltet med NotI og SalI og ligert
 med et SalI/NotI-humant IgG1-Fc-fragment inn i NotI-linea-
 risert og fosfatasebehandlet SAB132 for å danne JLB122. For
 20 en stabil ekspresjon ble NotI-kassetten som inneholdt mu-
 rint LT β -R-Ig-fragment, overført til NotI-stillingen av
 pMDR901, hvorved man dannet PSH001, og vektoren ble trans-
 fisert inn i CHO-celler som beskrevet (Browning et al., J.
Immunol., 154, s. 33-46 (1995)). Cellekloner som utsondret
 25 murint LT β -R-Ig, ble identifisert ved ELISA-analyse. Det
 rensede reseptorfusjonsprotein ble isolert fra CHO-celle-
 supernatanter ved Proten A-sepharose-rask flyt-kromatografi
 (Pharmacia), og benyttet i de følgende eksempler.

EKSEMPEL 3

30 **Immunohistokjemisk analyse av milt**
etter flere injeksjoner av LT β -R-Ig til mus

4-5 uker gamle mus fikk seks injeksjoner, én pr. uke, av
 LT β -R-Ig eller LFA-3-Ig (100 μ g ip), og ble immunisert med

SRBC på dagen for den sjette injeksjon av fusjonsprotein. Musene fikk deretter en ytterligere injeksjon av LT β -R-Ig eller LFA-3-Ig på dag 4 etter utfordringen med SRBC. Dyrene ble avlivet på dag 10 etter utfordringen med SRBC, og organer ble samlet for en strukturell analyse. Venstre spalte av figur 2 representerer miltsnitt fra dyr som ble behandlet med LFA-3-Ig (A, C, E, G, I), og høyre spalte fra dyr som ble behandlet med LT β -R-Ig (B, D, F, H, J). Acetonfikserte frosne miltsnitt ble dobbeltfarget med biotinylert anti-muse-B220-merket og anti-muse-CD4-antistoffer (A og B), etterfulgt av en andre farging med alkalifosfatase-merket streptavidin (purpurblå, mørk farging) og pepperrotperoksidasemerket muse-anti-rotte-Ig (lysebrun farging). En annen gruppe frosne snitt ble farget med antistoffene ER-TR-9 (for å påvise MZM, C og D), MOMA-1 (for å påvise metallofile makrofager, E og F), MECA-367 (spesifikt for MAD-CAM-1, G og H) og ER-TR-7 (for å farge retikulære fibroblaster, I og J), etterfulgt av en andre farging med pepperrotperoksidase-merket muse-anti-rotte-Ig (brun farging). Disse bilder er representative farginger av snitt fra minst seks dyr. Forstørrelse 10X.

EKSEMPEL 4

Virkning av LT β -R-Ig og anti-CD40-ligand på GC-dannelsen og FDC-fargingen

Dyrene ble behandlet slik det ble beskrevet i eksempel 3, med LT β -R-Ig eller LFA-3-Ig. En annen gruppe dyr ble behandlet med MR1 (anti-muse-CD40-ligand, 250 μ g/injeksjon, intraperitonealt) på dag -1, dag 1 og dag 3, fikk SRBC på dag 0 og ble avlivet på dag 10. Acetonfikserte miltsnitt fra dyr som var blitt behandlet med LFA-3-Ig (figur 3, venstre spalte A og D) eller LT β -R-Ig (midtre spalte, B og E) eller MR1 (høyre spalte, C og F) ble farget med biotinmerket peanøttagglutinin (PNA, øvre linje, A, B og C) eller med FDC-M1 (nedre rad, D, E og F), etterfulgt av en andre farging med henholdsvis pepperrotperoksidasemerket strep-

tavidin og pepperrotperoksidase-merket muse-anti-rote-Ig (brun farging). PNA-fargingen av marginalsonen vises med en pil i A og C. GC-dannelsen vises med en hvit stjerne i A. Fargingen for FDC vises med en sort pil i D og F. Disse
 5 bilder er representative farginger av snitt fra minst fire dyr. Forstørrelse 10X.

