

P 0 1 0 3 7 7 3

⁴⁴
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



72.224/SZE

A vírussal indukált szisztémás sokk és légzési nehézség megfordítása a limfotoxin-béta útvonal blokkolásán keresztül

KIVONAT

A találmány az antivirális válasz egyedben történő indukálási eljárásait biztosítja, melyek az egyedbe az LT-B blokkoló szer hatásos mennyiségének és a gyógyszerészetileg elfogadható hordozónak a beadását foglalják magukban. Részletesebben, a jelen találmány a vírussal indukált szisztémás sokk és légzési nehézség kezelési eljárására vonatkozik.

Fel-

P 0 1 0 3 7 7 3

72.224/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A2

A vírussal indukált szisztémás sokk és légzési nehézség megfordítása a limfotoxin-béta útvonal blokkolásán keresztül

A jelen találmány tárgyát az antivirális válasz indukálási eljárásai képezik egyedekben. Részletesebben a jelen találmány a vírussal indukált szisztémás sokk és légzési nehézség kezelési eljárására vonatkozik. Az eljárás bizonyos "limfotoxin-béta blokkoló szerek" beadását foglalja magában.

Számos vírus, beleértve a Sin Nombre (SNV), Ebola, Marburg, Lassa, és Dengue vírusokat, akut betegségeket okoz, melyeknek szimptomái a következők: gyors kialakulás, láz, szisztémás sokk és légzési nehézség [Lacy és mtsai: Adv. Ped. Inf. Dis., 12, 21 (1997)]. Az ilyen fertőzések másik általános jellemzője a szisztémás megjelenés az endotheliális sejtek és makrofágok révén [Lacy és mtsai: Adv. Ped. Inf. Dis., 12, 21 (1997)]. Az SNV kivételével a felsorolt vírusokat először évtizedekkel ezelőtt azonosították. Az elmúlt időben ezek a kórokozók világszerte ismételten felütötték fejüket. Az Amerikai Egyesült államok dél-keleti részében a fehérlábú egerek növekvő populációja miatt 1998. júniusa óta az SNV 183 esetét erősítették meg, ami a hantavírus okozta tüdőszindróma kórokozója. A fertőzöttek túlélése csak 55 %-os volt [Centers for Disease Control and Prevention, MMWR, 47, 449 (1998)]. E vírusok patogenezisééről jelenleg keveset tudunk, valamint arról

sem tudunk, hogy hogyan kezeljük hatásosan a minden évben világszerte megfertőződött, vírussal indukált szisztémás sokkban és légzési nehézségben szenvedő, betegeket.

Ezért a vírussal indukált szisztémás sokkban és légzési nehézségben szenvedő egyedek kezelésre új eljárásokra mutatkozik igény.

A jelen találmány a fenti probléma megoldásához a vírussal indukált szisztémás sokkban és légzési nehézségben szenvedő egyedek részére gyógyszerészeti összetételeket és kezelési eljárásokat biztosít.

A jelen találmány eljárásai és összetételei részben arra a felfedezésre építenek, hogy bizonyos szerek, melyeket itt limfotoxin-béta (LT-B) blokkoló szerként határozunk meg, felhasználhatók a vírussal indukált szisztémás sokkban és légzési nehézségben szenvedő egyedek kezelésében. Az egyik megvalósítási formában az LT-B blokkoló szerek a limfotoxin-béta receptort (LT-B-R) blokkolják. Egy előnyben részesített megvalósítási formában az LT-B-R egy limfotoxin-B receptor ellen képzett ellenanyag vagy egy oldható limfotoxin B receptor. A legelőnyösebb megvalósítási formában az LT-B-R blokkoló szer egy olyan rekombináns LT-B-R fúziós fehérje, mely egy az LT-B-R extracelluláris ligandkötő doménjához fuzionált immunglobulin nehézlánc állandó régiót tartalmaz.

A jelen találmány megelőző és további tárgyai, jellegzetességei, nézőpontjai és előnyei, valamint maga a találmány részletei

sebben érthetővé válik az előnyben részesített megvalósítási formák következő leírásából.

Az ábrák rövid leírása:

Az 1. ábra NZB egerek LCMV 13 klónnal végzett fertőzése után a mortalitást mutatja be. Az ábrán az LCMV-13-mal fertőzött NZB egerek (n = 14) mortalitási görbét és a fertőzés után a hatodik napon az LCMV-13-mal fertőzött egerek (n = 7) különböző szöveteiben a vírustitert mutatjuk be.

A 2. ábra az NZB egerekben az LCMV-13 fertőzés hisztológiai képét mutatja be. (A) Normális tüdő képe (100X, H+E). (B) A fertőzés utáni 5. napon az intersticiális pneumonitis mononukleáris sejtbeszűrődéssel és a tüdő alveoláris falának vastagodásával (100X, H+E). (C) A lépben a limfocita kimerítés, celluláris nekrozis és a follikuláris felépítés sérülése (25X, H+E). (D) A nagyobb nagyítások a lépben a celluláris nekrozist és a kariorrhéktikus maradványokat mutatja (158, H+E). (E) A tüdőben az LCMV-13 pozitív endotheliális sejtek (nyilak) és makrofágok (fehér nyilak) (100X, IHC). (F) A lépben az LCMV-13 pozitív endotheliális sejtek (nyilak) és makrofágok (nyílfej) (50X, IHC). (G) A szívben az LCMV-13 pozitív endotheliális sejtek (100X, IHC). (H) A májban az LCMV-13 pozitív Kupffer sejtek és a szinoidális határoló sejtek (100X, IHC).

A 3. ábra az LT β R jelátviteli út blokkolásának hatását mutatja a 13-as klónnal fertőzött NZB egerek túlélésére nézve. Az ábrán a 13-as klónnal fertőzött NZB egerek mortalitási görbét mutatjuk be az itt bemutatott kezelés hatására. Az NZB egerek-

nek intravénásan beadunk $2,5 \times 10^6$ pfu Cl 13-at, majd a fertőzés utáni 1. és a 4. napon két intraperitoneális injekciót, mely endotoxin-mentes PBS-ben $250 \mu\text{g}$ TN3-19.12 ellenanyagot tartalmazott. A kontroll egereket azonos napokon (lásd S hivatkozás), azonos térfogatú, ellenanyagtól mentes PBS-sel kezeltük. Az egereket az R hivatkozásban leírtaknak megfelelően kezeltük. A háromszorosan kezelt csoportnak a fertőzés napján majd a 3. napon ip. $200 \mu\text{g}$ mennyiségben TNFR55-Ig-t és LT β R-Ig fehérjéket adunk be. A kontroll egereknek azonos napokon, azonos mennyiségben humán ellenanyagot adunk, amelyet ezen fúziós fehérjék (AY1943-29) szintézisében használtunk fel. Az LT β R-Ig-vel kezelt egereket hasonlóan kezeltük, azzal az eltéréssel, hogy TNFR55-Ig injekciót nem kaptak. Az adatokat több anti-TNF kísérlet alapján állítottuk össze: anti-TNF magában (TN3-19.12); LT β R-Ig magában, $n = 16$; háromszor kezelt csoport, $n = 10$ ($n = 10$ a háromszor kezelt csoportnál, $n = 22$ az LT β R-Ig magában adottnál, $n=10$ az LT β R-Ig + TNFR55-Ig-vel kezelt csoportnál, $n = 5$ az anti-TNF és TNFR55-Ig-vel kezelt csoportnál, $n=6$ az anti-TNF (TN3-19.12) magában adott csoportnál, és a kontrollnál $n=25$).

A 4. ábra az LT β R útvonal blokkolási eredményét mutatja be, ami a CD8 T sejtek funkciójának csökkenését hozta. A különböző kezelési csoportból származó lépsejteket a fertőzés utáni 6. napon összegyűjtöttük és az NP118 9-tagú peptidet tartalmazó L^d tetramerrel a következőkben leírtaknak megfelelően festettük. A kapott értékeknél a nem-specifikus háttérrel figyelembe vettük.

Azonos peptid hatásának vizsgálatához az interferon-gamma termelés válaszában tanulmányozásánál a sejteket 5 óráig 37 °C-on NP118 (0,1 µg/ml végkoncentráció) és IL-2 jelenlétében inkubáltuk. Az értékeket a peptid hiányában kapott háttérszint figyelembevételével számoltuk ki. A kontroll humán Ig-vel kezelt három egérből, valamint az LTβR-Ig kezelt (LT béta # 2/3) két egérből származó lépsejteket külön-külön gyűjtöttük. Az összes többi eredményt egyedi állatokból kaptuk.

Az 5. ábra azt mutatja be, hogy a CD8⁺ T-sejtek kimerítésével, de a nem-CD4⁺ T sejtek kimerítésével, az NZB egerekben az LCMV-13 fertőzés letális hatásának megfordulását érhetjük el. Az egereket az *in vivo* sejtpopulációs kimerítési eljárásoknál leírtaknak megfelelően kezeltük. A kezelt csoportot mindegyikének mortalitási görbét bemutattuk (n = 4).

A jelen találmány részletes leírását a meghatározásokkal folytatjuk.

A jelen találmány tárgykörének világosabb és tömörebb kifejtéséhez a következő meghatározásokat használjuk, amelyeket a következő leírásban és a csatolt igénypontokban szakkifejezéseként alkalmazunk.

A limfotoxin-béta (LT- béta) a TNF ligandcsaládba tartozik, ide tartoznak többek között a következő anyagok ligandjai: Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 és 4-1BB receptorok [Smith és mtsai: Cell, 76, 959-962 (1994)]. A TNF jelátvitel számos tagja, beleértve a TNF-t, LT- alfát, az LT-bétát és a Fas-t, a tumoros sejtek nekrozissal vagy apoptózissal (programozott sejthalál) bekövetkező

halálát idézheti elő. A nem-tumoros sejtben a TNF és a TNF család számos tagjának ligand-receptor kölcsönhatásai az immunrendszer fejlődését és a különböző immunológiai kihívásokra adott válaszát befolyásolhatják.

A limfotoxin-bétát (amit p33-nak is neveznek) a T-limfocitákon, a T sejtvonalakon, a B sejtvonalakon és a limfokinnel aktiválódó ölösejteken (LAK) azonosították. Az LT-béta számos ide vonatkozó szabadalom tárgyát képezi [PCT/US91/04588 (1992. január 9.) WO 92/00329; és PCT/US93/11669 (1994. június 23.) WO 94/13808, amelyeket itt hivatkozásként építettünk be].

A TNF receptorok családjába tartozó LT-béta receptor specifikusan kötődik az LT ligandok felszínéhez. Az LT-béta-R az LT heteromer komplexekhez kötődik (ez elsősorban az LT- alfa 1/béta 2 és LT- alfa 2/béta 1), de a TNF-vel vagy az LT- alfával nem alakít ki kapcsolatot [Crowe és mtsai: Science, 264, 707-710 (1994)]. Az LT-béta-R jelátvitel a perifériás limfoid szervek kifejlődésében és a humorális immunválaszban játszhat szerepet.

A humán lépben, csecsemőmirigyben és egyéb szervekben az LT-béta-R mRNS-ek kifejezési mintázata nagyon hasonlít a p55-TNF-R-hez, azzal az eltéréssel, hogy az LT-béta-R a perifériás vér T-sejtjein és sejtvonalaiban hiányzik.

