

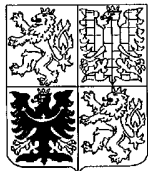
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2669

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.01.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.01.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/012330**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.11.2001**
(Věstník č. 11/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/01421**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/37319**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/17

A 61 P 33/00

A 61 P 37/08

A 61 P 11/06

(71) Přihlašovatel:

**NATIONAL JEWISH MEDICAL AND RESEARCH
CENTER, Denver, CO, US;**

(72) Původce:

**Gelfand Erwin W., Englewood, CO, US;
Haczku Angela Francisca, Princetown Junction, NJ, US;
Lukacs Katalin Veronika, London, GB;**

(74) Zástupce:

Kania František Ing., Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití proteinů tepelného šoku nebo molekuly
nukleové kyseliny, která jej kóduje, přípravek
tyto látky obsahující, způsob výběru léčby
přecitlivělosti nebo nedostatečnosti průchodu
dýchacích cest**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití proteinů tepelného šoku nebo molekuly nukleové kyseliny, která jej kóduje při ochraně savce před onemocněním spojeným se zánětlivým procesem a zejména před zánětlivým onemocněním charakteristickým eozinofilií, přecitlivělosti dýchacích cest a/nebo typem imunitní odpovědi Th2. Dále se řešení týká farmaceutického přípravku a způsobu výběru léčby přecitlivělosti nebo nedostatečnosti průchodu dýchacích cest.

Použití proteinů tepelného šoku nebo molekuly nukleové kyseliny, která jej kóduje, přípravek tyto látky obsahující, způsob výběru léčby přecitlivělosti nebo nedostatečnosti průchodu dýchacích cest.

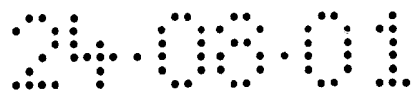
Oblast techniky

Vynález se týká použití proteinů tepelného šoku nebo molekuly nukleové kyseliny, která jej kóduje při prevenci zánětlivých onemocnění a zejména při onemocnění, která jsou charakteristická eozinofílií spojenou se zánětlivým procesem. Dále se vynález týká farmaceutického přípravku, který výše uvedené látky obsahuje a způsobu výběru léčby přecitlivělosti dýchacích cest nebo nedostatečnosti průchodu dýchacích cest spojené s onemocněním souvisejícím se zánětlivým procesem.

Dosavadní stav techniky

Onemocnění způsobené zánětem charakterizuje přítomnost určitých buněčných typů a mediátorů, jejichž přítomnost může vést k poškození tkáně a někdy ke smrti. Onemocnění způsobené zánětem jsou škodlivá zejména pokud postihují dýchací systém vedoucí k obtížím při dýchání, hypoxemii, hypercapnii a poškození plicní tkáně. Onemocnění zahrnující obtíže dýchacích cest jsou charakterizovány omezenou ventilací (například obtížnou ventilací nebo zúžením) způsobenou stažením hladkého svalstva dýchacích cest, edémem a zvýšeným vylučováním hlenu vedoucí ke zvýšené námaze při dýchání, dušnosti, hypoxemii a hypercapnii. Zatímco mechanické vlastnosti plic jsou během obtížného dýchání shodné u různých typů onemocnění s obtížemi dýchacích cest, patofyziologie může být odlišná.

Omezení ventilace mohou vyvolat různá zánětlivá činnidla, včetně alergenů, studeného vzduchu, fyzické zátěže, infekce a nečistoty v ovzduší. Alergeny nebo jiná činnidla u alergických nebo citlivých zvířat (to znamená alergenů nebo haptenu) způsobují zejména uvolnění zánětlivých mediátorů, které aktivují buňky zahrnuté do zánětlivého procesu. Tyto buňky zahrnují lymfocyty, eozinofily, mastocyty, bazofily, neutrofile, makrofágy, monocyty, fibroblasty a destičky. Zánět způsobí přecitlivělost dýchacích cest. Různé studie se týkají stupně, míry a průběhu zánětlivého procesu ve spojitosti se stupněm přecitlivělosti dýchacích cest. Důsledkem zánětu je běžně omezená ventilace a/nebo přecitlivělost dýchacích cest.



Astma je významným onemocněním plic, které postihuje přibližně 16 milionů Američanů. Astma je běžně charakterizováno pravidelným omezením ventilace a/nebo přecitlivělostí na různé stimuly, které způsobí nadměrné zúžení dýchacích cest. Jiná charakteristika zahrnuje zánět dýchacích cest a eozinofilii. Alergické astma je často charakterizováno zvýšenou hladinou IgE, eozinofilovým zánětem dýchacích cest a přecitlivělostí dýchacích cest.

Rozšíření astmatu (to znamená výskyt a doba trvání) se zvyšuje. Současné rozšíření zahrnuje 10% populace a za posledních 20 let se zvýšilo o 25%. Závažnější je však zvýšení úmrtnosti. Pokud se vezmou v úvahu také návštěvy naléhavých případů a hospitalizace, poslední data ukazují, že závažnost astmatu stoupá. Zatímco většina případů astmatu je snadno kontrolovatelná, závažnější průběh onemocnění, cena, vedlejší účinky a stále přetrvávající neúčinnost léčby je trvale závažným problémem. Fibroproliferativní odpověď na vystavení se chronickému antigenu může vysvětlovat závažnost astmatu i špatnou odpověď na léčbu, zejména, pokud se začne pozdě s léčbou. Většina pacientů s astmatem má velmi slabé symptomy, které se snadno léčí, ale výrazný počet astmatiků má více závažných symptomů. Chronické astma je však spojeno s rozvojem progresivního a ireverzibilního omezení ventilace způsobeného mechanismem neznámého původu.

Způsob léčby zánětlivých onemocnění, například mírného až závažného astmatu, zahrnuje v současné době převážně použití imunosupresivních glukokortikosteroidů. Jiné protizánětlivé látky, které se používají pro léčbu zánětu dýchacích cest, zahrnují kromolyn a nedokromil. Symptomatická léčba beta-agonisty, anticholinergními látkami a methylxanthiny je klinicky přínosná pro zmírnění příznaků, ale neodstraňuje podstatu zánětlivého procesu, který vyvolává onemocnění. Často užívané systémové glukokortikosteroidy mají mnoho vedlejších účinků, které zahrnují, ale neomezují se na přírůstek hmotnosti, diabetes, hypertenzi, osteoporózu, šedý zákal, aterosklerózu, náchylnost k infekcím, zvýšení tuků a cholesterolu a snadnou tvorbu modřin. Aerosolizované glukokortikosteroidy mají méně vedlejších účinků, ale mohou mít menší účinek a mají významné vedlejší účinky, jako například afty.

Jiné protizánětlivé látky, například kromolyn a nedokromil mají mnohem menší účinek a mají méně vedlejších účinků než glukokortikosteroidy. K léčbě zánětu dýchacích cest byly též s různými výsledky použity protizánětlivé látky, které jsou primárně používány jako imunosupresivní látky a protirakovinné látky (to znamená

cytoxan, methotrexát a immuran). Tyto látky mají však výrazné vedlejší účinky zahrnující, ale neomezující se na zvýšenou náchylnost k infekcím, toxicitu na játra, léky vyvolávající onemocnění plic a potlačující tvorbu kostní dřeně. Tyto léky tak mají omezené klinické použití pro léčbu většiny onemocnění plic s přecitlivělostí dýchacích cest.

Použití protizánětlivých a symptomatických látek je vážným problémem kvůli jejich vedlejším účinkům nebo jejich neschopnosti zabránit příčině zánětlivého procesu. Stále je třeba mírnější a účinnější látky, pro léčbu zánětu. Je tak třeba použít látky s menšími vedlejšími účinky a nižší toxicitou než se používají u současných protizánětlivých terapií.

Podstata vynálezu

Použití proteinu tepelného šoku pro výrobu léčiva pro prevenci savce před onemocněním charakteristickým eozinofilii spojenou se zánětlivým procesem.

Podle výhodného provedení je tímto savcem člověk.

U jednoho z provedení podle vynálezu může být onemocnění spojeno se zvýšenou tvorbou cytokinu vybraného ze skupiny zahrnující interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-13 (IL-13) nebo interleukin-15 (IL-15). Podle tohoto provedení léčivo obsahující proteinu tepelného šoku vyvolává tvorbu interferonu- γ (IFN- γ) pomocí T lymfocytů u savce. U jiného provedení vynálezu protein tepelného šoku potlačuje produkci interleukinu-4 (IL-4) a interleukinu-5 (IL-5) pomocí T lymfocytů u savce.

Onemocnění, u kterých léčivo podle vynálezu může mít preventivní účinek, zahrnují alergická onemocnění dýchacích cest, syndrom hypereozinofilie, hlístovou parazitovou infekci, alergickou rinitidu, alergickou konjunktivitidu, dermatitidu, ekzém, kontaktní dermatitidu nebo potravinovou alergii. U jiného provedení je onemocněním respirační onemocnění charakteristické eozinofilovým zánětem dýchacích cest a přecitlivělostí dýchacích cest, tato onemocnění zahrnují, ale neomezují se na alergické astma, pravé astma, alergickou bronchopulmonární aspergilózu, eozinofilovou pneumonii, alergickou bronchitis bronchiectasis, astma jako nemoc z povolání, reaktivní syndrom dýchacích cest, interní onemocnění plic, syndrom hypereozinofilie nebo parazitové onemocnění plic. U jiného provedení je toto onemocnění spojeno s citlivostí na alergen a u výhodného provedení jde o alergické astma.

Protein tepelného šoku použitý podle vynálezu je vybrán ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-60 nebo ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-70, ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-90 nebo ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-27. Dále je protein tepelného šoku s výhodou vybrán ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-60, ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-70 nebo ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-27; nebo ze skupiny bakteriálních proteinů tepelného šoku a savčích proteinů tepelného šoku. Ve výhodném provedení je protein tepelného šoku mykobakteriální protein tepelného šoku a výhodněji mykobakteriální protein tepelného šoku-65 (HSP-65).

V jednom z provedení dosud popisovaných použití podle vynálezu léčivo obsahuje protein tepelného šoku ve farmaceuticky přijatelném nosiči. Výhodnými aplikačními formami léčiva jsou orální, nasální, lokální, inhalační, transdermální, rektální nebo parenterální cesty a výhodněji zahrnují inhalační nebo nasální aplikační forma.

Protein tepelného šoku, obsažený v léčivu pro prevenci vůči onemocnění charakterizovaného eozinofilií, snižuje eozinofilii u savce. V jednom provedení podle vynálezu snižuje množství eozinofilů v krvi u savce na hodnotu 0 až 300 buněk/mm³ a s výhodou na hodnotu od 0 až 100 buněk/mm³. U jiného provedení protein tepelného šoku snižuje množství eozinofilů v krvi u savce na hodnotu přibližně 0% až 3% celkového počtu bílých krvinek u savce.

Protein tepelného šoku podle vynálezu aktivuje tvorbu interferonu- γ T lymfocyty, dále také potlačuje tvorbu interleukinu-4 a interleukinu-5 pomocí T lymfocytů u savce a snižuje odpověď dýchacích cest na methacholin u savce.

U jiných provedení je omezení ventilace cest u savce sníženo tak, že hodnota FEV₁/FVC u savce je alespoň 80%. U jiného provedení způsobí aplikace proteinu tepelného šoku zvýšení hodnoty PC_{20methacholin} FEV₁ tak, že hodnota PC_{20methacholin} FEV₁ získaná před aplikací proteinu tepelného šoku, u savce aktivovaného první koncentrací methacholinu je stejná jako hodnota PC_{20methacholin} FEV₁ získaná po aplikaci proteinu tepelného šoku, u savce, aktivovaného dvojitou dávkou první koncentrace methacholinu. U jiného provedení aplikace proteinu tepelného šoku zvyšuje savčí FEV₁ na hodnotu přibližně 5% až 100% předpokládaného FEV₁ u savce. U jiného provedení aplikace proteinu tepelného šoku snižuje omezenou ventilaci u savce tak, že hodnota R_L u savce je snížena o alespoň 20%.

Účinné množství proteinu tepelného šoku podle vynálezu určené pro aplikaci je 0,1 mikrogramů/kilogram až 10 miligramů/kilogram tělesné hmotnosti savce; a s výhodou v množství 1 mikrogram/kilogram a přibližně 1 miligram/kilogram tělesné hmotnosti savce. Pokud je léčivo v aplikační formě aerosolu, může se protein tepelného šoku aplikovat v množství 0,1 miligramů /kilogram až 5 miligramů /kilogram tělesné hmotnosti savce. Pokud se protein tepelného šoku aplikuje parenterálně, může se protein tepelného šoku aplikovat v množství přibližně od 0,1 mikrogramů/kilogram až 10 mikrogramů /kilogram tělesné hmotnosti savce.

Jiné provedení podle vynálezu se týká farmaceutického přípravku zabraňující savci rozvoji onemocnění charakterizovaného eozinofilii spojeného se zánětlivým procesem, například přípravek obsahující protein tepelného šoku a protizánětlivou látku. Tato protizánětlivá látka může zahrnovat, ale neomezuje se na antigen, alergen, haptén, prozánětlivého cytokinového antagonistu, prozánětlivého antagonistu cytokinového receptoru, anti-CD23, anti-IgE, inhibitory syntézy leukotrienu, antagonisty receptoru leukotrienu, glukokortikosteroidy, chemické deriváty steroidů, anti-cyklooxygenázové látky, anti-cholinergní látky, beta-adrenergní agonisty, methylxanthiny, antihistaminy, kromony, zyleuton, reagenty anti-CD4, anti-IL-5 reagenty, povrchově aktivní látky, anti-tromboxanové reagenty, anti-serotoninové reagenty, ketotifen, cytoxin, cyklosporin, methotrexát, makrolidová antibiotika, heparin, nízkomolekulový heparin nebo jejich směsi. V jednom provedení podle vynálezu je zahrnut přípravek podle vynálezu farmaceuticky přijatelný nosič a s výhodou, farmaceuticky přijatelný nosič vybraný ze skupiny biokompatibilních polymerů, jiných polymerních nosičů, kapslí, mikrokapslí, mikročástic, pilulkových preparátů, osmotických pump, difuzních prostředků, lipozomů, liposfér nebo transdermálních cílených systémů.

Farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahuje s výhodou protein tepelného šoku vybraný ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-60, ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-70, ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-90 nebo ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-27. Podle dalšího provedení vynálezu přípravek obsahuje mykobakteriální protein tepelného šoku nebo s výhodou mykobakteriální protein tepelného šoku-65.

Jiné provedení podle vynálezu se týká použití molekuly nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku pro prevenci savce před onemocněním

charakteristickým eozinofilíí, přecitlivělostí dýchacích cest nebo imunitní odpovědí typu Th-2, které je spojeno se zánětlivým procesem. S výhodou je molekula nukleové kyseliny funkčně spojena s kontrolní sekvencí transkripce. V dalším provedení léčivo obsahuje molekulu nukleové kyseliny s farmaceuticky přijatelným nosičem vybraným ze skupiny vodného fyziologicky vyváženého roztoku, umělým lipid obsahujícím substrátem, přírodním lipid obsahujícím substrátem, olejem, esterem, glykolem, virem, kovovou částicí a kationovou molekulou. Ve výhodném provedení je farmaceuticky přijatelný nosič vybrán ze skupiny lipozomů, micel, buněk nebo buněčných membrán. Aplikačními formami léčiva obsahujícího molekulu nukleové kyseliny je intradermální injekce, intramuskulární injekce, intravenózní injekce, subkutanní injekce nebo aplikační forma *ex vivo*.

Jiné provedení podle vynálezu se týká způsobu výběru léčby u přecitlivělosti dýchacích cest nebo nedostatečnosti průchodu dýchacích cest spojené s onemocněním souvisejícím se zánětlivým procesem. Tento způsob zahrnuje tyto kroky: (a) použití proteinu tepelného šoku savci jako léčiva; (b) měření funkční změny plic v odezvě na aktivační látku u savce kvůli zjištění, zda protein tepelného šoku ovlivňuje přecitlivělost dýchacích cest nebo omezení ventilace; a (c) výběr farmakologické léčby na základě funkční změny plic. U jednoho z provedení zahrnuje krok některé měření objemu vybraného ze skupiny zahrnující FEV_1 , FEV_1/FVC , $PC_{20\text{methacholin}}FEV_1$, h po zvýšení (Penh), vodivost, dynamický průběh, odpor plic (R_L), časový index tlaku ventilace (APTI) nebo průběh píků. Stimulační látka může zahrnovat přímý a nepřímý stimulant a výhodně zahrnuje látku vybranou ze skupiny zahrnující alergen, methacholin, histamin, leukotrien, fyziologický roztok, hyperventilaci, fyzickou zátěž, oxid siřičitý, adenosin, propranolol, studený vzduch, antigen, bradykinin, acetylcholin, prostaglandin, ozón, nečistoty z ovzduší a jejich směsi. V jednom provedení způsobu podle vynálezu je onemocnění charakterizováno eozinofilíí dýchacích cest.

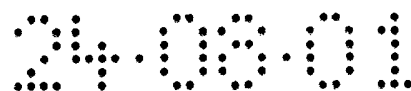
Vynález se obecně týká použití a farmaceutického přípravku pro prevenci savce před onemocněním spojeným se zánětlivým procesem a zejména před onemocněním, pro které je charakteristická eozinofilie, přecitlivělost dýchacích cest a/nebo imunitní odpověď typu Th-2, kdy je tato charakteristika spojená se zánětlivým procesem. Vynálezci uvádí aplikaci proteinu tepelného šoku savci, která vede k výraznému zmírnění zánětu, přesněji eozinofilie, spojené se zánětem. U respiračních onemocnění

zahrnujících omezenou ventilaci a/nebo přecitlivělost dýchacích cest vynálezci navíc uvádí aplikaci proteinu tepelného šoku s výrazným zmírněním přecitlivělosti dýchacích cest. Aplikace proteinu tepelného šoku savci se zánětlivým onemocněním, charakteristickým imunitní odpovědí typu Th-2, vyvolá změnu (to znamená zmírnění) imunitní odpovědi typu Th-2 na imunitní odpověď typu Th-1, například snížením tvorby cytokinů a/nebo imunoglobulinových izotypů.

Proteiny tepelného šoku jsou vysoce imunogenní proteiny spojeny s tvorbou různých zánětlivých cytokinů (zahrnujících Th-1 a Th-2 asociované cytokiny, podrobně popsané níže) a určitými onemocněními, například autoimunitními, a samozřejmě mykobakteriálními infekcemi. Překvapující je, že aplikace imunostimulačního proteinu tepelného šoku savci se jeví jako účinná terapie zánětlivého onemocnění, protože běžné léčby těchto onemocnění zdůrazňují imunitní supresi. Předpokládá se, že uvedený způsob aplikace proteinu tepelného šoku pro prevenci savce před zánětlivým onemocněním vyvolává imunostimulační účinek, způsobující zmírnění škodlivého zánětlivého procesu v imunitní odpovědi, které je účinné a ochranné, nebo alespoň neškodné.