EKSEMPEL 5

Adressinekspresjon i LN av mus som ble behandlet in utero og fortsatt etter fødselen med LT β -R-Ig

10 Disse eksperimenter benyttet avkommet av tidsovervåkede gravide Balb/c-mus som fikk iv-injisert 200 μ g reseptor-Ig-proteiner på dag 14 og 17 av graviditeten. Etter fødselen fikk avkommet ip-injisert 100 μ g LT β -R-Ig, TNF-.R55-Ig eller LFA-3-Ig én gang pr. uke. Fusjonsproteinnivået holdt
 15 seg ved eller over 10 μ g/ml gjennom hele livet ifølge ELISA (data ikke vist). Figur 4: panelene A, B, G, H: farging av lymfeknuter fra mus behandlet med LT β -R-Ig. Paneler C, D: farging av lymfeknuter fra mus behandlet med LFA-3-Ig. Paneler E, F: farging av lymfeknuter fra mus behandlet med
 20 TNF-R55-Ig. Paneler A, C, E og G er mesenteriske lymfeknuter som er farget med antistoffet MECA367 for å påvise mukosalt adressin, MAdCAM-1. Panelene B, D, F og H er perifere (brakiale) lymfeknuter farget med antistoffet MECA79 som er spesifikt for perifere LN-adressiner (PNAd'er). Panelene G, H er lymfeknuter fra 6 uker gamle mus som kun ble
 25 behandlet med LT β -R-Ig in utero. Alle bilder er 50X forstørret.

EKSEMPEL 6

Lymfocyttoposisjonering og ekspresjon av makrofag-markører i LN av mus som ble behandlet in utero og kontinuerlig etter fødselen med LT β -R-Ig
 30

Ms ble behandlet in utero og kontinuerlig etter fødselen med LT β -R-Ig, TNF-R55-g eller LFA-3-Ig slik det ble beskrevet.

vet i eksempel 5. LN-snitt ble deretter farget med anti-stoffer som er spesifikke for markører som uttrykkes av makrofager, eller med mAb'er som er spesifikke for B-celle-markøren B220 og T-celle-markøren CD4. Bildeanalyse ble
 5 brukt for å identifisere områder med overlappende T- og B-cellesoner. Figur 5: Panelene A, d, G er B20/CD4-fargingen av LN fra LT β -R-Ig-, LF-3-Ig- hhv. TNF-R55-Ig-behandlede mus. Fluorescensbilder ble analysert ved bruk av bildeanalyseprogramvare. Panelene B, E, H er fargingen for sialoadhesin, og panelene C, F, I er fargingen for MOMA-1.
 10

EKSEMPEL 7

Virkning av LT β -R-Ig-behandling på antistoff-responsen mot SRBC

Balb/c-mus fikk injisert enten LT β -R-Ig, humant Ig eller
 15 PBS som følger: Figur 6A: mus fikk seks injeksjoner slik det ble beskrevet for figur 2, eksempel 3. Det ble tatt blodprøver fra dyrene på dag 5 (sorte stolper) og dag 14 (stripede stolper) etter SRBC-immuniseringen. 6B: dyrene fikk fusjonsproteinene på dag -7 og 0. SBC ble gitt på dag
 20 0, og det ble tatt blodprøver fra dyrene på dag 7 (sorte stolper), dag 15 (stripede stolper) og dag 30 (hvite stolper). 6C: Dyrene fikk fusjonsproteinet én gang på dag 0, samtidig som SRBC-immuniseringen. Blodprøver ble tatt på dag 7 (sorte stolper), dag 14 (stripede stolper) og dag 34
 25 (grå stolper).

Titeren av SRBC-spesifikt IgM og IgG ble bestemt ved å analysere seraene i hemagglutinasjonsassayer. Titeren defineres som resiproken av den siste serumfortynning som hemagglutinasjon kan påvises for, og vises på en logaritmisk
 30 skala med base 2 (1=fortynning 1/15 av seraene). Resultatene vises som gjennomsnittet for 4 forskjellige dyr pr. gruppe, med standardavvik.