Az "LT-béta -blokkoló szer" szakkifejezés azokra a szerekre vonatkozik, melyek a ligand LT-bétához történő kötődését, az LT-béta sejtfelszíni csoportosulását vagy az LT-béta jelátvitelét csökkentik, vagy amelyek az LT-béta jel sejtbeni értelmezését megfe-

előben befolyásolják. Az LT-béta blokkoló szerek közé a következők tartoznak: anti-LT-béta , oldható LT-béta-R-Fc molekulák és anti-LT-alfa , anti-LT-alfa /béta és anti-LT-béta-R ellenanyagok. Előnyösen az ellenanyagok a kiválasztott formájú LT-alfával nem adnak keresztreakciót.

Az "LT-béta-receptor blokkoló szer" szakkifejezés azokra a szerekre vonatkozik, melyek az LT-béta-R sejtfelszíni csoportosulását vagy az LT-béta-R jelátvitelt csökkentik, vagy amelyek az LT-béta-R jel sejtbeni értelmezését megfelelően befolyásolják. Az LT-béta-R blokkoló szerek példái a következők: oldható LT-béta-R-Fc molekulák és anti-LT-alfa-R ellenanyagok. Előnyösen az ellenanyagok a kiválasztott formájú LT-alfával nem adnak keresztreakciót.

Az "anti-LT-béta receptor ellenanyag" szakkifejezés bármely ellenanyagra vonatkozik, mely az LT-béta receptor legalább egy epitópjához specifikusan kötődik.

Az "anti-LT ellenanyag" szakkifejezés bármely ellenanyagra vonatkozik, mely az LT-alfa, az LT-béta vagy az LT-alfa /béta komplex legalább egy epitópjához specifikusan kötődik.

Az "LT ligand" szakkifejezés az LT heteromer komplexére vagy annak származékára vonatkozik, mely az LT-béta receptorhoz képes specifikusan kötődni.

Az "LT-béta-R jeltovábbítás" olyan molekuláris reakciókra vonatkozik, melyek az LT-béta-R úttal és az azt követő, annak eredményeként megvalósuló, molekuláris reakciókkal kapcsolatban vannak.

Az "LT-béta-R ligandkötő domén" szakkifejezés az LT-béta-R olyan részére vagy részeire vonatkozik, amelyek az LT-liganddal történő specifikus felismerésben és kölcsönhatásban részt vesznek.

Az "LT- alfa /béta heteromer komplex" és az "LT heteromer komplex" szakkifejezések olyan stabilis képződményekre vonatkoznak, melyek legalább egy LT-alfa és egy vagy több LT-béta alegység stabilis kapcsolatából állnak, beleértve egy vagy több alegység oldható, mutáns, megváltoztatott és kiméra formáit. Az alegységek kapcsolata elektrosztatikus úton, van der Waals erők révén vagy kovalens kölcsönhatásokkal biztosított. Előnyösen az LT-alfa/62 heteromer komplex legalább két egymás melletti LT-béta alegységet tartalmaz és közvetlen LT-alfa alegység nem szerepel benne. Ha a sejtnövekedést vizsgáló eljárásban az LT-alfa /béta heteromer komplex LT-béta-R aktiváló szerként szolgál, akkor a komplex előnyösen oldható és sztöchiometrikusan az LT-alfa/béta arány 1/2.

Az oldható LT-alfa/62 heteromer komplexeknek nincs membránon átnyúló doménjük és az LT-alfa és/vagy LT-béta alegységek kifejezésére kialakított megfelelő gazdasejt képes szekretálni [Crowe és mtsai: J. Immunol. Methods, 168, 79-89 (1994)].

A "felszíni LT-alfa/62 komplex" és a "felszíni LT komplex" szakkifejezések olyan komplexekre vonatkoznak, melyek az LT-alfát és a membránhoz kötött LT- béta alegységeket tartalmazzák, beleértve a sejtek felszínén megjelenő egy vagy

több mutáns, megváltoztatott és kiméra formákat. A "felszíni LT ligand" szakkifejezés olyan felszíni LT komplexre vagy annak származékára vonatkozik, amely képes specifikusan kötődni az LT-béta receptorhoz.

A "hatásos mennyiség" az előnyös vagy kívánt klinikai hatás eléréséhez elegendő. A hatásos mennyiséget egy vagy több adagban adhatjuk be. A jelen találmány szándékainak megfelelően a limfotoxin-B és annak receptorához történő kötődésének gátlásához hatásos mennyiségű szer a virális válasz gyengítésére, stabilizálására vagy késleltetésére elegendő. Részletesebben az a szer felel meg, mely a vírussal indukált szisztémás sokk vagy légzési nehézség kifejlődésének gyengítésére, stabilizálására vagy késleltetésére elegendő. A szakirodalomban jártas szakemberek számára ezek hatékonyságának kimutatása és mérése ismert.

Az "egyed" szakkifejezés gerincesek, különösen emlős fajokra vonatkozik és magában foglalja, de nem korlátozódik a háziállatokra, sport-állatokra, és főemlősökre, ide értjük az embereket is.

A "funkcionálisan egyenértékű" aminosavmaradék (i) hasonló reagáló képességgel rendelkezik mint az az aminosavmaradék, melyet a funkcionálisan egyenértékűvel kicserélnek; (ii) a találmány szerinti aminosav antagonist, ahol az aminosav hasonló tulajdonsággal rendelkezik mint az az aminosavmaradék, melyet a funkcionálisan egyenértékűvel kicserélnek; (iii) egy nem aminosav molekula, amely hasonló tulajdonsággal rendelkezik mint az

az aminosavmaradék, melyet a funkcionálisan egyenértékűvel kicserélnek.

Az első polinukleotid, mely a jelen találmány fehérje természetű antagonistáját kódolja, összehasonlítva egy második polinukleotiddal, mely az antagonista fehérjét kódolja, akkor "funkcionálisan egyenértékű", ha a következő feltételek legalább egyikének megfelel:

(a): a "funkcionálisan egyenértékű" első polinukleotid standard hibridizálási körülmények között a második polinukleotiddal hibridizál és/vagy az első polinukleotid szekvencia degenerált változata. Legelőnyösebben egy mutáns fehérjét kódol, mely az integrin antagonista-fehérje aktivitásával rendelkezik;

(b) a "funkcionálisan egyenértékű" első polinukleotid kifejeződésekor olyan aminosavszekvenciát ad, melyet a második polinukleotid kódol.

A találmány szerinti LT-B blokkoló szerek közé, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az itt felsorolt szerek, valamint ezek funkcionálisan egyenértékű formái tartoznak. Ahogy azt itt használjuk, a "funkcionálisan egyenértékű" szakkifejezés olyan LT-B blokkoló szerekre vagy az LT-B blokkoló szert kódoló polinukleotidra vonatkozik, amely a befogadónál azonos vagy jobb hatást fejt ki mint a funkcionálisan egyenértékűnek vélt LT-B blokkoló szer. A szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a funkcionálisan egyenértékű fehérje rekombináns technikákkal is előállítható, például a "funkcionálisan egyenértékű DNS" kifejezésével. Ennek megfelelően a jelen talál-

mány a természetben előforduló DNS-ek, valamint a nem-természetben előforduló, de a természetben előforduló DNS-sel megegyező fehérjét kódoló, DNS által kódolt LT-B blokkoló szereket felöleli. A kódoló szekvencia degeneráltsága miatt az LT-B blokkoló ágenst kódoló más polinukleotid is felhasználható. Ez a fenti szekvencia a különböző kodonok helyettesítésével megváltoztatott teljes egészét vagy részeit úgy foglalja magában, hogy a szekvencia ennek ellenére azonos aminosavakból épül fel, és így csak csendes változásokat eredményez. Az így megváltoztatott szekvenciákat e szekvenciák egyenértékű formáinak tekintjük. Például a következő aminosavakat két kodon is meghatározza: a Phe (F)-t a TTC vagy a TTT, a Tyr (Y)-t a TAC vagy a TAT és a His (H)-t a CAC vagy a CAT. Másrészt a Trp (W)-t csak egy kodon határozza meg, a TGG. Ennek megfelelően a szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy egy szóban forgó integrin kódoló adott DNS szekvenciát számos degenerált DNS szekvencia meghatározhat, melyek így a szóban forgó integrin kódolják. Ezek a degenerált DNS szekvenciák a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak.

A "fúzió" vagy a "fúziós fehérje" szakkifejezések két vagy több kovalensen kapcsolt fehérje vagy annak fragmenseinek egyedi peptidvázain keresztül megvalósuló lineáris kapcsolatát jelenti, amelyet legelőnyösebben e fehérjéket kódoló polinukleotid genetikai kifejezésével kaphatunk meg. Előnyös, ha a fehérje vagy annak fragmensei különböző forrásból származnak, ennek megfelelően az ilyen fúziós fehérjét "kiméra" molekulának

nevezzük. Így az előnyben részesített kiméra fehérjék közé azok tartoznak, melyeknél az LT-B blokkoló ágens vagy annak fragmense kovalensen egy második egységhez kapcsolt, mely nem egy LT-B blokkoló szer. A találmány előnyben részesített fúziós fehérjéi közé azok a sértetlen ellenanyagok tartozhatnak, melyek antigénkötő specifitásukat megtartják, például ilyenek az Fab fragmensek, az Fab' fragmensek, az F(ab')₂ fragmensek, a nehézlánc monomerek vagy dimerek, a könnyűlánc monomerek vagy dimerek és hasonlók.

A legelőnyösebb fúziós fehérjék kiméra jellegűek, és az LT-B blokkoló szer csoportja az immunglobulin könnyűlánc, nehézlánc vagy mindkettő kapocs és állandó régióihoz fuzionált vagy másképpen kapcsolt. Így a találmány ezen jellemvonása a következőket foglalja magában: (1) egy LT-B blokkoló szer csoportot, (2) egy második peptidet, ami például az LT-B blokkoló szer csoportjának oldhatóságát vagy *in vivo* életidejét megnöveli, például ezek lehetnek az immunglobulin osztály tagjai vagy azok fragmensei, vagy azok részei, vagy az IgG fragmense, például a humán IgG1 nehézláncának állandó régiója, így például a CH₂, CH₃ és a kapocsrégiók. Specifikusan az "LT-B" vagy az „LT-B-R/Ig” fúzió olyan fehérje, mely a találmány biológiailag aktív LT-B blokkoló szerét tartalmazza (például az oldható LT-B-R-t, vagy egy immunoglobulin lánc N-terminálisának részében kapcsolt biológiailag aktív fragmenst, ahol az immunglobulin N-terminálisának részénél az LT-B blokkoló szerrel kicserélték). Az LT-B vagy az LT-B-R/Ig fúzió egyik fajtája az "LT-B-R/Fc” fúzió,

mely fehérje az LT-B-R-t az immunglobulin állandó régiójának legalább egy részével kapcsolja. Egy előnyben részesített Fc fúzió a találmány szerinti LT-B blokkoló szert az immunglobulin nehézlánc C-terminálisán lévő ellenanyag fragmenshez kapcsoltn tartalmazza.

