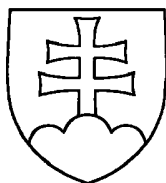


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

553-99

- (22) Dátum podania: 24.10.1997
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/029 060
(32) Dátum priority: 25.10.1996
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 09.10.2000
(86) Číslo PCT: PCT/US97/19436, 24.10.1997

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

A 61K 39/395
A 61K 38/17
A 61K 38/55
// C 07K 19/00
(A 61K 39/395,
A 61K 38:17)
(A 61K 38/55,
A 61K 38:17)

(71) Prihlasovateľ: BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Browning Jeffrey, Brookline, MA, US;
Hochman Paula Susan, Newton, MA, US;
Rennert Paul D., Holliston, MA, US;
MacKAY Fabienne, Watertown, MA, US;

(74) Zástupca: Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Činidlo blokujúce LT-β-R na použitie na zmenu imunitnej odpovede a farmaceutické prípravky obsahujúce tieto činidlá**

(57) Anotácia:
Opísané činidlo blokuje signálnu dráhu receptora lymfotoxínu-β, ktoré je vhodné na liečenie imunologických ochorení, najmä na potlačenie imunitnej odpovede sprostredkovanvej protilátkami, na reguláciu expzie tzv. adresínov, cielenie prenosu látok v bunke a na ovplyvnenie diferenciacie folikulárnych dendritických buniek. Ďalej je opísaný farmaceutický prípravok obsahujúci terapeuticky účinné množstvo činidla blokujúceho LT-β-R a terapeuticky účinné množstvo činidla blokujúceho CD40L na liečenie odvrhnutia štepu.

Činidlo blokujúce LT- β -R na použitie na zmenu imunitnej odpovede a farmaceutické prípravky obsahujúce tieto činidlá

Oblasť techniky

Vynález sa týka prípravkov obsahujúcich „činidlo blokujúce receptor lymfotoxínu- β “, ktoré blokuje signálnu dráhu lymfotoxínu- β . Činidlo blokujúce receptor lymfotoxínu- β je užitočné na liečenie imunologických ochorení, a najmä na potlačenie imunitnej odpovede sprostredkovanvej protilátkami, na reguláciu expresie tzv. adresínov a cielenie prenosu látok v bunke a na ovplyvnenie diferenciácie folikulárnych dendritických buniek. Vynález sa týka rozpustných foriem extracelulárnych domén receptora lymfotoxínu- β a protilátok namierených proti receptorom lymfotoxínu- β alebo ich ligandom, povrchovým lymfotoxínom, ktoré pôsobia ako činidlo blokujúce receptory lymfotoxínu- β .

Doterajší stav techniky

Existujú dva druhy získanej imunity, ktoré sú schopné spolupracovať pre dosiahnutie spoločného cieľa, čiže eliminácie antigénu, ale sú sprostredkované odlišnými zložkami imunitného systému s rôznymi účinkami. Jeden typ získanej imunitnej odpovede, imunita humorálna (látková) je sprostredkovaný prevažne B bunkami a cirkulujúcimi protilátkami. Druhý typ, označovaný ako bunková alebo bunkami sprostredkovaná imunita, je sprostredkovaná T bunkami, ktoré syntetizujú a spracovávajú cytokíny, ktoré pôsobia zase na ďalšie bunky.

Aktivácia a diferenciácia B buniek ako odpoveď na väčšinu antigénov vyžaduje, aby (1) B bunky prijali antigénny signál prostredníctvom svojich receptorov špecifických pre antigén, t. j. membránových Ig, a (2) B bunky prijali kontaktne závislé aj nezávislé signály od aktivovaných T buniek. Kontaktne závislý kostimulačný signál je dôsledkom väzby receptora CD40 na B bunkách s ligandom CD40 exprimovaným na aktivovaných pomocných („helper“) T bunkách (Laman a kol., Crit. Rev. Immunol. 16, 59-108, 1996; Van Kooten a Bancherou, Adv. Immunol. 61, 1-77, 1996). Kontaktne nezávislý prenos signálov je sprostredkovaný cytokínmi syntetizovanými a spracovávanými aktivovanými T bunkami. Tieto kontaktne nezávislé signály spoločne s kontaktne závislými signálmi smerujú diferenciáciu B buniek buď do (1) pamäťových B buniek pripravených sprostredkovať rýchlejšiu odpoveď v prípade sekundárnej expozície antigénu, alebo (2) plazmatické bunky secernujúce protilátky. Plazmatické bunky, ktoré predstavujú terminálne diferenciačné štádium B buniek, syntetizujú a secernujú protilátky.

Pomocné T bunky (Th) majú niekoľko významných úloh v imunitnom systéme. Bolo ukázané, že cytokíny produkované Th bunkami na počiatku imunitnej odpovede ovplyvňujú, ktoré imunitné efektorové bunky budú následne aktivované. Th bunky sú aktivované tým, že ich receptory špecifické pre antigén reagujú s bunkami prezentujúcimi antigén (APC), ktoré exponujú na svojom povrchu peptidové fragmenty alebo spracovaný cudzorodý antigén v spojení s molekulami MHC (hlavného histokompatibilného systému) II. triedy. Aktivované Th naopak secernujú cytokíny (lymfokíny), ktoré aktivujú príslušné imunitné efektorové mechanizmy.

Th bunky sa delia do troch podskupín Th0, Th1 a Th2 podľa toho, aké cytokíny secernujú (Fitch a kol., Ann. Rev. Immunol. 11: 29-48, 1993). Napríklad u myši nestimulované „naivné“ pomocné T bunky produkujú IL-2. Krátkodobá stimulácia vedie k premene na TH0 prekurzorovú bunku, ktorá produkuje rad

cytokínov vrátane IFN- α , IL-2, IL-4, IL-5 a IL-10. Trvalo stimulované Th0 sa môžu diferencovať buď na Th1 alebo Th2 bunky, v závislosti od zmeny typu exprimovaných cytokínov. Niektoré cytokíny sú uvoľňované ako Th1, tak aj Th2 bunkami (napríklad IL-3, GM-CSF a TNF). Iné cytokíny sú vytvárané výlučne jednou podskupinou Th buniek (Romagnani a kol., Ann. Rev. Immunol. 12: 227-257, 1994). Th1 bunky produkujú LT- α , IL-2 a IFN- γ , ktoré aktivujú makrofágy a zápalové odpovede spojené s bunkovou imunitou a odolnosťou proti intracelulárnym infekciám.

Th2 bunky produkujú cytokíny IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10. Cytokíny Th2 buniek zvyšujú produkciu eozinofilov a žírnych buniek a podporujú plný rozvoj a dozrievanie B buniek (Howard a kol., „T-cell derived cytokines and their receptors“, Fundamental Immunology, 3rd ed., Raven Press, New York, 1993). Th2 bunky sa podieľajú na vzniku pamäti B buniek, somatických mutácií a na afinitnom dozrievaní, a tiež na regulácii *de novo* prepínania izotypov imunoglobulínov. Tak napríklad cytokín IL-4 Th2 buniek prepína aktivované B bunky na izotyp IgG1 a pritom potláča iné izotypy. IL-4 tiež stimuluje nadprodukciu IgE v imunitnej reakcii pri precitlivenosti I. typu. Cytokín IL-5 Th2 buniek indukuje izotyp IgA, ktorý zohráva dôležitú úlohu v slizničnej (mukózovej) imunite.

Sekundárne lymfatické tkanivo, ako sú lymfatické uzliny (LN), slezina a lymfatické tkanivo sliznice, je veľmi účinné v zachytávaní a koncentrovaní cudzorodých látok, a je to tiež hlavné miesto, kde dochádza k aktivácii a diferenciacii T a B lymfocytov pod vplyvom antigénov. Tieto procesy sú závislé od diverzity a organizácie buniek v takých tkanivách, ktoré poskytujú rámec pre mnoho aspektov humorálnej imunitnej odpovede, ako je napríklad interakcia T a B buniek, vytváranie zárodočných (germinálnych) centier (GC), afinitné zrenie, prepínanie tried imunoglobulínov a bunkový prenos (Klein, J.,

Immunology, John Willey and Sons, 1982). Molekulárne mechanizmy zodpovedné za vývoj, udržovanie štruktúry a funkciu periférneho lymfatického tkaniva nie sú dosiaľ úplne známe.

Aj keď sa všeobecná štruktúra sekundárneho lymfatického tkaniva výrazne odlišuje medzi rôznymi druhmi cicavcov, detailná štruktúra sekundárneho lymfatického tkaniva vykazuje niektoré spoločné vlastnosti, ako je napríklad (1) dostupnosť antigénu, (2) štruktúrne vlastnosti zaisťujúce pokračujúci kontakt antigénu s lymfocytmi, (3) oblasti bohaté na T bunky obklopené B bunkami, (4) folikuly bohaté na B bunky, (5) miesta typu marginálnej zóny, (6) špecializované endotelové bunky a (7) miesta produkcie protilátok, čo bude ďalej ešte opísané podrobnejšie.

Sekundárne lymfatické tkanivo je prístupné pre antigén v systéme. Napríklad do sleziny antigén vstúpi prostredníctvom sínusového krvného zásobenia, do LN vstúpi prostredníctvom aferentných lymfatických ciev a do slizničného lymfatického tkaniva vstúpi transportom cez špecializovaný epitel.

Sekundárne lymfatické tkanivo rôznych druhov má spoločné tiež určité štruktúrne rysy, ako sú napríklad folikulárne dendritické bunky (FDC) a vmedzerené bunky (IDC), ktoré zaisťujú predĺženú prítomnosť antigénu v oblastiach tkanív bohatých na lymfocyty.

Ďalším spoločným rysom je existencia oblastí bohatých na T bunky obklopených B bunkami. K takýmto oblastiam bohatým na T bunky patria napríklad periarteriálne lymfatické pošvy v bielej dreni sleziny a parakortikálne oblasti v LN, ktoré obsahujú veľké počty recirkulujúcich T buniek v IDC, ktoré naopak fungujú ako sprievodné bunky pre T a B bunky.

Okrem toho, v lymfatickom tkanive, v bielej dreni sleziny a v kôre LN sú typické primárne a sekundárne folikuly bohaté na

B bunky. Sekundárne folikuly v takomto lymfatickom tkanive sa označujú tiež ako zárodočné centrá (GC) a majú hustú sieť FDC na zachytenie prítomných antigénov.

Oblasti typu marginálnej zóny sú zreteľne histologicky definované oblasti v myšej slezine a ako do určitej miery difúzne oblasti sa vyskytujú v ľudských sekundárnych lymfatických orgánoch. Tieto oblasti obsahujú hlavne makrofágy marginálnej zóny (MZM), metalofilné makrofágy (MM), B bunky marginálnej zóny a retikulocyty, ale môžu obsahovať aj T bunky a dendritické bunky (Kraal, Int. Rev. Cytol. 132, 31-74, 1992). Vyústenie arteriálneho krvného riečiska do oblastí marginálnych zón umožňuje priamy prístup antigénov k bunkám a podporuje bunkové reakcie na antigén v týchto miestach (Kraal, Int. Rev. Cytol. 132, 31-74, 1992). Prítomnosť MZM je tiež nevyhnutná pre optimálny prenos B buniek v bielej dreni sleziny (Kraal, 1992, Kraal a kol., Immunology, 68, 227-232, 1989).

Krvné lymfocyty typicky vstupujú do sekundárneho lymfatického tkaniva tak, že prekročia špecializovaný endotel, napr. endotelovú výstelku žiliek lymfatických uzlín (HEV), endotelovú výstelku krvných sinusov sleziny v marginálnej oblasti a podobné štruktúry. Tieto endotelové tkanivá exprimujú adhezívne molekuly a adresíny, ktoré účinkujú v prenose buniek v sekundárnom lymfatickom tkanive. Napríklad adresíny periférnych lymfatických uzlín (PNAd) sa odlišujú od adresínov slizničných lymfatických uzlín MAdCAM-1, ktoré sa podieľajú na prenose lymfocytov do slizničných lymfatických tkanív, ako sú napríklad mezenterické lymfatické uzliny, Peyerské pláty a lamina propria.

Nie všetky adresíny sú jasne definované, napríklad adresíny umožňujúce nasmerovanie do sleziny sú doposiaľ neznáme. K fyziologickým funkciám týchto adresínov patrí zvyšovanie doplnovania vhodných populácií antigénovo špecifických lymfocytov do imunitnej reakcie a následné

rozšírenie imunitnej reakcie v celom tele.

A nakoniec plazmatické bunky, čo sú plazmatické bunky produkujúce protilátky, sa vyskytujú na rôznych miestach, kde sú antigénom aktivované prekursorzy B buniek. Napríklad protilátky produkované plazmatickými bunkami v červenej dreni sleziny pochádzajú hlavne z B buniek aktivovaných v zónach T buniek, a plazmatické bunky v dreni LN pochádzajú z B buniek aktivovaných v zónach T buniek v tej istej uzline. Podobne protilátky produkované plazmatickými bunkami v kostnej dreni sú odvodené z B buniek aktivovaných v slezine a lymfatických uzlinách a plazmatické bunky v *lamina propria* pochádzajú hlavne z B buniek aktivovaných v mezenterických LN alebo v lymfatickom tkanive spojenom s črevom (pozri napríklad ICM MacLennan, „The Structure and Function of Secondary Lymphoid Tissue“, *Clinical Aspect of Immunology*, 4th ed., eds. P. J. Lachman, sir D. K. Peters, F. S. Rosen, M. J. Walport, Blackwell Scientific Publication, 13-30, 1993).

Všeobecne bunkové a histologické udalosti, ku ktorým dochádza pri humorálnej imunitnej odpovedi na T-závislé antigény, sú nasledujúce (Tollner a kol., *J. Exp. Med.* 183, 2303-2312, 1996). V indukívnej fáze sú naivné B a T bunky aktivované a vtiahnuté do imunitnej reakcie počas niekoľkých dní nasledujúcich po vstupe antigénu do tela. V slezine sa napríklad do 12 hodín po imunizácii na sekundárnu odpoveď pamäťové B bunky stretnú s antigénom neseným krvou v marginálnej zóne a ponechajú túto zónu, aby sa premenila na zónu T buniek. B bunky je možné detegovať v zóne T buniek do 24 hodín. Imunoglobulínové prepínacie transkripty sa dajú detegovať behom 12 hodín po sekundárnej expozícii antigénu, čo ukazuje, že už došlo k interakcii T a B buniek. B bunky potom migrujú do výstupovej zóny a červenej drene, kde proliferujú a vytvárajú ložiská nezrelých B buniek a diferencujú sa na plazmatické bunky. B bunky tiež pokračujú v proliferácii v zónach T buniek bohatých na IDC. Počas 4 dní po imunizácii a

po proliferácii v GC začne produkcia pamäťových B buniek. V primárnej odpovedi sú po 10 dňoch zreteľne dobre vyvinuté GC a maximálnu veľkosť dosahujú 14. deň po imunizácii.