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av et lymfotoksin- β -reseptor (LT- β -R)-
blokkerende middel omfattende enten en oppløselig lymfo-
toksin- β -R med et ligandbindende domene som selektivt kan
5 binde til en LT overflateligand eller til et antistoff
rettet mot LT- β -R for fremstilling av en farmasøytisk sam-
mensetning for behandling av antistoffmediert autoimmun
lidelse i et dyr, hvor det LT- β -R -blokkerende middel inhi-
berer interaksjonen mellom LT- β og dens reseptor.
- 10 2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den farmasøytiske sam-
mensetning ytterligere omfatter en farmasøytisk akseptabel
bærer eller adjuvans.
3. Anvendelse ifølge krav 2, hvor dyret er et pattedyr.
4. Anvendelse ifølge krav 3, hvor dyret er et menneske.
- 15 5. Anvendelse ifølge krav 1, hvor overflate-LT-liganden
er en murin LT-overflateligand.
6. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den oppløselige
lymfotoksin- β -reseptor (LT- β -R) omfatter aminosyresekvensen
vist i Figur 1 eller et funksjonelt fragment derav.
- 20 7. Anvendelse ifølge krav 1, hvor det ligandbindende
domene omfatter aminosyresekvensen vist i Figur 1 eller et
funksjonelt fragment derav.
8. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den oppløselige LT- β -R
ytterligere omfatter et eller flere heterologe protein-
25 domener.
9. Anvendelse ifølge krav 8, hvor det heterologe protein-
domene er valgt fra gruppen bestående av immunoglobuliner,

serum albumin, lipoproteiner, apolipoproteiner og transferrin.

10. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den oppløselige lymfotoksin- β -R omfatter et humant immunoglobulin Fc-domene.

5 11. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 4, hvor det LT- β -R-blokkerende middel omfatter et monoklonalt antistoff rettet mot LT- β -reseptor.

12. Anvendelse ifølge krav 11, hvor den farmasøytiske sammensetning er egnet til å administreres i en mengde som
10 er tilstrekkelig til å belegge LT- β -reseptor-positive celler i omkring 1 til omkring 14 dager.

13. Anvendelse ifølge krav 11 eller 12, hvor det LT- β -R-blokkerende middel omfatter anti-human LT- β -R Ab BDA8 (ATCC deponeringsnummer: HB 11798).

15 14. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den antistoffmedierte immunrespons er valgt fra gruppen bestående av Myasthenia gravis, autoimmun hemolytisk anemi, idiopatisk trombocytopenia purpura (FTP), systemisk lupus erytematosus (SLE), Wegeners granulomatosis, poly-arteritis nodosa samt raskt
20 progressiv kresentisk glomerulonefritt.

15. Anvendelse ifølge krav 14, hvor den antistoffmedierte immunrespons er en kronisk inflammatorisk sykdom.

16. Anvendelse ifølge krav 15, hvor den kroniske inflammatorisk sykdommen er Chagas sykdom eller Graves sykdom.

25 17. Anvendelse av en oppløselig lymfotoksin-beta-reseptor (LT β R) omfattende et ligandbindende domene av aminosyresekvensen vist i Fig. 1 eller et funksjonelt fragment derav, kondensert til et humant IgG1 Fc-domene for fremstilling av

en farmasøytisk sammensetning til behandling av en auto-immunmediert autoimmunsykdom i et menneske.

18. Anvendelse av en oppløselig lymfotoksin-beta-reseptor (LT β R) omfattende et ligandbindende domene av aminosyresekvensen vist i Figur 1 eller et funksjonelt fragment derav,
5 kondensert til et humant IgG1 Fc-domene ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av systemisk lupus erytematosus (SLE) i et menneske.

1	SQPQAVPPYA	SENQTCRDQE	KEYYEPQHRI	CCSRCPPGTY	VSAKCSRIRD	50
51	TVCATCAENS	YNEHWNYLTI	CQLCRPCDPV	MGLEETAPCT	SKRTQCRQ	100
101	PGMFCAAWAL	ECTHCELLSD	CPPGTEAELK	DEVGKGNHC	VPCKAGHFQ	150
151	TSSPSARCQP	HTRCENQGLV	EAAPGTAQSD	TTCTNPLEPL	PEMSGT	197