A "standard hibridizációs körülmények", így a sókoncentráció és a hőmérséklet érték mind a hibridizációnál, mind a mosásoknál a következők: 0,5 X SSC-től körülbelül 5 X SSC-ig és 65 °C. Ahogy azt itt használjuk, a "standard hibridizáció" szakkifejezés végrehajtási meghatározás és a hibridizációs körülmények tartományát foglalja magában. Az igen szigorú hibridizációs körülmények például a következőket foglalhatják magukban: plakkszűrési puffer (0,2 % poli(vinil-pirrolidon), 0,2 % Ficoll 400; 0,2 % borjú szérumalbumin, 50 mM trisz-HCl (pH = 7,5); 1 M nátrium-klorid; 0,1 % nátrium-pirofoszfát; 1 % SDS); 10 % dextrán-szulfát és 100 µg/ml denaturált, ultrahanggal kezelt lazac sperma DNS kiegészítéssel, 65 °C-on 12-20 óráig, és a mosás 75 mM nátrium-klorid/7,5 mM nátrium-citrát (0,5 x SSC)/1 % SDS oldattal 65 °C-on történik. A kevésbé pontos körülmények például a következőket foglalhatják magukban: a hibridizálás plakkszűrő pufferben, 10 % dextrán-szulfátban és 110 µg/ml denaturált, ultrahanggal kezelt lazac sperma DNS, 55 °C-on 12-20 óráig, és a mosás 300 mM NaCl/30 mM nátrium-citrát (2,0 x SSC)/1 % SDS oldattal 55 °C-on történik [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York, Sections 6.3.1-6.3.6 (1989)].

Ahogy azt itt használjuk, a "terápiás összetétel" szakkifejezés a jelen találmány szerinti fehérjét és más, biológiailag összeférhető alkotórészt tartalmaz. A terápiás összetétel kiegészítésként vizet, ásványi sókat és hordozófehérjéket tartalmazhat.

Ezután az előnyben részesített megvalósítási formákat ismertetjük.

A jelen találmány részben azon a felfedezésen alapul, hogy az egyedben az LT-B blokkoló szerek az antivirális válasz indukálására képesek. Azt találtuk, hogy a vírussal fertőzött egyed kezelése az egyed túlélését nagymértékben megnövelte. Részletesebben, kimutattuk, hogy az LCMV-13-mal fertőzött NZB egerek LT-B blokkoló szerrel, mint például az LT β R-Ig fúziós fehérjével történő kezelése a túlélési arányukat 73 %-kal megnövelte.

Az Ebola, a Dengue, az SNV és más itt említett vírus jelenlegi kezelése a betegség terjedésének megakadályozására szolgál. Az ilyen erősen kórokozó vírusok elleni vakcinák még nem léteznek. A Ribavirin-t, ami egy guanidin analóg, számos ilyen fertőzés általános antivirális gyógyszerként alkalmazzák, de dokumentáltan megismételhető sikert csak a Lassa Fever-nél sikerült elérni, a betegség korai szakaszában. [Lacy és Smego: Adv. Ped. Inf. Dis., 12, 21 (1997)]. Adataink arra utalnak, hogy a vírusokkal kapcsolódó néhány kórban az immunrendszernek közvetítő szerepe lehet. Az LT-rendszer blokkolásával, a vírusokra specifikus CD8 T-sejtek számának és funkcióinak átmeneti csökkenésével, a túlélés esélye nagymértékben megnőhet. A klinikai kezelések, melyek a TNF α útvonal

blokkolását többféle eszközzel próbálják megoldani, számos ilyen jellegű betegség esetében már beindultak [Pass és mtsai: Chest Surg. Clin. N. Amer., 5, 73 (1995)]. Úgy véljük, hogy az LT β R-Ig kezelést további állati modellekben tovább kell vizsgálni, mielőtt azokat a humán próbálkozásokat megkezdenénk, amelyek a betegek akut, gyorsan kifejlődő virális infekcióinak tüneteire vonatkoznak, mint például a sokk és a pulmonáris fájdalmak.

Az LT-B blokkoló szerek:

A jelen találmány egyik megvalósítási formájában az LT-béta blokkoló szer az LT-béta ellen kialakított ellenanyagot (Ab) tartalmazza, mely az LT-béta jelátvitelt gátolja. Előnyösen, az anti-LT-béta Ab egy monoklonális ellenanyag (mAb). A gátló anti-LT-béta Ab-k és más LT-béta blokkoló szerek olyan szűrési eljárásokkal azonosíthatók, melyek egy vagy több szer azon képességét mutatják ki, mellyel az LT ligandhoz kötődnek, vagy melyek a sejteken az LT-béta jelátvitel hatását gátolják.

A jelen találmány egy másik megvalósítási formájában az LT-béta blokkoló szer egy LT-béta receptort (LT-B-R) blokkoló szert tartalmaz. Az előnyben részesített megvalósítási formában az LT-B-R blokkoló szer az LT-béta-R gátlására kialakított ellenanyag, mely az LT-béta-R jelátvitelt gátolja. Előnyösen, az anti-LT-béta-R Ab egy monoklonális ellenanyag (mAb). Az egyik ilyen gátló anti-LT-béta-R mAb a BDA8 jelű mAb. A gátló anti-LT-béta-R Ab-k és más LT-béta-R blokkoló szerek olyan szűrési eljárásokkal azonosíthatók, melyek egy vagy több szer azon

képességét mutatják ki, mellyel egyrésről az LT-béta-R-hez vagy az LT ligandhoz kötődnek, vagy melyek a sejteken az LT-béta-R jelátvitel hatását gátolják.

Az egyik szűrési eljárás az LT-béta-R-t hordozó tumoros sejteken az LT-béta-R jelátvitel citotoxikus hatásán alapul. A tumoros sejteket az LT-béta-R jelátvitel indukálásához egy vagy több LT-béta-R aktiváló szerrel kezeljük. Az LT-béta-R aktiváló szerek közé tartoznak az LT-alfa 162 heteromer komplexek (előnyösen az oldható LT-alfa 1/béta 2) IFN-gamma jelenlétében, valamint az aktiváló anti-LT-béta-R Ab [a kapcsolódó 08/378,968 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés].

Az LT-béta-R jelátvitelt blokkoló ellenanyagokat és más szereket a tumoros sejteken az LT-béta-R jelátvitel citotoxikus hatásának gátlási képessége alapján választjuk ki, a következő eljárásban:

- 1) A tumoros sejteket, mint például a HT29 sejteket, három-négy napig több szövettenyésztő edény lyukában tápoldék jelenlétében tenyésztjük és legalább az egyik LT-béta-R aktiváló szert, hígítási sorozatban, levizsgáljuk;
- 2) A mitokondriumok funkcióját megvizsgáljuk, például MTT-vel, ennél a módszernél a tumoros sejtek keverékéhez vitális festéket adunk és ezzel reagáltatjuk több órán keresztül;
- 3) Mindegyik lyukban az elegy optikai denzitását 550 nm-en meghatározzuk (OD_{550}). Az OD_{550} mindegyik lyukban az LT-béta-R aktiváló szer jelenlétében megmaradt tumoros

sejtek számával és a tesztelt LT-béta-R blokkoló szer hatásával arányos.

Bármely szer vagy a szerek bármely kombinációja, melyek az LT-béta-R jelátvitelt aktiválják, felhasználható a fenti vizsgálatban az LT-béta-R blokkoló szerek azonosítására. Az LT-béta-R aktiváló szerek, melyek az LT- béta-R jelátvitelt indukálják (mint például az aktiváló anti-LT-béta-R mAb-k), a maguk vagy más szerekkel kombinációban kifejtett képességük alapján a tumoros sejt elleni citotoxicitásuk megerősítésére kiválaszthatók, felhasználva a fentiekben leírt tumorsejt vizsgálati módszert.

Az LT-béta-R blokkoló szerek kiválasztásának másik módszere a kísérleti szer azon képességének kivizsgálását foglalja magában, ami közvetlenül az LT-ligand-receptor kötődésre hat. A szert vagy a szerek kombinációját, melyek a ligand-receptor kötődést legalább 20 %-ban képesek blokkolni, a jelen találmány oltalmi körébe tartozó LT-béta-R blokkoló ágensnek tekintjük.

Számos, a ligand-receptor kötődés erősségét több szempontból mérő vizsgálati módszer felhasználható a kísérleti LT-béta-R blokkoló szerek vetélkedési vizsgálatának végrehajtásában. A receptor és a ligand közötti kötés erőssége enzimmel kapcsolt immunadszorpciós vizsgálati módszerrel (ELISA) vagy radioimmun vizsgálati módszerrel (RIA) mérhető. A specifikus kötődés a fluoreszcensen jelölt ellenanyag-antigén komplexeken keresztül szintén mérhető, de fluoreszcensen aktivált sejtosztályozási analízist (FACS) is végezhetünk, vagy akár a szakirodalomban jól ismert immunkimutatási eljárásokat vethetünk be.

A ligand-receptor kötődésben szereplő kölcsönhatás
BIAcore

TM készülékkel is mérhető (Pharmacia Biosensor), mely a plazmon-rezonancia kimutatásra épül [Zhou és mtsai: Biochemistry, 32, 8193-8198 (1993); Faegerstram és O'Shannessy: "Surface plasmon resonance detection in affinity technologies", megjelent: Handbook of Affinity Chromatography, 229-252, Marcel Dekker, Inc., New York (1993)].

A BIAcore TM technológia lehetővé teszi a receptor kötődését az arany felszínen áramló ligandhoz. A plazmon-rezonancia kimutatás valós időben a felszínhez kötődő mennyiség meghatározását teszi lehetővé. Ez a technika mind a kapcsolódás, mind a leválás sebességi állandóját megadja, és így a ligand-receptor disszociációs állandó és affinitási állandó a kísérleti LT-béta-R blokkoló szer jelenlétében vagy hiányában közvetlenül meghatározható.

Bármely fenti vagy más technika alapján a receptor-ligand kölcsönhatás mérésével megállapíthatjuk az LT-béta-R blokkoló szer képességeit, magában vagy más szerekkel együtt, mint például a felszíni vagy oldható LT ligandok kötődésének gátlását a felszíni vagy oldható LT-béta-R molekulákhoz. Az ilyen módszerek a megváltoztatott szer LT-béta-R aktiválást blokkoló képességének optimalizálásánál az LT-béta-R blokkoló szerek vagy az ilyen szerek származékainak (például fúziók, kimérák, mutánsok és kémiaailag megváltoztatott formák) vizsgálatához,

magukban vagy más kombinációban más anyagokkal, szintén felhasználhatók.

A jelen találmány egyik megvalósítási formájában az LT-béta-R blokkoló szerek az oldható LT-béta receptor-molekulákat tartalmazzák. A humán LT-béta-R extracelluláris részének szekvenciáját, mely a ligandkötő domént kódolja, a szakirodalomban bemutatták [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés 1. ábrája, amelyet itt hivatkozásként építettünk be]. Felhasználva ezt a szekvenciát, a szakirodalomban jól ismert rekombináns DNS technikák segítségével az LT-béta-R ligandkötő domén funkcionális fragmensét kódoló polinukleotid vektorba klónozható, és a megfelelő gazdában az oldható LT-béta-R molekula elkészíthető. Az oldható LT-béta-R molekulákat, melyek a natív LT-béta receptorokkal az LT ligandért az itt leírt eljárásban képesek vetélkedésre, LT-béta-R blokkoló szernek tekintjük.