Proliferácia T buniek v zónach T buniek je dokázaná po 48 až 72 hodinách a maximum dosahuje 7. deň po imunizácii. Proliferácia T buniek prispieva k aktivácii B buniek závislej od T buniek. Úroveň proliferácie v zónach T buniek sa zníži, keď sa vytvorí GC. Proliferácia T buniek v GC nastáva tiež vtedy, keď centrocyty (B bunky) v tmavej zóne prevezmú antigén od IDC a prezentujú antigén T bunkám v svetlej zóne.

Antigén závislý od T buniek môže aktivovať B bunky marginálnej zóny, novo vytvárané naivné B bunky a cirkulujúce lymfocyty vťahované do a udržiavané v sekundárnych lymfatických orgánoch prostredníctvom adhezívnych molekúl a adresínov. Naivné B bunky vykazujú rovnakú kinetiku pre prechod do zón T buniek a pod. ako aktivované B bunky.

Stála fáza imunitných odpovedí závislých od T buniek

Stála fáza imunitných odpovedí závislých od T buniek je udržiavaná pokračujúcou aktiváciou pamäťových B buniek vo folikuloch sekundárnych lymfatických orgánov. V tejto fáze je veľmi malý vstup nových naivných B buniek a odpoveď je založená predovšetkým na antigéne zachytenom na FDC. Na optimálne vytváranie pamäti, prepínanie izotypov, somatické mutácie a afinitné dozrievanie imunoglobulínov sú potrebné GC.

Táto lymfocytová odpoveď vedie k produkcii protilátok schopných cirkulovať v tele rôznymi cestami. Tak napríklad protilátky sa krvou dostanú zo sleziny a prostredníctvom eferentných lymfatických ciev opustia lymfatické uzliny. Protilátky sa tak hneď stretávajú a môžu sa viazať so vstupujúcim patogénom. Udalosť rozpoznania spustí kaskádu

imunitných efektorových mechanizmov, vrátane aktivácie komplementovej kaskády a bunkových reakcií na ochranu hostiteľa pred patogénom.

Protilátky hrajú dôležitú úlohu v niektorých patologických odpovediach známych ako precitlivenosti, čo sú nevhodné alebo neprimerané imunitné odpovede vyvolané po kontakte s už predtým rozpoznaným antigénom.

Existujú štyri typy precitlivenosti. Precitlivenosť I. typu, takzvaná „včasná precitlivenosť“, zahŕňa aktiváciu Th2 buniek indukovanú alergénom a uvoľnenie cytokínov typu Th2. Cytokín IL-4 stimuluje B bunky k zmene izotypu na produkciu IgE, čo aktivuje žírne bunky, a vzniká tak akútna zápalová reakcia, ktorá vedie napríklad k ekzému, astme alebo nádche.

Precitlivenosť II. a III. typu je spôsobená protilátkami IgG a IgM namierenými proti antigénom bunkového povrchu alebo špecifickým tkanivovým antigénom (II. typ) alebo rozpustným sérovým antigénom (III. typ), kedy sa vytvárajú cirkulujúce imunitné komplexy.

Precitlivenosť IV. typu, tzv. „neskorá precitlivenosť“ (DTH) je sprostredkovaná Th1 bunkami. Reakcia môže byť prenesená medzi pokusnými myšami Th1 bunkami, ale nie samotným bezbunkovým sérom (Roitt a kol., Immunology, s. 198.1-22.12, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3rd ed., 1993).

Patologické reakcie Th1 buniek sú spojené s mnohými orgánovo špecifickými a systémovými autoimunitnými stavmi, ako sú napríklad systémový lupus erythematoses, Wagnerova granulomatóza, polyarteriitis nodosa (PAN), rýchla progradujúca kosáčikovitá glomerulonefritída a idiopatická trombocytopenická purpura, a tiež chronické zápalové ochorenia ako je napríklad Gravesova a Chagasova choroba. Reakcia typu Th1 tiež prispieva k bunkovej imunite, ktorá spôsobuje

odhojenie štepu alebo orgánového transplantátu.

Liečenie takýchto rôznych imunologických stavov je založené na užití imunomodulačných a imunosupresívnych prípravkov. Tri v súčasnosti najpoužívannejšie imunosupresíva sú steroidy, cyklofosfamid a azatioprín.

Steroidy sú pleiotropné protizápalové látky, ktoré potlačujú aktivované makrofágy a inhibujú aktivitu buniek prezentujúcich antigén, a to takým spôsobom, že rušia mnohé patologické účinky T buniek. Cyklofosfamid, ktorý je alkylačné činidlo, pomáha bunkovej smrti tým, že inhibuje replikáciu a reparáciu DNA. Azatioprín je prípravok s antiproliferačným účinkom, ktorý inhibuje syntézu DNA. Tieto nešpecifické imunosupresíva sú spravidla podávané vo veľkých dávkach, čo zvyšuje ich toxicitu (napríklad nefro- a hepatotoxicitu) a spôsobuje mnohé vedľajšie účinky, nie sú preto vhodné na dlhodobú liečbu.

Existuje preto značná dosiaľ nenaplnená potreba ďalších prípravkov a terapií, ktoré by vyriešili problémy spôsobované pri liečení súčasnými prípravkami a postupmi.

Podstata vynálezu

Predkladaný vynález rieši vyššie naznačené problémy tým, že poskytuje farmaceutický prípravok a spôsob liečenia imunologických ochorení tak, že používa látku blokujúcu receptory lymfotoxínu- β (LT- β -R), a tým inhibuje signálnu dráhu receptorov lymfotoxínu- β . Prípravky a spôsoby obsahujúce látku blokujúcu LT- β -R sú mimoriadne vhodné na inhibíciu imunitnej odpovede sprostredkovanej protilátkami, na reguláciu expresnej hladiny adresínov a bunkový prenos, na ovplyvňovanie

diferenciácie folikulárnych dendritických buniek a na zmeny štruktúrnej organizácie sekundárneho lymfatického tkaniva a podobných lymfatických štruktúr vznikajúcich pri patologických stavoch, ako sú napríklad systémový *lupus erythematoses* a idiopatická trombocytopenická purpura.

Okrem toho, niektoré uskutočnenia predkladaného vynálezu sú vhodné na zmeny asociácie medzi imunitnými komplexmi a B bunkami. Konkrétne, spôsoby podľa predkladaného vynálezu môžu zabrániť prezentácii alebo depozícii antigénov na bunkách, alternatívne môžu v podstate rozpustiť alebo vyrušiť antigény už prítomné na bunkách.

V alternatívnom uskutočnení vynálezu je činidlo blokujúce LT- β -R vybrané zo skupiny obsahujúcej rozpustný lymfotoxín- β -R, protilátku namierenú proti LT- β -R a protilátku namierenú proti povrchovému ligandu LT.

Jedno uskutočnenie predkladaného vynálezu poskytuje rozpustné formy extracelulárnych domén receptora lymfotoxínu- β , ktoré pôsobia ako činidlo blokujúce LT- β -R. Vhodné prípravky a spôsoby podľa tohto uskutočnenia vynálezu obsahujú rekombinantný fúzny proteín receptora lymfotoxínu- β , v ktorom je extracelulárna väzbová doména LT- β -R pre ligand spojená s doménou Fc ľudského IgG.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu poskytuje protilátky, ktoré pôsobia ako činidlo blokujúce LT- β -R. Výhodne prípravky a spôsoby v tomto uskutočnení obsahujú jednu alebo viac protilátok namierených proti receptorom lymfotoxínu- β . Výhodnejšie protilátky sú monoklonálne protilátky namierené proti receptorom lymfotoxínu- β . Ďalší výhodný prípravok a spôsob v tomto uskutočnení obsahuje jednu alebo viac protilátok namierených proti povrchovému lymfotoxínu. Výhodnejšie je protilátka monoklonálna protilátka proti lymfotoxínu- β . Výhodné

protilátky podľa predkladaného vynálezu sú monoklonálne protilátky BDA8 proti ľudskému LT- β -R a B9 proti ľudskému LT- β .

Ďalšie uskutočnenie predkladaného vynálezu sa týka spôsobu, ako zmeniť humorálnu imunitnú odpoveď zvieráťa tým, že sa mu podá farmaceutický prípravok, ktorý obsahuje terapeuticky účinné množstvo činidla blokujúceho LT- β -R. V niektorých uskutočneniach vynálezu sa farmaceutický prípravok podáva v takom množstve, ktoré je dostatočné na pokrytie LT- β -R pozitívnych buniek na dobu 1 až 14 dní. Farmaceutický prípravok v niektorých uskutočneniach podľa vynálezu môže ďalej obsahovať farmaceuticky prijateľný nosič alebo adjuvans.

Ďalším uskutočnením vynálezu je spôsob inhibície signálnej dráhy LT- β -R bez toho, aby došlo k inhibícii signálnej dráhy TNF-R, a to pomocou činidla blokujúceho LT- β -R opísaného v predchádzajúcom texte. Predmetom predkladaného vynálezu je i spôsob liečenia, prevencie alebo eliminácie vírusu ľudskej imunodeficiencie u cicavcov, ktorý spočíva v tom, že sa podá činidlo blokujúce LT- β -R buď samotné, alebo spoločne s farmaceutickým nosičom alebo adjuvans, alebo spoločne s inými liekmi odborníkovi známymi a vhodnými na liečenie alebo zmiernenie príznakov HIV alebo AIDS.

Okrem toho sa predkladaný vynález týka tiež spôsobu liečenia v odbore transplantácií, t. j. odvrhnutia štepu. Niektoré uskutočnenia vynálezu sa týkajú súčasného podania činidla blokujúceho dráhu CD40 a činidla blokujúceho dráhu LT.

Podrobný opis vynálezu

V tejto časti je vynález ešte podrobnejšie opísaný, aby mohol byť úplne vysvetlený a pochopený.

Termín „imunoglobulínová odpoveď“ alebo „humorálna odpoveď“ sa v tomto texte používa na označenie imunitnej odpovede zvierata na cudzorodý antigén, pri ktorej zviera produkuje protilátky proti uvedenému antigénu. Trieda Th2 pomocných T buniek je dôležitá na produkciu protilátok s vysokou afinitou.

Termín „zárodočné centrum“ (alebo „germinálne centrum“) označuje folikul B buniek, ktoré sa vytvárajú po imunizácii antigénom. Objavenie sa takéhoto histologického miesta je vo vzťahu s optimálnym vytváraním pamäti, prepínaním izotypov, somatickou hypermutáciou afinitným dozrievaním imunitnej odpovede.

Termín „marginálna zóna“ alebo „oblasť marginálnej zóny“ sa týka histologicky opísaného kompartmentu sekundárneho lymfatického tkaniva obsahujúceho predovšetkým makrofágy marginálnej zóny (MZM), metalofilné makrofágy (MM), B bunky marginálnej zóny a retikulocyty, a tiež T bunky a dendritické bunky. Vyústenie arteriálneho krvného riečiska do oblasti marginálnych sínusov umožňuje priamy prístup antigénov k bunkám a podporuje bunkové reakcie na antigén v týchto miestach.

Termín „adresín“ označuje molekulu zúčastňujúcu sa nasmerovania prenosu lymfocytov do sekundárnych lymfatických orgánov. Takéto molekuly sa exprimujú na endotelových bunkách, na bunkách vysokého endotelu žiliek lymfatických uzlín. Adresíny sleziny zatiaľ nie sú známe. MAdCAM-1 je mukózový adresín, PNA_d je periférny adresín.

Termín „pomocná T bunka (Th bunka)“ označuje funkčnú podtriedu T buniek, ktoré pomáhajú generovať cytotoxické T bunky a ktoré spolupracujú s B bunkami a stimulujú tak tvorbu protilátok. Pomocné T bunky rozpoznávajú antigén v spojení s molekulami MHC II. triedy a poskytujú kontaktne závislé a kontaktne nezávislé (cytokíny) signály pre efektorové bunky.

Termín „cytokín“ v tomto texte znamená molekulu, ktorá sprostredkováva interakciu medzi bunkami. „Lymfokín“ je cytokín uvoľňovaný lymfocytmi.

Termín „Th1“ sa týka podtriedy pomocných T buniek, ktoré produkujú LT- α , interferón- γ a IL-2 (a ďalšie cytokíny) a ktoré vyvolávajú zápalovú reakciu v spojení s bunkovou (t. j. bez účasti imunoglobulínov) imunitnou odpoveďou.

Termín „Th2“ označuje podtriedu pomocných T buniek, ktoré produkujú cytokíny vrátane IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10, a ktoré sú spojené s imunoglobulínovou, t. j. humorálnou imunitnou odpoveďou.

Termín „doména Fc“ protilátky označuje časť molekuly obsahujúcu kĺbovú oblasť, doménu CH2 a CH3, ale neobsahuje miesto viažuce antigén. Termín sa tiež používa na označenie zodpovedajúcej oblasti IgM alebo protilátky iného izotypu.

Termín „protilátka anti-LT- β -receptor“ opisuje akúkoľvek protilátku, ktorá sa špecificky viaže k aspoň jednému epitopu na receptore LT- β .

Termín „protilátka anti-LT“ opisuje akúkoľvek protilátku, ktorá sa špecificky viaže k aspoň jednému epitopu na LT α , LT β , alebo komplexu LT- α/β .

Termín „signálna dráha LT- β -R“ („signalizácia LT- β -R“) označuje molekulárne reakcie spojené s celou metabolickou cestou prenosu signálu LT- β -R a ďalšie molekulárne reakcie, ktoré k nej vedú.