Protein tepelného šoku (HSP) může být podle vynálezu jakýkoli protein patřící do skupiny proteinů původně charakteristických svojí zvýšenou expresí při zvýšených teplotách a jiných stimulech, spojených se stresem, společně náležející ve stavu techniky k „proteinům tepelného šoku“. V současné době je známo, že proteiny tepelného šoku nejsou produkovány pouze při buněčném stresu, ale mohou být běžně přítomny v buňce a účastnit se zde různých procesů.

Proteiny tepelného šoku se v současné době dělí do alespoň pěti hlavních skupin podle velikosti proteinu. Těchto pět skupin zahrnuje skupinu HSP-100 (to znamená protein o velikosti přibližně 100 kD); skupinu HSP-90 (to znamená protein o velikosti přibližně 90 kD); skupinu HSP-70 (to znamená protein o velikosti přibližně 70 kD); skupinu HSP-60 (to znamená protein o velikosti přibližně 60 kD); skupinu HSP-27 (to znamená protein o velikosti přibližně 27 kD). Proteiny tepelného šoku mají několik výrazných charakteristik. HSP-27, HSP-60 a HSP-70 například patří do skupiny proteinů zpracovávajících a slučujících a mohou být důležité při prezentaci antigenu. O HSP-27 a HSP-90 je známo, že se účastní vazby steroidu k receptoru. Mykobakteriální proteiny a zejména mykobakteriální protein tepelného šoku -65 (HSP-65), člen skupiny



HSP-60, je znám jako silný induktor buněčné imunitní odpovědi a tyto proteiny jsou známy zejména jako zvyšující poměr monocytů/makrofágy a funkci T buněk.

Protein tepelného šoku, použitelný podle vynálezu, může být protein tepelného šoku z jakékoli známé skupiny těchto proteinů, zahrnujících výše uvedené skupiny proteinů tepelného šoku. S výhodou, protein tepelného šoku použitelný podle vynálezu, je vybrán ze skupiny proteinů tepelného šoku zahrnující HSP-90, HSP-70, HSP-60 a HSP-27. V jednom z provedení je protein tepelného šoku, použitelný podle vynálezu, ze skupiny HSP-90 nebo HSP-27. V jiném provedení je protein tepelného šoku, použitelný podle vynálezu, ze skupiny HSP-60, HSP-70 a/nebo skupiny HSP-27. Ve výhodném provedení je protein tepelného šoku použitelný podle vynálezu ze skupiny HSP-60.

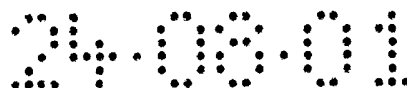
Proteiny tepelného šoku použitelné podle vynálezu mohou být odvozeny nebo získány z jakéhokoli organismu, s výhodou ze savce nebo z bakterie nebo ještě výhodněji z rodu *Mycobacterium*. Zvláště výhodné příklady *Mycobacterií*, z kterých se může získat protein tepelného šoku, zahrnují, ale neomezují se na *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium leprae*. Ve výhodném provedení je proteinem tepelného šoku použitelným podle vynálezu mykobakteriální protein tepelného šoku-65 (HSP-65), 65 kD, mykobakteriální protein ze skupiny HSP-60.

Protein tepelného šoku, použitelným podle vynálezu, může být například získán z přírodního zdroje, vytvořený použitím rekombinatní DNA technologie, nebo syntetizovaný chemicky. Protein tepelného šoku, jak se zde užívá, může být protein tepelného šoku plné délky nebo může být homologní s tímto proteinem, například protein tepelného šoku, v kterém byly aminokyseliny vypuštěny (například zkrácená verze proteinu, jako například peptid), vloženy, zaměněny, nahrazeny a/nebo odvozeny (například glykosilací, fosforylací, acetylací, myristoilací, prenylací, palmitací, amidací a/nebo přidavkem glykosylfosfatidyl inositolu). Homologem proteinu tepelného šoku je protein s aminokyselinovou sekvencí, která je dostatečně podobná aminokyselinové sekvenci přirozeného proteinu tepelného šoku tak, že nukleotidová sekvence kódující homolog je schopná hybridizace za přísných podmínek s molekulou nukleové kyseliny kódující přirozený protein tepelného šoku (například s komplementem řetězce nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci přirozeného proteinu tepelného šoku). Komplement sekvence nukleové kyseliny jakékoli sekvence nukleové kyseliny se týká řetězce nukleové kyseliny, který je komplementární (to znamená může tak tvořit

kompletní dvoušroubovici) k řetězci, pro který je sekvence určena. Proteiny tepelného šoku, použitelné podle vynálezu, zahrnují, ale neomezují se na proteiny kódované molekulami nukleové kyseliny s kódujícími oblastmi plné délky pro protein tepelného šoku; proteiny kódované molekulami nukleové kyseliny mají částečné kódující oblasti pro protein tepelného šoku, kdy tyto proteiny chrání savce před onemocněním identifikovaným charakteristickou eozinofilií, přecitlivělostí dýchacích cest, a/nebo imunitní odpovědí typu Th-2; fúzní proteiny a chimerické proteiny nebo chemicky spřažené proteiny, zahrnující kombinace různých proteinů tepelného šoku nebo kombinace proteinů tepelného šoku s jinými proteiny, například s alergenem nebo antigenem. U jiného provedení zahrnují proteiny tepelného šoku, použitelné ve způsobu podle vynálezu, proteiny tepelného šoku s aminokyselinovou sekvencí, která je alespoň z 70% identická a výhodněji přibližně z 80% identická a nejlépe přibližně z 90% identická k aminokyselinové sekvenci přirozeně se vyskytujícího proteinu tepelného šoku.

Pojem „protein tepelného šoku“ (HSP) se též může týkat proteinů kódovaných alelovými variantami, zahrnujícími přirozeně se vyskytující alelové varianty molekul nukleové kyseliny známé jako kódující proteiny tepelného šoku, které mají podobné, ale nikoli identické sekvence nukleové kyseliny vzhledem k přirozeně se vyskytujícím, nebo „divoké typy“, sekvence nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku. Alelová varianta je gen, který se vyskytuje na zcela stejném lokusu (nebo lokusech) v genomu jako gen proteinu tepelného šoku, který má však díky přirozeným variacím, způsobeným například mutací nebo rekombinací, podobnou, nikoli však identickou sekvencí. Alelové varianty běžně kódují proteiny s podobnou aktivitou jako má protein kódovaný genem s kterým jsou srovnávány. Alelové varianty mohou též obsahovat změny v 5'nebo 3'nepřekládané oblasti genu (například v oblastech regulátorové kontroly).

Fráze „aplikace proteinu tepelného šoku“ podle vynálezu může zahrnovat aplikaci proteinu přímo savci, jakoukoli cestou aplikace proteinu, podrobně popsanou níže, nebo fráze „aplikace proteinu tepelného šoku“ může též znamenat aplikaci molekuly nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku savci tím způsobem, že protein tepelného šoku se u savce exprimuje. Provedení podle vynálezu, kdy se molekula nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku aplikuje savci, je podrobně popsáno níže.



Protein tepelného šoku se může podle vynálezu aplikovat jakémukoli jedinci třídy obratlovců, savců, zahrnujícím bez omezení primáty, hlodavce, dobytek a kočky domácí. Výhodně, způsob podle vynálezu je určen k prevenci a/nebo léčbě onemocnění, charakteristického eozinofilii, přecitlivělostí dýchacích cest a/nebo imunitní odpovědi typu Th-2, spojenou se zánětlivým procesem u savců. Výhodnými savci pro použití proteinu tepelného šoku jako prevence zahrnují člověka, hlodavce, opici, ovci, prase, kočku, psa a koně. Ještě výhodnějším savcem pro prevenci je člověk.

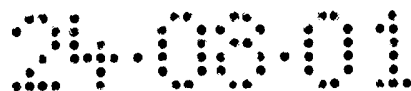
Jak se zde uvádí, fráze „prevence savce proti onemocnění“ zahrnující zánět, se týká: snížení možnosti zánětlivé reakce (to znamená reakce zahrnující zánět) na zánětlivou látku (to znamená látku schopnou vyvolat zánětlivou reakci, například methacholin, histamin, alergen, leukotrien, fyziologický roztok, hyperventilaci, fyzickou zátěž, oxid siřičitý, adenosin, propranolol, studený vzduch, antigen nebo bradykinin); snížení projevu onemocnění nebo zánětlivé reakce a/nebo snížení závažnosti onemocnění nebo zánětlivé reakce. S výhodou, předpoklad pro zánětlivou reakci se sníží, optimálně až do takové míry, že savec již nemá žádné problémy a (nebo se zlepši funkce po vystavení se látce způsobující zánět. Například prevence savce závisí na schopnosti sloučeniny, pokud je aplikována savci, předejít projevu onemocnění a/nebo léčit nebo zmírnit příznaky onemocnění, projevy nebo příčiny. Prevence savce se zejména týká regulace zánětlivé reakce směrem k potlačení (například zmírněním, inhibicí nebo odstraněním) nadměrné nebo poškozující zánětlivé reakce a může zahrnovat indukci výhodné, preventivní nebo neškodné imunitní odpovědi. Prevence savce se též týká zejména regulace buněčné imunity a/nebo humorální imunity (to znamená aktivity T buněk a/nebo imunoglobulinové aktivity, zahrnující typ Th-1 a/nebo Th-2 typ buněčné a/nebo humorální aktivity). Pojem „onemocnění“ se týká jakékoli odchylky od normálního zdraví savce a zahrnuje stav, kdy jsou projeveny symptomy onemocnění, stejně jako podmínky, při kterých se projeví odchylka (například infekce, genová mutace, genetický defekt atd.), ale symptomy se ještě neprojeví.

Onemocnění, pro která je způsob podle vynálezu preventivní, mohou zahrnovat jakákoli onemocnění charakterizované eozinofilii, přecitlivělost dýchacích cest a/nebo imunitní odpověď typu Th-2, kdy je tato charakteristika spojena se zánětlivou reakcí. Tato onemocnění mohou zahrnovat, ale neomezují se na alergická onemocnění dýchacích cest, syndrom hypereozinofilie, hlístové parazitické infekce, alergické

rhinitidy, alergické konjunktivitidy, dermatitidy, ekzémy, kontaktní dermatitidy nebo potravinové alergie. Jednoho z provedení zahrnuje onemocnění, pro které je způsob podle vynálezu preventivní, respirační onemocnění charakterizované eozinofilovým zánětem dýchacích cest a/nebo přecitlivělostí dýchacích cest. Tato respirační onemocnění zahrnují výše uvedená alergická onemocnění dýchacích cest, která zahrnují, ale neomezují se na alergické astma, alergickou bronchopulmonární aspergilózu, eozinofilovou pneumonii, alergickou bronchitis bronchiectasis, astma z povolání (to znamená astma, sípání, stažení hrudníku a kašel vyvolaný aktivační látkou, například alergenem, dráždidlem nebo haptenem na pracovišti), reaktivní syndrom onemocnění dýchacích cest (to znamená samostatné vystavení se látce, která vede k astmatu) a vnitřní onemocnění plic. Ještě výhodněji zahrnují respirační onemocnění, pro která může být způsob podle vynálezu preventivní, ale neomezují se na alergické astma, vnitřní astma, alergickou bronchopulmonární aspergilózu, eozinofilovou pneumonii, alergickou bronchitidovou bronchiektázu, astma z povolání, reaktivní syndrom onemocnění dýchacích cest, vnitřní onemocnění plic, syndrom hypereozinofilie a parazitové onemocnění plic. Další z provedení, pro která může být způsob podle vynálezu preventivní, zahrnuje onemocnění, které je spojeno s citlivostí na alergen. Příklady těchto onemocnění jsou popsány výše. Ve výhodném provedení je způsob podle vynálezu preventivní proti astmatu a zejména proti alergickému astmatu.

Jak je popsáno výše, způsob podle vynálezu působí preventivně u savce proti onemocnění charakterizovaného eozinofilií, přecitlivělostí dýchacích cest a/nebo imunitní odpovědí typu Th-2, spojenou se zánětlivou reakcí. Přestože je každá jednotlivá charakteristika - eozinofilie, přecitlivělost dýchacích cest a imunitní odpověď typu Th-2, podrobně popsána níže, je dobré pochopit, že způsob podle vynálezu je použitelný jako prevence savce proti onemocnění s jakoukoli charakteristikou nebo jejich kombinací, které je spojeno se zánětlivým procesem. Jednotlivé výsledky získané použitím způsobu a/nebo další charakteristiky onemocnění, pro které je způsob podle vynálezu účinný, se proto mohou použít u onemocnění s jakoukoli charakteristikou nebo kombinací výše uvedených charakteristik.

Jedno z provedení podle vynálezu se týká způsobu prevence savce proti rozvoji onemocnění charakterizovaného eozinofilií spojenou se zánětlivým procesem. Tento způsob zahrnuje krok aplikace proteinu tepelného šoku savci trpícímu tímto onemocněním. Pojem „eozinofilie“, jak se zde užívá, se týká klinicky rozpoznávanému



stavu, kdy počet eozinofilů přítomných u savce s eozinofilií je zvýšen ve srovnání s počtem eozinofilů u normálního savce (to znamená savce bez těchto příznaků). U savce netrpícího tímto onemocněním charakteristickým eozinofilií, tvoří eozinofily přibližně 0% až 3% celkového počtu bílých krvinek u savce. Množství eozinofilů v krvi u savce se může změřit použitím metod známých odborníkům v tomto oboru. Množství eozinofilů v krvi se může spočítat přesněji na základě barvení živých buněk, například floxinem B nebo DiffQuick.

Ve způsobu podle vynálezu aplikace proteinu tepelného šoku u savce trpícího onemocněním charakteristické eozinofilií, výhodně způsobí zmírnění eozinofilie u savce. Aplikace proteinu tepelného šoku způsobem podle vynálezu výhodně způsobí snížení počtu eozinofilů v krvi u savce na hodnotu od přibližně 0 až 470 buněk/mm³, výhodněji přibližně 0 až 300 buněk/mm³, a ještě výhodněji přibližně 0 až 100 buněk/mm³. Ve výhodném provedení aplikace způsobem podle vynálezu protein tepelného šoku výhodně způsobí redukci počtu eozinofilů v krvi u savce na hodnotu přibližně 0% až 3% celkového počtu bílých krvinek u savce.

Jiné provedení podle vynálezu se týká způsobu prevence savce proti onemocnění charakterizovaného přecitlivělostí dýchacích cest spojenou se zánětlivým procesem. Tento způsob zahrnuje aplikaci proteinu tepelného šoku savci trpícímu tímto onemocněním. Pojem „přecitlivělost dýchacích cest“ (AHR) se týká abnormalit dýchacích cest, které vedou k jejich snadnému zúžení a/nebo příliš vysoké reakci na stimul schopný vyvolat omezení ventilace. AHR může být funkční změnou respiračního systému vyvolanou zánětem nebo změnami v dýchacích cestách (například ukládáním kolagenu). Omezená ventilace se týká zúžení dýchacích cest, které může být ireverzibilní nebo reverzibilní. Omezená ventilace nebo přecitlivělost dýchacích cest může být způsobena ukládáním kolagenu, bronchospasmem, hypertrofií hladkých svalů dýchacích cest, kontrakcí hladkých svalů dýchacích cest, mukózní sekrecí, buněčným depozitem, poškozením epitelu, poruchou propustnosti epitelu, poruchou funkce hladkého svalstva nebo jeho citlivosti, abnormalitami v plicním parenchymu, abnormalitami v nervové regulaci funkce hladkého svalstva (zahrnujícími adrenergní, cholinergní a nonadrenergně-noncholinergní regulaci) a infiltrativní onemocnění uvnitř dýchacích cest a v jejich okolí.

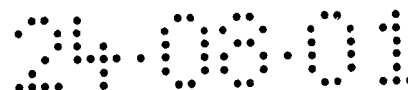
AHR se může měřit zátěžovým testem, který zahrnuje měření funkce respiračního systému savce jako reakce na aktivační látku (to znamená stimul). AHR

se může měřit jako změna v respirační funkci od základní linie oproti dávce aktivující látky (postup tohoto měření a savčí model, použitelný pro toto měření, je popsán podrobněji v příkladech níže). Respirační funkce se může měřit například spirometricky, pletysmograficky, podle průběhu píků, míry symptomu, fyzických projevů (to znamená respirační rychlosti), sípání, tolerance k zátěži, použití účinných léků (to znamená bronchodilatátorů) a krevních plynů.

Spirometrie se může u pacientů použít pro zjištění míry změny v respirační funkci spolu s aktivující látkou, například methacholinem nebo histaminem. U pacientů se spirometrie provádí za požádání pacienta o hluboký a dlouhý nádech a výdech, provedený co nejrychleji pro správné měření ventilace a objemu. Objem vydechovaného vzduchu v první sekundě je znám pod označením jako „vynucený výdechový objem“ (FEV_1) a celkové množství vydechovaného vzduchu je známo jako „vynucený respirační kapacita“ (FVC). U člověka lze stanovit normální předpokládanou FEV_1 a FVC standardizací podle hmotnosti, výšky, pohlaví a rasy. Zdravý člověk má FEV_1 a FEV alespoň přibližně 80% normálního předpokládaného objemu a poměr FEV_1/FVC alespoň přibližně 80%. Objemy se stanoví před (to znamená představují klidový stav u savce) a po (to znamená představují vyšší plicní rezistenci u savce) inhalaci aktivující látky. Pozice výsledné křivky ukazuje citlivost dýchacích cest na aktivující látku.

Účinek zvyšujících se dávek nebo koncentrace vyvolávající látky na funkci plic se může stanovit měřením vydechovaného vzduchu v první sekundě (FEV_1) a FEV_1 poděleného vitální kapacitou (poměr FEV_1/FVC) u savce vyprovokovaného aktivační látkou. U člověka je dávka nebo koncentrace aktivující látky (to znamená methacholinu nebo histaminu), která způsobí 20% úbytek v FEV_1 ($PD_{20}FEV_1$) stanovitelná podle stupně AHR. FEV_1 a FVC hodnoty se měří za použití metod známých odborníkům v této oblasti.