Az oldható LT-béta receptor aminosav szekvenciáját, ami a szakirodalomban leírt szekvenciát tartalmazza [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1. ábra] egy vagy több heterológ fehérje doménhez ("fúziós domén") lehet kapcsolni a receptor fúziós fehérje *in vivo* stabilitásának növelése vagy a biológiai aktivitásának növelése, illetve helyzetének megváltoztatása érdekében. Előnyösen a stabilis plazmafehérjék, melyek féléletideje a keringésben tipikusan nagyobb, mint 20 óra, a receptor fúziós fehérjék kialakításához felhasználhatók. Az ilyen plazmafehérjék közé, anélkül, hogy

erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: immunglobulinok, szérum albumin, lipoproteinek, apolipoproteinek és transferrin. A specifikusan elhelyezkedő oldható LT-béta-R fúziós fehérje létrehozásához a szekvenciákat, melyekkel az oldható LT-béta-R molekulát adott sejthez vagy szövettípusokhoz eljuttathatjuk, az LT-béta-R ligandkötő doménhez is kapcsolhatjuk. Az LT-béta-R extracelluláris régiójának összes vagy funkcionális részeit [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1. ábra], amelyek az LT-béta-R ligandkötő domént tartalmazzák, az immunglobulin állandó régiójához kapcsolhatjuk, így például az IgG nehézlánc Fc régiójához [Browning és mtsai: J. Immunol., 154, 33-46 (1995)]. Az oldható receptor-IgG fúziós fehérjék kialakításához a szakirodalomban az általános immunológiai reagensek és eljárások jól ismertek [az 5,225,538 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. A funkcióképes LT-béta-R ligandkötő domén az immunglobulin (Ig) Fc doménhez fuzionálható, amelyek az immunglobulin osztályokból vagy alosztályokból vagy más IgG1-ből származhat. Az ellenanyagok Fc doménjei, melyek különböző Ig osztályokhoz vagy alosztályokhoz tartoznak, különböző másodlagos végrehajtó funkciót képesek aktiválni. Az aktiváció úgy történik, hogy az Fc domén egy rokon Fc receptor által kötötté válik. A másodlagos végrehajtó funkciók közé a komplement-rendszer aktiválásának képessége, a méhlepényen történő áthaladás, és a különböző mikrobiális fehérjékhez való kapcsolódás képessége tartozik. Az

immunglobulinok különböző osztályainak és alosztályainak tulajdonságait a szakirodalomban leírták [Roitt és mtsai: Immunology, 4.8, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. kiadás (1993)]. A komplement enzimek sorozatát az antigénnel kötődött IgG1, IgG3 és IgM ellenanyagok Fc részével aktiválhatjuk. Az IgG2 Fc része tűnik a legkevésbé aktívnak, és az IgG4, IgA, IgD és IgE Fc részei a komplement-rendszer aktiválásában hatástalanok. Így az Fc rész az adott immunválaszhoz szükséges másodlagos effektor funkciók alapján vagy az LT-béta-R fúziós fehérjével kezelt betegséghez választható ki. Ha az LT ligandot hordozó céltáblasejt károsítása vagy elpusztítása előnyös, akkor az LT-béta-R fúziós fehérje elkészítéséhez a különösen aktív Fc részt (IgG1) választhatjuk. Alternatívaként, ha a komplement nélküli folyamat megindítása a cél, akkor az LT-béta-R-Fc fúzióhoz egy inaktív IgG4 Fc részt választhatunk.

Az Fc receptorok kötődésének csökkentésére vagy megszüntetésére és a komplement aktivációhoz a szakirodalomban leírták az Fc részek mutációit [Morrison: Annu. Rev. Immunol., 10, 239-265 (1992)]. Ezek és más mutációk magukban vagy kombinációban az LT-béta-R-Fc fúziós fehérje kialakításánál, az Fc domén aktiválásának érdekében, felhasználhatók.

A szakirodalomban leírták az oldható humán LT-béta-R fúziós fehérje termelését, mely a ligandkötő szekvenciát egy humán immunglobulin Fc doménhez kötve tartalmazza (hLT-béta-R-Fc), [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli

szabadalmi bejelentés 1. példája, amelyet itt hivatkozásként építettünk be]. A fenti 1. példa alapján egy CHO-vonalat, mely a hLT-béta-R-Fc-t szekretálja, "hLT béta; R-hG1 CHO#14"-nek neveztünk el. Ennek a vonalnak egy mintáját 1995. július 21-én a Budapesti Egyezmény alapján az American Type Culture Collection (ATCC) gyűjteményébe CRL 11965 ATCC hozzáférési számon letétbe helyeztük (Rockville, Md).

A szakirodalomban leírták az oldható egér LT-béta-R fúziós molekula (mLT-béta-R-Fc) előállítását [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés 2. példája, amelyet itt hivatkozásként építettünk be]. A fenti 2. példa alapján egy CHO-vonalat, mely a mLT-béta-R-Fc-t szekretálja, „mLT béta; R-hG1 CHO#1.3.BB"-nek neveztük el. Ennek a vonalnak egy mintáját 1995. július 21-én a Budapesti Egyezmény alapján az American Type Culture Collection (ATCC) gyűjteményébe (Rockville, Md) CRL 11964 ATCC hozzáférési számon helyeztük letétbe.

A receptor-Ig fúziós fehérje kapcsolódási pontját képező különböző aminosavak megváltoztathatják az LT-béta receptor fúziós fehérje felépítését, stabilitását és végleges biológiai aktivitását. A kiválasztott fúziós domén kapcsolódási pontjának módosítására az kiválasztott LT-béta-R fragmenshez egy vagy több aminosavat adhatunk.

Az LT-béta-R fúziós fehérje N-terminálisa szintén megváltoztatható abban a helyzetben, ahol a kiválasztott LT-béta-R DNS fragmenst a rekombináns expressziós vektorba beépítjük (5' vé-

généel végzett hasításánál). Az egyes LT-béta-R fúziós fehérjék stabilitása és aktivitása levizsgálható és optimalizálható, felhasználva a rutin kísérleteket és vizsgálati módszereket, amiket az itt leírt LT-béta-R blokkoló szerek kiválasztásához használunk fel.

Az idézett szabadalom első ábráján bemutatott LT-béta-R ligandkötő domén extracelluláris szekvenciájában az aminosavak változtatásával az LT-ligand oldható LT-béta receptora vagy fúziós fehérje szintén előállítható. A jelen találmány oldható LT-béta-R molekulái a felszíni LT ligandkötésért az endogén sejt felszíni LT-béta receptorokkal vetélkedhetnek. Elképzelhető, hogy bármely oldható, LT-béta-R ligandkötő domént tartalmazó molekula, mely a sejt felszíni LT-béta receptorokért az LT ligandkötésen keresztül vetélkedésre képes, egy LT-béta-R blokkoló szer, és így a jelen találmány oltalmi körébe esik.

A jelen találmány egy másik megvalósítási formájában a humán LT-béta receptorfunkciók (anti-LT-béta-R Ab-k) ellen alakítunk ki ellenanyagokat, ilyenek például az LT-béta-R blokkoló szerek, olyan állapotok kezelésre, melyek az egyedekben, beleértve az embereket is, a vírussal indukált szisztémás sok és légzési nehézség kockázatának csökkentésére szolgál. A jelen találmány anti-LT-béta-R ellenanyagai poliklonálisak vagy monoklonálisak (mAb-k) lehetnek, és ezek az LT-béta-R jelátvitel blokkolási, *in vivo* biológiai hozzáférési, stabilitási képességeinek vagy más kívánt jellemvonásainak optimalizálása érdekében módosíthatók.

A humán LT-béta receptor ellen kifejlesztett poliklonális ellenanyagok (szérumok) hagyományos technikákkal, az állatok, mint például kecskét, nyulak, patkányok, tengerimalacok vagy egerek szubkután végzett humán LT-béta receptor fúziós fehérje injektálásával készíthetők el [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1. példája], ahol az immunizálást Freund-féle adjuvánsban végzik, és a megerősítés intraperitoneális vagy szubkután injekcióval nem teljes Freund-féle adjuvánsban történik. A poliklonális antiszérumok, melyek az LT-béta receptor ellen kialakított kívánt ellenanyagokat tartalmaznak, hagyományos immunológiai eljárásokkal szűrhetők.

A humán LT-béta receptor fúziós fehérje ellen kialakított egér monoklonális ellenanyagokat (mAbs) a szakirodalomban leírtaknak megfelelően állítottuk elő [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés 5. példája]. A hibridóma sejtvonalt egy mintáját (BD.A8.AB9), mely az egér anti-humán LT-béta-R mAb BDA8-at termeli, 1995. január 12-én a Budapesti Egyezmény alapján az American Type Culture Collection (ATCC) gyűjteményébe (10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) HB 11798 ATCC hozzáférési számon letétbe helyeztük.

Hagyományos rekombináns DNS technikákkal az anti-LT-béta-R ellenanyagok különböző formái is elkészíthetők [Winter és Milstein: *Nature*, 349, 293-299 (1991)]. Például olyan "kiméra" ellenanyagokat készíthetünk el, melyben az állatból származó antigénkötő domén a humán állandó doménhez kötött [Cabilly és

mtsai: a 4,816,567 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; Morrison és mtsai: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855 (1984)]. A kiméra ellenanyagok az állati ellenanyagok megfigyelt immunválaszát csökkentik, ha azokat az emberi klinikai kezeléseknél felhasználják. Továbbá olyan rekombináns "humanizált ellenanyagok" hozhatók létre, melyek az LT-béta-R-t képesek felismerni. A humanizált ellenanyagok kimérák, melyek túlnyomó részben a humán IgG szekvenciából állnak, melyeknél a felelős régiókba specifikus antigénkötő régiókat építettek be [WO 94/04679 számú szabadalmi bejelentés]. Az állatokat a kívánt antigénnel immunizálják, a megfelelő ellenanyagokat kinyerik és a specifikus antigénkötésért felelős variábilis régiók szekvencia részeit eltávolítják. Az állatokból származó antigénkötő régiókat ezután a megfelelő helyzetben a humán ellenanyag génekbe klónozzák, melyekből az antigénkötő régiókat eltávolították. A humanizált ellenanyagok a humán ellenanyagokban lévő heterológ (fajok közötti) szekvenciák használatát minimalizálják, és ezért a kezelt személyben az immunválasz megjelenésének sokkal kisebb a valószínűsége.

A rekombináns anti-LT-béta-R ellenanyagok különböző formái olyan kiméra vagy humanizált ellenanyagok elkészítésével hozhatók létre, melyek anti-LT-béta-R variábilis doménokat és humán állandó régiókat (CH1, CH2, CH3) tartalmaznak, és amelyeket az immunglobulinok különböző osztályaiból nyerhetünk ki. Például a megnövekedett antigénkötőhely affinitással

rendelkező anti-LT-béta-R IgM ellenanyagok az antigénkötőhely a humán mu lánc állandó régióit hordozó vektorba építéssel, rekombináns eljárással előállíthatók [Arulanandam és mtsai: J. Exp. Med., 177, 1439-1450 (1993); Lane és mtsai: Eur. J. Immunol., 22, 2573-2578 (1993); Traunecker és mtsai: Nature, 339, 68-70 (1989)]. Ráadásul a standard rekombináns DNS technikák a rekombináns ellenanyagok antigénnel szembeni kötőaffinitásának megváltoztatására is felhasználhatók, az antigénkötőhelyek közelében az aminosavösszetétel megváltoztatása révén. A humanizált ellenanyag antigénkötő affinitása molekuláris modellezésen alapuló mutagenézissel megnövelhető [Queen és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 10029-10033(1989); WO 94/04679 számú szabadalmi bejelentés].

A megcélzott szövettípuson az LT-béta-R függés vagy az adott kezelés érdekében szükség lehet arra, hogy az anti-LT-béta-R Ab-k affinitását megnöveljük vagy csökkentsük. Például a megelőző kezelésekben előnyös lehet a betegek állandó szintű anti-LT-béta-R Ab-ekkel történő kezelése, miközben az LT-béta útvonalon a jel csökken. Hasonlóan a rövididejű kezeléseknél a gátló, az LT-bétával megnövekedett affinitást mutató, anti-LT-béta-R ellenanyagok előnyösek lehetnek.