FIG. 1

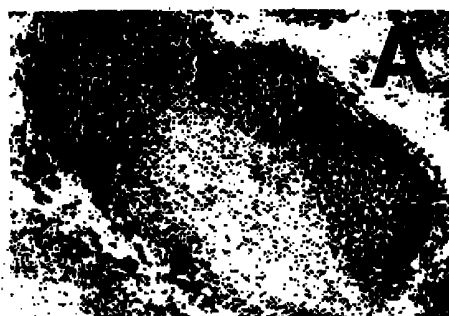


FIG. 2A

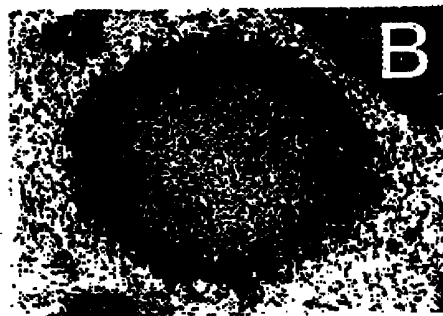


FIG. 2B

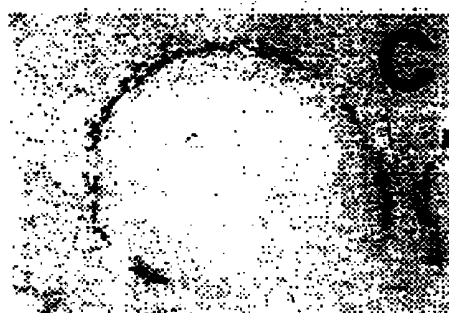


FIG. 2C



FIG. 2D



FIG. 2E

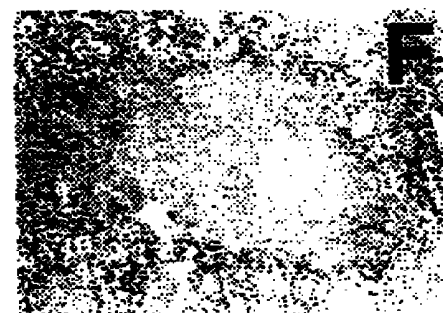


FIG. 2F



FIG. 2G



FIG. 2H



FIG. 2I



FIG. 2J



FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 3C

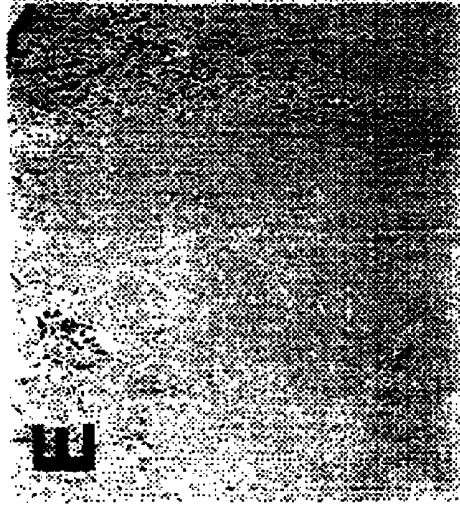


FIG. 3D

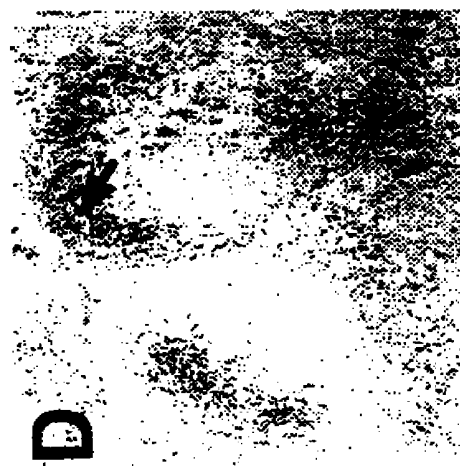


FIG. 3E



FIG. 3F

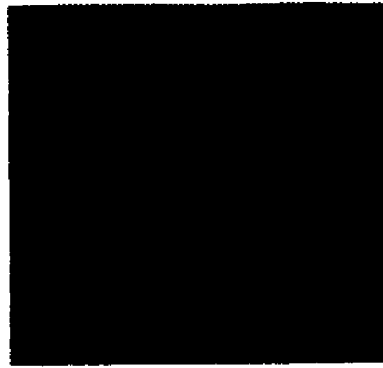


FIG. 4A



FIG. 4C

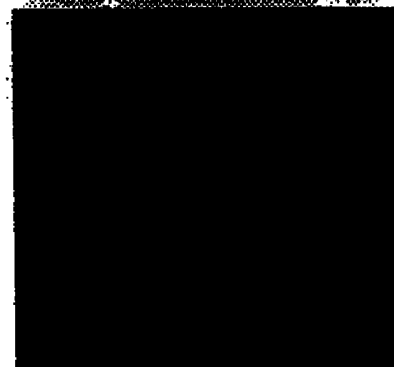


FIG. 4E

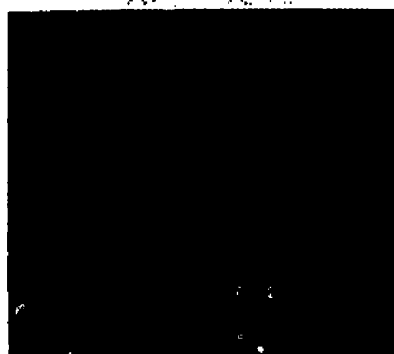