Měření pulmonární funkce odporu dýchacích cest (R_L), dynamického průběhu (C_L) a přecitlivělosti se provede měřením transpulmonárního tlaku jako rozdílu tlaku mezi otevřenými dýchacími cestami a tělním pletysmografem. Objem je kalibrovaná změna tlaku v tělním pletysmografu a průtok je digitální odchylka signálu objemu. Odpor (R_L) a průběh (C_L) se získají za použití metod známých odborníkům v této oblasti (například řešením rovnice pohybu použitím rekurzivních nejmenších čtverců). Odpor dýchacích cest (R_L) a dynamický průběh (C_L) jsou popsány podrobně v příkladech.

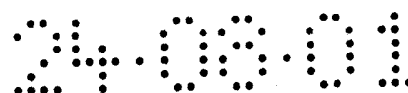


Pro měření hodnot AHR lze použít mnoho aktivačních látek. Vhodné aktivační látky zahrnují přímá a nepřímá stimulancia. Výhodné aktivační látky zahrnují například methacholin (Mch), histamin, alergen, leukotrien, fyziologický roztok, hyperventilaci, fyzickou zátěž, oxid siřičitý, adenosin, propranolol, studený vzduch, antigen, bradykinin, acetylcholin, nečistoty z ovzduší (například částice, NO, NO₂), prostaglandiny, ozón a jejich směsi. Výhodně se použije methacholin jako aktivační činidlo. Výhodné koncentrace methacholinu pro použití křivky závislosti odezvy na koncentraci leží v oblastech od přibližně 0,001 až 100 miligramů na mililitr (mg/ml). Výhodnější koncentrace methacholinu pro použití křivky závislosti odezvy na koncentraci leží v oblastech od přibližně 0,01 až 50 mg/ml. Ještě výhodnější koncentrace methacholinu pro použití křivky závislosti odezvy na koncentraci leží v oblastech od přibližně 0,02 až 25 mg/ml. Pokud se použije methacholin jako aktivační látka, stupeň AHR je definován aktivující koncentrací methacholinu, potřebné k vyvolání 20% poklesu FEV₁ u savce (PC_{20 methacholin}FEV₁). Například, u člověka za použití standartních protokolů dosavadního stavu techniky má normální člověk běžně PC_{20methacholin}FEV₁ > 8 mg/ml methacholinu. U člověka je proto AHR definován jako PC_{20methacholin}FEV₁ < 8 mg/ml methacholinu.

Účinnost léčiva jako prevence před AHR u savce se sklonem k AHR se běžně měří dvakrát. Například, účinnost léčiva jako prevence před AHR u savce je zřetelná u savce s PC_{20methacholin}FEV₁ 1 mg/ml před aplikací léčiva a 2 mg/ml methacholinu po aplikaci léčiva. Podobně, léčivo je zřejmě účinné pokud má savec PC_{20methacholin}FEV₁ 2 mg/ml před aplikací léčiva a 4 mg/ml methacholinu po aplikaci léčiva.

U jednoho z provedení podle vynálezu protein tepelného šoku snižuje odezvu na methacholin u savce. Výhodně, aplikace proteinu tepelného šoku zvyšuje PC_{20methacholin}FEV₁ u savce léčeného proteinem tepelného šoku v přibližně dvojnásobné koncentraci oproti PC_{20methacholin}FEV₁ u normálního savce. U normálního savce se předpokládá, že netrpí nebo nemá předpoklad k abnormální AHR. U testovaného savce se předpokládá postižení nebo rozvoj abnormální AHR.

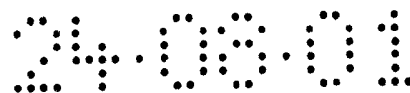
U jiného provedení aplikace proteinu tepelného šoku savci způsobí zvýšení hodnoty PC_{20methacholin}FEV₁ u savce tak, že hodnota PC_{20methacholin}FEV₁ získaná před aplikací proteinu tepelného šoku, pokud je savec aktivován první koncentrací methacholinu, je stejná jako hodnota PC_{20methacholin}FEV₁ získaná po aplikaci proteinu tepelného šoku, pokud je savec vyprovokován dvojnásobným množstvím první



koncentrace methacholinu. Výhodné množství proteinu tepelného šoku k aplikaci je takové množství, které vyvolá zvýšení hodnoty $PC_{20\text{methacholin}} FEV_1$ u savce tak, že hodnota $PC_{20\text{methacholin}} FEV_1$ u savce získaná před aplikací proteinu tepelného šoku, pokud je savec aktivován koncentrací methacholinu, která je v množství od přibližně 0,01 mg/ml do 8 mg/ml, je stejná jako hodnota $PC_{20\text{methacholin}} FEV_1$ po aplikaci proteinu tepelného šoku pokud je savec aktivován dvojnásobnou koncentrací methacholinu, která je v rozmezí od přibližně 0,02 mg/ml až 16 mg/ml.

Respirační funkce může být podle vynálezu stanovena na základě různých statických testů, které zahrnují měření funkce respiračního systému u savce v nepřítomnosti aktivační látky. Příklady statických testů zahrnují například spirometrii, pletysmograf, průběh píků, stav symptomu, fyzické příznaky (to znamená respirační rychlost), sípání, zátěžovou toleranci, použití zmírňujících léků (to znamená bronchodilatátorů) a krevní plyny. Stanovení pulmonární funkce u statických testů se může provést například měřením celkové kapacity plic (TLC), hrudníkového objemu plynu (TgV), funkčního zbytkového objemu (FRC), zbytkového objemu (RV) a měrné vodivosti (SGL) pro objemy plic, difuzní kapacity plic pro oxid uhelnatý (DLCO), plynů v arteriální krvi, zahrnující pH, P_{O_2} a P_{CO_2} pro výměnu plynu. FEV_1 i poměr FEV_1/FVC se může použít pro měření omezení ventilace. Pokud se u člověka použije spirometrie, FEV_1 se u individuálního případu může srovnat s předpokládanými hodnotami FEV_1 . Předpokládané hodnoty FEV_1 jsou vhodné pro standartní normogramy založené na věku, pohlaví, hmotnosti, výšce a rase savce. Normální savec má běžně FEV_1 alespoň 80% předpokládaného FEV_1 u savce. Omezení plicní ventilace způsobí pokles FEV_1 nebo FVC na méně než 80% předpokládaných hodnot. Alternativní metoda pro měření omezení plicní ventilace je založena na poměru FEV_1 a FVC (FEV_1/FVC). U zdravých jedinců je definován poměr FEV_1/FVC alespoň přibližně 80%. Omezená ventilace způsobí pokles poměru FEV_1/FVC na méně než 80% předpokládaných hodnot. Savec s omezenou plicní ventilací má tak definován poměr FEV_1/FVC nižší než přibližně 80%.

Účinnost léčiva jako prevence savce s předpokládanou omezenou ventilací může být stanovena měřením procenta zvýšení FEV_1 a/nebo poměru FEV_1/FVC před a po aplikaci léčiva. V jednom provedení aplikace proteinu tepelného šoku podle vynálezu zmírňuje omezení plicní ventilace u savce tak, že hodnota FEV_1/FVC u savce je alespoň 80%. U jiného provedení aplikace proteinu tepelného šoku zvyšuje FEV_1 s výhodou přibližně o 5% až 100%, výhodněji o 6% až 100%, ještě výhodněji o 7% až



100% a nejlépe přibližně o 8% až 100% (nebo přibližně 200 ml) předpokládaného FEV_1 u savce.

Je třeba si uvědomit, že měření hodnoty odporu plicní ventilace (R_L) u jiného savce než člověka (například myši) se může použít ke stanovení diagnózy obtížnosti plicní ventilace podobnému měření FEV_1 a/nebo poměru FEV_1/FVC u člověka. U jednoho z provedení podle vynálezu zmírňuje aplikace proteinu tepelného šoku omezení ventilace u savce tak, že hodnota R_L se sníží o alespoň 10% a výhodněji o alespoň 20%, ještě výhodněji o alespoň 30% a nejlépe o alespoň 40%.

Rozsah vynálezu zahrnuje tu skutečnost, že statický test je možné provést před nebo po aplikaci aktivační látky používané u zátěžového testu.

U jiného provedení zmírňuje aplikace proteinu tepelného šoku ve způsobu podle vynálezu omezení ventilace u savce tak, že změna hodnot FEV_1 nebo PEF u savce, pokud se měří večer před spaním a ráno po probuzení, je nižší než přibližně 75%, výhodněji méně než přibližně 45%, ještě výhodněji méně než přibližně 15% a nejlépe méně než přibližně 8%.

Další provedení podle vynálezu se týká způsobu prevence savce před zánětlivým onemocněním charakteristickým imunitní odpovědí typu Th-2. Tento způsob zahrnuje aplikaci proteinu tepelného šoku savci trpícímu tímto onemocněním. Podle vynálezu, onemocnění charakterizované imunitní odpovědí typu Th-2 (alternativně související s imunitní odpovědí typu Th-2) může být charakterizováno jako onemocnění, které je spojeno s přednostní aktivací skupiny pomocných T lymfocytů známých v dosavadním stavu techniky jako Th-2 typ T lymfocytů (nebo Th2 lymfocyty), ve srovnání s aktivací typu Th-1 T lymfocytů (nebo Th-1 lymfocytů). T lymfocyty typu Th-2 lze podle vynálezu charakterizovat tvorbou jednoho nebo více cytokinů souhrnně známých jako cytokiny typu Th-2. Jak se zde uvádí, cytokiny typu Th-2 zahrnují interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-13 (IL-13) a interleukin-15 (IL-15). Naopak, lymfocyty typu Th-1 tvoří cytokiny, které zahrnují IL-2 a IFN- γ . Alternativně, imunitní odpověď typu Th-2 může být někdy charakterizována přednostní tvorbou izotypů protilátek, které zahrnují IgG1 (jehož přibližným ekvivalentem je u člověka IgG4) a IgE, kdy imunitní odpověď typu Th-1 může být někdy charakterizována tvorbou protilátek izotypů IgG2a nebo IgG3 (jejichž přibližným ekvivalentem jsou u člověka IgG1, IgG2 nebo IgG3).

Podle způsobu podle vynálezu vede aplikace proteinu tepelného šoku savci trpícímu onemocněním charakteristickým imunitní odpovědí typu Th-2 přednostně ke zmírnění imunitní odpovědi typu Th-2 na přednostní odpověď typu Th-1. S výhodou aplikace proteinu tepelného šoku podle způsobu podle vynálezu vede ke snížení (nebo potlačení) tvorby cytokinů typu Th-2 lymfocyty T, jako například IL-4 a IL-5. Navíc, nebo alternativně, aplikace proteinu tepelného šoku podle způsobu podle vynálezu vede ke zvýšení (nebo indukci) tvorby cytokinů typu Th-1, jako například IFN- γ . Navíc, aplikace proteinu tepelného šoku podle způsobu podle vynálezu může někdy vést ke snížení tvorby izotypů protilátek typu Th-2, jako například IgG1 a IgE a/nebo zvýšení tvorby izotypů protilátek typu Th-1, jako například IgG2a nebo IgG3.

V jednom provedení aplikace proteinu tepelného šoku savci trpícímu onemocněním zde popsaným, může přednostně snížit hladinu IgG1 (jehož přibližným ekvivalentem u člověka je IgG4) v séru savce na hodnoty od přibližně 0 do 100 mezinárodních jednotek/ml, s výhodou na hodnoty od přibližně 0 do 50 mezinárodních jednotek/ml, výhodněji na hodnoty od přibližně 0 do 25 mezinárodních jednotek/ml a nejlépe na hodnoty od přibližně 0 do 20 mezinárodních jednotek/ml. Koncentrace IgG1 v séru savce se může měřit za použití metod známých odborníkům v této oblasti. Přesněji, koncentrace IgG1 v séru savce nebo koncentrace IgG1 vyprodukovaná B buňkami savce *in vitro* se může měřit například za použití protilátek, které se specificky vážou k IgG1 v metodě ELISA (enzyme-linked immunoassay) nebo radioimunostanovení.

V jiném provedení aplikace proteinu tepelného šoku savci trpícímu onemocněním zde popsaným, může s výhodou snížit hladinu IgG2a (jehož přibližnými izotypovými ekvivalenty u člověka jsou IgG1, IgG2 nebo IgG3) v séru savce na hodnoty od přibližně 0 do 100 mezinárodních jednotek/ml, výhodně na hodnoty od přibližně 10 do 50 mezinárodních jednotek/ml, výhodněji na hodnoty od přibližně 15 do 25 mezinárodních jednotek/ml, ještě výhodněji na hodnoty od přibližně 15 do 25 mezinárodních jednotek/ml a nejlépe přibližně 20 mezinárodních jednotek/ml.

Jak se uvádí výše, provedení podle vynálezu, může být imunitní odpověď Th-2 spojena s jinými výše uvedenými charakteristikami onemocnění, pro které je způsob podle vynálezu preventivní (například eozinofilie a/nebo přecitlivělost dýchacích cest). Eozinofilie je například spojena s tvorbou cytokinu IL-5 a přecitlivělost dýchacích cest může být spojena s tvorbou cytokinu IL-4. V jednom provedení způsobu pro prevenci

savce trpícího onemocnění charakteristickým eozinofilii, přecitlivělostí dýchacích cest a/nebo imunitní odpovědi typu Th-2 spojené se zánětlivým procesem, toto onemocnění může být dále spojeno se zvýšenou tvorbou cytokinu vybraného ze skupiny interleukinu-4 (IL-4), interleukinu-5 (IL-5), interleukinu-6 (IL-6), interleukinu-9 (IL-9), interleukinu-10 (IL-10), interleukinu-13 (IL-13) a interleukinu-15 (IL-15).

Přijatelné protokoly pro aplikaci proteinu tepelného šoku podle vynálezu zahrnují způsob aplikace i množství proteinu tepelného šoku, které je třeba plalikovat savci, včetně individuální dávky, počtu dávek a frekvenci aplikace.

Výběr těchto protokolů může provést odborník v této oblasti. Vhodné způsoby aplikace mohou zahrnovat, ale neomezují se na orální, nasální, lokální, inhalační, transdermální, rektální a parenterální cestu. Výhodné parenterální cesty mohou zahrnovat, ale neomezují se na subkutanní, intradermální, intravenózní, intramuskulární a intraperitoneální cesty. Výhodné cesty lokální aplikace zahrnují inhalaci aerosolu (to znamená sprejem), nasální aplikaci nebo lokální povrchovou aplikaci na kůži savce. Ve výhodném provedení se protein tepelného šoku používá ve způsobu podle vynálezu aplikuje nasální nebo inhalační cestou. Zejména výhodné cesty aplikace molekuly nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku jsou podrobně popsány níže.

Jak je uvedeno výše, aplikace proteinu tepelného šoku savci způsobem podle vynálezu může mít jeden nebo více vlivů na savce, které zahrnují, ale neomezují se na redukci eozinofilie (zahrnující, ale neomezující se na eozinofilový zánět dýchacích cest), snížení přecitlivělosti dýchacích cest, indukci tvorby IFN- γ T buňkami a/nebo potlačení tvorby IL-4 a/nebo IL-5 T-buňkami. Podle způsobu podle vynálezu zahrnuje účinné množství proteinu tepelného šoku pro aplikaci savci množství, které je schopno snížit přecitlivělost dýchacích cest (AHR), eozinofilii, potlačení omezení plicní ventilace a/nebo symptomy (například zkrácený dech, sípání, dyspnea, omezení pohybu nebo noční buzení), zahrnující tvorbu IFN- γ T buňkami a/nebo potlačení tvorby IL-4 a/nebo IL-5 T-buňkami bez toxického vlivu na savce. Množství, které je toxické pro savce, je jakékoli množství, které způsobí jakékoli fyzické nebo funkční poškození savce (to znamená jed).

Jednotlivá vhodná dávka proteinu tepelného šoku pro aplikaci savci je dávka, která je schopna prevence savce před onemocněním charakterizovaným eozinofilii, přecitlivělostí dýchacích cest, a/nebo imunitní odpovědí typu Th-2 spojené se

zánětlivým procesem, pokud se aplikuje jednou nebo vícekrát během určité doby. Přesněji, vhodná dávka proteinu tepelného šoku znamená dávku, která zlepšuje AHR zdvojnásobením dávky vyvolávající látky nebo zlepšuje statickou respirační funkci savce. Vhodná dávka proteinu tepelného šoku znamená případně dávku proteinu tepelného šoku, která snižuje množství eozinofilů u savce na hladinu zde uvedenou, zvyšuje tvorbu cytokinů typu Th-1 (například IFN- γ) a/nebo inhibuje tvorbu cytokinů typu Th-2 (například IL-4 a IL-5).

Výhodná dávka proteinu tepelného šoku leží v rozmezí přibližně 0,1 mikrogramů/kilogram až 10 miligramů/kilogram tělesné hmotnosti savce. Výhodnější dávka proteinu tepelného šoku leží v rozmezí přibližně 1 mikrogram/kilogram až 10 miligramů/kilogram tělesné hmotnosti savce. Ještě výhodnější dávka proteinu tepelného šoku leží v rozmezí přibližně 1 mikrogram/kilogram až 5 miligramů/kilogram tělesné hmotnosti savce. Zvláště výhodná dávka proteinu tepelného šoku leží v rozmezí přibližně 1 mikrogram/kilogram až 1 miligram/kilogram tělesné hmotnosti savce. V jiném provedení zvláště výhodná dávka proteinu tepelného šoku leží v rozmezí přibližně 0,1 miligram/kilogram až 5 miligramů/kilogram tělesné hmotnosti savce, pokud je protein tepelného šoku aplikován ve formě aerosolu. Jiná zvláště výhodná dávka proteinu tepelného šoku leží v rozmezí přibližně 0,1 mikrogramů/kilogram až 10 miligramů/kilogram tělesné hmotnosti savce, pokud je protein tepelného šoku aplikován parenterálně.