Termín „činidlo blokujúce LT- β -R“ označuje také činidlo, ktoré naruší väzbu ligandu na LT- β -R, zhlukovanie LT- β -R na bunkovom povrchu alebo signálnu dráhu LT- β -R, alebo ktoré

spôsobí zmenu v tom, ako je signál dráhy LT- β -R interpretovaný v bunke. Činidlo blokujúce LT- β -R, ktoré pôsobí v kroku väzby ligand-receptor, inhibuje väzbu LT ligandu na LT- β -R aspoň o 20 %. Príklady činidla blokujúceho LT- β -R zahŕňujú rozpustné molekuly LT- β -R-Fc a protilátky anti-LT- α , anti-LT- β , anti-LT- α/β a anti-LT- β -R. Výhodne protilátky nereagujú krížovo so secernovanou formou LT- α .

Termín „biologická aktivita LT- β -R“ znamená 1) schopnosť molekuly LT- β -R alebo jej derivátov súťažiť o rozpustný alebo povrchový LT ligand viažuci sa k rozpustnej alebo povrchovej molekule LT- β -R, alebo 2) natívnu aktivitu LT- β ako je schopnosť stimulovať regulačnú imunitnú odpoveď alebo všeobecne cytotoxickú aktivitu.

Termín „LT ligand“ znamená heteromérený komplex LT α/β alebo jeho derivát, ktorý sa špecificky viaže na receptor LT- β .

Termín „doména LT- β -R viažuca ligand“ alebo „väzbová doména LT- β -R pre ligand“ opisuje časť alebo časti LT- β -R, ktoré sa zúčastňujú špecifického rozpoznanie a interakcie s ligandom LT.

Termíny „povrchový LT“ a „povrchový LT komplex“ označujú komplex, skladajúci sa z podjednotky LT- α a podjednotky LT- β viazanej na membránu, vrátane mutovaných, pozmenených a chimérických foriem jednej alebo viacerých podjednotiek, pričom tento komplex je prezentovaný na povrchu bunky.

„Povrchový ligand LT“ znamená povrchový LT komplex alebo jeho derivát, ktorý sa špecificky viaže na receptor LT- β .

Termín „subjekt“ tu znamená zviera alebo jednu či niekoľko buniek pochádzajúcich zo zvierata. Výhodne je zviera

cicavec. Bunky sú v akejkoľvek forme, vrátane, ale nie výlučne, buniek obsiahnutých v tkanive, zhlukov buniek, imortalizovaných, transfekovaných alebo transformovaných buniek, a tiež buniek pochádzajúcich zo zvierata, ktoré bolo fyzikálne alebo fenotypovo zmenené.

Lymfotoxín- β : člen rodiny TNF

Cytokíny príbuzné s nádorovým nekrotickým faktorom (TNF - „tumor necrosis factor“) sa vyskytujú ako veľká rodina pleiotropných mediátorov zúčastňujúcich sa regulácie imunity a hostiteľskej obranyschopnosti. Členovia tejto rodiny sa vyskytujú vo forme viazanej na membránu, ktorá lokálne pôsobí prostredníctvom priameho medzibunkového kontaktu, alebo vo forme secernovaného proteínu, ktorý pôsobí na vzdialené ciele. Paralelná rodina receptorov príbuzných TNF reaguje s týmito cytokínmi a spúšťa tak rôzne metabolické dráhy vrátane bunkovej smrti, proliferácie, diferenciácie tkanív a zápalovej reakcie.

TNF, lymfotoxín- α , (LT- α , tiež nazývaný TNF- β) a lymfotoxín- β (LT- β) sú členmi rodiny TNF ligandov, ktorá zahŕňa tiež ligandy receptorov Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 a 4-1BB (Smith a kol., Cell 76: 959-962, 1994). Signálne dráhy niektorých členov TNF rodiny, vrátane TNF, LT- α , LT- β a Fas, môžu indukovať odumieranie nádorových buniek tým, že spôsobia nekrózu alebo apoptózu (programovanú bunkovú smrť). TNF a mnoho ďalších interakcií ligand-receptor TNF rodiny ovplyvňuje v netumorogénnych bunkách vývoj imunitného systému a imunitnú odpoveď na rôzne antigény.

Väčšina komplexov LT- α/β asociovaných s membránou (povrchových LT) má stechiometriu LT- α_1/β_2 (Browning a kol., Cell 72: 847-856, 1993, Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Povrchové LT ligandy sa neviažu na TNF-R s vysokou

afinitou a neaktivujú signálnu dráhu TNF-R. Iný receptor príbuzný TNF, nazývaný LT- β receptor (LT- β -R), viaže tieto povrchové lymfotoxínové komplexy s vysokou afinitou (Crowe a kol., Science 264: 707-710, 1994).

Aktivácia signálnej dráhy LT- β -R, podobne ako signálnej dráhy TNF-R, má antipólový účinok a môže mať cytotoxický účinok na nádorové bunky. V prejednávanej patentovej prihláške pôvodcov predkladaného vynálezu (prihláška US 08/378 968) sú opísané prípravky a spôsoby na selektívnu stimuláciu LT- β -R použitím činidla aktivujúceho LT- β -R. Agens aktivujúce LT- β -R je užitočný na inhibíciu rastu nádorových buniek, bez toho aby súčasne viedol k aktivácii zápalovej reakcie alebo imunoregulačnej dráhy aktivovanej TNF-R.

Súčasný výskum génového cielenia („gene targeting“) predpokladá úlohu LT- α/β vo vývoji sekundárnych lymfatických orgánov (Banks a kol., J. Immunol. 155, 1685-1693, 1995, DeTongi a kol., 1994, Matsumoto a kol., Science 271, 1289-1291, 1996). Žiadna z týchto vlastností nebola opísaná u myši s geneticky vyradenou funkciou („knock out“) TNF receptora (Erickson a kol., Nature 372, 560-563, 1994, Pfeffer a kol., Cell 73, 457-467, 1993, Rothe a kol., Nature 364, 798-802, 1993). Pôvodca nedávne definoval úlohu membránových komplexov LT- α/β vo vývoji sekundárnych lymfatických orgánov tým, že ukázal, že potomstvu myši, ktorým bola v priebehu gestácie injikovaná rozpustná forma LT- β -R fúzovaného s úsekom Fc ľudského IgG1 (LT- β -R-Ig) chýba väčšina lymfatických uzlín a vykazuje narušenú architektúru sleziny (Rennert a kol., 1996, Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs, J. Exp. Med. 184, 1999-2006). Iná štúdia dokázala, že transgénne myši s podobným konštruktom LT- β -R-Ig, ktorého expresia začala tri dni po narodení, mali lymfatické uzliny. Ale mali narušenú

architektúru sleziny a niekoľko markerov slezinovej marginálnej zóny sa neexprimovalo (Ettinger a kol., Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble LT- β -R/IgG1 fusion protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13102-7). Tieto údaje spoločne ukazujú, že tu existuje dočasná požiadavka na membránové funkcie LT pre sprostredkovanie účinkov na vývoj sekundárnych lymfatických orgánov, ale bez účinku na architektúru sleziny.

System TNF sa tiež zúčastňuje na vývoji sleziny. Bunky marginálnej zóny sleziny myši deficitných na TNF neexprimujú adhezióne markery alebo MAdCAM-1 (Alexopoulou a kol., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 228, 1996, Pasparakis a kol., 60th Int TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 239, 1996). Myšiam deficitným v TNF-R55 tiež chýba MAdCAM-1 (ale nie MOMA-1) v marginálnej zóne sleziny (Neumann a kol., J. Exp. Med. 184, 259-264, 1996, Matsumoto a kol., Science 271, 1289-1291, 1996).

Lymfatické tkanivo alebo tkanivo podobného typu nevzniká len v priebehu vývoja, ale aj pri určitých patologických stavoch, ako sú napríklad chronické zápal, v procese zvanom neolymfoorganogéza (Picker a Butcher, Annu. Rev. Immunol. 10, 561-591, 1992, Kratz a kol., J. Exp. Med. 183, 1461-1471, 1996). Tieto procesy sú zjavne ovplyvnené členmi rodiny TNF. U transgénnych myši s génom LT- α riadeným promótorom krysieho inzulínu (RIP-LT) sa vyvinuli chronické zápalové lézie s charakterom organizovaného lymfatického tkaniva (Kratz a kol., J. Exp. Med. 1183, 1461-1471, 1996, Picarella a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10036-10010, 1992).

Vyhodnotenie funkcie LT v priebehu imunitnej odpovede závislej od T buniek pomocou myši deficitných na LT- α ukázalo na nevyhnutnosť LT pre vytváranie GC, a zrejme tiež pre udržiavanie organizovanej štruktúry folikulárnych dendritických buniek (FDS) a pre imunitnú humorálnu odpoveď

(Banks a kol., J. Immunol. 155, 1685-1693, 1995, Matsumoto a kol., Science 271, 1289-1291, 1996, Matsumoto a kol., Nature 382, 462-466, 1996). Myši deficitné na TNF-R55 tiež nemajú FDC, nevyvíja sa u nich GC a nie sú schopné optimálnej imunitnej odpovede na ovčie červené krvinky (SRBC). To predpokladá, že TNF-R55 môže byť spúšťaný rozpustným signálom LT alebo TNF vo väčšine takých odpovedí (LeHir a kol., J. Exp. Med. 183, 2367-2372, 1996, Aflexopoulou a kol., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 228, 1996, Pasparakis a kol., 60th Int. TNF Congress, Eur. Cytokine Network, 239, 1996). Funkčná rola pre dráhu povrchového LT/LT- β -R v imunitnej humorálnej odpovedi nebola dosiaľ identifikovaná.

Receptor LT- β , člen rodiny receptorov TNF, špecificky viaže povrchové LT ligandy. LT- β -R viaže heteroméne LT komplexy (prevažne LT- α 1/ β 2 a LT- α 2/ β 1), ale neviaže ani TNF ani LT- α (Crowe a kol., Science 264, 707-710, 1994).

mRNA pre LT- β -R sa našla v ľudskej slezine, týmuse a ďalších orgánoch spojených s imunitou. Aj keď výskum expresie LT- β -R je len v počiatkovej fáze, profil expresie LT- β -R je podobný profilu p55-TNF-R, okrem toho, že LT- β -R chýba na T a B bunkách periférnej krvi a na líniiach T a B buniek.

Komplexy povrchových lyfotoxínov (LT) boli charakterizované v hybridómových T bunkách CD4⁺ (II-23.D7), ktoré exprimujú vysokú hladinu LT (Browning a kol., J. Immunol. 147, 1230-1237, 1991, Androlewicz a kol., J. Biol. Chem. 267, 2542-2547, 1992). Expresia a biologická funkcia LT- β -R, LT podjednotiek a povrchových LT komplexov sú opísané v prehľade Ware, C. F., „The ligands and receptors of the lymphotoxin system“, v: Pathways for Cytolysis. Current Topics Microbiol. Immunol. Springer-Verlag, s. 175-218, 1995.

Expresia LT- α je indukovaná a LT- α je primárne

secernovaný aktivovanými T a B lymfocytmi a zabíjačskými (NK, „natural killer“) bunkami. LT- α produkuje v rámci pomocných T buniek podskupina Th1, ale nie podskupina Th2 buniek. LT- α sa tiež našiel v melanocytoch. Mikroglie a T bunky v léziách u pacientov s roztrúsenou mozgovomiechovou sklerózou reagujú pozitívne s antisérom antiLT- α (Selmaj a kol., J. Clin. Invest. 87, 949-954, 1991).

Lymfotoxín- β (zvaný tiež p33) je exprimovaný na povrchu myších aj ľudských T lymfocytov, línií T buniek, línií B buniek a zabíjačských buniek aktivovaných lymfokínom (LAK). LT- β je predmetom už prejednávanych patentových prihlášok rovnakých pôvodcov ako predkladaný vynález PCT/US91/04588, publikovanej 9. januára 1992 ako dokument WO 92/00329, a PCT/US93/11669, publikovanej 23. júna 1994 ako WO 94/13808, na ktoré tu odkazujeme.

Povrchové LT komplexy sú exprimované primárne aktivovanými T lymfocytmi (pomocnými, Th1 i zabíjačskými bunkami) a B bunkami a zabíjačskými bunkami, ako sa dá ukázať analýzou pomocou FACS alebo imunohistologickou analýzou pomocou protilátok anti-LT-a alebo rozpustných fúzných proteínov LT- β -R-Fc. V prejednávanej prihláške rovnakého pôvodcu US 08/505 606 podanej 21. júla 1995 sú opísané prípravky a spôsoby používajúce rozpustné LT- β receptory a protilátky špecifické proti LT- β receptoru a ligand ako liečivo na liečenie imunitných chorôb sprostredkovaných Th1 bunkami.

Povrchové LT sa tiež našli na klonoch ľudských cytotoxických T lymfocytov (CTL), v aktivovaných periférnych mononukleárnych lymfocytoch (PML), lymfocytoch periférnej krvi aktivovaných IL-2 (LAK), periférnych B lymfocytoch aktivovaných buď mitogénom z *Phytolacca americana* alebo anti-CD40 (PL), a rôznych T a B buniek pochádzajúcich z lymfoidných nádorov. Zapojenie cieľových buniek nesúcich aloantigén špecificky

indukuje expresiu povrchových LT u klonov $CD4^+$ a $CD8^+$ CTL.

Pôvodca vynálezu opísal niekoľko imunologických funkcií povrchového LT a ukázal vplyv $LT-\alpha/\beta$ väzbového činidla na vyvolanie a charakter imunoglobulínovej odpovede, udržiavanie bunkovej organizácie sekundárneho lymfatického tkaniva vrátane účinku na diferenciačný stav folikulárných dendritických buniek a vytváranie germinálnych centier a tiež úroveň expresie adresínov, ktorá ovplyvňuje bunkový transport. Pôvodca tak definoval terapeutické využitie väzbových čindiel povrchových $LT-\alpha/\beta$ a $LT-\beta$ receptorov.

Až do predloženia tohto vynálezu nebol význam signálnej dráhy $LT-\beta-R$ pre humorálnu alebo imunogénnu odpoveď dobre vysvetlený. Pôvodcovia prvý krát v predkladanom vynáleze objavili, že činidlo blokujúce dráhu LT, buď $LT-\beta$, alebo $LT-\beta-R$, môže zmeniť humorálnu imunitnú odpoveď zvieráťa. Predkladaný vynález sa tak v širšom význame týka spôsobu, ako zmeniť humorálnu imunitnú odpoveď u zvieráťa, pričom tento spôsob obsahuje krok, kedy sa podá farmaceutický prípravok, ktorý obsahuje terapeuticky účinné množstvo činidla blokujúceho dráhu LT, výhodne blokátora $LT-\beta-R$.