A humán LT-béta receptor ellen kialakított egyéb ellenanyagok vizsgálatánál további anti-LT-béta-R ellenanyagok megjelenése várható, melyeknek LT-béta-R blokkoló ágenseként emberekben kifejtett funkciói rutin kísérletek, és az itt leírt vizsgálatok



alapján megállapíthatók azoknak az egyedeknek, beleértve az embereket is, kezelése érdekében, melyek a vírusokkal indukált szisztémás sokk és légzési nehézség kockázatát mutatják.

A jelen találmány egy másik előnyben részesített megvalósítási formája olyan összetételekre és eljárásokra vonatkozik, melyek az LT ligand ellen kialakított ellenanyagokat tartalmazznak, melyek képesek az LT-béta-R blokkoló szerek funkcióját betölteni. Ahogy azt a fentiekben leírtuk az anti-LT-béta-R Ab-knél, az anti-LT ligand ellenanyagok, melyek LT-béta-R blokkoló funkciót képesek betölteni, poliklonálisak vagy monoklonálisak lehetnek, és az antigénkötő tulajdonságaik és immunológiai válaszkiváltó képességeik megváltoztatása érdekében módosíthatók. A jelen találmány anti-LT ellenanyagai egy vagy akár két LT alegység ellen egyedileg kialakíthatók, beleértve az oldható, mutáns, megváltoztatott és kiméra LT alegység formákat. Ha az LT alegységeket antigénként alkalmazzuk, akkor ezek alatt előnyösen az LT-béta alegységeket értjük. Ha LT-alfa alegységeket használunk, akkor előnyben részesítjük, ha az eredményül kapott anti-LT-alfa ellenanyagok a felszíni LT ligandhoz kötődnek és a kiválasztott LT-alfával nem adnak keresztreakciót vagy a TNF-R aktivitást nem módosítják (ahogy azt a szakirodalomban leírták, az 5, 925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés 3. példájában).

Alternatívaként, a homomer (LT-béta) vagy a heteromer (LT-alfa/62) komplexek ellen képzett ellenanyagok, amelyek egy vagy több LT alegységet tartalmazznak, kialakíthatók, és az LT-bé-



ta-R blokkoló szer aktivitásukra nézve szűrhetők. Előnyös az LT-alfa 1/béta 2 komplexek antigénként történő felhasználása. Ahogy azt a fentiekben megvitattuk, előnyben részesítjük azt, ha az eredményül kapott anti-LT-alfa 1/béta 2 ellenanyagok a felszíni LT ligandhoz anélkül kötődnek, hogy a kiválasztott LT-alfához kötődnének, és hogy TNF-R aktivitásukat ez befolyásolná.

A poliklonális anti-humán LT-alfa ellenanyagok előállítását leírták a szakirodalomban [a kapcsolódó WO 94/13808 számú szabadalmi bejelentés]. A monoklonális anti-LT-alfa és anti-LT-béta ellenanyagokat szintén leírták [Browning és mtsai: J. Immunol., 54, 33-46 (1995)]. Az egér anti-humán LT-béta mAb-eket a szakirodalomban leírtaknak megfelelően állítottuk elő [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés 6. példája]. A hibridóma sejtvonalat (B9.C9.1), mely az egér anti-humán LT-béta-R mAb B9-et termeli, 1995. július 21-én a Budapesti Egyezmény alapján az American Type Culture Collection (ATCC) gyűjteményébe (10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) 11962 ATCC hozzáférési számon letétbe helyeztük.

A monoklonális tengerimalac anti-egér LT-alfa/62 ellenanyagokat a szakirodalomban leírtak alapján készítettük el [az 5,925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés 7. példája]. A hibridóma sejtvonalat (BB.F6.1), mely a tengerimalac anti-egér LT-alfa/62 mAb BB.F6-ot termeli, 1995. július 21-én a Budapesti Egyezmény alapján az American Type Culture Collection (ATCC) gyűjteményébe (10801 University

Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) MB 11963 ATCC hozzáférési számon letétbe helyeztük.

Az LT alegysége és az LT komplexek ellen kialakított ellenanyagoknak, melyek LT-béta-R blokkoló szerként alkalmazhatók, fluoreszcensen aktivált sejtosztályozó (FACS) vizsgálatait elvégeztük, ahogy azt a szakirodalomban leírták [az 5, 925,351 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés 6. és 7. példái]. Ebben a vizsgálatban az oldható humán LT-béta-R-Fc fúziós fehérjét a PMA-val aktivált II-23 sejtekhez növekvő koncentrációban adtuk hozzá, melyek felszínükön LT komplexeket fejeznek ki [Browning és mtsai: J. Immunol., 154, 33-46 (1995)]. Az LT-béta receptor-ligand kölcsönhatás legalább 20 %-os blokkolására képes ellenanyagot LT-béta-R blokkoló ágensként választottuk ki.

Az immunizáláshoz antigénként az LT-alfa/béta komplexet, és nem az LT alegységet alkalmazva, hatásosabb immunizációt kaptunk, vagy olyan ellenanyagok keletkeztek, melyek a felszíni LT ligandhoz nagyobb affinitással kapcsolódtak. Elképzelhető, hogy az LT-alfa/62 komplexszel végzett immunizáció során kapott ellenanyagok között olyanok is izolálhatók, melyek mind az LT-alfa, mind az LT-béta alegységek aminosavmaradékait felismerik (például azokat, melyek az LT-alfa/62 kapocsrégiót felismerik). A humán LT-alfa/62 heteromer komplexek ellen képzett ellenanyagok vizsgálatánál elvárható, hogy emberben LT-béta-R blokkoló szerként ható anyagot találjunk, felhasználva rutin kísérleti eljárásokat és itt leírt vizsgálatokat.

Az itt leírt összetételeket a vírusokkal indukált szisztémás sokk és a légzési nehézség kezelési eljárásában az egyekbe hatásos dózisban adjuk be. Az adott alkalmazásnál az előnyben részesített gyógyszerészeti kiszerelés és a dózistartomány meghatározása a szakemberek számára nyilvánvaló tények figyelembe vételével történik, mint például a beteg állapota, tömege, a kívánt kezelést kiterjedése és a beteg kezeléssel szembeni toleranciája. A dózisok kiindulásként körülbelül 1 mg/kg oldható LT-béta-R-t tartalmaznak, majd ezután a kezelés dózisát optimalizálhatjuk.

A terápiásan hatásos dózis meghatározása olyan *in vitro* kísérletekben történik, melyek 1-14 napig a céltábla sejtek (LT-béta-R vagy LT ligand-pozitív sejtek, a blokkolószerrel függően) fedéséhez szükséges LT-béta-R blokkoló koncentrációjának mérésén alapulnak. Az itt leírt receptor-ligand-kötő vizsgálati módszer a sejtfedési reakció nyomonkövetésére alkalmas. Az LT-béta-R vagy az LT ligand-pozitív sejtek az aktivált limfocita populációtól FACS alkalmazásával elkülöníthetők. Az ilyen *in vitro* kötési vizsgálatok alapján az adott állatban elvégzett, itt leírt vizsgálattal az LT-béta-R blokkoló szer alkalmas koncentrációnak tartománya megválasztható.

A jelen találmány oldható LT-béta-R molekuláinak, az anti-LT ligandjainak az anti-LT-béta-R Ab-jeinek alkalmazása magukban vagy kombinációban, beleértve az ellenanyagok és komplexek izolált és tisztított formáit, ezek sóit vagy gyógyszerészetileg elfogadható származékait, melyek

immunszuppresszív hatást mutatnak, bármely hagyományosan elfogadott módon a szerek beadásával elvégezhető.

A terápiákban alkalmazott gyógyszerészeti összetételek különböző formában lehetnek. Ezek például a következők: szilárd és félig szilárd, valamint folyékony dózisformák, mint például tabletták, pirulák, porok, folyadékok vagy szuszpenziók, kúpok és in-jektálható, valamint infúzióban beadható oldatok. Az előnyben részesített formák a szándékolt beadás módjától és a terápiás alkalmazás milyenségétől függenek.

A beadási módok közé a következők tartozhatnak: orális, parenterális, szubkután, intravénás, intraléziós vagy helyi beadás. A jelen találmány oldható LT-béta-R molekuláit, az anti-LT ligandját és az anti-LT-béta-R Ab-ít például steril, izotóniás kiszerelekben állíthatjuk elő, kofaktorokkal együtt vagy azok nélkül, amelyek a felvételt vagy a stabilitást stimulálják. A kiszerelek előnyösen folyadék, vagy liofilezett por lehet. Például a jelen találmány oldható LT-béta-R molekulái, az anti-LT ligandja és az anti-LT-béta-R Ab-i kiszereleési pufferben hígíthatók, amely 5,0 mg/ml citromsavat (monohidrát), 2,7 mg/ml trinátrium-citrátot, 41 mg/ml mannitolt, 1 mg/ml glicint és 1 mg/ml poliszorbát 20-at tartalmaz. Ez az oldat liofilezhető, hűtéssel tárolható és a beadás előtt steril Water-For-Injection (USP) nevű vízzel helyreállítható.

Az összetételek előnyösen hagyományos, a szakirodalomban jól ismert, gyógyszerészetileg elfogadható hordozót is tartalmazhatnak [Remington's Pharmaceutical

Sciences, 16. kiadás (1980) Mac Publishing Company]. Az ilyen gyógyszerészetileg elfogadható hordozók közé más gyógyszerek, hordozók, genetikai hordozók, adjuvánsok, kötőanyagok, mint például szérum albumin vagy plazmakészítmények, is kerülhetnek. Az összetételek előnyösen egységdózis formában vannak, és ezeket rendszerint naponta egyszer vagy többször adják be.

A jelen találmány gyógyszerészeti összetételei mikrogömbök, liposzómák, vagy más mikrorészecskés szállítórendszerek alkalmazásával vagy késleltetett kibocsátású kisserelések formájában adhatók be, ahol az utóbbiakat a kezelendő területbe, annak közelébe vagy azzal más úton kapcsolatot tartó testtájba vagy a véráramba juttatják. A késleltetett kibocsátású hordozó megfelelő példái közé a féligáteresztő polimer mátrixok tartoznak, melyek formája kúp vagy mikrokapszula lehet. A beültethető vagy mikrokapszulás késleltetett kibocsátású mátrixok közé a polilaktidok [3,773,319 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; EP 58,481 számú szabadalmi bejelentés], az L-glutaminsav és az etil-L-glutamát kopolimerei [Sidman és mtsai: Biopolymers, 22, 547-556 (1985)]; a poli(2-hidroxi-etil-metakrilát) vagy az etilénvinil-acetát [Langer és mtsai: J. Biomed. Mater. Res., 15, 167-277 (1981); Langer: Chem. Tech., 12, 98-105 (1982)] tartoznak.

A jelen találmány oldható LT-béta-R molekuláit, az anti-LT ligandját és az anti-LT-béta-R Ab-it tartalmazó liposzómák egyedül vagy kombinációban a szakirodalomban jól ismert eljárások-

kal előállíthatók [DE 3,218,121 számú szabadalmi bejelentés; Epstein és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 82, 3688-3692 (1985); Hwang és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 77, 4030-4034(1980); a 4,485,045 és a 4,544,545 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentések]. A liposzómák rendszerint kis (körülbelül 200-800 Angström méretű) egyrétegű képletek, melyekben a lipidtartalom nagyobb, mint körülbelül 30 mól% koleszterin. A koleszterin arányát úgy választjuk meg, hogy az oldható LT-béta-R molekula, az anti-LT ligand és az anti-LT-béta -R Ab kibocsátási aránya optimális legyen.