V jiném provedení může být protein tepelného šoku podle vynálezu aplikován současně nebo následně se sloučeninou schopnou zvýšit ochrannou schopnost proteinu tepelného šoku u savce před onemocněním charakteristickým eozinofilií, přecitlivělostí dýchacích cest a/nebo imunitní odpovědí typu Th-2 spojenou se zánětlivým procesem. Vynález též zahrnuje formulaci obsahující protein tepelného šoku a alespoň jednu takovou sloučeninu pro prevenci savce před onemocněním zahrnujícím zánět. Vhodná sloučenina k současné nebo následné aplikaci s proteinem tepelného šoku zahrnuje sloučeninu, která je schopná regulace tvorby IgG1 nebo IgE (to znamená potlačení syntézy interleukinu-4 indukujícím syntézu IgE), zvýšení tvorby interferonu-gama, regulaci proliferace a aktivace NK buněk, regulaci lymfokinem aktivovaných zabíječských buněk (LA-K), regulaci aktivity pomocných T buněk, regulaci degranulace mastocytů, ochranu senzorických nervových zakončení, regulaci eozinofilové a/nebo blastocytové aktivity, ochranu nebo relaxaci hladkého svalstva,

snížení mikrovaskulární permeability nebo zmírnění diferenciace Th1 a/nebo Th2 podtříd T buněk. Výhodná sloučenina k aplikaci současně nebo následně s proteinem tepelného šoku zahrnuje, ale neomezuje se na jakékoli protizánětlivé látky. Protizánětlivou látkou podle vynálezu může být sloučenina, která má podle dosavadního stavu techniky protizánětlivé vlastnosti a může také zahrnovat jakoukoli sloučeninu, která za určitých podmínek a/nebo při aplikaci ve spojení s proteinem tepelného šoku může mít protizánětlivý účinek. Výhodná sloučenina k aplikaci současně nebo následně s proteinem tepelného šoku zahrnuje, ale neomezuje se na antigen, alergen, haptén, prozánětlivé cytokinové antagonisty (například anti-cytokinové protilátky, rozpustné cytokinové receptory), prozánětlivé antagonisty cytokinových receptorů (například anticytokinové receptorové protilátky), anti-CD23, anti-IgE, inhibitory syntézy leukotrienů, antagonisty leukotrienového receptoru, glukokortikosteroidy, chemické deriváty steroidů, anti-cyklooxygenázové látky, anti-cholinergní látky, beta-adrenergní agonisty, methylxanthiny, anti-histaminy, kromony, zyleuton, látky anti-CD4, látky anti-IL-5, povrchově aktivní látky, anti-tromboxanové látky, anti-serotoninové látky, ketotifen, cytoxin, cyklosporin, methotrexát, makrolidová antibiotika, heparin, heparin nízké molekulové hmotnosti, a jejich směsi. Výběr sloučeniny pro aplikaci ve spojení s proteinem tepelného šoku může provést odborník v této oblasti podle různých charakteristik savce. Přesněji, podle genetické výbavy savce, okolností projevu zánětu, dyspney, sípání po fyzické zátěži, stavu symptomů, fyzických projevů (to znamená respirační rychlosti), snášenlivosti zátěže, použití pomocných léků (to znamená bronchodilatátorů) a krevních plynů.

Protein tepelného šoku a/nebo formulace podle vynálezu pro aplikaci savci může též zahrnovat jiné složky, jako např. farmaceuticky přijatelný nosič. Například, formulace podle vynálezu mohou být spojeny s nosičem přijatelným pro savce, který má být chráněn. Příklady těchto nosičů zahrnují vodu, fyziologický roztok, fosfátem pufrované roztoky, Ringerův roztok, roztok dextrózy, Hankův roztok, polyethylenglykol obsahující fyziologicky vyvážené roztoky solí a jiné vodné fyziologicky vyvážené roztoky solí. Mohou se též použít nevodné nosiče, jako například husté oleje, sezamový olej, ethyloléát nebo triglyceridy. Jiné využitelné formulace zahrnují suspenze obsahující viskózní podpůrné látky, jako například karboxymethylcelulózu sodnou, sorbitol nebo dextran. Nosiče mohou též obsahovat malá množství přísad, jako například látek, které zvyšují izotonicitu a chemickou stabilitu, nebo pufry. Příklady

pufrů zahrnují fosfátový pufr, uhličitanový pufr a Tris pufr, zatímco příklady konzervačních látek zahrnují thimerosal, m- nebo o-kresol, formalin a benzylalkohol. Standardní formulace mohou být buď ve formě injekčních roztoků nebo pevných látek, z kterých je možné ve vhodných kapalinách připravit suspenzi nebo injekční roztok. V nekapalných formulacích může proto nosič obsahovat dextrans, lidský sérový albumin, konzervační látky a podobně, ke kterým lze před aplikací přidat sterilní vodu nebo fyziologický roztok. Příklady farmaceuticky přijatelných nosičů, které jsou zvláště vhodné pro aplikaci molekul nukleové kyseliny, kódujících proteiny tepelného šoku, jsou podrobně popsány níže.

V jednom z provedení podle vynálezu protein tepelného šoku nebo formulace podle vynálezu může zahrnovat kontrolní uvolňovací kompozici, která je schopná pomalého uvolnění proteinu tepelného šoku nebo formulace podle vynálezu v těle savce. Jak se zde uvádí, kompozice pro kontrolované uvolnění obsahuje protein tepelného šoku nebo formulaci podle vynálezu v nosiči pro kontrolované uvolnění. Vhodné nosiče pro kontrolované uvolnění zahrnují, ale neomezuji se na biokompatibilní polymery, jiné polymerní matrice, kapsle, mikrokapsle, mikročástice, pilulkové preparáty, osmotické pumpy, difuzní prostředky, lipozomy, liposféry, suché prášky a transdermální přenašečové systémy. Jiné kompozice pro kontrolované uvolnění podle vynálezu zahrnují kapaliny, které po aplikaci savci vytvoří pevnou látku nebo gel uvnitř těla. Výhodné kompozice pro kontrolované uvolnění jsou biodegradovatelné (to znamená biologicky odbouratelné).

Výhodné kompozice pro kontrolované uvolnění jsou schopné uvolnění proteinu tepelného šoku nebo formulace podle vynálezu do krve savce v konstantní míře dostatečné pro zajištění určité terapeutické hladiny proteinu tepelného šoku nebo formulace pro prevenci zánětu po určitou dobu dní až měsíců v závislosti na parametrech toxicity proteinu tepelného šoku. Farmaceutický přípravek pro kontrolované uvolnění podle vynálezu je schopná účinná prevence po dobu alespoň 6 hodin, výhodněji alespoň 24 hodin a nejlépe alespoň po dobu 7 dnů.

Jiné provedení podle vynálezu zahrnuje způsob výběru léčby přecitlivělosti dýchacích cest a/nebo omezení ventilace spojeného s onemocněním zahrnujícím zánětlivý proces, způsob zahrnuje: (1) aplikaci proteinu tepelného šoku savci; (2) měření změny v plicní funkci v závislosti na vyvolávající látce u savce pro stanovení, zda je protein tepelného šoku schopen zmírnit přecitlivělost dýchacích cest a/nebo

omezení ventilace; a (3) výběr farmakologické léčby účinné pro zmírnění zánětu založené na funkční změně plic. V jiném z provedení je toto onemocnění charakteristické eozinofilií dýchacích cest.

Funkční změna plic zahrnuje měření statické respirační funkce před a po aplikaci proteinu tepelného šoku. V souladu s vynálezem trpí savec přijímající protein tepelného šoku respiračním onemocněním spojeným se zánětem. Měření funkční změny plic při odpovědi na vyvolávající látku se může provést za použití různých technik známých odborníkům v tomto oboru. Tyto vyvolávající látky mohou zahrnovat přímý a nepřímý stimul a mohou obsahovat jakoukoli dříve uvedenou vyvolávající látku. Přesněji, funkční změnu plic lze měřit stanovením FEV_1 , FEV_1/FVC , $PC_{20\text{methacholin}}$, FEV_1 h po zvýšení (Penh), vodivosti, dynamickým průběhem, plicním odporem (R_L), časovým indexem tlaku plicní ventilace (APTI) a/nebo průběhem píků příjemce vyvolávající látky. Jiné metody měření funkční změny plic zahrnují například odpor plicní ventilace, dynamický průběh, objemy plic, průběh píků, stavy symptomů, fyzické příznaky (to znamená respirační průběh), sípání, zátěžovou toleranci, použití pomocných léků (to znamená bronchodilatátorů) a krevní plyny. Vhodná farmakologická terapie účinná k potlačení zánětu u savce může být vybrána na základě stanovení, zda a do jaké míry má aplikace proteinu tepelného šoku účinek na funkci plic u savce. Pokud je změna funkce plic následkem aplikace proteinu tepelného šoku, pak může být savec léčen proteinem tepelného šoku. V závislosti na míře změny funkce plic mohou být pro zvýšení léčebného účinku u savce aplikovány další sloučeniny. Pokud se neprojeví žádná změna nebo dostatečně malá změna v plicní funkci po aplikaci proteinu tepelného šoku, pak by měl být savec léčen alternativní sloučeninou k proteinu tepelného šoku. Způsob výběru léčby respiračního onemocnění může též zahrnovat stanovení jiných charakteristik pacienta, jako například průběhu respiračního onemocnění, přítomnosti infekčních látek, návyků pacienta (například kouření), pacientova pracovního a soukromého prostředí, alergie, průběhu život ohrožujících respiračních příhod, závažnosti onemocnění, trvání onemocnění (to znamená akutní nebo chronické) a předchozí reakce na jiné léky a/nebo léčebné postupy.

Jiné provedení podle vynálezu se týká způsobu prevence savce před onemocněním identifikovaným jednou nebo více charakteristikami vybranými ze skupiny eozinofilie, přecitlivělosti dýchacích cest, a imunitní odpovědi typu Th-2, kdy je charakteristika spojená se zánětlivým procesem. Tento způsob zahrnuje krok aplikace

molekuly nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku savci trpícímu tímto onemocněním. Tato molekula nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku může být exprimována v hostitelské buňce savce, do kterého je tato izolovaná molekula nukleové kyseliny přenesena. Exprimovaný protein tepelného šoku pak může působit v místě, kam byl přenesen, způsobem zde popsáným dříve u proteinů tepelného šoku používaných v uváděném způsobu (to znamená preventivně před onemocněním savce charakteristickým eozinofilií, přecitlivělostí dýchacích cest a/nebo imunitní odpovědí typu Th2 spojenou se zánětlivým procesem).

Molekula nukleové kyseliny může podle vynálezu zahrnovat DNA, RNA nebo deriváty DNA nebo RNA. Molekula nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku může být získána z přírodního zdroje jako celá (to znamená kompletní), gen nebo jeho část, která je schopna kódování proteinu tepelného šoku, který chrání savce před onemocněním identifikovaným na základě charakteristiky vybrané ze skupiny eozinofilie, přecitlivělosti dýchacích cest a/nebo imunitní odpovědi typu Th-2, kdy tento protein a/nebo molekula nukleové kyseliny kódující tento protein se aplikuje savci. Molekula nukleové kyseliny se dá též získat použitím rekombinantní DNA technologie (například amplifikací pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), klonováním) nebo chemickou syntézou. Molekula nukleové kyseliny zahrnuje molekulu přirozené nukleové kyseliny a její homology, zahrnující, ale neomezující se na přirozené alelové varianty a molekuly modifikovaných nukleových kyselin, v kterých jsou nukleotidy vloženy, odstraněny, nahrazeny a/nebo přeměněny takovým způsobem, že tyto modifikace významně nezasahují do schopnosti molekuly nukleové kyseliny kódovat protein tepelného šoku, který je využitelný ve způsobu podle vynálezu. V jednom z provedení molekula nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku, který je využitelný podle vynálezu, má nukleotidovou sekvenci, která je alespoň ze 70% identická, výhodněji alespoň z 80% identická a ještě výhodněji z 90% identická se sekvencí nukleové kyseliny přirozeně se vyskytujícího proteinu tepelného šoku. Izolovaná, nebo biologicky čistá molekula nukleové kyseliny je molekula nukleové kyseliny, která byla odstraněna ze svého přírodního prostředí. Pojem „izolovaná“ a „biologicky čistá“ nezbytně neodráží míru, do jaké byla molekula nukleové kyseliny přečistěna.

Homolog molekuly nukleové kyseliny se může získat použitím řady metod známých odborníkům v této oblasti (viz. například Sambrook a kol., *Molecular Cloning*:

A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989). Molekuly nukleové kyseliny mohou být například modifikovány za použití různých technik zahrnujících, ale neomezujičích se na klasické mutagenové techniky a rekombinantní DNA techniky, jako například místně cílenou mutagenezi, chemickou reakci molekuly nukleové kyseliny pro vyvolání mutageneze, štěpení fragmentu nukleové kyseliny restričními enzymy, ligaci fragmentu nukleové kyseliny, amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a/nebo mutagenezi vybraných oblastí sekvence nukleové kyseliny, syntézu směsi oligonukleotidů a ligaci skupin směsi pro „složení“ směsi molekul nukleové kyseliny a jejich kombinací. Homology molekuly nukleové kyseliny mohou být vybrány ze směsi modifikovaných nukleových kyselin screeningem funkce proteinu kódovaného nukleovou kyselinou (například aktivitou proteinu tepelného šoku, jak je to vhodné). Techniky screeningu aktivity proteinu tepelného šoku jsou známy odborníkům v této oblasti.

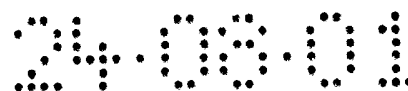
Ačkoli se spojení „molekula nukleové kyseliny“ primárně vztahuje na molekulu nukleové kyseliny z fyzického hlediska a spojení „sekvence nukleové kyseliny“ se primárně týká sekvence nukleotidů v molekule nukleové kyseliny, tato dvě spojení se mohou zaměnit, zejména s ohledem na molekulu nukleové kyseliny nebo sekvenci nukleové kyseliny se schopností kódovat protein tepelného šoku. Pojem „rekombinantní molekula“ se navíc primárně vztahuje na molekulu nukleové kyseliny funkčně spojenou se sekvencí transkripční kontroly, ale může se použít v záměně ve spojení „molekula nukleové kyseliny“, která se aplikuje savci.

Jak se uvádí výše, molekula nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku, který je využitelný ve způsobu podle vynálezu, může být funkčně spojena s jednou nebo více sekvencemi transkripční kontroly za tvorby rekombinantní molekuly. Výraz „funkčně spojena“ se týká spojení molekuly nukleové kyseliny se sekvencí transkripční kontroly tím způsobem, že molekula je schopna exprese, pokud je transfektována (to znamená transformována, transdukována nebo transfektována) do hostitelské buňky. Sekvence transkripční kontroly jsou sekvence, které kontrolují zahájení, elongaci a zakončení transkripce. Zvláště důležité sekvence transkripční kontroly jsou takové, které kontrolují zahájení transkripce, jako promotorová, zesilující transkripci, operátorová a represorová sekvence. Vhodné sekvence transkripční kontroly zahrnují sekvenci jakékoli transkripční kontroly, která může být funkční v rekombinantní buňce použitelné pro expresi proteinu tepelného šoku a/nebo použitelná pro aplikaci savci

způsobem podle vynálezu. Různé sekvence transkripční kontroly jsou známy odborníkům v této oblasti. Výhodné sekvence transkripční oblasti zahrnují takové, které jsou funkční u savčích, bakteriálních nebo hmyzích buněk a výhodně u savčích buněk. Výhodnější sekvence transkripční kontroly zahrnují, ale neomezují se na opičí virus 40 (SV-40), β -aktin, retrovirovou dlouhou terminální repetici (LTR), Rous sarcoma virus (RSV), cytomegalovirus (CMV), *tac*, *lac*, *trp*, *trc*, *oxy-pro*, *omp/lpp*, *rrnb*, bakteriofág lambda (λ) (jako například λp_L a λP_R a fúze, které obsahují tato promotory), bakteriofág T7, T7/*lac*, bakteriofág T3, bakteriofág SP6, bakteriofág SP01, metallothionein, alfa kopulační faktor, *Pichia* alkohol oxidázu, subgenomové promotory alfaviru (jako například subgenomové promotory viru Sindbis), bakulovirus, hmyzí virus *Heliothis zea*, očkovací virus a jiné poxviry, herpesvirus a sekvence adenovirové transkripční kontroly, stejně jako jiné sekvence schopné kontroly genové exprese v eukaryotických buňkách. Další vhodné sekvence transkripční kontroly zahrnují tkáňově specifické promotory a zesilovače (například promotory a zesilovače specifické pro T-buňky). Sekvence transkripční kontroly podle vynálezu mohou též zahrnovat přirozeně se vyskytující sekvence transkripční kontroly přirozeně spojené s genem kódujícím protein tepelného šoku využitelný způsobem podle vynálezu.

Rekombinantní molekuly podle vynálezu, které mohou být DNA nebo RNA, mohou též obsahovat další regulátorové sekvence, jako například translační regulátorové sekvence, začátky replikace a jiné regulátorové sekvence, které jsou kompatibilní s rekombinantní buňkou. V jednom z provedení obsahuje rekombinantní molekula podle vynálezu též sekreční signály (to znamená sekvence signálních segmentů nukleové kyseliny), které uzpůsobí exprimovaný protein tepelného šoku, aby byl vyloučen z buňky, která produkuje protein. Vhodné signální segmenty zahrnují: (1) bakteriální signální segment, zejména signální segment proteinu tepelného šoku; nebo (2) jakýkoli heterologní signální segment schopný vést sekreci proteinu tepelného šoku z buňky. Výhodné signální segmenty zahrnují, ale neomezují se na signální segmenty přirozeně spojeny s jakýmkoli proteinem tepelného šoku dříve uvedeným.

K tvorbě kódovaného produktu (to znamená proteinu tepelného šoku) se může použít jedna nebo více rekombinantních molekul podle vynálezu. V jednom z provedení se tvoří kódovaný produkt expresí molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu za podmínek účinných pro tvorbu proteinu. Výhodným způsobem tvorby kódovaného proteinu je transfekce hostitelské buňky jednou nebo více rekombinantními molekulami



se sekvencí nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku pro vytvoření rekombinantní buňky. Vhodné hostitelské buňky k transfekci zahrnují jakoukoli buňku, která může být transfektována. Hostitelskými buňkami mohou být buď netransfektované buňky nebo buňky, které jsou již transformované alespoň jednou molekulou nukleové kyseliny. Hostitelskou buňkou použitelnou podle vynálezu může být jakákoli buňka schopná tvorby proteinu tepelného šoku, zahrnující bakteriální, houbovou, savčí a hmyzí buňku. Výhodnou hostitelskou buňkou je savčí buňka. Výhodnější hostitelskou buňkou je savčí lymfocyt, svalová buňka, hematopoietické prekursorové buňky, mastocyty, NK buňky, makrofágy, monocyty, epitelové buňky, endotelové buňky, dendritické buňky, mezenchymální buňky, eozinofily, plicní buňky a keratinocyty.