Akokoľvek blokujúce činidlo sa môže použiť podľa vynálezu a odborník ľahko stanoví činidlo, ktoré blokuje $LT-\beta-R$. Tak napríklad takéto činidlo môže obsahovať malé molekulové inhibítory receptora, rozpustné receptory $LT-\beta$, protilátky namierené proti $LT-\beta-R$ alebo protilátky namierené proti povrchovému ligandu LT. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu blokujúce činidlo obsahuje rozpustný $LT-\beta-R$, ktorý má väzbovú doménu pre ligand, ktorá môže selektívne viazať povrchový LT ligand, a výhodnejšie, kde rozpustný $LT-\beta-R$ obsahuje Fc doménu ľudského imunoglobulínu.

V inom uskutočnení predkladaného vynálezu výhodné blokujúce činidlo obsahuje monoklonálne protilátky namierené proti LT- β -R, vrátane výhodných anti-ludských monoklonálnych protilátok BDA8 proti LT- β -R a B9 proti LT- β . Ešte výhodnejšie protilátky sú A1.D5.18 a A0.D12.10 a BB-F6. V niektorých prípadoch môže byť vhodnejšie použiť monoklonálne protilátky namierené proti myšiemu povrchovému LT ligandu.

..
.. Dlhodobá prezentácia antigénu na FDC je pravdepodobne veľmi dôležitá pri autoimunitných ochoreniach, kde kontinuálna aktivácia imunitného systému endogénnymi alebo autoantigénmi udržiava chorobu. Zachytenie imunitných systémov na FDC je znázornené na obrázku 7. Schopnosť odstrániť tieto imunitné komplexy z FDC by mohla slúžiť na redukcii imunitnej aktivácie a na utlmenie choroby alebo dokonca k zastaveniu postupu choroby. Takéto autoimunitné choroby, na ktorých sa podieľajú reakcie aberantnej protilátky sú zrejším cieľom pre inhibítory LT dráhy, aj keď aj autoimunitné choroby „klasicky“ sprostredkované T bunkami majú dosiaľ nerozpoznanú humorálnu zložku a môžu byť teda ovplyvnené.

..
.. Podobne na poli transplantáčnej medicíny odvrhnutie štepu alebo „choroba hostiteľ verzus štep a štep verzus hostiteľ“ vyžaduje prezentáciu antigénu, aby mohla pretrvávať. Mechanizmy tu popísané pre manipuláciu FDC sa môžu aplikovať tiež na problémy spojené s rozpoznávaním „nie-vlastného“, teda pri transplantáciách.

Okrem toho, kontinuálna prezentácia antigénu alebo udržiavanie antigénnej pamäti môžu hrať značnú úlohu v autoimunitných chorobách spôsobených tzv. molekulárnym mimikry. Napríklad imunitná reakcia na infekčný agens lymfkej choroby *Borelia burgdorferi* vedie k chorobe podobnej artritíde, pravdepodobne preto, že nejaký antigénny epitop v tejto baktérii je podobný nejakej normálnej zložke kíbu. Odstránenie antigénu lymfkej choroby viazaného na FDC môže zmierniť

artritídu indukovanú lymskou chorobou. takáto terapia y mohla byť vhodná tiež v iných prípadoch mimikry spojených s infekčným agens.

Pôvodca prekvapivo zistil, že podanie činidla blokujúceho LT- β -R je schopné interferovať s prezentáciou a/alebo depozíciou antigénov na folikulárnych dendritických bunkách. Typicky, B bunky rozpoznávajú antigény ako imunitné komplexy viazané na povrch folikulárnych dendritických buniek. Folikulárne dendritické bunky si môžu udržať antigén počas nešpecificky dlhej doby. Periodický kontakt s antigénom naviazaným na FDC tak môže byť spojený s udrzovaním pamäte B buniek. Takže spôsoby podľa predkladaného vynálezu sa týkajú mnohých chorôb, ktoré sú závislé od prezentácie antigénu na dendritických bunkách. Podanie blokujúceho činidla podľa vynálezu môže byť uskutočnené pred vnesením antigénu do zvieraťa a v tomto prípade blokujúce činidlo potom zabráni všetkým alebo aspoň časti depozícií antigénu na folikulárnych dendritických bunkách, čím sa zmierni alebo úplne odstráni imunitná odpoveď. Alternatívne sa blokujúce činidlo podľa vynálezu môže podať zvierati v okamžiku po tom, čo už folikulárne dendritické bunky na sebe antigén majú asociovaný. Spôsob podľa vynálezu v takom prípade môže zrušiť túto asociáciu, takže očakávaná imunitná odpoveď bude zmiernená alebo úplne odstránená. Takže spôsoby podľa predkladaného vynálezu zahrnujú úplnú alebo aspoň čiastočnú elimináciu imunitných komplexov už naviazaných na folikuloch B buniek alebo zabránenie, úplné alebo čiastočné, zachytenia imunitných komplexov vo folikuloch buniek.

Schopnosť rozrušiť asociáciu medzi antigén prezentujúcimi folikulárnymi dendritickými bunkami a imunitnými komplexmi sa zdá byť jedinečnou vlastnosťou dráhy LT- β . Tak napríklad anti-CD40 (MR-1) je jediný člen rodiny TNF a je tiež exprimovaný na folikulárnych dendritických bunkách. Dokázalo

sa, že podobne ako LT- β -R/Ig, tiež MR-1 zabraňuje tvorbe germinálnych buniek, ale neovplyvňuje expresiu markerov FDC. Anti-CD40-L na rozdiel od LT- β -R nezabraňuje zachyteniu imunitných komplexov na folikulárnych dendritických bunkách ani nie je schopný eliminovať imunitné komplexy už raz zachytené na folikulárnych dendritických bunkách. Okrem toho pôvodca ukázal, že anti-CD40-L neovplyvňuje prežívanie a/alebo udržiavanie skôr vzniknutých pamäťových B buniek.

Aj keď nie je známa podstata rozdielov medzi dopadom činidiel blokujúcich anti-CD40-L a LT- β -R, hypoteticky sa predpokladá, že CD40 poskytuje signály pre prežívanie B buniek. Avšak systém LT je kritický pre udržiavanie folikulárnych dendritických buniek v plne diferencovanom a funkčnom stave, t.j. v takom stave, ktorý je nevyhnutnou podmienkou reakcie zárodočných centier a vytvárania pamäťových B buniek a ich udržiavania. Takže blokovanie dráhy CD40 (CD40L) môže zabrániť vytváraniu pamäťových buniek, ale neovplyvní zásobu už raz vytvorených pamäťových buniek. Blokovanie dráhy LT na druhej strane zabráni nie len vytváraniu a udržiavaniu pamäťových B buniek, ale ovplyvní aj udržiavanie už skôr vytvorených pamäťových buniek.

Ďalšia možnosť využitia inhibície LT spočíva v ovplyvňovaní vírusov, ktoré vytvárajú zásobníky v kompartmente folikulárnych dendritických buniek (FDC). Dobrým príkladom takéhoto vírusu je HIV. Po vírusovej infekcii značné množstvo vírusu zostáva na FDC vo folikuloch B buniek v sekundárnych lymfatických orgánoch (Heathe a kol., 1995, „Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity“, Nature 377:740-4). Predpokladá sa, že vírus je v podobe komplexov buď s komplementom, alebo imunoglobulínom viazaný buď na Fc receptory, alebo komplementové receptory, alebo receptory oboch typov. Takže vírus využíva normálny mechanizmus imunitného systému na to, aby pozastavil antigénnu

pamäť na veľmi dlhú dobu. V priebehu choroby sa potom objavuje akútna infekcia lymfocytov primárne v týchto miestach. Vypočítalo sa, že počas asymptomatickej fázy infekcie je „pool“ vírusu v tomto kompartmente asi 10 x väčší ako koľko obsahujú T bunky a monocyty (Cavert a kol., 1997, „Kinetics of response in lymphoid tissue to antiretroviral therapy of HIV-1 infection“, Science 276: 940-6). V súčasných spôsoboch liečenia vírusovej infekcie HIV sa kombinujú mnohé antivírusové prípravky, aby sa znížilo celkové množstvo vírusu a aby sa zabránilo úniku rezistentných variantov. Obmedzenie tejto terapie spočíva v zlej kompliancii terapie a tiež v tom, že v priebehu týchto dlhých intervalov sa môže zvyškový vírus voľne vyvíjať a mutovať na rezistentné varianty, a tak zabrániť liečeniu. Zatiaľ čo celkové množstvo vírusu v kompartmente FDC je počas terapie mnohými prípravkami dramaticky znížené, prípravky samotné sú väčšinou namierené proti mechanizmu vírusovej replikácie a teda nie proti nereplikujúcemu sa vírusu na povrchu FDC. Takže rezervoár vírusu na FDC môže slúžiť ako inokulum pre opakované rozšírenie infekcie po zastavení podávania liekov. Okrem toho je známe, že FDC môžu premeniť neutralizovaný vírus na infekčnú formu vírusu, čo len ďalej podčiarkuje význam týchto buniek v patogenéze HIV.

Keďže inhibícia dráhy LT môže spôsobovať, že FDC uvoľní imunitné komplexy z bunkového povrchu, môže sa uvoľniť aj HIV v podobe imunitných komplexov. Bolo by žiaduce uvoľniť všetok HIV z tohto kompartmentu ešte pred začatím režimu terapie s niekoľkými kombinovanými prípravkami, lebo uvoľnený vírus by mohol byť buď ovplyvnený a odstránený z tela, alebo by bol citlivejší na podávané lieky. Takáto kombinácia by mohla viesť k podstatnému zníženiu celkového zvyškového vírusu na veľmi nízku hladinu a prípadne by mohla viesť k vyliečeniu. V takomto prípade by boli užitočné ako LT- β -R/Ig alebo blokujúce protilátky, a to buď proti ligandu, alebo proti receptoru. Predkladaný postup liečenia by mal zahŕňať začiatok podávania liekov a potom, počas niekoľkých ďalších dní, uvoľnenie

všetkých získaných vírusov jedným alebo opakovaným podávaním inhibítorov dráhy LT. Hneď ako raz dôjde k zníženiu množstva vírusu, ďalšie podávanie LT činidla už nie je potrebné.

Vírus HIV je mimoriadne dobre skúmaný príklad, ale je pravdepodobné, že aj iné vírusy sa môžu skrývať na FDC v pokojovom stave a čakať na situáciu, kedy dôjde k nejakému narušeniu imunitného systému a jeho zataženiu ďalšími antigénmi, a následne potom k uvoľneniu vírusu z FDC a jeho opätovnému rozšíreniu. Preto sa predkladaný vynález týka tiež akéhokoľvek prostriedku na inhibíciu dráhy LT, ktorý zabráni komplikáciám s vírusom viazaným na FDC.

Predkladaný vynález má značné dôsledky pre mnoho chorôb, ktoré sú závislé od prezentácie antigénu na dendritických bunkách a od odpovede vytváranej pamäťovými B bunkami. Monoklonálna protilátka namierená proti ľudskému LT- α zvaná AOD12 bola schopná dobre blokovat LT- α 1/ β 2 signálnu dráhu v porovnaní s väčšinou monoklonálnych protilátok proti ľudskému LT- α , a bola málo účinná proti samotnému LT- α . Takéto monoklonálne protilátky boli získané imunizáciou rozpustným ligandom LT- α 1/ β 2, čo viedlo k objaveniu protilátok s jedinečnou špecifickosťou. Okrem toho zastávame názor, že monoklonálne protilátky anti-LT- α so špecifickosťou namierenou proti LT- α 1/ β 2 komplexom možno nájsť len po takomto type imunizácie a nie po imunizácii samotným LT- α , a predstavujú teda jedinečnú triedu protilátok anti-LT- α .

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 je sekvencia extracelulárneho úseku ľudského LT- β receptora, ktorý kóduje väzbovú doménu pre ligand.

Obrázok 2 ukazuje imunohistochemickú analýzu sleziny myši, ktorá dostala opakované injekčné dávky fúzných proteínov LT- β -R-Ig alebo LFA-3-Ig a antigén.

Obrázok 3 ukazuje výsledky imunohistochemickej analýzy, ktorá dokazuje neprítomnosť germinálnych centier v slezine myši ošetrovaných LT- β -R-Ig a MR-1 (protilátka proti ligandu CD40) a prítomnosť folikulárnych dendritických buniek v slezine myši ošetrovaných len MR-1 bez LT- β -R-Ig. Fúzne proteíny a SRBC boli podávané rovnako ako pri obrázku 2.

Obrázok 4 je imunohistochemická analýza expresie adresínu, ktorá je zmenená v lymfatických uzlinách (LN) myši ošetrovaných *in utero* a ďalej po narodení LT- β -R-Ig.

Obrázok 5 je imunohistochemická analýza umiestnenia lymfocytov a expresie makrofágových markerov v mezenterických lymfatických uzlinách (LN) myši ošetrovaných (ako na obrázku 4) *in utero* a ďalej po narodení LT- β -R-Ig.

Obrázok 6 je imunohistochemická analýza ukazujúca, že ošetrovanie myši LT- β -R-Ig inhibuje protilátkovú odpoveď na SRBC.

Obrázok 7 predstavuje schematické zachytenie imunitných komplexov na FDC.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Materiál a metódy

Myši

Načasované brezivé myši Balb/c sa kúpili od firmy Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), sa chovali v obvyklých klietkach a zaobchádzalo sa s nimi v súlade s inštitucionálnymi smernicami. Proteíny receptora Ig sa injikovali do chvostovej žily (i.v.) brezivej myši. Potomstvo týchto myší a 5 týždňov staré samice myší Balb/c (zakúpené od Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) sa intraperitoneálne (i.p.) injikovali fúznymi proteínmi .

Fúzne proteíny a protilátky

Fúzne proteíny, ktoré obsahovali extracelulárnu doménu buď myšieho LT- β -R, ľudského TNF-R55 alebo ľudského LFA-3 (ktorý neviaže myšie CD2), fúzovanú ku kĺbovej oblasti, a domény C_H2 a C_H3 ľudského IgG1 sa pripravili, ako už bolo opísané (Force a kol., J. Immunol., 155, 5280-5288, 1995, Miller a kol., J. Exp. Med., 178, 211-222, 1993). Purifikovaný ľudský IgG1 použitý ako kontrola sa zakúpil od firmy Protos Immunoresearch (San Francisco, CA). MR1, protilátka proti myšiemu CD40 ligandu sa zakúpila od firmy Pharmigen (San Diego, CA).