A jelen találmány oldható LT-béta-R molekuláit, az anti-LT ligandját és az anti-LT-béta-R Ab-it olyan liposzómákkal is kapcsolhatjuk, melyek más LT-béta -R blokkoló szert, immunszuppresszív szereket vagy citokineket tartalmaznak, melyek az LT-béta-R blokkoló aktivitását módosíthatják. Az LT-béta-R molekulák, az anti-LT ligand és az anti-LT-béta-R Ab-k liposzómákhoz kapcsolása bármely, a szakirodalomban ismert keresztkötő szerrel végrehajtható, mint például heterobifunkciós keresztkötő szerekekkel, amelyeket a célzott szállításhoz a toxinok és más kemoterápiás szerek ellenanyagokkal történő kapcsolásában széles körben alkalmaznak. A liposzómákhoz történő konjugáció is végrehajtható, felhasználva a szénhidrátokkal irányított keresztkötő reagenst, a 4-(4-maleimid-fenil) vajsav-hidrazidot (MPBH) [Duzgunes és mtsai: J. Cell. Biochem. Abst. Suppl. 16E, 77 (1992)].



A jelen találmány LT-béta-R blokkoló szerei és összetételei, valamint eljárásai a kívánt szintű LT-béta-R jelátvitelhez az állapottól, a kórtól vagy a kezelt betegségtől függően módosítható. Elképzelhető, hogy a megfelelő molekuláris célokhoz az LT-béta-R jelátvitel abszolút szintje az LT-béta-R blokkoló szerek koncentrációjával vagy affinitásával finoman behangolható. Például a jelen találmány egyik megvalósítási formájában az oldható LT-béta-R molekulákat tartalmazó összetételeket a szubjektumba beadjuk. Az oldható LT-béta receptor hatásosan vetélkedhet a sejtfelszíni LT-béta receptorokkal a felszíni LT ligandok kötéséért. A felszíni LT ligandok vetélkedési képessége a relatív oldható és sejtfelszíni LT-béta-R molekulák koncentrációjától függ, valamint a ligandkötés viszonylagos affinitásától.

A felszíni LT-liganddal szemben megnyilvánuló kötési affinitás növelését vagy csökkentését eredményező mutációkat hordozó oldható LT-béta-R molekulák létrehozhatók a szakirodalomban leírt standard rekombináns DNS technikákkal. A helyspecifikus vagy random mutációkkal rendelkező nagyszámú molekula LT-béta-R blokkoló képességére nézve megvizsgálható, felhasználva a rutin kísérleteket és az itt leírt technikákat. Hasonlóan, a jelen találmány egy másik megvalósítási formájában akár az LT-béta receptorok, akár egy vagy több LT ligand alegység funkció ellen képzett ellenanyagok LT-béta-R blokkoló szereknek tekinthetők. Az ilyen ellenanyagok LT-béta receptor jelátvitelt blokkoló képessége mutációval, kémiai módosításokkal, vagy más módszerekkel módosítható,

amivel a szubjektumba bejuttatott ellenanyag hatásos koncentrációja vagy aktivitása változtatható.

Általánosságban a jelen találmány eljárásai az antivirális válasz egyedben történő indukálására alkalmazhatók, ezek az eljárások az LT-B blokkoló szer hatásos mennyiségének és a gyógyszerészetileg elfogadható hordozónak a beadását tartalmazzák. A kezelt virális hatást bármely ismert vírus előidézheti, beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a Sin Nombre (SNV), Ebola, Marburg, Lassa és a Dengue vírusokat.

A találmány más specifikus formákban is megvalósítható, anélkül, hogy annak szellemétől és lényeges jellemvonásaitól eltérnénk. A megelőző megvalósítási formákat ezért inkább bemutató jelleggel tettük közzé, és ezek a találmányt nem korlátozzák. Így a találmány oltalmi körét a csatolt igénypontok és a megelőző leírást adja, és azokat a változásokat, melyek az egyenértékűség szellemében születnek, a jelen találmány oltalmi körébe tartóznak tekintjük.

Példa

A tumornekrózis faktor alfa (TNF α) a vírusos fertőzések és más immunogének akut sokkhatásának elősegítésében játszik szerepet [Sheehan és mtsai: J. Immunol., 142, 3884 (1989); Wong és Goeddel: Nature, 323, 819 (1986); Beutler és mtsai: Science, 229, 869 (1985); Mackay és mtsai: J. Immunol., 159, 3299 (1997); Crowe és mtsai: Science, 264, 707 (1994)]. A Dengue-lázban fellépő sokkban az TNF α szintje a betegek

szérumaiban megemelkedett, hasonlóan az oldható TNFR-75 szinthez [Hober és mtsai: J. Trop. Med. Hyg., 48, 324 (1993); Bethell és mtsai: J. Infect. Dis., 177, 778 (1998)]. A limfocitás koriomeningitisz vírus variánsával (LCMV, 13-as klón (LCMV-13) (HH, II)) fertőzött egerek szérumában megmértük a TNF α szinteket. Az LCMV-13-mal fertőzött egerek szérumában a TNF α szintek a fertőzés utáni 4. napig éppen a kimutatási határ felett voltak (a szérum TNF α szinteket ELISA-val mértük, Genzyme Corporation, száma: 80-2802-00). A betegség 5. és 6. napján, a betegség csúcspontján, az oldható TNF α szintek a szérumban a normál szint 3-6-szorosát érték el (az adatokat nem mutatjuk be). Ezért a TNF α blokkolását monoklonális ellenanyaggal, a TN3-19.12-vel, kíséreltük meg, melyről közismert, hogy a szekretált TNF α -hoz kötődik, így az egerből kimerítettük, amit ELISA-val igazoltunk [Sheehan és mtsai: J. Immunol., 142, 3884(1989); Wong és mtsai: Nature, 323, 819 (1986); Beutler és mtsai: Science, 229, 869 (1985); Mackay és mtsai: J. Immunol., 159, 3299 (1997); Crowe és mtsai: Science, 264, 707(1994); Hober és mtsai: J. Trop. Med. Hyg., 48, 324 (1993); Bethell és mtsai: J. Infect. Dis., 177, 778 (1998)]. A szérum TNF α szinteket ELISA-val mértük (Genzyme Corporation, száma: 80-2802-00). Az NZB egereknek $2,5 \times 10^6$ pfu Cl 13-at intravénásan adtunk be, majd a fertőzés utáni 1. és a 4. napon két intraperitoneális injekciót, mely endotoxin-mentes PBS-ben 250 μ g TN3-19.12 ellenanyagot tartalmazott. A kontroll egereket azonos napokon (lásd S hivatkozás), azonos térfogatú ellenanyagtól mentes PBS-

sel kezeltük. Ez a kezelés (anti-TNF) ezeknek az egereknek a túlélési arányára csak kis hatással volt (3. ábra). A limfotoxin al-fát ($LT\alpha$), ami $TNF\beta$ -ként is ismert, és amely a $TNF\alpha$ -val biológiai hatásában számos azonos receptoron osztozik, ez az ellenanyag nem ismeri fel [Mackay és mtsai: *J. Immunol.*, 159, 3299 (1997)]. Az is lehetséges, hogy mind a $TNF\alpha$, mind az $LT\alpha$ célbajutása szükséges a túlélési ráta növeléséhez. A hipotézis kivizsgálásához a fenti TN3-19.12 mAb-t és a receptor fúziós fehérjét használtuk fel, mely utóbbi a TNF p55 receptor extracelluláris doménjainak és a humán IgG1 CH2 és CH3 doménjainak fúziója, (TNFR55-Ig) [Walter és mtsai: *J. Immunol.*, 155, 5280 (1995); Miller és mtsai: *J. Exp. Med.*, 178, 211 (1993); Browning és mtsai: *J. Immunol.*, 154, 33 (1995)]. Az egereket az R hivatkozásban leírtaknak megfelelően kezeltük. A háromszorosan kezelt csoportnak a fertőzés napján, majd a 3. napon ip. 200 μ g mennyiségben TNFR55-Ig-t és $LT\beta$ R-Ig fehérjéket adtunk be. A kontroll egereknek azonos napokon, azonos mennyiségben humán ellenanyagot adtunk, amelyet ezen fúziós fehérjék (AY1943-29) szintézisében használtunk fel. Az $LT\beta$ R-Ig-vel kezelt egereket hasonlóan kezeltük, azzal az eltéréssel, hogy TNFR55-Ig injekciót nem kaptak. Ez a kezelés az LCMV-13-mal fertőzött NZB egerekben (lásd az anti-TNF és a TNFR55-Ig csoportot) a túlélési rátát szintén nem változtatta meg szignifikánsan. A limfotoxint, a heteromer $LT\alpha$ -t és az $LT\beta$ -t tartalmazó membrán a TNFR-75-öt vagy a TNFR-55-öt nem ismerte fel, de az $LT\beta$ R receptort igen (15). Fúziós fehérjeként azt választottuk, mely az $LT\beta$ R extracel-

luláris domént a humán IgG1 CH2 és a CH3 doménokkal kapcsolva tartalmazta (LT β R-Ig). Az egerek kezelését az anti-TNF α mAb-vel, a TNFR55-Ig-vel és az LT β R-Ig-vel (háromas kezelés) vagy a TNFR55-IG és a LT β R-Ig fúziókkal végeztük, aminek eredményeként a túlélési arány drámai 80 %-os, illetőleg 70 %-os növekedését kapuk. Ezzel szemben az anti-TNF α mAb és a TNFR55-Ig kezelések a fertőzött egerek túlélését csak 20 %-kal növelték. Mostanában egy második LT β R, LIGHT, ligandot azonosítottak [Mauri és mtsai: *Immunity*, 8, 21 (1998); Montgomery és mtsai: *Cell*, 87, 427 (1996)]. A LIGHT-ról szintén kimutatták, hogy a herpeszvírus belépési elősegítőjéhez (HVEM) kapcsolódik, ami egy I. típusú membránon átnyúló fehérje, mely a TNFR család tagjaival szignifikáns homológiát mutat, azaz az aktivált CD4 és CD8 T-sejteken kifejeződnek [Mauri és mtsai: *Immunity*, 8, 21 (1998); Montgomery és mtsai: *Cell*, 87, 427 (1996)]. Az itt bemutatott eredmények alapján az LT β R jelátvitel és az LT β 2 α 1 és a LIGHT kapcsolódásával a HVEM jelátvitel megakadályozása az LT β R-Ig-nek a háromszorosan kezelt csoportban megfigyelt hatásáért valószínűleg felelős. Ezt a hipotézist úgy erősítettük meg, hogy az LCMV-13-mal fertőzött NZB egereket csak LT β R-Ig fúziós fehérjével kezeltük. Ebben a csoportban a túlélési arány (73%) majdnem olyan magas volt, mint a háromszorosan kezelt csoportban (3. ábra). Mindent egybevetve, ezek a bemutatott anyagok az első demonstrációja annak, hogy az LT β R és/vagy a HVEM jelátviteli út az akut letális betegségekben szerepet játszik, beleértve a szisztémás sokkot és a légzési nehézséget.