Hostitelská buňka podle vynálezu může být transfektována *in vivo* (to znamená dodáním molekuly nukleové kyseliny savci), *ex vivo* (to znamená mimo savce pro následné zavedení do jeho těla, jako například zavedením molekuly nukleové kyseliny do buňky, která byla přenesena ze savce do tkáňové kultury a následně zpětným přenesením buňky do savce); nebo *in vitro* (to znamená mimo tělo savce, jako například v tkáňové kultuře pro tvorbu rekombinantního proteinu tepelného šoku). Transfekce molekuly nukleové kyseliny do hostitelské buňky je možné docílit jakoukoli metodou, kterou je možné molekulu nukleové kyseliny vpravit do buňky. Transfekční techniky zahrnují, ale neomezuji se na transfekci, elektroporaci, mikroinjekci, lipofekci, adsorpci a protoplastovou fúzi. Výhodné metody transfekce hostitelských buněk *in vivo* zahrnují lipofekci a adsorpci. Rekombinantní buňka podle vynálezu zahrnuje hostitelskou buňku transfektovanou s molekulou nukleové kyseliny, která kóduje protein tepelného šoku. Odborník v tomto oboru může docenit tu skutečnost, že použití technik rekombinantní DNA může zlepšit expresi transfektovaných molekul nukleové kyseliny manipulací, například množstvím kopií molekul nukleové kyseliny v hostitelské buňce, účinností, s kterou jsou molekuly nukleové kyseliny transkribovány, účinností, s kterou jsou výsledné transkripty translatovány a účinností posttranslačních modifikací. Rekombinantní techniky využitelné pro zvýšení exprese molekul nukleové kyseliny kódujících protein tepelného šoku, zahrnují, ale neomezuji se na provedení spojení molekul nukleové kyseliny s plazmidy o vysokém počtu kopií, vpravení molekul nukleové kyseliny do jednoho nebo více hostitelských chromozomů, přidání vektorově stabilních sekvencí do plazmidů, nahrazení nebo modifikací signálů transkripční kontroly (například promotorů, operátorů, zesilovačů), substitucí nebo modifikací

signálů translační kontroly (například vazebných míst na ribozomu, Shine-Dalgarnových sekvencí), modifikace molekul nukleové kyseliny, které mají odpovídat použitému kodónu hostitelské buňky a vymazání sekvencí, které destabilizují transkripty. Aktivita exprimovaného rekombinantního proteinu tepelného šoku se může zvýšit fragmentací, modifikací nebo vytvořením derivátů molekul nukleové kyseliny kódujících tento protein.

Molekula nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku může být podle vynálezu aplikována v jednom provedení s farmaceuticky přijatelným nosičem. Farmaceuticky přijatelný nosič může zahrnovat, ale neomezuje se na vodný fyziologicky vyvážený roztok, umělý lipid obsahující substrát, přírodní lipid obsahující substrát, olej, ester, glykol, virus, částici kovu nebo molekulu kationtu. Zvláště výhodné farmaceuticky přijatelné nosiče pro aplikaci molekuly nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku, zahrnují lipozomy, micely a buněčné membrány.

Rekombinantní molekuly nukleové kyseliny aplikované způsobem podle vynálezu zahrnují: (a) rekombinantní molekuly použitelné podle způsobu podle vynálezu v necíleném nosiči (například jako „holé“ molekuly DNA, jako takové, například ve Wolff a kol., 1990, *Science* 247, 1465-1468); a (b) rekombinantní molekuly podle vynálezu komplexně spojené s nosičem podle vynálezu. Vhodné nosiče pro lokální aplikaci zahrnují lipozomy. Prostředky pro lokální aplikaci mohou dále obsahovat ligandy pro zacílení prostředku na určité místo (jak se zde podrobně uvádí). Výhodně, molekula nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku se aplikuje způsobem, který zahrnuje intradermální injekci, intramuskulární injekci, intravenózní injekci, subkutánní injekci nebo aplikaci *ex vivo*.

V jednom z provedení se aplikuje rekombinantní molekula nukleové kyseliny použitelná způsobem podle vynálezu injekčně přímo do svalových buněk pacienta, což způsobí delší expresi (například týdny až měsíce) této rekombinantní molekuly. Tato rekombinantní molekula je výhodně ve formě „holé DNA“ a aplikuje se injekčně přímo do svalových buněk pacienta.

Farmaceuticky přijatelný prostředek, který je schopen zacílení je zde uváděn pod spojením „nosič“. Nosiče podle vynálezu jsou schopny dopravit formulaci včetně proteinu tepelného šoku a/nebo molekuly nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku do cílového místa u savce. Cílové místo představuje takové místo u savce, kde je vyžadováno dodání terapeutické formulace. Například, cílovým místem může být plicní buňka, antigen prezentující buňka nebo lymfocyt, který je zacílen přímou injekcí nebo

dodáním za použití lysozomů nebo jiných nosičů. Příklady nosičů zahrnují ale neomezuji se na umělé a přírodní, lipid obsahující nosiče. Přírodní, lipid obsahující nosiče zahrnují buňky a buněčné membrány. Umělé, lipid obsahující nosiče zahrnují lipozomy a micely. Nosič podle vynálezu může být modifikován pro zacílení na určité místo u savce, takto cílený využívá nukleovou kyselinu na určitém místě. Vhodné modifikace zahrnují manipulaci chemické formulace lipidové části nosiče a/nebo zavedení sloučeniny do nosiče schopného specifického zacílení na určité místo, například na určitý buněčný typ. Specifické zacílení způsobí vazbu nosiče na určitou buňku interakcí sloučeniny v nosiči s molekulou na povrchu buňky. Vhodné cílové sloučeniny zahrnují ligandy schopné selektivně (to znamená specificky) vázat jinou molekulu na určitém místě. Příklady těchto ligandů zahrnují protilátky, antigeny, receptory a receptorové ligandy. Protilátka specifická pro antigen nalezená na povrchu plicní buňky se může například dostat na vnější povrch lipozomového nosiče pro zacílení nosiče na plicní buňku. Manipulací chemické formulace lipidové části nosiče se může ovlivnit extracelulární nebo intracelulární zacílení nosiče. Například, k lipidové formulaci lipozomu se může přidat chemická látka, která mění náboj lipidové dvojvrstvy lipozomu, takže lipozom je schopen se spojit s určitými buňkami o určitých nábojových charakteristikách.

Výhodným nosičem podle vynálezu je lipozom. Lipozom je schopen zůstat stabilní v těle savce dostatečnou dobu na to, aby dodal molekulu nukleové kyseliny popsanou ve vynálezu na vhodné místo v těle savce. Lipozom podle vynálezu je výhodně stabilní u savce, kterému byl aplikován, po dobu alespoň 30 minut, výhodněji alespoň 1 hodinu a nejvýhodněji alespoň 24 hodin.

Lipozom podle vynálezu obsahuje lipidovou kompozici, která je schopná zacílení molekuly nukleové kyseliny popsané ve vynálezu na určité nebo vybrané místo u savce. Lipidová kompozice lipozomu je výhodně schopná zacílení na jakýkoli orgán savce, výhodněji na plíce, slezinu, lymfatické uzliny a kůži savce a ještě výhodněji na plíce savce.

Lipozom podle vynálezu obsahuje lipidovou kompozici, která je schopná spojení s plazmatickou membránou cílové buňky pro dodání nukleové kyseliny do buňky. Transfekční účinnost lipozomu podle vynálezu je výhodně přibližně 0,5 mikrogramů (μg) DNA na 16 nanomolů (nmol) lipozomu dodávaného na 10^6 buněk, výhodněji přibližně 1,0 mikrogramů (μg) DNA na 16 nanomolů (nmol) lipozomu dodávaného na

10^6 buněk a ještě výhodněji přibližně 2,0 mikrogramů (μg) DNA na 16 nanomolů (nmol) lipozomu dodávaného na 10^6 buněk. Velikost výhodného lipozomu podle vynálezu je přibližně 100 až 500 nanometrů (nm), výhodněji přibližně 150 až 450 nm a nejvýhodněji přibližně 200 až 400 nm v průměru.

Výhodné lipozomy pro použití podle vynálezu zahrnují jakýkoli lipozom. Výhodné lipozomy podle vynálezu zahrnují ty lipozomy, které se standardně používají, například v metodách pro dodání genu, známých odborníkům v tomto oboru. Výhodnější lipozomy zahrnují lipozomy obsahující polykationtovou lipidickou kompozici a/nebo lipozomy s cholesterolovým řetězcem spojeným s polyethylenglykolem.

Spojení lipozomu s molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu se může dosáhnout použitím metod standardně užívaných v dosavadním stavu techniky (viz. například metody popsané v příkladu 2). Vhodná koncentrace molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu pro přidání k lipozomu zahrnuje koncentraci účinnou pro dodání vhodného množství nukleové kyseliny do buňky tak, že buňka může tvořit vhodný superantigen a/nebo protein cytokinu k regulaci efektorové buněčné imunity požadovaným způsobem. Výhodně, přibližně alespoň 0,1 μg až 10 μg molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu se smíchá s přibližně 8 nmol lipozomů, výhodněji přibližně 0,5 μg až 5 μg molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu se smíchá s přibližně 8 nmol lipozomů a ještě výhodněji, přibližně 1,0 μg molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu se smíchá s přibližně 8 nmol lipozomů.

Jiný cílený nosič zahrnuje rekombinantní vakcínu virové částice. Rekombinantní vakcína virové částice podle vynálezu zahrnuje molekulu rekombinantní nukleové kyseliny použitelnou způsobem podle vynálezu, v které jsou rekombinantní molekuly obaleny virem, který umožňuje průnik DNA do buňky, takže DNA je exprimována v buňce. Je možné použít řadu rekombinantních virových částic, zahrnujících, ale neomezuujících se na ty, jejichž podstatou jsou alfaviry, poxviry, adenoviry, herpesviry, arena viry a retroviry.

Následující příklady jsou uvedeny pro ilustraci a neomezují rozsah vynálezu.

Popis obázků

Obr. 1 je sloupcový graf, který ukazuje, že léčba myši mykobakteriálním HSP-65 během 7 dnů podle protokolu senzibilizace vaječným albuminem (ovalbuminem, OA) zvyšuje nespecifickou a antigen specifickou proliferaci T buněk u myši.

Obr. 2A je lineární graf, který ukazuje, že léčba myši mykobakteriálním HSP-65 po suboptimální senzibilizaci vaječným albuminem (ovalbuminem, OA) zvyšuje antigen specifickou proliferaci T buněk ve slezině.

Obr. 2B je lineární graf, který ukazuje, že léčba myši mykobakteriálním HSP-65 po suboptimální senzibilizaci vaječným albuminem (ovalbuminem, OA) zvyšuje antigen specifickou proliferaci T buněk v peribronchiálních lymfatických uzlinách (PBLN).

Obr. 3 je sloupcový graf, který ukazuje, že léčba myši mykobakteriálním HSP-65 po senzibilizaci vaječným albuminem (ovalbuminem, OA) a aktivaci zvyšuje nespecifickou a antigen specifickou proliferaci T buněk.

Obr. 4A je sloupcový graf, který ukazuje účinek léčby myši mykobakteriálním HSP-65 po senzibilizaci vaječným albuminem (ovalbuminem, OA) a aktivaci na tvorbu interferonu- γ vaječným albuminem (ovalbuminem, OA) stimulovanými buňkami sleziny *in vitro*.

Obr. 4B je sloupcový graf, který ukazuje účinek léčby myši mykobakteriálním HSP-65 po senzibilizaci vaječným albuminem (ovalbuminem, OA) a aktivaci na tvorbu IL-4 vaječným albuminem stimulovanými buňkami sleziny *in vitro*.

Obr. 4C je sloupcový graf, který ukazuje účinek léčby myši mykobakteriálním HSP-65 po senzibilizaci vaječným albuminem a aktivaci k tvorbě IL-5 vaječným albuminem stimulovanými buňkami sleziny *in vitro*.

Obr. 5A je sloupcový graf, který ukazuje účinek léčby myši mykobakteriálním HSP-65 po senzibilizaci vaječným albuminem a aktivaci ke tvorbě IgG2a specifického pro vaječný albumin a vaječným albuminem stimulovanými buňkami sleziny *in vitro*.

Obr. 5B je sloupcový graf, který ukazuje účinek léčby myši mykobakteriálním HSP-65 po senzibilizaci vaječným albuminem a aktivaci k tvorbě IgG1 specifického pro vaječný albumin a vaječným albuminem stimulovanými buňkami sleziny *in vitro*.

Obr. 5C je sloupcový graf, který ukazuje účinek léčby myši mykobakteriálním HSP-65 po senzibilizaci vaječným albuminem a aktivaci k tvorbě IgE specifického pro vaječný albumin a vaječným albuminem stimulovanými buňkami sleziny *in vitro*.

Obr. 6 je sloupcový graf, který ukazuje, že léčba myši mykobakteriálním HSP-65 odstraňuje eozinofilový zánět dýchacích cest vyvolaný senzibilizací vaječným albuminem a aktivací *in vivo*.

Obr. 7 je lineární graf, který ukazuje, že léčba myši mykobakteriálním HSP-65 odstraňuje přecitlivělost dýchacích cest na methacholin po senzibilizaci vaječným albuminem a aktivaci *in vivo*.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Následující příklad ukazuje, že mykobakteriální protein tepelného šoku protein-65 (HSP-65) zvyšuje proliferativní odpověď T buněk u myšího modelu přecitlivělosti dýchacích cest po krátkodobé senzitivizaci ovalbuminem v kamenci.

Zvířecí modely onemocnění jsou bezcenné pro potvrzení hypotézy nebo oprávnění k pokusu spojeného s člověkem. Myši mají mnoho proteinů, které jsou z více než 90% homologní s odpovídajícími lidskými proteiny. Pro následující pokusy vynálezci použili antigenem řízený systém u myší, který je charakteristický imunitní odpovědí (IgE), závislostí na imunitní odpovědi Th-2 a eozinofilovou odezvou. Model je charakteristický zjevnou a vyvíjející se přecitlivělostí dýchacích cest.

Vývoj univerzálního myšího systému chronického vystavování se aeroantigenu, který je spojen s výraznou eozinofilií a zjevnou, trvalou a progresivní přecitlivělostí dýchacích cest, umožňuje nesouběžnou možnost studia potenciálních terapeutických kompozicí (to znamená terapeutických formulací) pro prevenci nebo léčbu respiračního zánětu a/nebo zánětu spojeného s eozinofilií a imunitní odpovědí typu Th-2. Myší systém zde uváděný, je charakterizován výraznou eozinofilií s následnou fibrózou dýchacích cest a ukládáním kolagenu. Vynálezci použili tento myší systém jako důkaz toho, že aplikace mykobakteriálního proteinu tepelného šoku, proteinu-65 (HSP-65) účinně odstraňuje přecitlivělost dýchacích cest a eozinofilii u senzitivizované myši.

Samice myši BALB/c staré 8-12 týdnů se získaly od Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Myši se umístily do sterilního prostředí a byly na dietě bez vaječného albuminu (OA). Příklady popsané níže byly prováděny na věku a pohlavím odpovídajících si skupinách, stáří 8 až 12 týdnů.

Ke zjištění, zda mykobakteriální HSP-65 napomáhá imunitní odpovědi na senzitivizaci antigenem, byly účinky mykobakteriálního HSP-65 na reakci T buněk OA senzitivizovanou myší studovány *in vitro*.



V tomto příkladu byly myši senzitivizovány intraperitoneálně (i.p.) injekcí 20 μg vaječného albuminu (OA) (Grade V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) spolu s 20 mg kamence ($\text{Al}(\text{OH})_3$) (Inject Alum; Pierce, Rockford, IL) ve 100 μl PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem) nebo PBS samotným. Ihned po injekci OA se myši intravenózně (i.v.) aplikovalo 100 μl proteinu tepelného šoku-65 (mykobakteriální HSP-65) *M. leprae* v množství 100 μg v PBS (provedla Dr. Kathleen Lukacs, National Heart & Lung Institute, London) nebo samotný PBS. Po 7 dnech se myši utratily, sleziny se odstranily a umístily do sterilního PBS. Ze sleziny se připravily suspenze jednotlivých buněk a mononukleární buňky se přečistily centrifugací v hustotním gradientu. Buňky se pěstovaly v koncentraci $2 \times 10^6/\text{ml}$ v destičkách pro tkáňové kultury s 96 jamkami a kulatým dnem, buňky se inkubovaly ve třech sériích pouze s médiem (Med: RPMI 1640 obsahujícím teplem inaktivované sérum z telecího plodu (10%); L-glutaminem (2 mM), 2-merkaptioethanolem (5 mM); HEPES pufrem (15 mM); penicilinem (100 U/ml); a streptomycinem (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$); všechny komponenty z GIBCO/BRL) se 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vaječného albuminu (OA) nebo v kombinaci s forbolem 12,13-dibutyratem (10 nM) a ionomycinem (0,5 μM) (PI) po dobu 48 hodin. Buněčná proliferace se měřila podle množství buněk s inkorporovaným (^3H)-thymidinem. Supernatanty neobsahující buňky se sklídily a uchovaly při -20°C až do měření metodou ELISA.

Množství cytokinů vyloučených do supernatantů kultur mononukleových buněk se stanovilo metodou ELISA. V principu, destičky s 96 jamkami (Immulon) se pokryly přes noc (4°C) primární anti-cytokinovou protilátkou (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Přečistěné krysí protilátky proti myšímu IL-4, IL-5 a $\text{IFN-}\gamma$ se získaly od firmy Pharmigen (San Diego, CA). Destičky se pak třikrát promyly roztokem PBS/Tween 20 (Fischer) a přes noc se blokovaly roztokem PBS/10%FCS. Po promytí se přidalo do jamek 100 μl vzorků supernatantu z buněčné kultury. Připravila se řada ředěných standartů s ředícím faktorem 0,33. Po inkubaci přes noc při 4°C se destičky promyly a přidala se anti-cytokinová protilátka konjugovaná s biotinem (Pharmigen) v množství 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Destičky se inkubovaly přes noc a následně se 6 krát promyly, přidal se avidin-peroxidázový komplex (Sigma St. Louis, MO) a substrát a proběhla inkubace při laboratorní teplotě. Došlo k vývoji zeleného zbarvení, které se vyhodnotilo spektrofotometricky (Biorad 2550, Japonsko) při vlnové délce 410 nm. Množství cytokinů se vyhodnotilo za použití standardní křivky pro každou destičku. Limity detekce byly 5 pg/ml pro IL-4 a IL-5 a

3 pg/ml pro IFN- γ . Jako standardy byly použity rekombinantní myši IL-4 (Pharmigen), IL-5 (Pharmigen) a rekombinantní myši IFN- γ (Gentech, San Francisco, CA).

Pro stanovení hladiny protilátek se ELISA destičky (Dynatech, Chantilly, VA) pokryly OA (20 μ g/ml (NaHCO₃ pufr, pH 9,6)) nebo polyklonální kozí protilátkou proti myším IgE, 3 μ g/ml (The Binding Site Ltd., San Diego, CA) a inkubovaly se přes noc při 4°C. Destičky se zablokovaly 0,2% želatinovým pufr (pH 8,2) 2 hodiny při 37°C. Standardy obsahující OA-specifický IgE a IgG byly vyrobeny v současné laboratoři vynálezce za použití metody popsané v Oshiba a kol., 1996, *J.Clin. Invest.* 97:1398-1408, práce uvedené v citacích. Data z měření ELISA byla analyzována za použití softwarového programu Microplate Manager pro Macintosh (Bio-Rad Labs, Richmond, VA).