Prottilátky (MOMA-1, ED3) špecifické pre markery exprimované myšími metalofilnými makrofágmi (MM), (ED3 rozpoznáva sialoadhezín), alebo špecifické pre myšie retikulárne fibroblasty (ER-TR-7) sa zakúpili od firmy Serotec (Oxon, UK). Prottilátky špecifické pre myši B220, CD4 a MadCAM-1 (MECA 367) sa zakúpili od firmy Pharmigen (San Diego, CA). Prottilátku špecifickú pre marker exprimovaný makrofágmi marginálnej zóny myši poskytol Dr. Reina Mebius (Vrije

Universiteit, Amsterdam). Protilátky (FDC-M1 a FDC-M2) špecifické pre myšie folikulárne dendritické bunky (FDC) boli opísané už skôr (Marda a kol., J. Immunol. 148, 2340-2347, 1992). Anti-myšiu protilátku CR1 (ktorá značí aj FDC) láskavo poskytol Dr. Randolph J. Noelle (Dartmouth Medical School). Na detekciu adresínu periférnych lymfatických uzlín (PNAd) sa používala protilátka MECA 79 (supernatant pochádzajúci z buniek zakúpených od ATCC, Rockville, MD).

Antigény a imunizácia

Myši sa imunizovali i.p. so 100 μ l 10 % suspenzie SRBC (zakúpené od firmy Colorado Serum Company), čo je ekvivalent $1-5 \times 10^4$ SRBC na imunizáciu.

Imunohistochemické analýzy

Slezina a lymfatické uzliny sa zmrazili v zalievacom médiu OCT (Miles, Elkhart, IN) a upevnili sa na rezanie na kryostate. Rezy hrubé 7-10 μ m sa sušili a fixovali acetónom. Rezy sa inkubovali s konjugovanými protilátkami 1 hodinu pri teplote miestnosti v zvlhčenej komôrke po tom, čo sa protilátky nariedili pufrom A, fyziologickým roztokom pufrovaným Tris (TBS-A, 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween-20 (V/V), 0,25 % hovädzi sérový albumín (BSA)), potom sa rezy opláchli v TBS-B (0,5 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20) a fixovali 1 minútu v metanole pred zahájením enzymatickej reakcie. Aktivity chrenovej peroxidáza (HRP) a alkalickéj fosfatázy (AP) sa vyvíjali pomocou substrátovej súpravy s tabletkami DAB (Sigma, St. Louis, MO) s 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfátu/tetrazólium-nitromodrá (BCIP/NBT, Sigma). Tkanivové rezy sa fixovali 5 minút v metanole a kontrastne farbili podľa Giemxy (Fluka, Buchs, Švajčiarsko).

Obrazová fluorescenčná analýza

Na imunofluorescenciu sa zmrazené rezy fixovali acetónom, sušili na vzduchu a vopred blokovali 5 µg/ml anti-CD16/CD32 Fc blokujúceho činidla (Pharmigen, San Diego, CA) vo fyziologickom roztoku pufrovanom Tris s 0,25 % BSA, 0,05 % Tween-20 a 10 % králičím sérom agregovaným zahriatím. Rezy sa značili v rovnakom pufri pomocou nasledujúcich mAb (monoklonálnych protilátok) a detekčných reagensov: 10 µg/ml biotinylovaná anti-B220 mAb (Pharmigen) nasledovaná 20 µg/ml streptavidín-FITC (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), 10 µg/ml MECA 367 nasledovaná 10 µg/ml PE-kozí F(ab')₂ anti-kryší IgG (Southern Biotechnology Associates), supernatant z tkanivovej kultúry MECA79 nasledovaný 20 µg/ml FITC-myší anti-kryší IgM (Pharmigen), 20 µg/ml anti-sialoadhezín mAb nasledovaná 10 µg/ml PE-kozí F(ab')₂ anti-kryší IgG (Southern Biotechnology Associates), 50 µg/ml biotinylovaná PNA (Vector Laboratories, Burlingame, CA) nasledovaná 10 µg/ml streptavidín-PE (Southern Biotechnology Associates), 1:5 nariadená mAb zo supernatantu bunkovej kultúry MOMA-1, nasledovaná 20 µg/ml FITC-myším anti-kryším IgM (Pharmigen). Niektoré rezy sa značili niekoľkými mAb súčasne, aby bola možná viacvrstváva obrazová analýza. Všetky rezy sa pozorovali pri zväčšení 50x a fotografovali sa pomocou Ektachrome P1600 (Kodak, Rochester), alebo sa zachytávali ako oddelené červené a zelené obrazové súbory, ako už bolo skôr opísané (Renner a kol., J. Exp. Med., november 1996, v tlači).

Hemaglutinačné testy

Sériové riedenia séra sa uskutočnili na 96-jamkových mikrotitračných doštičkách (Costar, Cambridge, MA) v PBS/1%

glukóza. Titer SRBC-špecifického IgM sa určoval pridaním 25 μ l 10 % SRBC suspenzie do každej jamky a inkubáciou doštičky 1 hodinu vo zvlhčovanom inkubátore pri 37 °C. Pre SRBC-špecifický IgG sa séra inkubovali 30 minút pri 37 °C s 20 μ l/jamku 1 % merkaptoretanolu (o/o) (Bio-Rad, Richmond, CA), aby sa vylúčili IgM pentaméry. Potom sa pridalo 25 μ l/jamku 10 % suspenzie SRBC, nasledované 25 μ l/jamku 10 mg/ml roztoku (v PBS/1 % glukóza) kozieho anti-myšieho IgG (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) ako krížovo viažuceho činidla na hemaglutináciu. Titer sa určoval ako obrátená hodnota posledného riedenia séra, pre ktoré je jasne zjavná hemaglutinácia.

Testy ELISA

Na analýzy receptor-Ig v plazme sa používali mAb špecifické pre myši LT- β -R (Browning a kol., pripravovaný rukopis), LFA-3 (Miller a kol., J. Exp. Med., 178, 211-222, 1993) alebo doménu CH3 ľudského IgG₁ (CDG5, pripravené v Biogene), priamo imobilizované na 96-jamkových mikrotitračných doštičkách na vychytávanie a oslí anti-ľudský IgG₁-chrenová peroxidáza (HRP) na detekciu (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, riedenie 1:4000).

Produkcia rozpustných molekúl LT- β -R

Činidlo blokujúce LT- β -R podľa jedného uskutočnenia tohto vynálezu obsahuje molekulu LT- β receptora. Obrázok 1 ukazuje sekvenciu extracelulárneho úseku ľudského LT- β -R, ktorá kóduje doménu viažucu ligand. Na základe znalosti sekvencie (obrázok 1) a pomocou postupov rekombinantných DNA v odbore dobre známych, sa dá klonovať funkčný fragment domény viažucej ligand do vektoru a potom exprimovať vo vhodnej hostiteľskej bunke a

tak produkovať rozpustnú molekulu LT- β -R. Rozpustné molekuly LT- β -R, ktoré súťažia s natívnymi LT- β receptormi o LT ligand v teste opísanom vyššie, sa vyberú ako činidlo blokujúce LT- β -R.

Rozpustné LT- β receptory obsahujúce sekvenciu aminokyselín vybranú zo sekvencie uvedenej na obrázku 1 sa môžu pripojiť k jednej alebo viacerým heterologickým proteínovým doménam („fúzne domény“), aby sa zvýšila *in vivo* stabilita receptorového fúzneho proteínu, alebo aby sa modulovala jeho biologická aktivita alebo lokalizácia.

Výhodne sa na vytvorenie receptorových fúznych proteínov používajú plazmatické proteíny, ktoré majú typicky polčas obehu väčší ako 20 hodín. Takéto plazmatické proteíny sú napríklad (ale vymenovanie nie je obmedzujúce) imunoglobulíny, sérový albumín, lipoproteíny, apolipoproteíny a transferín. K doméne viažucej ligand sa môžu tiež pripojiť sekvencie, ktoré zacielia rozpustnú molekulu LT- β -R do určitého typu bunky alebo tkaniva, aby sa vytvoril špecificky lokalizovaný rozpustný fúzny proteín LT- β -R.

Buď celý LT- β -R, alebo funkčný úsek z jeho extracelulárnej domény obsahujúci doménu viažucu ligand, sa môže fúzovať s konštantným úsekom imunoglobulínu, napríklad s Fc doménou ťažkého reťazca ľudského IgG1 (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Rozpustné fúzne proteíny receptor-IgG sú výhodné, sú bežným imunologickým reagens a spôsoby ich prípravy sú v odbore dobre známe (pozri napríklad US patent č. 5 225 538, na ktorý tu odkazujeme).

Funkčná doména viažuca ligand z LT- β -R sa môže fúzovať s Fc doménou imunoglobulínu (Ig) odvodeného od imunoglobulínu inej triedy alebo podtriedy ako IgG1. Fc domény protilátok patriacich do odlišných tried alebo podtried môžu aktivovať odlišné druhotné efektorové funkcie. K aktivácii dôjde, keď sa

Fc doména naviaže na vhodný receptor. Druhotné efektorové funkcie zahrnujú napríklad schopnosť aktivovať komplement, krížovo reagovať s placentou alebo viazať rôzne mikrobiálne proteíny. Vlastnosti rôznych tried a podtried imunoglobulínov sú opísané v Roitt a kol., *Immunology*, s. 4.8, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. vyd., 1993).

Aktivácia komplementu iniciuje kaskádu enzymatických reakcií, ktoré sprostredkovávajú zápalovú reakciu. Jednotlivé produkty komplementu majú rôzne funkcie vrátane pútania baktérií, endocytózy, fagocytózy, cytotoxicity, produkcie voľných radikálov a solubilizácie imunitných komplexov.

Enzymová kaskáda komplementu je aktivovaná Fc doménami protilátok IgG1, IgG3 a IgM s naviazanými antigénmi. Fc doména IgG2 sa zdá byť menej účinná a domény IgG4, IgA, IgD a IgE sú úplne neúčinné v aktivácii komplementu. Takže sa dá vybrať Fc doména v závislosti na tom, či s ňou spojená druhotná efektorová funkcia je žiaduca pre určitú imunitnú odpoveď alebo chorobu, ktorá je pomocou fúzneho proteínu LT- β -R-Fc liečená.

Pokiaľ by bolo výhodné poškodiť alebo usmrtiť cieľové bunky nesúce LT ligand, treba vybrať pre fúzny receptorový proteín zvlášť aktívnu Fc doménu (IgG1). Pokiaľ by bolo žiaduce zacieliť fúzny proteín LT- β -R-Fc na bunku, bez toho, aby sa aktivoval komplement, vyberie sa neaktívna Fc doména IgG4.

Mutácie v Fc doméne, ktoré redukujú alebo úplne eliminujú väzbu Fc na receptor a aktiváciu komplementu, boli opísané (Morrison, S., *Annu. Rev. Immunol.* 10:239-265, 1992). Tieto mutácie, či už samostatných, alebo v kombinácii, sa dajú využiť na optimalizáciu aktivity Fc domén použitých na vytvorenie proteínu LT- β -R-Fc.

Produkcia rozpustného ľudského fúzneho proteínu obsahujúceho sekvencie viažuce ligand fúzované s Fc doménou

Iudského imunoglobulínu (hLT- β -R-Fc) je opísaná v príklade 1. Jedna línia buniek CHO vytvorená podľa príkladu 1, ktorá secernuje hLT- β -R-Fc, je nazvaná „hLT β R; hG1 CHO 14“. Vzorka bola deponovaná v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v súlade s Budapeštianskou dohodou dňa 21. júla 1995 pod prístupovým číslom CRL11965.

Produkcia rozpustného myšieho fúzneho proteínu LT- β -R-Ig je opísaná v príklade 2. Bunková línia CHO pripravená podľa príkladu 2, ktorá secernuje LT- β -R-Ig je nazvaná „mLT; R-hG1 CHO 1.3. BB“. Vzorka tejto línie bola deponovaná v American Type Culture collection (ATCC, Rockville, MD) v súlade s Budapeštianskou dohodou dňa 21. júla 1995 pod prístupovým číslom CRL11964.

Všetky obmedzenia týkajúce sa dostupnosti týchto deponovaných vzoriek pre verejnosť budú zrušené ihneď potom, čo budú dané záruky udelenia patentu na túto prihlášku.

Rôzne aminokyselinové zvyšky tvoriace spojovací bod vo fúznom proteíne receptor-Ig ovplyvňujú štruktúru, stabilitu a teda aj konečnú biologickú aktivitu rozpustného LT- β receptorového fúzneho proteínu. Jedna alebo viac aminokyselín sa môže pridať k C-koncu vybraného fragmentu LT- β -R, a tak je možné modifikovať spojovací bod vo vybranej fúznej doméne.

Tiež N-koniec fúzneho proteínu LT- β -R sa môže pozmeniť tým, že sa mení poloha, v ktorej sa vybraný fragment LT- β -R štiepi na svojom 5'-konci, aby sa mohol vložiť do rekombinantného vektora. Stabilita a aktivita každého fúzneho proteínu LT- β -R sa testuje a optimalizuje pomocou rutinných testov a tiež pomocou testov na výber činidla blokujúceho LT- β -R, ako je popísaný v tejto prihláške.

Na základe sekvencie domény LT- β -R viažucej ligand vnútri

extracelulárnej domény, ktorá je ukázaná na obrázku 1, sa môžu vytvárať rôzne sekvenčné varianty, aby sa modifikovala afinity rozpustného LT- β receptora alebo fúzneho proteínu k LT ligandu. Rozpustné molekuly LT- β -R podľa vynálezu môžu súťažiť o naviazanie povrchového LT ligandu s endogénnymi receptormi LT- β -R na povrchu buniek. Dá sa predpokladať, že akákoľvek rozpustná molekula obsahujúca doménu LT- β -R viažucu ligand, ktorá súťaží s povrchovými bunkovými receptormi LT- β o naviazanie LT ligandu, je blokujúce činidlo v zmysle predkladaného vynálezu.