Az LT β blokkolási kezelés túlélésben játszott szerepének meghatározásához mind az NP118 specifikus T sejtek CD8/tetramer együttes festését, ami az NZB L^D rendszerben a domináns CD8 epitóp, mind a NP118 peptiddel stimulált lépsejtek interferon gamma termelésének intracelluláris festését az LCMV-13-mal fertőzött NZB egerek mintáin végrehajtottuk, ezeket az egereket kontroll ellenanyaggal, magában csak LT β R-Ig-vel vagy háromszorosan kezeltük. A 4. ábra az NP118 specifikus CD8 T-sejtek számának csökkenését mutatja be, ahol a háromszorosan kezelt egereknél mutatkozott a legnagyobb hatás. A kontroll ellenanyaggal kezelt egerekben a tetramer pozitív sejteknek csak 10 %-a termelt aktívan INF-gammát. Az LCMV-13 fertőzés alatt az anergikus T-sejteket korábban kimutatták, és ez nagy valószínűséggel az egerekben a virális antigén magas szintjének köszönhető (1. ábra). Nem csak az NP118 specifikus sejtek száma csökkent az LT β R-Ig-vel kezelt egerekben, hanem az INF-gammát termelő sejtek százaléka is. Ez a hatás a háromszorosan kezelt csoportban még kifejezettebb volt. Így lehetséges, hogy a CD8 kompartment az NZB LCMV-13 fertőzés letális válaszáinak forrása. Az a tény, hogy az aktivált CD8-ak LT β ₂ α ₁-et fejezik ki, ezzel a hipotézissel jó összhangban van [Abe és mtsai: Lymph. Cytok. Res., 11, 115 (1992); Ware és mtsai: J. Immunol., 149, 3881 (1992); Browning és mtsai: Cell, 72, 847 (1993)]. E megállapítás megerősítésére a fertőzött NZB egerekben a CD8 vagy a CD4 pozitív T-sejteket *in vivo* kimerítettük. (Hím NZB egereknek 2,5 x 10⁶ pfu Cl 13-at intravénásan adtunk be, amit

500 µg intraperitoneális injekciókban adott anti T-sejt ellenanyag követett. A Lyt2.43 mAb-t a CD8⁺ T-sejtek kimerítésére, míg GK1,5 (M1) ellenanyagot a CD4⁺ T-sejtek kimerítésére használtuk. Mindkét ellenanyagot a hibridóma felülűszó ammónium-szulfátos kicsapásával nyertük ki, majd ezután PBS-sel szemben dializáltuk. A kimerítés ellenőrzéséhez FACS analízist alkalmaztunk.) A CD4 T-sejtek kimerítése a túlélést nem növelte. Ezzel szemben a CD8 T-sejtek kimerítése 100 %-os túlélést eredményezett, és a betegség szimptomáinak hiányát, nem úgy mint az LTβR-Ig-vel kezelt egereknél (5. ábra). Mivel a CD8 kimerített egerek több szövetében a vírusok titere magasabb volt, mint a nem kezeltéknél, ezért valószínű, hogy a fellépő halál inkább a CD8 T-sejtek által közvetített toxikus immunválasz eredménye, mint a vírusfertőzés okozta szövetkárosodás következménye.

Beszámoltunk arról, hogy ha az NZB egereket magas dózisu LCMV-13-mal intravénásan fertőzzük, akkor akut, gyorsan fejlődő betegséget hívunk életre, mely számos jellemvonásában az Ebola, Marburg, Lassa, Dengue és a Sin Nombre fertőzésekre hasonlít. Ennek a betegségnek a letalitása a CD8⁺ T-sejtek jelenlététől függ, melyekről közismert, hogy aktiválásukkor TNFα-t, LTα-t és LTβ-t fejeznek ki. Bár ez egy biztató megfigyelés, mégis a vírusos fertőzés CD8 T-sejt kimerítéses kezelésével nem ajánlható. Az ilyen kezelések a beteget a megalkuvó fertőzésekkel szemben sérülékennyé teszik. Továbbá, mivel a víruskiürülés a CTL-ek jelenlétében valószínűtlen, ezért a beteg vírussal

szembeni toleranciájának elvesztési kockázata a CD8 kompartment újjáalakulásával tényleges veszély jelent. Kimutattuk, hogy az LT β R/HVEM útvonalak blokkolása LT β R-Ig adásával egy igen erőteljes kezelést jelent, mely természetében átmeneti, és a kezelés megszüntetésével a homeosztázis gyors visszaállásával jellemezhető [Mackay és Browning, nem publikált adat]. A túlélő egerek esetében, melyeket ilyen módon kezeltek, végül a vizsgált szövetekből a vírusok kiürültek (adatokat nem mutattuk be) és a továbbiakban a betegség jeleit nem mutatták.

Ezek az adatok először mutatják be, hogy LT β R jelátvitel az antivirális válaszban és a CD8 T-sejtek funkciójában fontos szerepet játszik. A limfotoxin rendszer a limfoid sejtek kifinomult hálózatával több kemokinen keresztül bensőséges kapcsolatban van, ami a T- és B-sejtek szerveződését irányítja [Chaplin és mtsai: Curr. Opin. Immunol., 10, 289 (1998); Cyster: kiadás alatt]. A folliculáris dendritikus sejtek funkcionális érési állapotát az állandó B-sejtes jelátvitel tartja fenn, és ezek a sejtek az LT β R jelátvitel abbahagyásának napján eltűnnek. Ezek a sejtek a B- és T-sejtek részére az antigén bemutatásában kritikus helyet foglalnak el. Ésszerű feltételezni, hogy az antigénbemutatás néhány vonása a CD8 sejtek felé vagy ezeknek a sejteknek az érés alatt a kemokin gradiens segítségével a megfelelő helyzetbe kerülése az LT β R jelátvitel megszakításával megakadályozható. Az LT funkció megelőző vizsgálata elsődlegesen a B-sejt biológián alapult és a T-sejtek részvételét nem láthattuk előre. Vagy az LT rendelkezik további funkciókkal, vagy ezek az adatok az új

LIGHT ligand szerepét tükrözik. Jelenleg a HVEM és a LIGHT betegségek kialakulásában játszott, itt dokumentált, szerepe nem tisztázott.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az antivirális válasz egyedben történő indukálására, azzal jellemezve, hogy az egyedbe olyan szer hatásos mennyiségének beadását foglalja magában, mely a limfotoxin- β receptorához történő kötődését blokkolja, és amely szer gyógyszerészetiileg elfogadható hordozót tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó szer az LT-béta-R blokkoló ágens.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó szer a limfotoxin- β receptor vagy az oldható limfotoxin- β receptor ellen kialakított ellenanyag.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy szóban forgó szer a limfotoxin- β receptor/Ig fúziós fehérje.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó szer az oldható limfotoxin- β vagy a limfotoxin- β ellen kialakított ellenanyag.

6. Eljárás az antivirális válasz egyedben történő indukálására, azzal jellemezve, hogy az egyedbe olyan szer hatásos mennyiségének beadását foglalja magában, mely a limfotoxin- β receptor és/vagy a HVEM jelátvitel útvonalát blokkolja.

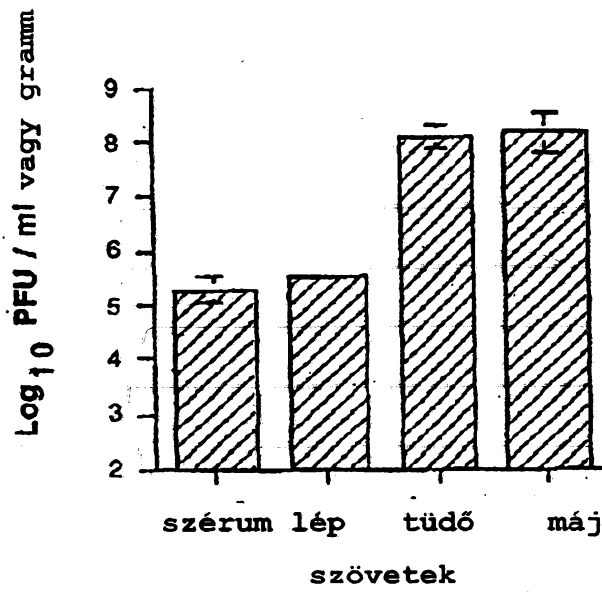
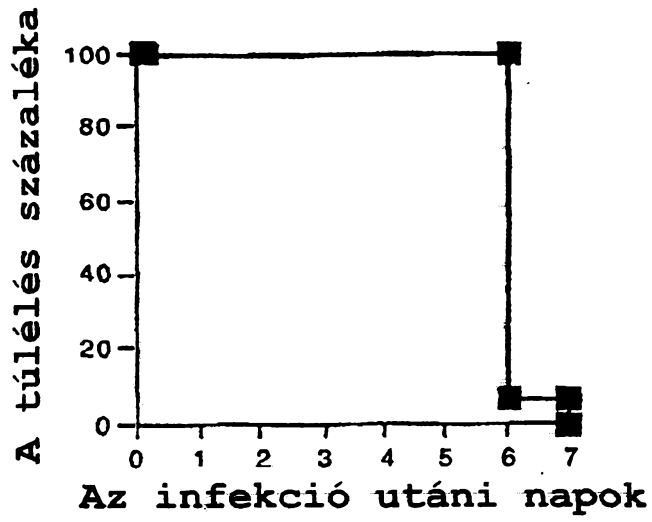
7. Az 1-től 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó egyed Sin Nombre, Ebola, Marburg, Lassa vagy Dengue vírussal fertőzött.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szer a limfotoxin- β receptor/Ig fúziós fehérje.

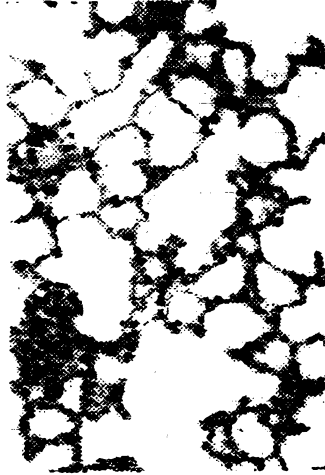
T. P. P.

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.H.C. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323