Údaje uvedené u všech obrázků jsou vyjádřeny ve tvaru průměrné hodnoty $\pm$ SEM. Ke stanovení významné odchylky mezi skupinami byla použita neparametrická analýza odchylky (metoda Kruskal-Wallis). Pokud byly zjištěny významné odchylky, k analýze rozdílů mezi jednotlivými skupinami se použil Mann-Whitney U test. V případě několikanásobného srovnání se použila Benferroniho korekce. Za významnou byla považována hodnota $p < 0,05$. Pro stanovení korelace mezi odchylkami se použila regresní analýza. Data se analyzovala za použití standardního statistického bloku MINITAB (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Obrázek 1 ukazuje, že imunizace senzitivované myši mykobakteriálním HSP-65 významně zvyšuje proliferativní odpověď slezinných buněk v kulturách obsahujících pouze médium nebo OA ($p < 0,05$; $n=6$). U myši po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 byla zvýšena nespecifická i pro vaječný albumin specifická proliferativní odpověď. Zvýšen byl též IL-4, IL-5 a IFN- γ , stejně jako byly u supernatantů kultury myši po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 zvýšeny hladiny imunoglobulinu, ale nikoli u kultur z myši po aplikaci PBS (data nejsou uvedena). Tato data závěrem ukazují, že po senzitivaci OA se u myši po imunizaci mykobakteriálním HSP-65, ne však samotným PBS, stimuloval imunitní proces závislý na OA.

Příklad 2

Následující příklad ukazuje, že mykobakteriální protein tepelného šoku protein-65 (HSP-65) zvyšuje proliferativní odpověď T buněk u myšního modelu alergické senzitivace po suboptimální senzitivaci vaječným albuminem ve formě aerosolu.

Vzhledem k tomu, že imunizace myši mykobakteriálním HSP-65 zesilovala odpověď T buněk na OA po i.p. senzitivizaci myši (příklad 1), vyvstala otázka, zda za podmínek, kdy antigen specifická odpověď T buněk není detekována, (to znamená za suboptimální senzitivizace vaječným albuminem) by mykobakteriální HSP-65 zesiloval odpověď. Následující příklad byl navíc navržen za účelem otestování délky léčby, po které by mykobakteriální HSP-65 poškodil reakci buněk dýchacích cest (buňky broncho alveolární laváže (BAL) a reakci dýchacích cest na stimulaci methacholinem).

Myši byly vystaveny OA aerosolu (1%) 1., 2., 3., a 6. den (suboptimální protokol) a injekčně se jim aplikovalo 1. a 6. den 100 μ g mykobakteriálního HSP-65 nebo PBS, i.v.. Je třeba si povšimnout, že je třeba imunizace a současně následné stimulace antigenem (OA) pro projevení reakce u myši v optimálním protokolu pro myší model. 7. den se měřila odpověď na methacholin (Mch), analyzovala se broncho alveolární laváž (BAL) vzorků na obsah buněk a odstranila se slezina a peribronchiální lymfatické uzliny (PBLN) pro studium proliferativních odpovědí.

Bronchiální reakce se měřily jako změny ve funkci dýchacích cest po stimulaci methacholinem ve formě aerosolu přes dýchací cesty za použití modifikovaných metod dříve popsanych pro krysy a myši (viz Haczku a kol., 1995, *Immunology* 85: 598-603; a Martin a kol., 1988, *J. Appl. Physiol.* 64:2318-2323; obě publikace jsou uvedeny v odkazech). Krátce, myši byly uvedeny do anestezie intraperitoneální injekcí pentobarbitalu sodného (70 až 90 mg/kg). 18 G trubice z nerez oceli se zavedla jako tracheostomická kanyla a procházela otvorem v komůrce z plexiskla s myší. Ke tracheostomické trubici byl připojen čtyřcestný konektor s dvěma otvory spojenými s vdechovými a výdechovými přírady na ventilátoru (model 683, Harvard Apparatus, South Natwick, MA). Ventilace bylo dosaženo při 160 vdeších za minutu a vstupním objemem 0,15 ml s pozitivním výdechovým tlakem na konci 2-4 cm H₂O. Komůrka z plexiskla byla spojena s 1,0 litrovou skleněnou nádobou naplněnou měděnou gázou kvůli stabilizaci tlakového signálu pro tepelný proud.

Transpulmonární tlak byl odhadnut jako P_{AO} vzhledem k tlaku s pletysmografickým použitím diferenciálního tlakového snímače (Model Validine MP-45-1-871, Validyne Engineering Corp., Northridge, CA). Změny v objemu plic byly měřeny detekcí změn tlaku v pletysmografické komůrce vzhledem k tlaku v referenčním boxu za použití dalšího diferenciálního tlakového snímače. Tyto dva snímače a amplifikátory byly elektronicky zřazovány na méně než 5 stupňů od 1 do 30 Hz a pak převedeny z

analogu na digitální signál za použití 16 bitového analogu na digitální desku Model NB-MIO-16X-18 (National Instruments Corp., Austin, TX) při 600 bitech za sekundu na kanál. Digitalizované signály byly uloženy do počítače Macintosh Quadra 800 (Model M1206, Apple Computer, Inc., Cupertino, CA) a analyzovány za použití počítačového programu reálného času LabVIEW (National Instruments Corp., Austin, TX). Ventilace byla hodnocena podle odlišnosti objemového signálu a průběh se spočetl jako změna objemu podělená změnou tlaku v bodech nulového průtoku pro nádechovou a výdechovou fázi. Průměrný průběh se spočetl jako aritmetický průměr nádechového a výdechového průběhu pro každý dech. Počítačový program LabView používal tlak, průtok, objem a průměrný průběh pro průběžný výpočet plicního odporu (R_L) a dynamického průběhu (C_{dyn}) podle metody Amdur a kol. (strana 364-368, 1958, Am. J. Physiol., sv. 192). Průběh ventilace podle výsledků ventilace pro R_L , průběh, vodivost a specifický průběh byly uspořádány do tabulky a uváděné objemy jsou průměrem alespoň 10-20 dechů na pík jako odpovědi na každou dávku. Je třeba si uvědomit, že měření objemu R_L u myši se může použít k diagnóze obtížnosti plicní ventilace, podobně jako měření FEV_1 a/nebo poměr FEV_1/FVC u člověka.

Aerosolizované látky pro bronchokonstrikci byly aplikovány pomocí připojené trubice přes ultrasonický rozprašovač umístěný mezi expirační otvor ventilátoru a trubice připojené přes ultrasonický rozprašovač umístěný mezi expirační otvor ventilátoru a čtyřcestný konektor. Aerosolizované látky byly aplikovány po dobu 10 sekund se vstupním objemem 0,5 ml. Po dávce inhalovaného PBS byly následně použity objemy R_L jako základní linie. Po 3 minutách aplikace fyziologického roztoku se inhalací aplikovaly zvýšené koncentrace methacholinu (10 dechů) s počáteční koncentrací 0,4 mg/ml. Zvýšené koncentrace se aplikovaly v 5-7 minutových intervalech. Hyperinflace dvojnásobku vstupního objemu se použily mezi každou koncentrací methacholinu a provedlo se manuální zablokování průtoku vzduchu ven z ventilátoru z důvodu napravení jakéhokoli zbytkového zúžení a zajistit konstantní objem před aktivací. Od 20 sekund do tří minut se po každé aktivaci aerosolem kontinuálně shromažďovala data R_L a C_{dyn} a maximální objemy R_L a C_{dyn} vyjadřovaly změny ve funkci dýchacích cest u myši.

Po měření funkčních parametrů plic byla provedena laváž plic 1 ml alikvoty 0,9% (hmot./obj.) sterilního NaCl (laboratorní teplota) polyethylenovou stříkačkou připojenou ke tracheální kanyli. Lavážní tekutina se zcentrifugovala ($500 \times g$ po dobu 10 minut při

4°C) a buněčný pelet se opět suspendoval v 0,5 ml média RPMI pro tkáňové kultury. Supernatant zbavený buněk z každého BAL vzorku se uchovával při -20°C před následnou cytokinovou analýzou pomocí metody ELISA (popsaná v příkladu 1).

PBLN a slezinné buňky se analyzovaly měřením na proliferaci, jak je popsána v příkladu 1. Obrázek 2 ukazuje, že léčba mykobakteriálním HSP-65, dokonce po suboptimální senzitivizaci pomocí OA, významně zvyšuje proliferační odpověď T buněk na OA v buňkách sleziny (Obrázek 2A) i buňkách peribronchiálních lymfatických uzlin (PBLN) (Obrázek 2B) a zejména v buňkách od lokálního odtoku PBLN ($p < 0,05$; ANOVA). V BAL nebyly nalezeny žádné buněčné změny, ačkoli došlo ke zvýšení plicního odporu (R_L) na methacholin ve skupině, které byl aplikován mykobakteriální HSP-65 (data neuvedena).

Tyto údaje ukazují, že mykobakteriální HSP-65 zvyšují antigen specifickou imunitní odpověď, dokonce po suboptimální senzitivizaci pomocí OA. Mykobakteriální HSP-65 má dále také vliv na odezvu dýchacích cest na methacholin, pokud je aplikován 24 hodin před funkčním měření plic.

Příklad 3

Následující příklad ukazuje, že mykobakteriální protein tepelného šoku-65 (HSP-65) zvyšuje proliferativní odpověď T buněk u myšího modelu přecitlivělosti dýchacích cest po optimální senzitivizaci a aktivaci vaječným albuminem v kamenci.

U myšího modelu přecitlivělosti dýchacích cest a alergické senzitivizaci, jak se zde užívá, bylo ustanoveno, že systemická senzitivizace a lokální aktivace dýchacích cest způsobí přecitlivělost dýchacích cest (AHR) spojenou s eozinofilovým zánětem dýchacích cest, základního příznaku astmatu u člověka (viz například Bentley a kol., 1992, *Am.Rev.Respir.Dis.* 146:500-506; Houston a kol., 1953, *Thorax* 8: 207-213; nebo Dunhill, 1960, *J.Clin. Pathol.* 13:27-33; tyto publikace jsou zahrnuty v odkazech). Za účelem zjištění účinků léčby mykobakteriálním HSP-65 těchto patologických změn dýchacích cest byly myši senzitivizovány intraperitoneálně 20 μ g OA (Grade V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) spolu s 20 mg kamence ($Al(OH)_3$) (Inject Alum; Pierce, Rockford, IL) ve 100 μ l PBS (fyziologický roztok pufovaný fosfátovým puforem) nebo samotným PBS, 1. a 14. den. Myši byly následně aktivovány aerosolovým OA po dobu 20 minut s 1% roztokem OA/PBS 24., 25. a 26. den. Myši se pak utratily a po 48

hodinách se zjišťovalo, zda se objeví pík eozinofilové infiltrace a odezva dýchacích cest.

Mononukleové buňky sleziny z myši senzitivizované a aktivované OA se přečistily, převedly do kultury a měřila se proliferační odezva na OA jak je popsáno v příkladu 1. Obrázek 3 ukazuje, že mononukleové buňky myši senzitivizované a aktivované OA (imunizovány pouze PBS) vykazují významnou proliferativní odezvu na OA (viz. obr. 3, skupina PBS). Dále, proliferace mononukleových buněk po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 myši senzitivizované a aktivované OA (viz. obr. 3, skupina HSP) byla výrazně zvýšena za přítomnosti OA, stejně jako v samotném médiu.

Tyto výsledky ukazují, že mononukleové buňky myši po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 jsou aktivovány *in vivo* a prokážou antigen-specifickou a nespecifickou proliferaci *in vitro*.

Příklad 4

Následující příklad dokazuje, že mykobakteriální HSP-65 zvyšuje tvorbu cytokinů spojených s Th-1 a protilátkových izotypů a snižuje tvorbu cytokinů spojených s Th-2 u myšího modelu přecitlivělosti dýchacích cest po předchozí senzitivizaci a aktivaci vaječným albuminem v kamenci.

Alergické astma je charakteristické vysokou hladinou IgE, eozinofilovým zánětem dýchacích cest a přecitlivělostí dýchacích cest. T buňky hrají základní roli u tohoto onemocnění, poněvadž po rozeznání alergenu jsou schopné tvorby velkého množství podskupin cytokinů, souhrnně známých podle dosavadního stavu techniky jako cytokiny Th-2. Mezi cytokiny Th-2 má významnou roli IL-4 v aktivaci tvorby IgE a IL-5 je důležitý v rozvoji tkáňové eozinofilie. Zatímco tvorba cytokinů typu Th-1 by normálně vedla k aktivaci T buněk, syntéza cytokinů Th-2 vyžaduje specifické podmínky, jejichž podstata a význam jsou neznámy. Bez omezení teorií vynálezci předpokládají, že alergický zánět může odrážet patologickou nevyváženost mezi tvorbou cytokinů Th2 a Th1, a že tato odezva na společné vnější antigeny je pravděpodobně způsobena nedostatečností regulačních mechanismů, které normálně fungují tak, že jejich tvorbu potlačují. Popsaný myší model přecitlivělosti dýchacích cest představuje ideální systém, v kterém je možné zjistit, zda aplikace proteinu tepelného šoku může zmírnit přednostní imunitní odpověď typu Th2 zjištěnou u tohoto modelu.

Slezinné mononukleové buňky myši po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 a PBS, jak je popsáno v příkladu 3, se kultivovaly 48 hodin. Supernatanty kultury se odstranily a analyzovaly na tvorbu cytokinů pomocí metody ELISA, jak je popsáno v příkladu 1. Obrázek 4 ukazuje, že buňky sleziny u myši po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 tvořily významně zvýšené množství IFN- γ (Obrázek 4A) v kulturách stimulovaných roztokem forbolester/ionomycin (PI), ale nikoli v kulturách stimulovaných OA, ve srovnání s buňkami myši po aplikaci PBS ($P < 0,05$; $n=6$). Zatímco tvorba IL-4 (obrázek 4B) a IL-5 (obrázek 4C) u kultur stimulovaných PI i OA byla snížena u slezinných buněk izolovaných z myši po aplikaci HSP-65 ve srovnání s myši po aplikaci PBS, předpokládá se, že léčba mykobakteriálním HSP-65 může mít zmírňující účinek na tvorbu cytokinů T-buňkami *in vitro*.

Za účelem stanovení tvorby imunoglobulinu se mononukleové buňky sleziny, které byly izolovány z myši s aplikací popsanou v příkladu 3, inkubovaly 14 dnů v přítomnosti různých koncentrací OA, jak je uvedeno na ose X na obrázku 5. Supernatanty se odebraly a analyzovalo se množství OA specifického imunoglobulinu ELISA metodou popsanou v příkladu 1. Obrázek 5 ukazuje, že tvorba OA specifického IgG2a (obrázek 5) buňkami myši po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 se významně zvýšila ve srovnání s buňkami myši po aplikaci PBS ($p < 0,05$; $n=6$). Tvorba OA specifického IgG1 *in vitro* (obrázek 5B) a IgE (obrázek 5C) u myši po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 se jeví mírně snížená ve srovnání s myši po aplikaci PBS, ačkoli z těchto výsledků nelze učinit závěr.

Tyto výsledky ukazují, že imunizace myši mykobakteriálním HSP-65 snižuje funkci T a B buněk a dále to, že mykobakteriální HSP-65 může měnit zánětlivou imunitní odpověď Th2 na imunitní odpověď typu Th1.

Příklad 5

Následující příklad ukazuje, že mykobakteriální HSP-65 odstraňuje eozinofilový zánět dýchacích cest vyvolaný senzitivací a aktivací vaječným albuminem u myšního modelu přecitlivělosti dýchacích cest.

Alergická senzitivace dýchacích cest je spojena s rozsáhlým zánětem s převládajícími eozinofily. Za účelem stanovení účinků mykobakteriálního HSP-65 na eozinofilový zánět dýchacích cest po alergické senzitivaci, se u každé skupiny myši po aplikaci jak je popsáno v příkladu 3, změřil buněčný obsah v BAL. Broncho alveolární

laváž se prováděla 48 hodin po poslední aktivaci OA ve formě aerosolu, jak je popsáno výše v příkladu 2. Buňky BAL se resuspendovaly v RPMI a spočítaly pomocí hemocytometru. Diferenciální počet buněk se získal podle cytospinového postupu podle popisu (viz. Haczku a kol., *supra*). Buňky byly rozpoznávány jako makrofágy, eozinofily, neutrofily a lymfocyty podle standardní morfologie a počítalo se alespoň 300 buněk při zvětšení 400 $\times$. Následně se spočítala procenta a absolutní čísla pro každý buněčný typ.

Obr. 6 ukazuje, že u myši senzitizedované a vystavené OA a po aplikaci PBS (normální kontrola pro přecitlivělost dýchacích cest) se rozvinul výrazný zánět dýchacích cest (černé sloupce; $n=8$). Přibližně 60% všech buněk v BAL byly eozinofily, ale počty neutrofilů byly též významně zvýšeny. Myš, která byla po dobu 3 dnů vystavena pouze aerosolu OA (bílé sloupce; $n=8$), neměla žádné eozinofily ve vzorcích BAL. U zvířat po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 nebyla překvapivě detekována žádná eozinofilie (šrafovaný sloupec; $n=8$) a počet buněk u této myši byl v podstatě shodný s kontrolou u myši vystavené pouze OA. Rozdíl v počtu buněk v BAL mezi zvířaty po aplikaci PBS a mykobakteriálního HSP-65 byl významný jak v počtu eozinofilů ($P<0,001$), tak neutrofilů ($p<0,001$).

Tyto výsledky ukazují, že mykobakteriální HSP-65 odstraňuje eozinofilový zánět dýchacích cest po senzitzaci a aktivaci OA.

Příklad 6

Následující příklad ukazuje, že mykobakteriální HSP-65 odstraňuje přecitlivělost dýchacích cest na methacholin po senzitzaci a aktivaci myši vaječným albuminem u myšího modelu přecitlivělosti dýchacích cest.

V tomto příkladě byla bronchiální odpověď měřena změnou funkce dýchacích cest po aktivaci methacholinem ve formě aerosolu přes dýchací cesty. Myši, které byly aktivovány mykobakteriálním HSP-65 nebo PBS, jak je popsáno v příkladu 3, byly po konečné aktivaci antigenem pod anestézií 48 hodin, připojeny ke kanyle a pod ventilací, jak je popsáno v příkladu 2. Myši, s kterou dosud nebyl podniknut žádný pokus, byla aplikována látka rozprášením během tří dnů 48 hodin před měřením. Měřil se transrespirační tlak objemu plic a průtok a kontinuálně se měřil plicní odpor R_L , jak je též popsáno v příkladu 2.