Zdroj protilátok proti ľudskému LT- β -R

V inom uskutočnení tohto vynálezu protilátky namierené proti ľudskému LT- β receptoru (protilátka anti-LT- β -R) pôsobia ako činidlo blokujúce LT- β -R. Protilátky anti-LT- β -R podľa predkladaného vynálezu sú buď polyklonálne, alebo monoklonálne protilátky a je možné ich modifikovať tak, aby sa dosiahla optimálna schopnosť blokovat' signálnu dráhu LT- β -R, ich biologickú dostupnosť *in vivo*, stabilitu alebo iné žiaduce znaky.

Polyklonálne protilátkové sérum proti ľudskému LT- β receptoru sa pripraví konvenčným spôsobom tak, že sa zvierajú ako napríklad koza, králik, potkan, škrečok alebo myš subkutánne injikuje ľudským fúznym proteínom LT- β -R-Ig (príklad 1) v kompletnom Freundovom adjuvans, a potom nasleduje druhá (spúšťacia) intraperitoneálna alebo subkutánna injekcia s neúplným Freundovým adjuvans. Polyklonálne sérum obsahujúce požadované protilátky sa testuje obvyklým imunochemickým spôsobom.

Myšie monoklonálne protilátky proti ľudskému fúznemu

proteínu LT- β -R-Fc sa pripravia tak, ako už bolo opísané v prejednávanej prihláške pôvodcu č. US 08/505 606 podanej 21. júla 1995. Hybridómová bunková línia BD.A8.AB9, ktorá produkuje myšiu monoklonálnu protilátku BDA8 namierenú proti ľudskému LT- β -R, bola deponovaná v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v súlade s Budapeštianskou dohodou dňa 12. januára 1995 pod prístupovým číslom CRL11964. Všetky obmedzenia týkajúce sa dostupnosti týchto deponovaných vzoriek pre verejnosť budú zrušené ihneď potom, čo budú dané záruky udelenia patentu na túto prihlášku.

Rôzne formy protilátok anti-LT- β -R sa môžu tiež pripraviť štandardnými technikami rekombinantných DNA (Winter a Milstein, Nature 349: 293-299, 1991). Napríklad sa dajú vytvoriť chimérické protilátky, v ktorých sú domény viažuce antigén zo zvieracej protilátky spojené s ľudskou konštantnou doménou (Cabilly a kol., US 4,816,567, Morrison a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851-6855, 1984). Pri klinickom použití sa pozorovalo, že chimérické protilátky redukujú imunitnú reakciu vyvolanú zvieracími protilátkami použitými u človeka.

Okrem toho sa môžu syntetizovať aj rekombinantné „humanizované protilátky“ rozpoznávajúce LT- β -R. Humanizované protilátky sú chimérické molekuly obsahujúce väčšinou sekvencie ľudského IgG, do ktorých sa vložili úseky zodpovedajúce za špecifickú väzbu antigénom (napríklad WO 94/04679). Zvieratá sa imunizujú požadovaným antigénom, zodpovedajúca protilátka sa potom izoluje a odstráni sa variabilný úsek zodpovedný za špecifickú väzbu s antigénom. Úsek, odvodený zo zvieracej molekuly, zodpovedný za špecifickú väzbu s antigénom, sa potom klonuje do vhodného miesta v géne ľudskej protilátky, z ktorého sa odstráni oblasť špecificky viažuca antigén. Humanizované protilátky minimalizujú použitie heterológnych (medzidruhových) sekvencií v ľudských protilátkach, a teda s omnoho menšou pravdepodobnosťou vyvolávajú nežiaducu imunitnú odpoveď

ošetreného.

Rôzne triedy rekombinantných protilátok proti LT- β -R sa môžu pripraviť ako chimérické alebo humanizované protilátky obsahujúce variabilné domény protilátok LT- β -R a ľudské konštantné domény (CH1, CH2, CH3) izolované z rôznych tried imunoglobulínov. Tak napríklad protilátky anti-LT- β -R-IgM so zvýšenou valenciou miest viažucich antigén sa dajú pripraviť metódami rekombinantných DNA tak, že sa klonuje miesto viažuce antigén do vektora, ktorý obsahuje konštantnú oblasť ľudského μ -reťazca (Arulanandam a kol., J. Exp. Med. 177: 1439-1450, 1993, Lane a kol., Eur. J. Immunol. 22: 2573-78, 1993, Traunecker a kol., Nature 339: 68-70, 1989).

Navyše možno použiť štandardné techniky rekombinantných DNA, aby sa zmenila afinita väzby rekombinantných protilátok s antigénom, a to tým, že sa menia aminokyseliny susediace s väzbovým miestom. Afinitu k antigénu u humanizovaných protilátok možno zvýšiť mutagenezou založenou na molekulárnom modelovaní (Queen a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033, 1989, WO 94/04679).

Môže tiež byť žiaduce zvýšiť alebo znížiť afinitu protilátok anti-LT- β -R podľa typu cieľového tkaniva alebo v závislosti od predpokladaného liečebného pokusu. Tak napríklad z profylaktických dôvodov môže byť vhodné ošetrovať pacienta tak, že sa použije konštantná hladina anti-LT- β -R so zníženou schopnosťou prenášať signál v signálnej dráhe LT- β -R. Inhibičné anti-LT- β -R so zvýšenou afinitou k LT- β -R môžu byť zase vhodné na krátkodobé ošetrovanie.

Zdroj protilátok proti povrchovým LT ligandom

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka prípravkov a

spôsobov, ktoré obsahujú protilátky namierené proti LT ligandom, ktoré pôsobia ako činidlo blokujúce LT- β -R. Rovnako ako sa opisuje vyššie pre protilátky anti-LT- β -R, protilátky proti LT ligandom účinné ako činidlo blokujúce LT- β -R sú polyklonálne alebo monoklonálne a môžu sa modifikovať rutinnými postupmi, aby sa modulovali ich väzbové vlastnosti a imunogénnosť.

Protilátky namierené proti homoméryným (LT- β) alebo heteroméryným (LT- α/β) komplexom zloženým z jednej alebo viac LT podjednotiek sa môžu vytvoriť a testovať na aktivitu blokujúcu LT- β -R. Výhodne sa ako antigén použije komplex LT- α 1/ β 2. Ako bolo už spomenuté vyššie, je výhodné, keď sa výsledné anti-LT- α 1/ β 2 protilátky viažu s povrchovým LT ligandom a nereagujú krížovo so secernovaným LT- α ani nemodulujú aktivitu TNF-R.

Produkcia polyklonálnych proti-ludských protilátok LT- α je opísaná v už podanej patentovej prihláške pôvodcu SO 94/13808. Tiež monoklonálne protilátky anti-LT- α a anti-LT- β boli publikované (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995).

Myšie anti-ludské monoklonálne protilátky anti-LT- β sa pripravili postupom opísaným v pojednávanej patentovej prihláške pôvodcu WO 94/13808. Hybridómová bunková línia B9.C9.1, ktorá produkuje myšie anti-ludské monoklonálne protilátky anti-LT- β , bola deponovaná v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v súlade s Budapeštianskou dohodou dňa 21. júla 1995 pod prístupovým číslom HB11962.

Škrečie anti-myšie monoklonálne protilátky anti-LT- α/β BB.F6 sa pripravili postupom opísaným v už podanej patentovej prihláške pôvodcu WO 94/13808. Hybridómová bunková línia BB.F6.1, ktorá produkuje škrečie protimyšie protilátky anti-

LT- α/β , bola deponovaná v American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) v súlade s Budapeštianskou dohodou dňa 21. júla 1995 pod prístupovým číslom HB11963. Všetky obmedzenia týkajúce sa dostupnosti týchto deponovaných vzoriek pre verejnosť budú zrušené ihneď potom, čo budú dané záruky udelenia patentu na túto prihlášku.

Použitie rozpustných LT β -R-Ig na inhibíciu imunologických funkcií povrchového komplexu LT

Teraz sme ukázali účinky povrchového LT väzbového činidla, fúzneho proteínu tvoreného extracelulárnou doménou myšieho LT β -R a kĺbovým úsekom, domén CH2 a CH3 ľudského IgG1 (LT β -R-Ig), na vznik a charakter imunoglobulínovej odpovede, na udržanie bunkovej organizácie sekundárnych lymfoidných tkanív vrátane účinku na stav diferenciácie folikulárných dendritických buniek a formáciu zárodočných centier, a na expresné hladiny adresínu, ktoré majú vplyv na pohyb buniek.

Opakované injekcie LT β -R-Ig myšiam pozmeňujú organizáciu lymfocytov v slezine a expresiu funkčných markerov v bunkách marginálnej zóny sleziny

Skúmal sa účinok povrchovej blokády LT na štruktúru sleziny tým, že sa myšiam podalo v šiestich po sebe idúcich týždňoch celkom šesť injekcií LT β -R-Ig. Myši sa potom imunizovali so SRBC a 4 dni neskôr sa im podala ďalšia injekcia LT β -R-Ig. Myši sa usmrtili 10. deň po injekcii SRBC. Imunohistochemické značenie zmrazených rezov sleziny odhalilo niekoľko histologických zmien. Folikuly, ktoré obsahujú u normálnych myši kompartment splenických B buniek, nie sú po ošetrení LT β -R-Ig už ďalej zreteľne vymedzené. Miesto toho sú B

bunky teraz organizované v difúznom páse obklopujúcom oblasti T buniek (obrázok 2B) a hranica medzi zónami T a B buniek je rozrušená (obrázok 2B). Na rozdiel od toho u kontrolných myší ošetrovaných LFA-3-Ig sú folikuly B buniek v slezine oddelené a je jasné ohraničenie medzi oblasťami T a B buniek.

U myší ošetrovaných $LT\beta$ -R-Ig chýba expresia markerov bunkového povrchu rozpoznávaných monoklonálnymi protilátkami ER-TR-9 a MOMA-1 u dvoch odlišných populácií makrofágov, ktoré sídla v marginálnej zóne sleziny. Je známe, že ER-TR-9 značí marker na MZM (Dijkstra a kol., Immunol., 55,23-30, 1985) a MOMA-1 značí marker na metalofilých makrofágoch (Kraal a Janse, Immunol., 58, 665-669, 1986) (obrázok 2 D, F). Tieto markery sa exprimujú na bunkách u kontrolne (LFA-3-Ig) ošetrovaných myší. Expresia sialoadhezínu, ďalšieho markeru MOMA-1+ makrofágov u myší v splenickej marginálnej zóne, u myší ošetrovaných $LT\beta$ -R-Ig tiež chýba (dáta nie sú uvedené).

Protilátka MECA-376 viaže adhezívnu molekulu a slizničný adresín MAdCAM-1, pôvodne opísaný na endotelových bunkách Peyerských plátov, mezenterických lymfatických uzlinách, sliznici a lamina propria čriev (Briskin a kol., Nature, 363, 461-464, 1993, Nakache a kol., Nature, 337, 179-181, 1989). Expresia MAdCAM-1 sa zistila v marginálnej zóne sleziny (pravdepodobne exprimované na endotelových bunkách malých terminálnych arteriol otvárajúcich sa do sinus marginalis) a na retikulárnej sieťke v zárodočných centrách (Kraal a kol., Am. J. Pathol., 147, 763-771, 1995) (obrázok 2G). Značenie MECA 367 rezov z myší ošetrovaných $LT\beta$ -R-Ig ukázalo, že expresia MAdMAC-1 bola v slezine potlačená (obrázok 1H).

Podobne je abnormálne rozložené značenie protilátkou ER-TR-7 (Van Vliet a kol., Cytochem., 34, 883-890, 1986), ktoré vykresľuje populáciu retikulárnych fibroblastov v marginálnej zóne (obrázok 2I), a je silnejšie v bielej dreni zvierat

ošetrených $LT\beta$ -R-Ig ako LFA-3-Ig (obrázok 2J). Zmeny pozorované u myši ošetrených $LT\beta$ -R-Ig nezáviseli od expozície antigénu, lebo vzorec značenia sa zhodoval s neimunizovanými myšami ošetrenými $LT\beta$ -R-Ig (dáta neuvedené).

V slezinách myši ošetrených $LT\beta$ -R-Ig je odstránené vytváranie zárodočných centier a folikulárne dendritické bunky nie sú detegované

Aby sa určilo na histologickej úrovni, či opakované injekcie $LT\beta$ -R-Ig myšiam ovplyvňujú imunitnú odpoveď na SRBC, uskutočnila sa analýza tvorby zárodočných centier (GC) a distribúcie folikulárnych dendritických buniek (FDC) ako odpoveď na antigénový podnet („antigen priming“). Zmrazené rezy sleziny z myši, ktoré boli vopred ošetrené niekoľko krát $LT\beta$ -R-Ig alebo LFA-3-Ig, ako bolo opísané na obrázku 2, sa označili arašidovým aglutinínom (PNA), aby sa vyznačila GC, a protilátkou FDC-M1, aby sa detekovala FDC, bunková zložka vyžadovaná na tvorbu GC (Schriever a Nadler, *Adv. Immunol.*, 51, 243-284, 1992, Tew a kol., *Immunol. Rev.*, 117, 185-211, 1990). Tiež sa dokázalo, že pre tvorbu GC je kritická interakcia ligandov CD40-CD40 (Foy a kol., *J. Exp. Med.*, 180, 157-163, 1994). Na porovnanie bola skupina myši ošetrená s MR-1, anti-myšou protilátkou ligandu CD40, nasledujúcim injekčným protokolom, o ktorom sa už skôr dokázalo, že inhibuje tvorbu GC (Han a kol., *J. Immunol.*, 155, 556-567, 1995). 10 dní po podnete SRBC sa u myši ošetrených kontrolným proteínom LFA-3-Ig vyvinuli v slezine početné GC zvýraznené PNA (obrázok 3A). GC sa nedetegovali v slezine myši ošetrených $LT\beta$ -R-Ig alebo MR1 (obrázok 3 B, C). Ale účinok MR1 a $LT\beta$ -R-Ig sa môže rozlíšiť dvoma ďalšími pozorovaniami značenia na FDC (FDC-M1) v GC (obrázok 3D) chýba v slezine myši ošetrených $LT\beta$ -R-Ig (obrázok 3E), ale je stále prítomné v slezine myši ošetrených MR1

(obrázok 3F). Podobné pozorovania sa uskutočnili pomocou protilátky FDC-M2 na označenie FDC (dáta neuvedené). Tak ošetrovanie LT β -R-Ig má za následok fenotypové zmeny FDC v slezine a zlyhanie tvorby GC.