FIG. 4G

FIG. 4B

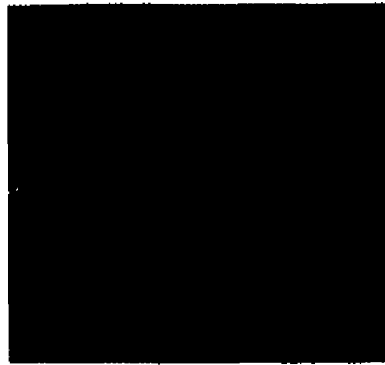


FIG. 4D



FIG. 4F

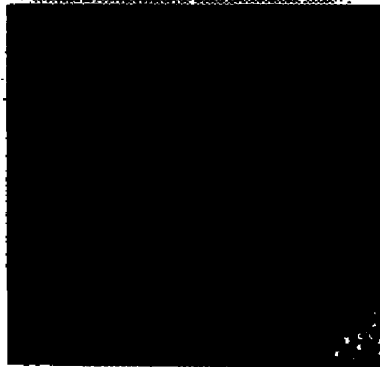


FIG. 4H



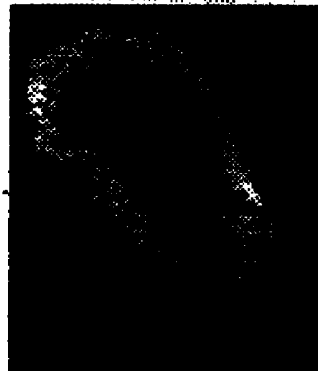


FIG. 5A



FIG. 5B



FIG. 5C



FIG. 5D



FIG. 5E



FIG. 5F

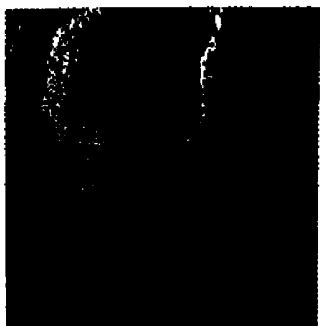


FIG. 5I