Obr. 7 ukazuje, že myš, která byla senzitivována a aktivována OA, a které byl aplikován PBS i.p. (normální kontrola pro přecitlivělost dýchacích cest), vykazuje významné zvýšení odporu plic (R_L) při odezvě na methacholinovou aktivaci (trojúhelníky) ve srovnání s myši, s kterou dosud nebyl podniknut žádný pokus (kroužky). Myši, které byly senzitivovány a aktivovány OA, a kterým byl aplikován mykobakteriální HSP-65, vykazovaly normální odezvu na methacholin (čtverce) (to znamená téměř identickou jako u myši, která nebyla dosud testována) a významně nižší než u myši po aplikaci PBS ($p < 0,001$), dokazující, že aplikace mykobakteriálního HSP-65 odstraňuje přecitlivělost dýchacích cest u myši senzitivované a vystavené OA.

V souhrnu, v pokusech popsanych výše byla studována OA specifická imunitní odpověď u kultury mononukleových buněk *in vitro* senzitivovaných myši, kterým byl aplikován mykobakteriální HSP-65. Přecitlivělost dýchacích cest byla *in vivo* měřena studiem plicního odporu na methacholin (MCh). Byl též hodnocen zánět dýchacích cest a eozinofilie plicní tkáně. U myši po aplikaci mykobakteriálního HSP-65 byla významně zvýšena OA specifická proliferace T buněk a supernatanty z buněčných kultur sleziny obsahovaly významně zvýšené množství IFN- γ a IgG2a. Překvapivě, významná eozinofilie dýchacích cest a zvýšená odpověď na metacholin, která se rozvinula u OA senzitivované a aktivované myši, byla odstraněna u myši, které byl současně aplikován mykobakteriální HSP-65 *in vivo*.

Zatímco různá provedení podle vynálezu byla popsána detailně, je zřejmé, že odborníkům v tomto oboru budou zjevné modifikace a různé změny těchto provedení. Je třeba však pochopit, že tyto modifikace a změny jsou v rozsahu vynálezu, jak se uvádí v následujících nárocích.

1. Použití proteinu tepelného šoku pro výrobu léčiva pro prevenci savce před onemocněním charakteristickým eozinofilií spojenou se zánětlivým procesem.
2. Použití podle nároku 1, kde onemocnění je spojeno se zvýšenou tvorbou interleukinu-4, interleukinu-5, interleukinu-6, interleukinu-9, interleukinu-10, interleukinu-13 nebo interleukinu-15.
3. Použití podle nároku 1, kde onemocněním je alergické onemocnění dýchacích cest, syndrom hyper-eozinofilie, hlístová parazitová infekce, alergická rhinitida, alergická konjunktivitida, dermatitida, ekzém, kontaktní dermatitida nebo potravinová alergie.
4. Použití podle nároku 1, kde onemocněním je respirační onemocnění charakterizované eozinofilovým zánětem dýchacích cest a přecitlivělostí dýchacích cest.
5. Použití podle nároku 4, kde respiračním onemocněním je alergické astma, vnitřní astma, alergická bronchopulmonární aspergilóza, eozinofilová pneumonie, alergická bronchitis bronchiectasis, astma z povolání, reaktivní syndrom onemocnění dýchacích cest, vnitřní onemocnění plic, syndrom hypereozinofilie nebo parazitové onemocnění plic.
6. Použití podle nároku 1, kde onemocnění je spojeno se citlivostí na alergen.
7. Použití podle nároku 1, kde onemocněním je alergické astma.
8. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku je ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-60, ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-70, ze

skupiny proteinů tepelného šoku HSP-90 nebo ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-27.

9. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku je ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-60, ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-70 nebo skupiny proteinů tepelného šoku HSP-27.
10. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku je ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-90 nebo ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-27.
11. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku je bakteriální protein tepelného šoku nebo savčí protein tepelného šoku.
12. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku je mykobakteriální protein tepelného šoku.
13. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku je mykobakteriální protein tepelného šoku-65.
14. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku je v aplikační formě vybrané ze skupiny obsahující orální, nasální, lokální, inhalační, transdermální, rektální, parenterální aplikační formu.
15. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku je v inhalační nebo nasální aplikační formě.
16. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku zmírňuje eozinofilii u savce.
17. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku snižuje počet eozinofilů v krvi savce na hodnoty 0 až 300 buněk/mm³.

18. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku snižuje počet eozinofilů v krvi u savce na hodnoty 0 až 100 buněk/mm³.
19. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku snižuje počet eozinofilů v krvi u savce na hodnoty 0 až 3% celkového počtu bílých krvinek u savce.
20. Použití nároku podle 1, kde protein tepelného šoku aktivuje tvorbu interferonu- γ T lymfocyty u savce.
21. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku potlačuje tvorbu interleukinu-4 a interleukinu-5 pomocí T lymfocytů u savce.
22. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku snižuje odpověď dýchacích cest na methacholin u savce.
23. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku redukuje omezení dýchacích cest u savce tak, že hodnota poměru FEV₁/FVC u savce je alespoň 80 %.
24. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku zvyšuje hodnotu FEV₁ o přibližně 5% až 100% předpokládané hodnoty FEV₁ u savce.
25. Použití podle nároku 1, kde protein tepelného šoku snižuje omezení ventilace u savce tak, že hodnota R_L u savce se sníží o alespoň 20 %.
26. Použití podle nároku 1, kde množství proteinu tepelného šoku je 0,1 až 10 mg na kg tělesné hmotnosti savce.
27. Použití podle nároku 1, kde množství proteinu tepelného šoku je 1 μ g až 1 mg na kg tělesné hmotnosti savce.

28. Použití podle nároku 1, kde množství proteinu tepelného šoku je 0,1 mg až 5 mg na kg tělesné hmotnosti savce, přičemž aplikační forma proteinu tepelného šoku je aerosol.
29. Použití podle nároku 1, kde množství proteinu tepelného šoku je 0,1 mg až 10 mg na kg tělesné hmotnosti savce, přičemž aplikační forma proteinu tepelného šoku je parenterální aplikační forma.
30. Použití podle nároku 1, kde léčivo obsahuje protein tepelného šoku a farmaceuticky přijatelný nosič.
31. Použití podle nároku 1, kde savcem je člověk.
32. Farmaceutický přípravek pro prevenci savce před rozvojem onemocnění charakterizovaného eozinofilii spojenou se zánětlivým procesem, vyznačující se tím, že obsahuje protein tepelného šoku a protizánětlivou látku.
33. Farmaceutický přípravek podle nároku 32, vyznačující se tím, že protizánětlivá látka je vybrána ze skupiny obsahující antigen, alergen, haptén, prozánětlivé, cytokinové antagonisty, prozánětlivé cytokinové receptorové antagonisty, anti-CD23, anti-IgE, inhibitory syntézy leukotrienu, receptorové antagonisty leukotrienu, glukokortikosteroidy, steroidní chemické deriváty, anticyklooxygenázové látky, anticholinergní látky, betaadrenergní agonisty, methylxanthiny, antihistaminy, kromony, zyleuton, anti-CD4 látky, anti-IL-5 látky, povrchově aktivní látky, anti-tromboxanové látky, anti-serotoninové látky, ketotifen, cytoxin, cyklosporin, methotrexát, makrolidová antibiotika, heparin, heparin nízké molekulové hmotnosti nebo jejich směsi.
34. Farmaceutický přípravek podle nároku 32, vyznačující se tím, že formulace obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič.

35. Farmaceutický přípravek podle nároku 32, vyznačující se tím, že formulace obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič, vybraný ze skupiny biokompatibilních polymerů, jiných polymerních matric, kapslí, mikrokapslí, mikročastic, pilulkových přípravků, osmotických pump, difuzních zařízení, lipozomů, liposfér a transdermálních cílených systémů.
36. Farmaceutický přípravek podle nároku 32, vyznačující se tím, že protein tepelného šoku je protein ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-60, ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-70, ze skupiny proteinů tepelného šoku HSP-90 nebo z skupiny proteinů tepelného šoku HSP-27.
37. Farmaceutický přípravek podle nároku 32, kde protein tepelného šoku je mykobakteriální protein tepelného šoku.
38. Farmaceutický přípravek podle nároku 32, kde protein tepelného šoku je mykobakteriální protein tepelného šoku-65.
39. Použití proteinu tepelného šoku k výrobě léčiva pro prevenci savce před onemocněním charakteristickým přecitlivělostí dýchacích cest spojeným se zánětlivým procesem.
40. Použití proteinu tepelného šoku k výrobě léčiva pro ochranu savce před zánětlivým onemocněním charakteristickým imunitní odpovědí typu Th2.
41. Použití molekuly nukleové kyseliny kódující protein tepelného šoku pro výrobu léčiva pro ochranu savce před onemocněním charakteristickým eozinofilií, přecitlivělostí dýchacích cest nebo imunitní odpovědí typu Th2, které je spojeno se zánětlivým procesem.
42. Použití podle nároku 41, kde molekuly nukleové kyseliny jsou funkčně spojeny se sekvencí pro transkripční kontrolu.

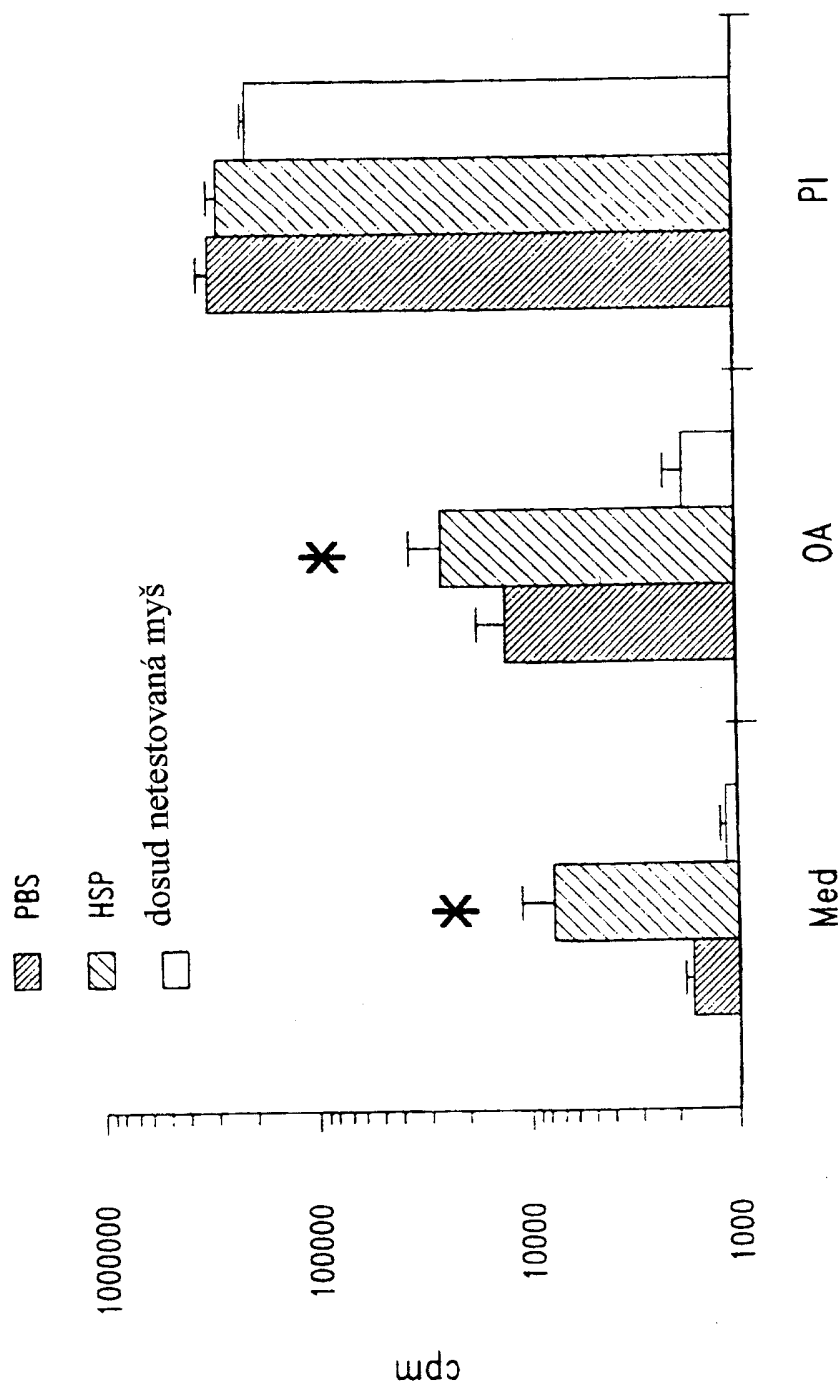
43. Použití podle nároku 41, kde léčivo obsahuje molekuly nukleové kyseliny s farmaceuticky přijatelným nosičem vybraným ze skupiny obsahující vodný fyziologicky vyvážený roztok, umělý substrát obsahující lipid, přírodní substrát obsahující lipid, olej, ester, glykol, virus, kovovou částici nebo kationovou molekulu.
44. Použití podle nároku 41, kde farmaceuticky přijatelným nosičem je lipozom, micela, buňka nebo buněčná membrána.
45. Použití podle nároku 41, kde molekula nukleové kyseliny je v aplikační formě vybrané ze intradermální injekce, intramuskulární injekce, intravenózní injekce, subkutánní injekce nebo aplikační formy *ex vivo*.
46. Způsob výběru léčby přecitlivělosti dýchacích cest nebo nedostatečnosti průchodu dýchacích cest spojené s onemocněním souvisejícím se zánětlivým procesem, vyznačující se tím, že obsahuje
- (a) použití proteinu tepelného šoku savci jako léčiva;
 - (b) měření změny funkce plic jako odezvy na stimulační látku u savce za účelem zjištění, zda protein tepelného šoku zmírňuje přecitlivělost dýchacích cest nebo omezení ventilace; a,
 - (c) výběr příslušné léčby na základě změn ve funkci plic.
47. Způsob podle nároku 46, vyznačující se tím, že onemocnění je charakterizováno eozinofilií dýchacích cest.
48. Způsob podle nároku 46, vyznačující se tím, že stimulační látka je přímým nebo nepřímým stimulem.
49. Způsob podle nároku 46, vyznačující se tím, že aktivační látkou je alergen, methacholin, histamin, leukotrien, fyziologický roztok, hyperventilace, fyzická zátěž, oxid siřičitý, adenosin, propranolol, studený vzduch, antigen, bradykinin, acetylcholin, prostaglandin, ozón, nečistoty z ovzduší nebo jejich směsi.

50. Způsob podle nároku 46, vyznačující se tím, že krok měření zahrnuje měření hodnoty FEV_1 , FEV_1/FVC , $PC_{20\text{methacholin}}FEV_1$, h po zvýšení (Penh), vodivosti, dynamického průběhu, plicního odporu (R_L), časového indexu tlaku plicní ventilace (APTI) nebo průběhu píků.