Okrem označenia GC, PNA tiež značí marginálnu zónu v slezine normálnych myší. Takéto značenie sa tiež pozorovalo u myší ošetrovaných LFA-3-Ig (obrázok 3A) a MR1 (obrázok 3C), ale chýbalo v slezine myší ošetrovaných LT β -R-Ig (obrázok 3B).

Ukázalo sa, že expresia sialoadhezínu, MOMA-1, ER-TR-9, ER-TR-7 a MAdCAM v slezine myší ošetrovaných MR1, bola tiež normálna (dáta neuvedené), čo ďalej odlišovalo molekulárne účinky interferencie so signalizáciou CD40 a LT β -R.

Kinetika alterácií vyvolaných LT β -R-Ig v organizácii lymfocytov sleziny a expresia markerov buniek marginálnej zóny

Analyzoval sa počet injekcií LT β -R-Ig vyžadovaných na ovplyvnenie organizácie lymfocytov a expresie markerov buniek marginálnej zóny v slezine. Myši sa injikovali i.p. LT β -R-Ig buď raz alebo niekoľkokrát, ako je uvedené v tabuľke 1. Niektoré myši sa potom imunizovali aj SRBC v deň poslednej injekcie LT β -R-Ig. Na zmrazených rezoch zo slezín ošetrovaných myší sa hodnotila expresia B220 a CD4 na B a T bunkách a značenie s PNA (pre GC) a MECA367 (pre MAdCAM-1), MOMA-1, ER-TR-9 a FDC-M1. Ukázalo sa, že kinetika vymiznutia značenia metalofilných makrofágov, makrofágov marginálnej zóny, MAdCAM-1, GC a FDC je rozdielna.

Jedna injekcia LT β -R-Ig stačí na elimináciu značenia MAdCAM-1 o týždeň neskôr. Po troch injekciách LT β -R-Ig v týždenných intervaloch nie sa nedeteguje značenie na GC a FDC a

kompartmenty lymfocytov T/B sú rozrušené. Na zrušenie značenia metalofilných makrofágov sú potrebné najmenej štyri injekcie $LT\beta$ -R-Ig. Šesť injekcií $LT\beta$ -R-Ig neodstráni úplne značenie makrofágov marginálnej zóny protilátkou ER-TR-9 (tiež zobrazené na obrázku 2D).

Presnejšia analýza rýchlej inhibície značenia MOMA-1, MAdCAM, FDC-M1, FDC-M2 a CR1 po jednej injekcii $LT\beta$ -R-Ig sa uskutočňovala v neprítomnosti antigénu (tabuľka 2).

Tabuľka 1: Účinok LT β -R-Ig na organizáciu sleziny a tvorbu zárodočných centier ako odpoveď na SRBC u dospelých myši

počet injekcií LT β -R-Ig	Organizácia buniek	T/B Metalofilné makrofágy*	Makrofágy marginálnej zóny	Expresia MAdCAM-1*	Zárodočné centrá [§]	FDC*
0	normálna	+++	+++	+++	+++	+++
1	normálna	++	+++	-	+	-
2	mierne abnormálna	+	+++	-	+	+/-
3 ^Δ	porušená	+	++	-	N	N
4 ^Δ	porušená	+/-	++	-	N	N
5 ^Δ	porušená	-	+	-	N	N
6	porušená	-	+/-	-	-	-

Myši sa injikovali i.p 100 µg LTβ-R-Ig každý týždeň 1 až 5 týždňov, a potom sa usmrtili. LTβ-R-Ig sa podával pred injekciou SRBC i.p. (100 µl 10 % suspenzie), ak nie je uvedené inak, a posledná injekcia LTβ-R-Ig sa podávala v rovnaký deň ako antigén. Zvieratá sa usmrtili 10 dní po injekcii SRBC. Zmrazené rezy sleziny sa dvojito značili s biotinylovanou krysou anti-myšou B220 a krysou anti-myšou CD4, nasledované streptavidín-alkalickou fosfatázou a myšou anti-krysou Ig-peroxidázou. Splenické rezy sa tiež značili nasledujúcimi anti-myšimi protilátkami: krysou proti makrofágom marginálnej zóny (ER-TR9), krysou proti metalofilným makrofágom (MOMA-1), krysou proti MAdCAM-1 (MECA 367) a krysou proti FDC (FDC-M1), nasledované myšou anti-krysou Ig-peroxidázou. Ďalšia série zmrazených rezov sa značila s biotinylovaným arašidovým aglutinínom (PNA-biotin), nasledované značením so streptavidín-peroxidázou na detekciu zárodočných centier. Pozorovania sa uskutočňovali na rezoch z aspoň troch zvierat v skupine.

* - Intenzita značenia sa určovala okom: normálne značenie +++, znížené značenie ++, slabé značenie + a žiadne značenie -. Intenzita značenia na rezoch z neošetrených zvierat a zvierat ošetrených s LFA-3-Ig sa použila ako referenčná pre normálne značenie.

§ - Počet zárodočných centier na rez sleziny je zaznamenaný nasledovne: > 10 +++, 5-10 ++, 1-5 +, žiadne -.

Δ - Zvieratá z týchto skupín nedostali SRBC. N - neuskutočnené.

Tabuľka 2: Presné načasovanie účinku $LT\beta$ -R-Ig na zančenie MOMA-1, MAdCAM-1, CR1, FDC-M1 a FDC-M2

	dni po jednej injekcii $LT\beta$ -R-Ig							
	0	1	3	5	7	10	14	
MOMA-1*	+++	+++	+++	+++		++	++	+
MAdCAM-1*	+++	+/-	-	-	-	-	-	
CR1*	+++	+++	++	++	++	++	+	
FDC-M1*	+++	+/-	-		-	-	-	-
FDC-M2*	+++	+/-	-	-	-	-	-	

Myši Balb/c, 5-6 týždňov dostávali jednu i.p. injekciu 100 μ g $LT\beta$ -R-Ig alebo ľudského Ig. Myši z každej skupiny boli usmrtené v deň 0, 1, 3, 5, 7, 10 a 14. Zmrazené rezy sleziny sa značili nasledujúcimi protilátkami: krysou proti myším metalofilným makrofágom (MOMA-1), krysou anti-myši MAdCAM-1 (MECA 367), krysou anti-myši FDC (FDC-M1), krysou anti-myši FDC (FDC-M2) a biotínom značenou krysou anti-myši CR1, nasledované myšou anti-krysou Ig-peroxidázou (MOMA-1, MAdCAM-1, FDC-M1 a FDC-M2) alebo peroxidázou značeným streptavidínom (CR1).

* - Intenzita značenia sa určovala okom: normálne značenie +++, znížené značenie ++, slabé značenie + a žiadne značenie -. Intenzita značenia na rezoch z neošetrených zvierat a zvierat ošetrených s LFA-3-Ig slúžila ako referenčná pre normálne značenie. Analyzovali sa rezy z aspoň 2 zvierat na skupinu.

Myši Balb/c, ktoré dostali jednu i.p. injekciu $LT\beta$ -R-Ig, boli usmrcované každý deň počas 14 dní po injekcii a ich sleziny sa vyňali a zmrazili. Zmrazené rezy sleziny sa značili s MOMA-1, anti-MAdCAM (MECA-367) a FDC špecifickými reagensiami: protilátkami FDC-M1, FDC-M2 a anti-CR1. Jeden deň po injekcii $LT\beta$ -R-Ig sa výrazne znížilo značenie s reagensiami anti-MAdCAM, FDC-M1 a FDC-M2 (tabuľka 2). Rýchlejšia inhibícia značenia FDC-M1 v tomto pokuse v porovnaní s výsledkami opísanými v tabuľke 1 môže byť spôsobená intenzitou značenia FDC-M1, ktorá je silnejšia u imunizovaných zvierat. Značenie na CR1 bolo detekovateľné stále po 14 dňoch, čo svedčilo o tom, že FDC boli stále prítomné 3. deň po ošetrovaní s $LT\beta$ -R-Ig, ale že bola potlačená expresia markerov detekovaných s FDC-M1 a FDC-M2. Tak ošetrovanie $LT\beta$ -R-Ig zmenilo fenotyp FDC. A nakoniec, značenie MOMA-1 bolo 14. deň znížené, ale stále detegované.

Opakované ošetrovanie $LT\beta$ -R-Ig inhibuje expresiu adresínu v lymfatických uzlinách

Vyšetrovali sme expresiu adresínu v LN u potomkov načasovane brezivých myší Balb/c, ktorým ssa injikovalo na 14. a 17. gestačný deň 200 μ g proteínu „receptor-Ig“. Po narodení boli potomkovia buď neošetrení, alebo sa im raz týždenne injikovalo 100 μ g $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig alebo LFA-3-Ig i.p.. Hladiny fúzných proteínov zostali počas života na 10 μ g/ml alebo viac, ako sa stanovilo testom ELISA (neuvedené dáta).

Imunohistochemické značenie s MECA367 a MECA79 ukázalo, že MAdCAM-1 a adresíny periférnych LN úplne chýbali v mezenterických LN myší ošetrovaných počas života s $LT\beta$ -R-Ig (obrázok 4 A, B). Sakrálne LN týchto myší tiež postrádali expresiu všetkých adresínov a cervikálne lymfatické uzliny a iliakálne uzliny nevykazovali značenie na periférne lymfatické

uzliny (PNAd) (dáta neuvedené). Utlmenie expresie adresínov bolo reverzibilné, lebo expresia sa v normálnej hladine obnovila u zvierat, ktoré boli ošetrené len *in utero* (obrázok 4 G, H). U myši ošetrených počas života so 100 μg /týždeň TNF-R55-Ig alebo LFA-3-Ig, zostala expresia adresínu v LN porovnateľná s expresiou u neošetrených myši (obrázok 4 C, D, E, F).

Lokalizácia B lymfocytov a expresia makrofágových markerov je zmenená v LN myši ošetrených LT β -R-Ig

Protilátky, ktoré viažu markery na populáciách makrofágov v lymfatickej uzline (LN) subkapsulárneho sínusu (analogické k marginálnej zóne sleziny), sa použili na uskutočnenie imunohistochemickej analýzy LN odobratých z myši, ktoré boli ošetrené počas gestácie a kontinuálne po pôrode, ako bolo opísané pre obrázok 4, s LT β -R-Ig, TNF-R55-Ig alebo LFA-3-Ig. Fluorescenčné snímky sa analyzovali pomocou software pre obrazovú analýzu. Ukázalo sa, že expresia sialoadhezínu je znížená v LN myši ošetrených rozpustným LT β -R-Ig (obrázok 5B), ale nie v LN myši TNF-R55-Ig alebo LFA-3-Ig (obrázok 5 E, H). V LN myši ošetrených LT β -R-Ig sa stále detegovala expresia MOMA-1 na makrofágoch v subkapsulárnom sínuse (obrázok 5 C).

Vyhodnotili sa tiež účinky kontinuálneho ošetrenia LT β -R-Ig na organizáciu lymfocytov v LN. Rezy LN sa značili s mAb špecifickými pre B bunkový marker B buniek B220 a marker T buniek CD4. Aby sa identifikovali oblasti prekryvu B a T bunkových zón, použila sa obrazová analýza. Ošetrenie LT β -R-Ig spôsobilo rozrušenie B bunkových folikulov tak, že B bunky boli prítomné v difúznom páse na vonkajšom okraji T bunkovej oblasti (obrázok 5 A). Napriek rozrušeniu folikulárnej štruktúry neboli B bunky prítomné v T bunkových oblastiach LN, miesto toho sa objavili v oblastiach, ktoré nie sú normálne obsadené lymfocytmi. Veľmi podobný obraz T a B bunkového značenia sa

pozoroval u myši ošetrených počas života so 100 μg /týždeň TNF-R55-Ig, ale nie u myši ošetrených LFA-3-Ig (obrázok 5 D). B bunkové folikuly boli opäť rozrušené a B bunky boli prítomné v oblastiach LN, ktoré obvykle neobsahujú lymfocyty. Prekry B buniek T bunkami nebol pozorovaný.

Ošetrovanie myši LT β -R-Ig inhibuje protilátkovú odpoveď IgM a IgG

Zlyhanie tvorby splénických GC po podnete SRBC u myši ošetrených niekoľkokrát LT β -R-Ig (ako na obrázku 3) svedčilo pre zmeny v humorálnej imunitnej odpovedi u týchto myši. Aby sa to otestovalo priamo, dostali dospelé myši šesť injekcií, jednu týždenne, LT β -R-Ig alebo LFA-3-Ig, a potom nasledoval podnet SRBC. Myšiam sa odobrala krv 7. a 14. deň po imunizácii a analyzoval sa výskyt SRBC-špecifických IgM a IgG v sére pomocou hemaglutinačných testov. Sedem dní po imunizácii SRBC bol titer IgM normálny, ale odpoveď IgG je značne znížená u myši ošetrených LT β -R-Ig v porovnaní s myšami ošetrenými ľudským Ig alebo PBS (obrázok 6 A). 14. deň po imunizácii ešte sa stále nedetegoval SRBC špecifický IgG v sére myši ošetrených LT β -R-Ig a titer SRBC špecifického IgM je u týchto myši tiež znížený viac ako na polovicu v porovnaní s myšami ošetrenými ľudským Ig alebo PBS (obrázok 6 A).

Desať dní po podnete SRBC sa detegujú GC v slezinách myši ošetrených jeden alebo dva krát s LT β -R-Ig, ale počet GC je značne znížený v porovnaní s kontrolami (tabuľka 1). Keď myši dostali dve injekcie LT β -R-Ig, prvú injekciu týždeň pred podnetom SRBC a druhú injekciu v ten istý deň ako injekciu SRBC, je inhibícia odpovede IgM a IgG na SRBC 7. a 14. deň (obrázok 6 B) podobná odpovedi detegovanej, keď myši dostali opakované injekcie LT β -R-Ig (obrázok 6 A). 30. deň po imunizácii sa SRBC-špecifický IgG nedeteguje a hladiny IgM sú znížené o viac ako 80

% v porovnaní s kontrolami (obrázok 6 B). Tieto postupy ošetrovania $LT\beta$ -R-Ig majú teda za následok kompletnú inhibíciu odpovede IgG a skrátenú/zníženú odpoveď IgM vzhľadom ku kontrolám.