FIG. 5H



FIG. 5G

9/10

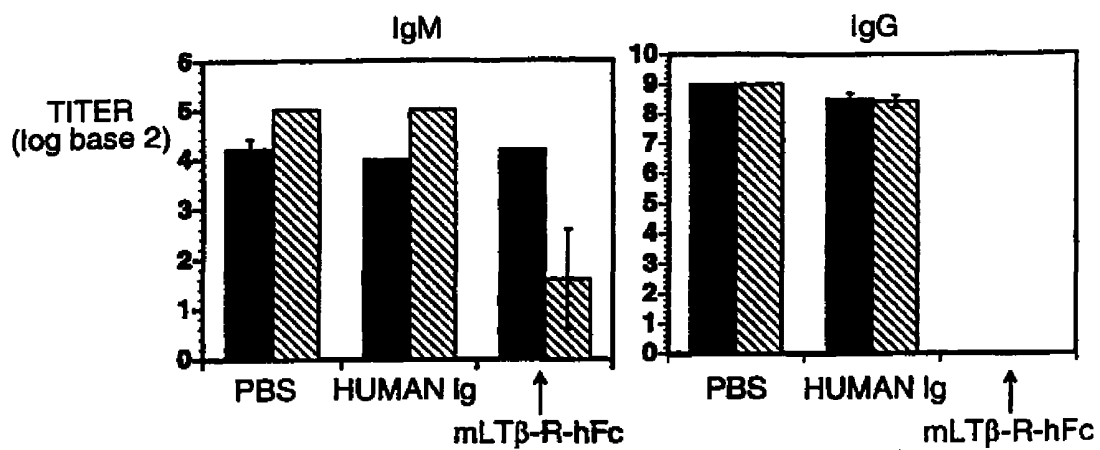


FIG. 6A

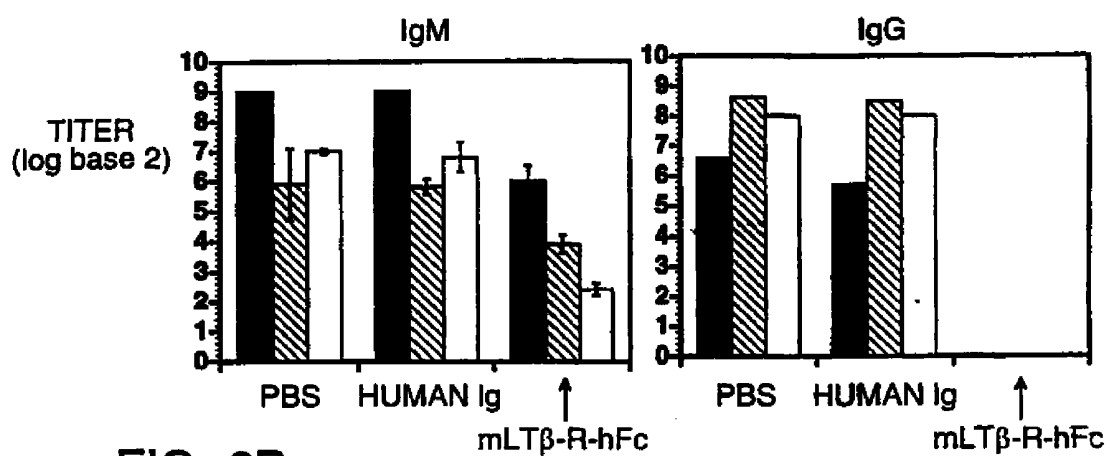


FIG. 6B

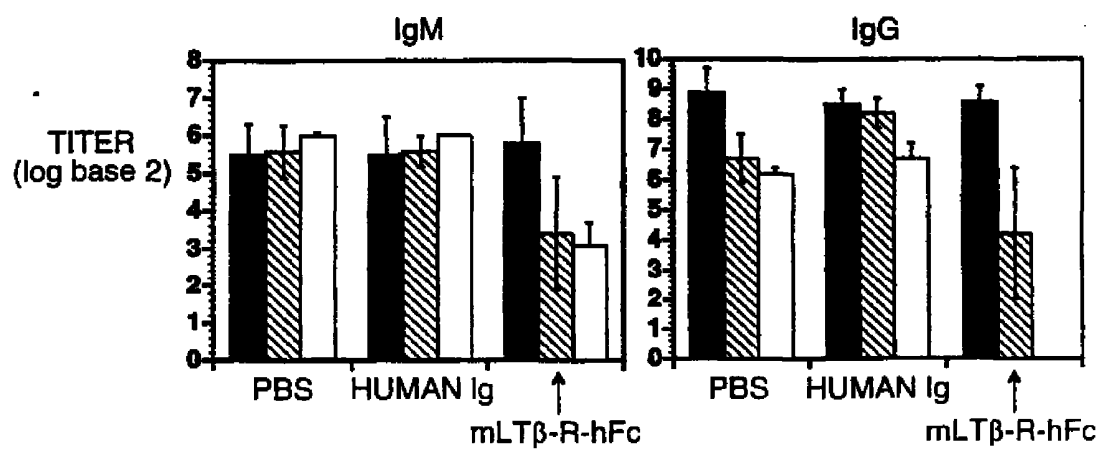
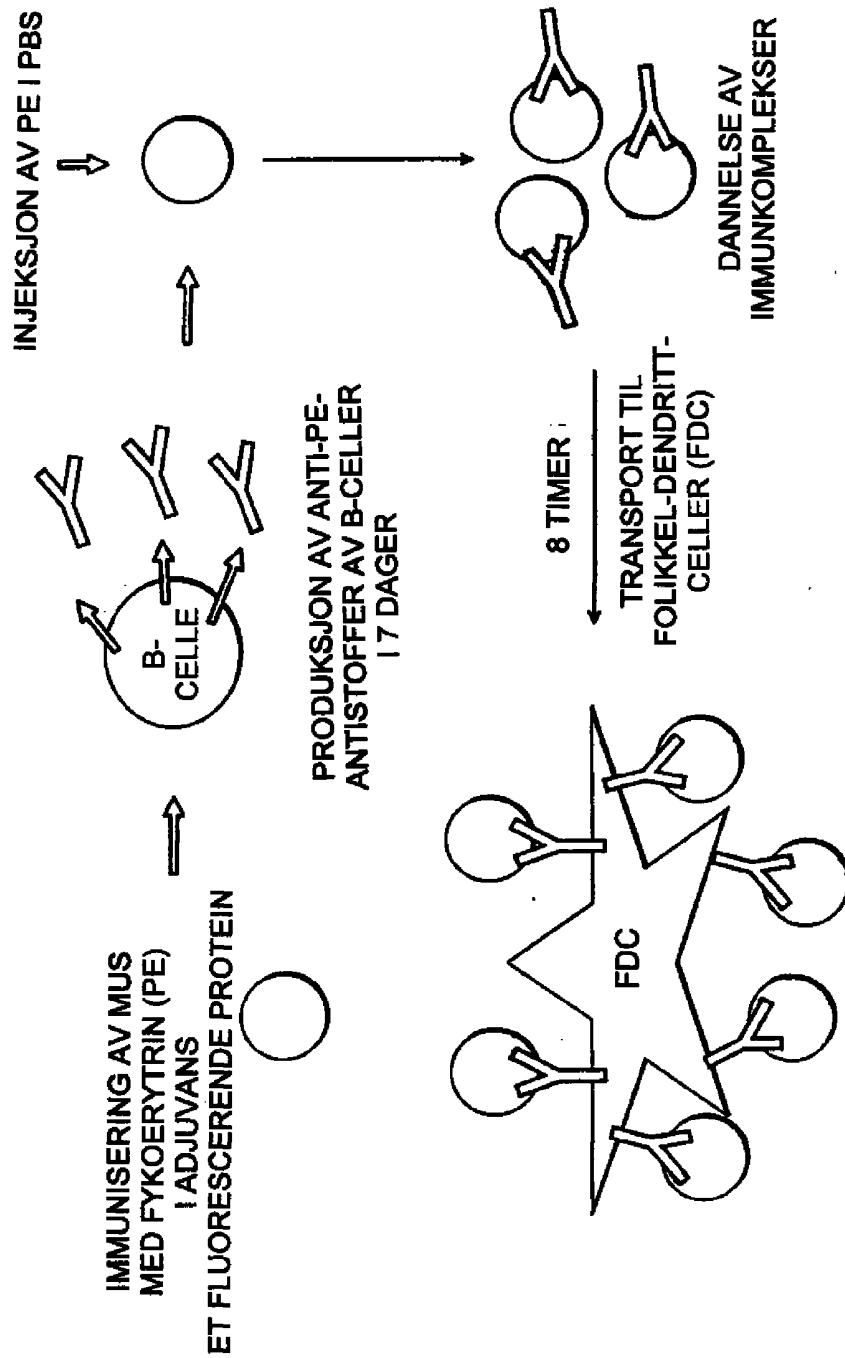


FIG. 6C



IMMUNKOMPLEKS-INNFANGING
PÅ FDC. DIREKTE OBSERVASJON
AV FLUORESCENSEN

FIG. 7