1. ÁBRA



2A. ÁBRA



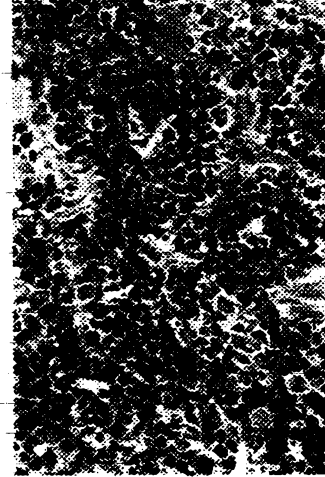
2B. ÁBRA



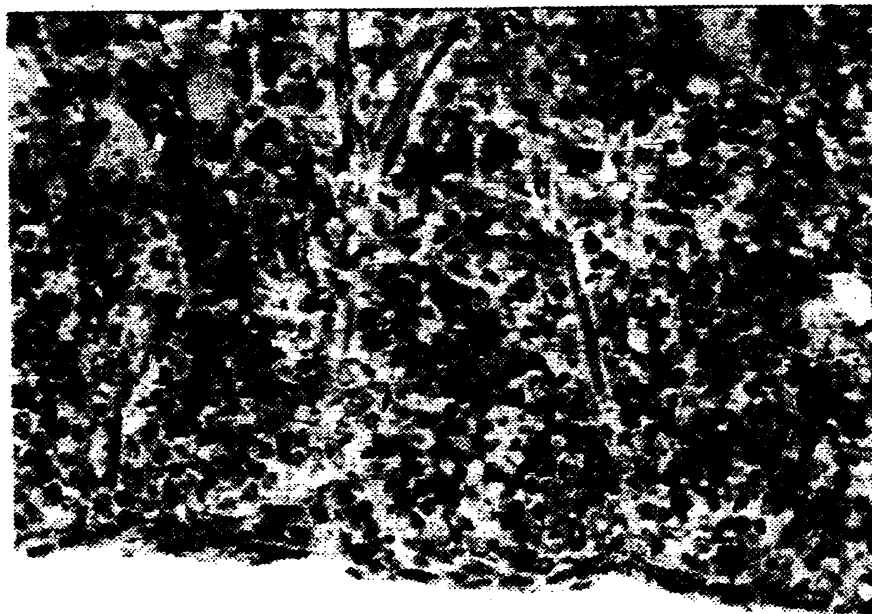
2C. ÁBRA



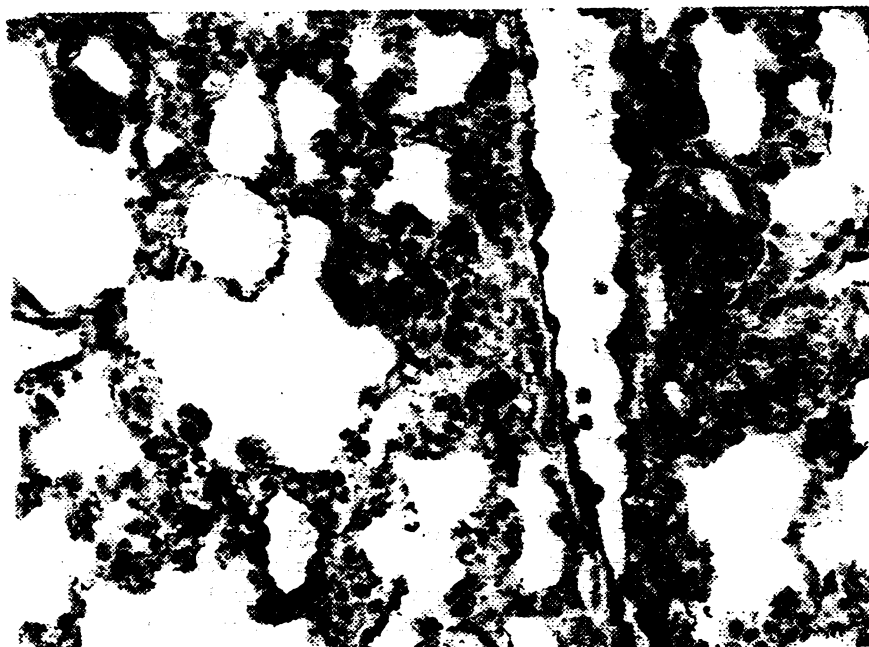
2D. ÁBRA



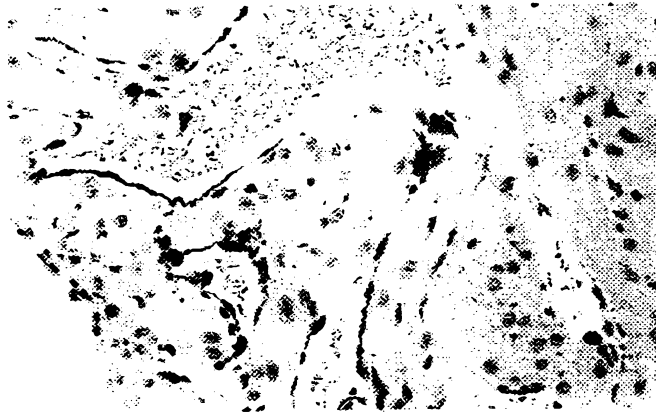
2F. ÁBRA



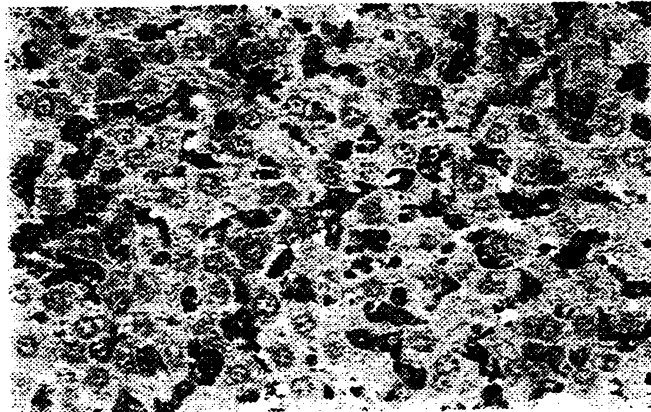
2E. ÁBRA



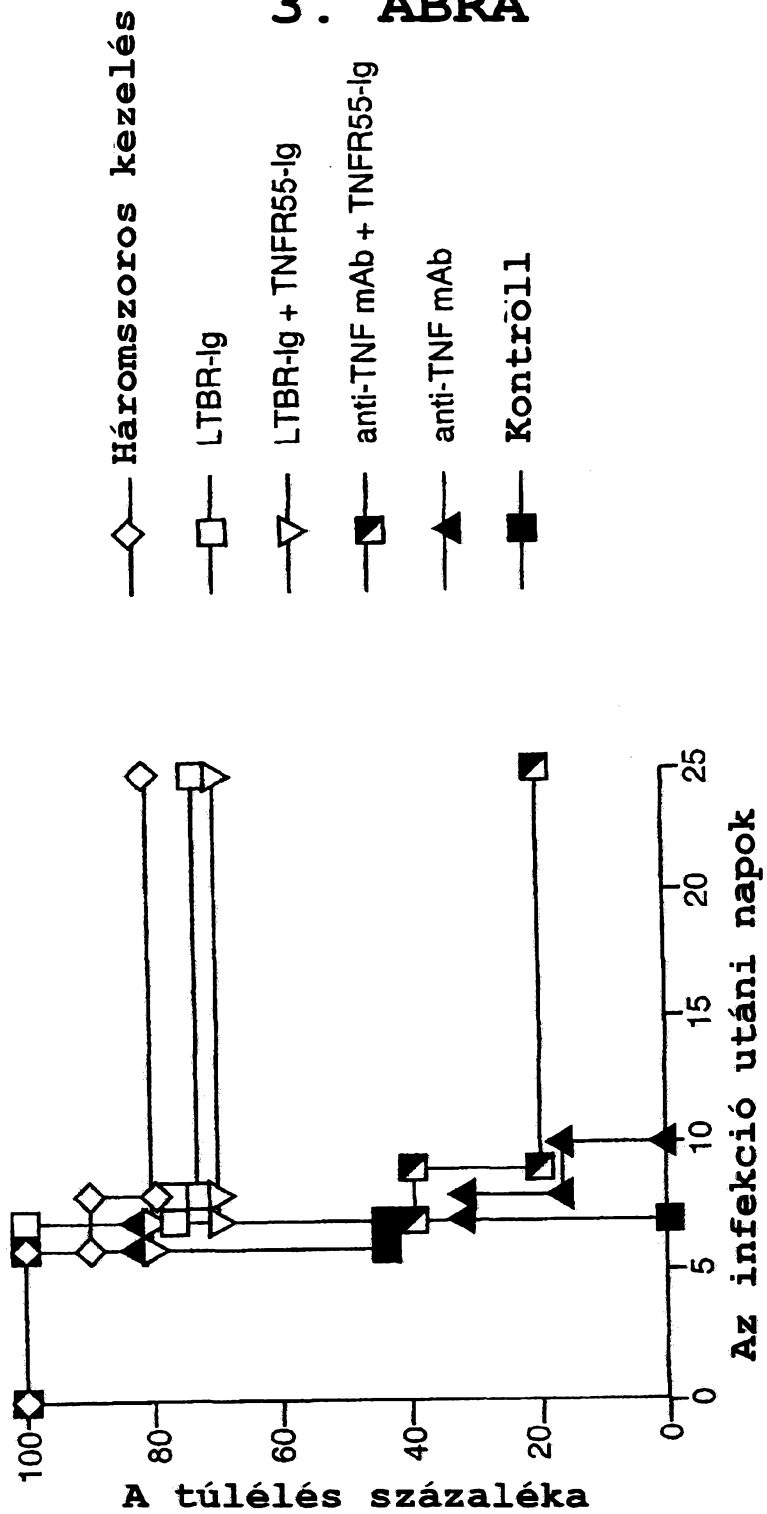
2G. ÁBRA



2H. ÁBRA

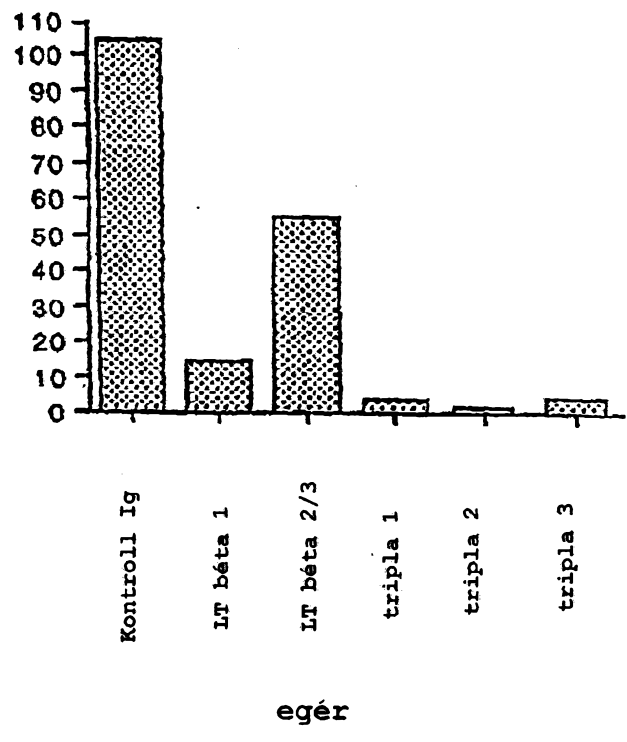


3. ÁBRA

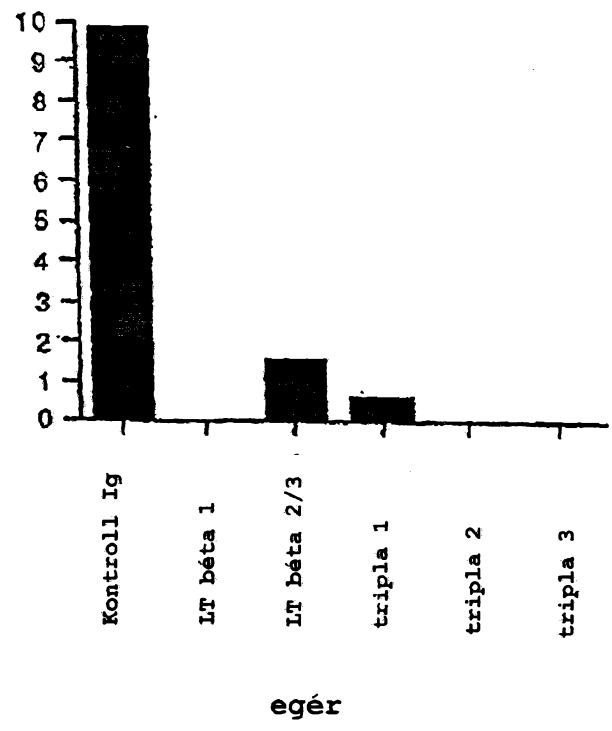


4. ÁBRA

Az NP 118 tetramer pozitív sejtek száma
($\times 10^3$) / 10^6 CD9 T sejt



Az NP118 specifikus interferon-gamma termelő
sejtek ($\times 10^3$) / 10^6 CD8 T sejt



5. ÁBRA