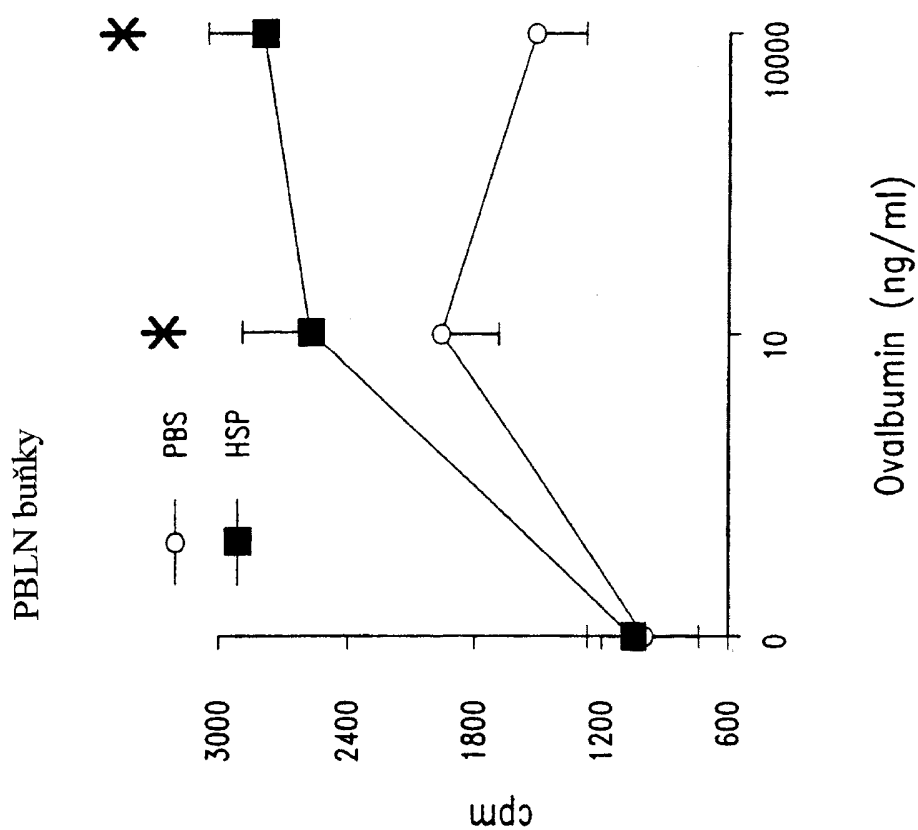
10.10.00

1/4

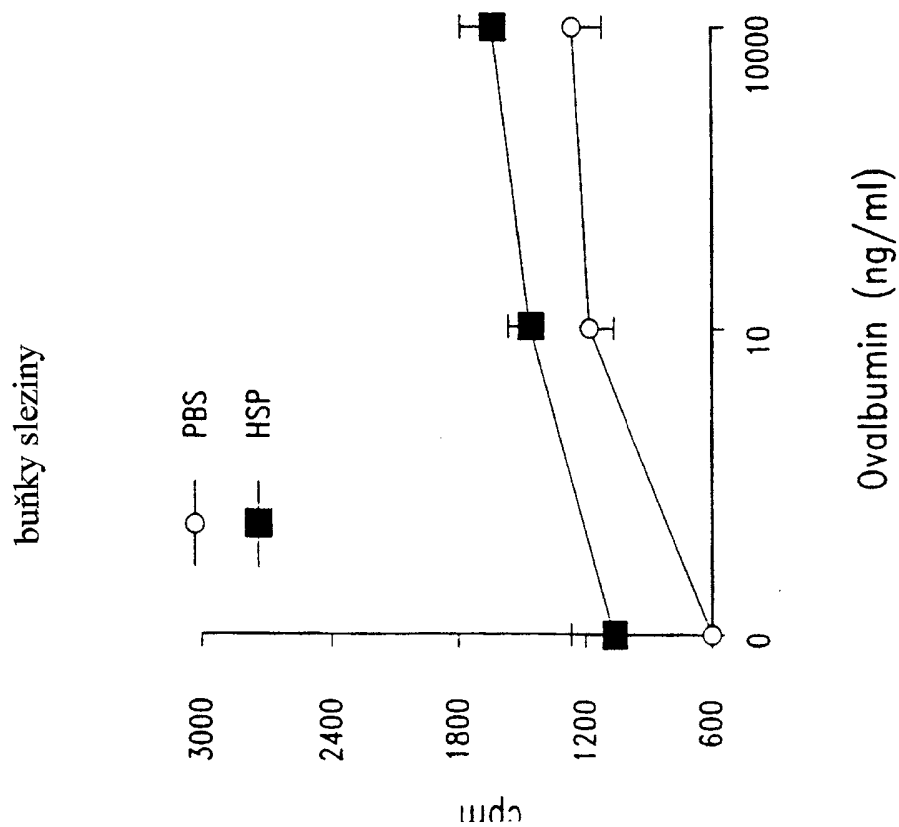
PV 2000 - 269



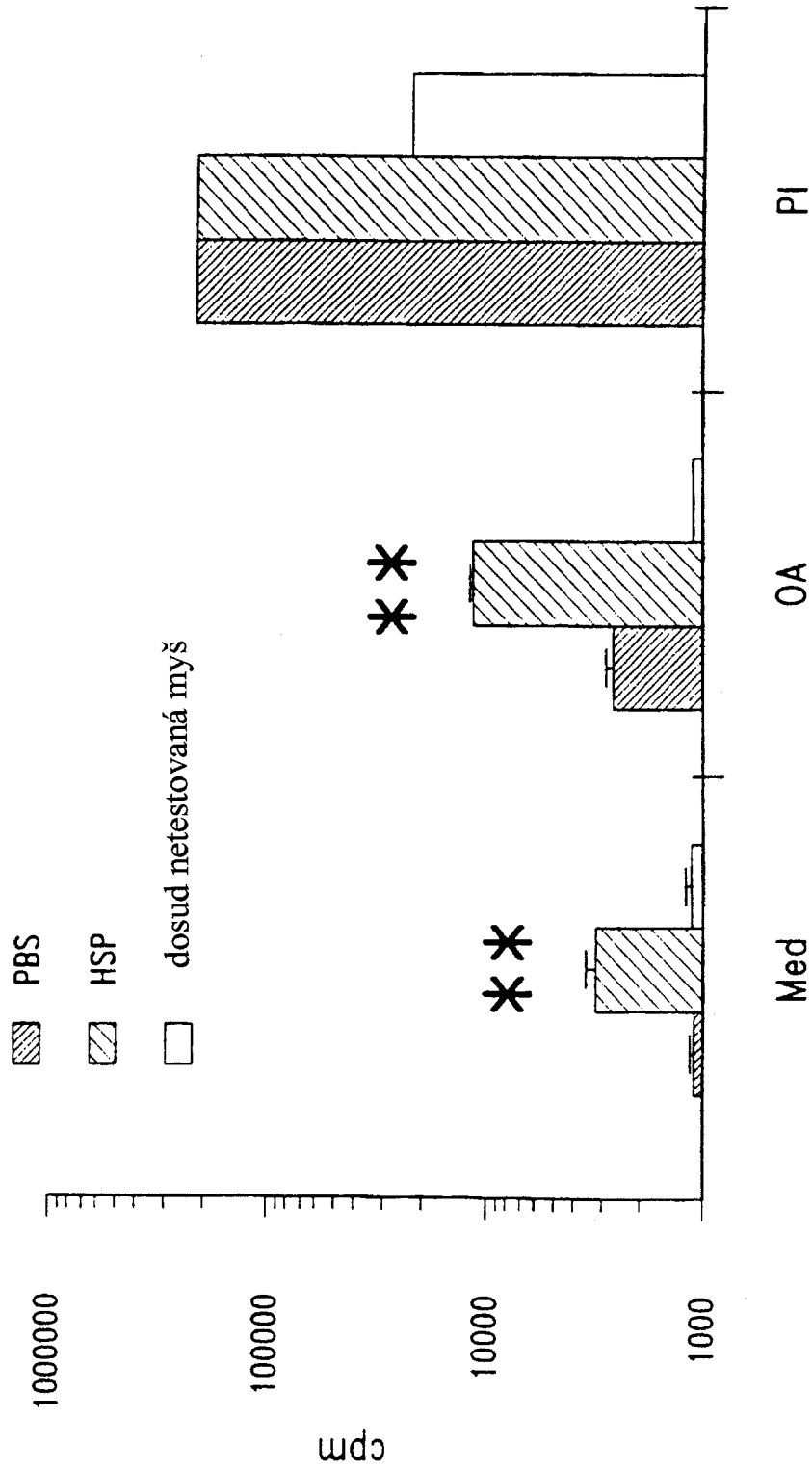
Obr. 1



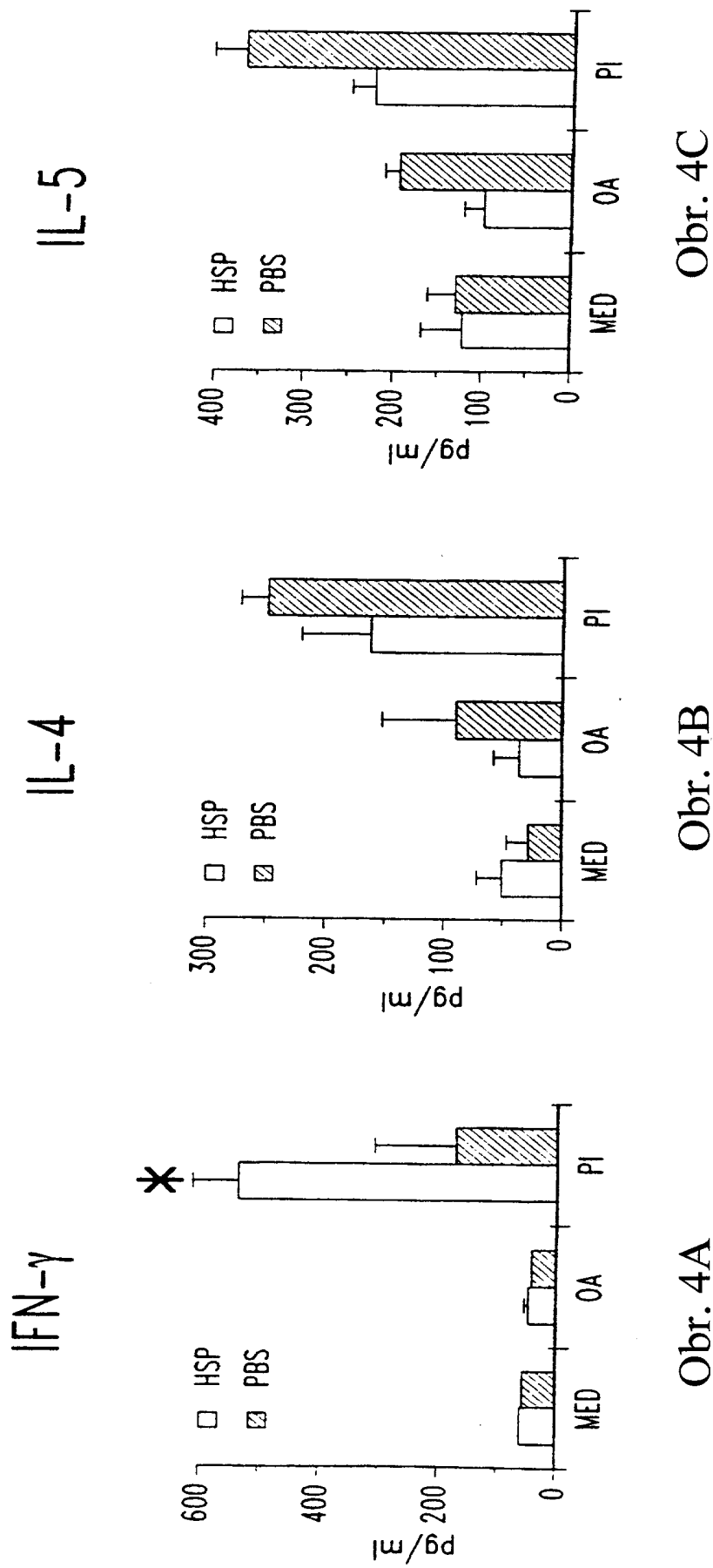
Obr. 2B



Obr. 2A



Obr. 3

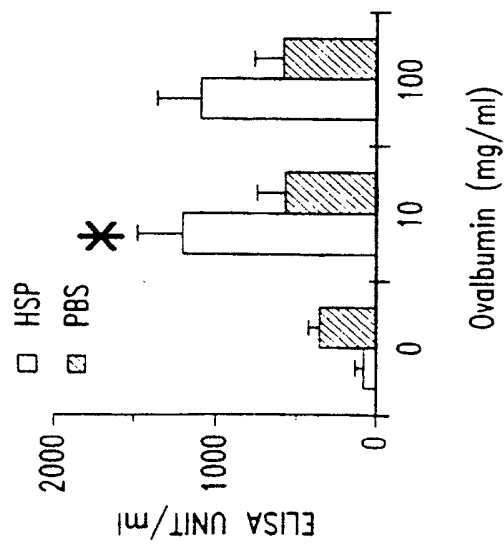


10.10.00

PV 2000 - 2119

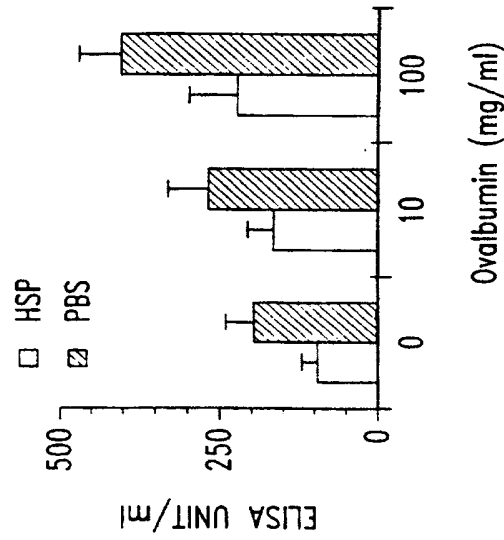
5/4

IgG2a



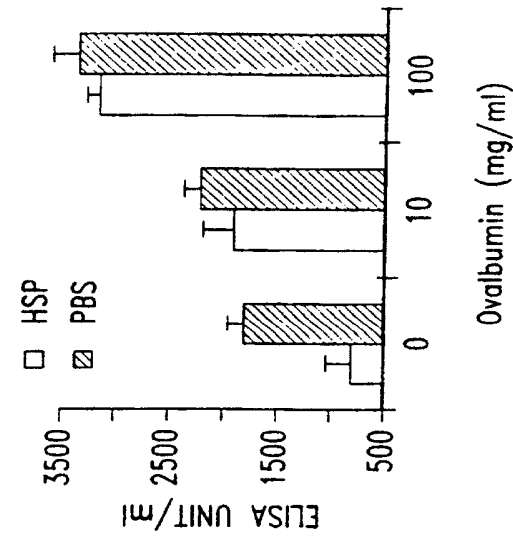
Obr. 5A

IgG1

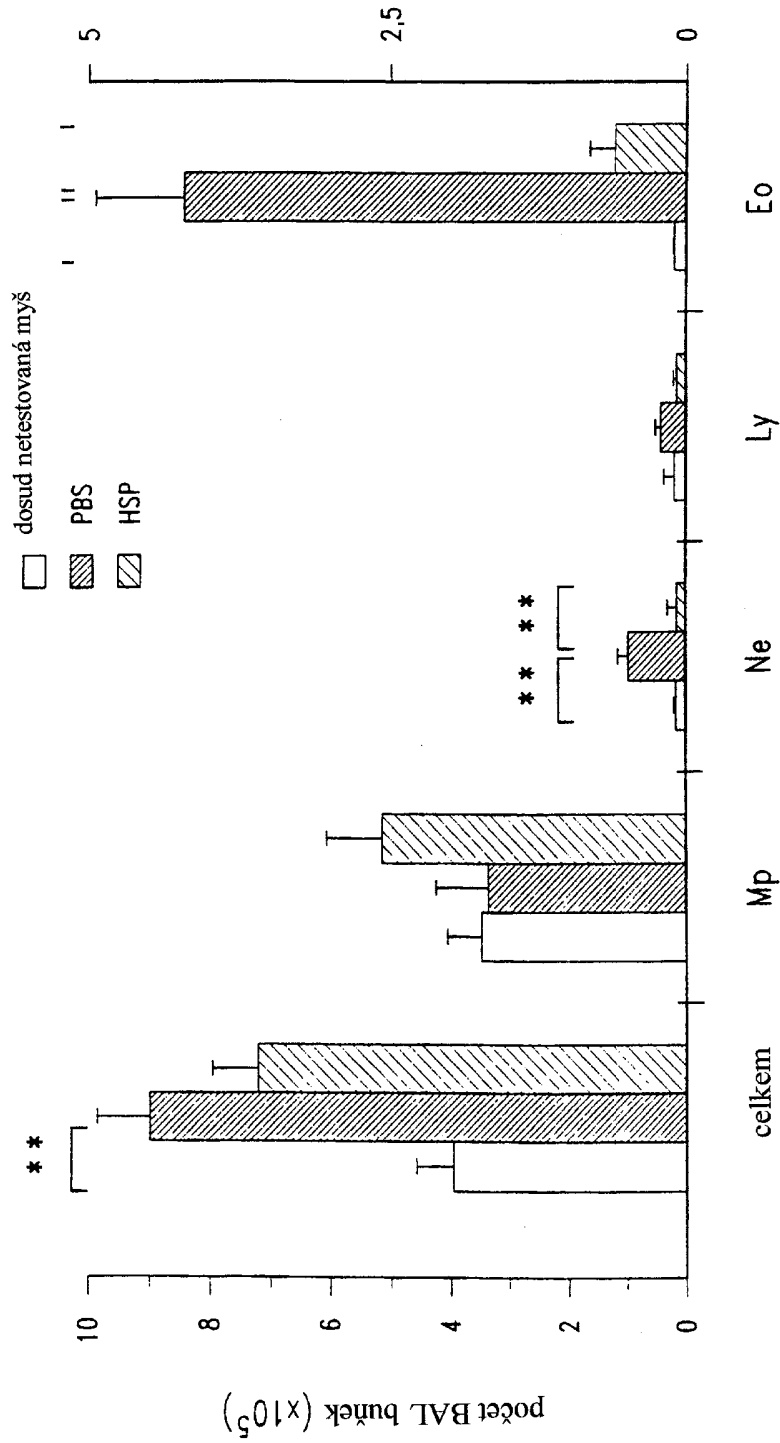


Obr. 5B

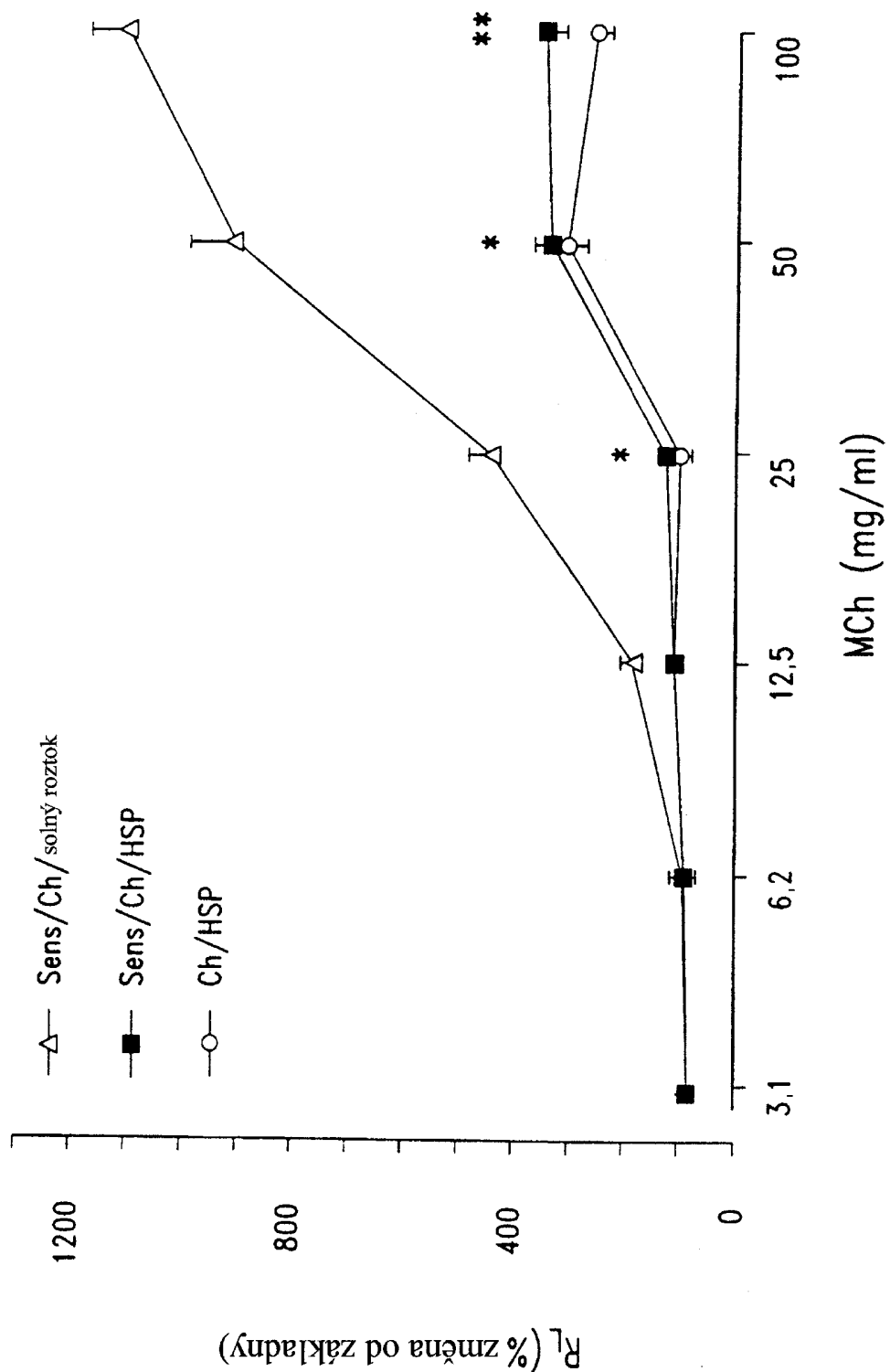
IgE



Obr. 5C



Obr. 6



Obr. 7