Keď myši dostali jednu injekciu $LT\beta$ -R-Ig v ten istý deň ako podnet SEBC, boli hladiny odpovede IgM a IgG na SRBC 7. deň porovnateľné s odpoveďou kontrolných skupín (obrázok 6 C). Avšak 24. deň po imunizácii sú titry IgM a IgG znížené o 30%. 34. deň po podnete SRBC je titer SRBC-špecifického IgM znížený o 50% v porovnaní s kontrolnými skupinami a SRBC-špecifický IgG nebol detegovaný (obrázok 6 C). Tieto dáta ukazujú, že protokol ošetrovania $LT\beta$ -R-Ig mal za následok zreteľné skrátenie/zníženie hladín odpovedí IgM a IgG, teda že ošetrovanie $LT\beta$ -R-Ig môže inhibovať humorálnu odpoveď, ktorá už bola iniciovaná.

Choroby sprostredkované protilátkami

Mnoho orgánovo špecifických a multisystémových autoimunitných stavov je spojených s patologickou protilátkovou odpoveďou. K takýmto stavom patrí: *myasthenia gravis*, autoimunitná hemolytická anémia, Chagasova choroba, Gravesova choroba, idiopatická trombocytopenická purpura (ITP), systémový *lupus erythematosus* (SLE), Wegenerova granulomatóza, *polyarteriitis nodosa* a rýchla progredujúca kosáčikovitá glomerulonefritída (pozri Benjamini a kol., Immunology, A Short Course, Wiley-Liss, New York, 3. vyd. 1996).

Aj keď etiológia SLE je neznáma, je dosť známe o imunologickom mechanizme zodpovednom za pozorované patologické zmeny. Pacienti so SLE tvoria z neznámeho dôvodu protilátky proti jadrovým zložkám tela (antinukleárne protilátky (ANA)), konkrétne proti natívnej dvojvláknovej DNA. Prítomnosť týchto protilátok koreluje klinicky najlepšie s patológiou renálneho

postihnutia u SLE. Tieto protilátky tvoria komplexy s DNA zjavne pochádzajúcou z rozpadu normálneho tkaniva a ako u každej choroby s imunitnými agregátmi, tieto komplexy tvoria usadeniny zachytené na bazálnej membráne glomerúl, v stenách arteriol a v kĺbových synoviálnych priestoroch. Tieto komplexy aktivujú komplementovú kaskádu a priťahujú granulocyty. Následná zápalová reakcia je charakterizovaná ako glomerulonefritída s výsledným poškodením obličiek vedúcim k proteinúrii a hematúrii.

Lupusová nefritída sa študovala na myších modeloch celé desaťročia. V súčasnosti bola na takomto modeli vyhodnotená terapeutická účinnosť reagentie špecifickej pre myšiu ligand CD40 (Mohan a kol., J. Immunol., 154, 1470-14780, 1995). Ukázalo sa, že akcelerácia lupusu prenosom buniek, ktoré vyvolávajú tvorbu patogénnych protilátok *in vivo*, sa inhibovala podávaním monoklonálnej protilátky, ktorá blokuje interakciu ligandu CD40/CD40. Navyše krátka liečba myši s lupusom protilátkou anti-ligand CD40 mala trvalý prospešný účinok na ich spontánnu chorobu dlho potom, ako bola protilátka odstránená z ich organizmu. Pokus naznačoval, že patogénne B bunky nemohli tvoriť protilátku dokonca ešte 9 mesiacov po liečbe, čo svedčí o oddialení expanzie autoimunitných pamäťových B buniek s dôsledkom dlhodobej liečebnej prospešnosti. Keďže sme ukázali, že reagentie, ktoré blokujú interakcie $LT\alpha\beta/LT\beta-R$ *in vivo* inhibujú vznik protilátkovej odpovede, mení fenotyp FDC a tvorbu zárodočných centier zapojených do optimálnej generácie pamäte B buniek, budú sa môcť $LT\alpha\beta/LT\beta-R$ blokujúce reagentie podľa tohto vynálezu použiť na liečbu alebo prevenciu SLE.

Normálna imunitná odpoveď na niektoré patogénne infekčné činidlo tiež vyvoláva autoprotiátkovú odpoveď, ktorá sa môže stať nadmernou a predstavovať liečebný problém. Jedným príkladom je Chagasova choroba, zápalová kardiomyopatia, ktorá sa rozvíja u človeka a pokusných zvierat s chronickou infekciou *Trypanosoma cruzi*. Z možných mechanizmov zapojených do patogenézy ľudskej Chagasovej kardiomyopatie dostalo v poslednom čase podstatnú

experimentálnu podporu vyvolanie autoimunitnej odpovede špecifickej pre srdce. Nedávna štúdia (Tibetts a kol., J. Immunol., 152, 1493-1499, 1994) zistila, že protilátky špecifické pre srdcové antigény sa tvoria u myši C57Bl/6 so srdcovou chorobou, ktoré sú infikované *t. cruzi*. Pri infekcii brazílskym kmeňom *T. cruzi* sa u myši C57Bl/6 rozvíja kardiomyopatia, ktorá je histologicky podobná kardiomyopatii pozorovanej u chronicky infikovaných ľudí. Antiséra týchto myši reagujú s tromi srdcovými antigénmi, zatiaľ čo myši C57Bl/6 infikované kmeňom Guayas *T. cruzi*, u ktorých sa kardiomyopatia nerozvíja, takéto protilátky netvoria. Tieto dáta naznačujú, že tieto protilátky sú špecifickými markermi kardiomyopatie. Schopnosť činidla blokujúceho $LT\beta$ -R inhibovať poškodenie sprostredkované autoprottilátkami sa teda môže určiť na takomto modeli hlodavcov.

Ďalším príkladom bunkového poškodenia antiprottilátkami, ktoré vzniká ako následok určitých infekčných chorôb alebo z iných neznámych dôvodov, je idiopatická trombocytopenická purpura (ITP). Pri tomto stave majú protilátky namierené proti doštičkám za následok zničenie doštičiek (komplementom alebo fagocytárnymi bunkami s receptorom Fc alebo C3b), čo môže viesť ku krvácaniu. Liečivá, ktoré budú indukovať také autoimunitné reakcie sprostredkované prottilátkou *in vivo*, ako je $LT\beta$ -R blokujúce činidlo podľa tohto vynálezu, ktoré inhibuje vznik prottilátok, budú tiež užitočné na liečbu alebo prevenciu autoimunitných ochorení.

Normálna imunitná odpoveď na niektoré patogénne infekčné či infekčné činidlo tiež vyvoláva hypersenzitívne reakcie, ktoré sa môžu stať nadmernými a ako také môžu predstavovať liečebný problém. Najbežnejší príklad precitlivenosti I. typu je alergická reakcia. Tá je sprostredkovaná prottilátkami IgE, ktoré sa viažu prostredníctvom ich Fc časti na receptory na žírnych bunkách a bazofiloch, aby spustili uvoľnenie farmakologicky aktívnych látok, ktoré sprostredkovávajú anafylaxiu. ITP a

Goodpastereov syndróm sú niekedy považované za reakcie II. typu, ktoré nastávajú, keď sa protilátky IgM alebo IgG viažu na antigén na bunkovom povrchu aktivujú komplementovú kaskádu. Granulocyty sú potom priťahované do miesta aktivácie a poškodenie uvoľnením lytických enzýmov z ich granúl má za následok zničenie buniek. Reumatická artritída sa považuje za dôsledok reakcie precitlivenosti III. typu, sprostredkovej imunitnými komplexmi antigénu (v tomto prípade reumatoidného faktora, autoprotiľátky IgM), ktorá sa viaže na Fc časť normálneho IgG. Tieto imunitné komplexy sa zúčastňujú vyvolania zápalu kĺbov a poškodenia charakteristického pre túto chorobu. Keďže tieto patológie sú sprostredkované čiastočne protilátkami, liečivá, ktoré budú inhibovať vznik protilátky, ako je $LT\beta$ -R blokujúce činidlo podľa vynálezu, budú tiež užitočné na liečbu alebo prevenciu týchto chorôb.

Liečenie podávaním činidla blokujúceho $LT\beta$ -R

Prípravky podľa vynálezu sa budú podávať v účinnej dávke na liečenie určitých klinických stavov. Určenie výhodného farmaceutického prípravku a terapeuticky účinnej dávky a režimu pre určité použitie je úplne zvládnuteľné a v rámci súčasného stavu odboru, napríklad pokiaľ sa vezme do úvahy hmotnosť pacienta. Dávky v hodnote 1 mg/kg rozpustného $LT\beta$ -R sú vhodným východiskovým bodom na optimalizáciu liečebných dávok.

Vhodné terapeuticky účinné dávky sa tiež môžu stanoviť uskutočnením pokusov *in vitro*, v ktorých sa meria koncentrácia činidla blokujúceho $LT\beta$ -R potrebná na vysýtenie povrchu cieľových buniek (v závislosti od činidla buď bunky pozitívne na $LT\beta$ -R alebo LT ligand) počas 1 až 14 dní. Test založený na sledovaní väzby ligand-receptor opísaný v prejednávanej prihláške č. US 08/505 606 podanej 21. júla 1995 sa môže použiť na sledovanie reakcie vysycovania povrchu buniek. Bunky

pozitívne na LT- β -R alebo LT ligand sa dajú separovať od populácie aktivovaných lymfocytov pomocou FACS. Na základe výsledkov testov *in vitro* možno stanoviť vhodný rozsah koncentrácií činidla blokujúceho LT- β -R pre ďalšie testovanie na zvieratách spôsobom opísaným vo vynáleze.

Podávanie rozpustných molekúl LT- β -R, protilátok anti-LT-ligand a anti-LT- β -R podľa vynálezu, samotných alebo kombinovaných, vrátane izolovaných a purifikovaných foriem protilátok alebo komplexov, ich solí alebo farmaceuticky prijateľných derivátov, sa dá uskutočniť obvyklým spôsobom na podávanie látok s imunosupresívnou aktivitou.

Farmaceutické prípravky na túto terapiu môžu byť v rôznych formách. To znamená napríklad tuhé, polotuhé alebo tekuté liekové formy ako napríklad tablety, pilulky, prášky, roztoky alebo suspenzie, čapíky, injekčné a infúzne roztoky. Výhodná forma závisí od požadovaného spôsobu podávania a terapeutického použitia. Spôsoby podávania zahŕňujú spôsob parenterálny, perorálny, subkutánný, intravenózný, intraleziálny (do poškodeného miesta) a topický.

Rozpustné molekuly LT- β -R, ligandy anti-LT a protilátky anti-LT- β -R podľa vynálezu sa môžu napríklad pridať do sterilného izotonického prípravku, buď s, alebo bez kofaktorov stimulujúcich príjem alebo stabilitu. Prípravok je výhodne tekutý alebo lyofilizovaný prášok. Prípravok sa z rozpustných molekúl LT- β -R, ligandov LT a protilátok anti-LT- β -R podľa vynálezu vytvorí napríklad tak, že sa nariedi pufrom, ktorý obsahuje 5,0 mg/ml monohydrátu kyseliny citrónovej, 2,7 mg/ml citrónanu trisodného, 41 mg/ml manitolu, 1 mg/ml polysorbátu. Tento roztok sa lyofilizuje, uskladní zmrazený a rekonštituuje pre použitím sterilnou vodou na injekcie (pozri liekopis USA).

Prípravok tiež výhodne obsahuje obvyklé farmaceuticky prijateľné nosiče, dobre známe v odbore (pozri napríklad

Remington Pharmaceutical Sciences, 16. vyd., Mac Publishing Company). Takéto farmaceuticky prijateľné nosiče zahŕňujú ďalšie farmaceutické činidlá, nosiče, genetické nosiče, adjuvanciá, excipienty a ďalšie, napríklad ľudský sérový albumín alebo preparáty z plazmy. Prípravok je výhodne v podobe jednotkovej liekovej formy a podáva sa jedenkrát alebo viackrát denne.

Farmaceutický prípravok podľa vynálezu sa môže podávať tiež pomocou mikrosfér, lipozómov alebo iných mikročasticových systémov alebo retardet umiestnených priamo v ovplyvňovanom orgáne, v jeho blízkosti alebo v inom spojení s ním, alebo v krvnom obehú. vhodným príkladom takej liekovej formy s predĺženým uvoľňovaním liečiva je semipermeabilná matrica formovaná do tvaru čapíkov alebo mikrotoboliek. Implantovateľné alebo v mikrotobolkách použiteľné matrice zahŕňujú polylaktidy (U.S. patent č. 3,773,319, EP 58,481), kopolyméry kyseliny L-glutámovej a etyl-L-glutamátu (Sidman a kol., Biopolymers 22: 547-556, 1985), poly-2-hydroxyethylmetakrylátu alebo etylvinylacetátu (Langer a kol., J. Biomed. Mater. Res. 15, 167-277, 1981, Langer, Chem. Tech. 12: 98-105, 1982).

Lipozómy obsahujúce rozpustné molekuly LT- β -R, ligandy anti-LT a protilátky anti-LT- β -R podľa vynálezu, samotné alebo v kombináciách, sa pripravujú spôsobom dobre známym v odbore (pozri napríklad DE 3,218,121, Epstein a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3688-3692, 1985, Hwang a kol., Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 4030-4034, 1980, U.S. patenty č. 4 485 045 a 4 544 545). Lipozómy sú obvykle malého (200 až 800 Angstrom) jednovrstvového typu a obsah cholesterolu je vyšší ako 30 % (molárnych) cholesterolu. Podiel cholesterolu sa vyberie tak, že určuje optimálnu mieru uvoľňovania rozpustných molekúl LT- β -R, protilátok anti-LT-ligand a anti-LT- β -R.

Rozpustné molekuly LT- β -R, ligandy anti-LT a protilátky anti-LT- β -R podľa vynálezu sa môžu pripojiť k lipozómom

obsahujúcim iné činidlá blokujúce LT- β -R, imunosupresíva alebo cytokíny modulujúce aktivitu blokujúcu LT- β -R. Naviazanie rozpustných molekúl LT- β -R, ligandov anti-LT a protilátok anti-LT- β -R sa uskutoční známym zosieťovacím činidlom ako je napríklad heterobifunkčné zosieťovacie činidlo, ktoré sa používa na naviazanie toxínov alebo chemoterapeutických agens na protilátky na cielené podávanie. Konjugácia s lipozómami sa dá tiež uskutočniť pomocou zosieťujúceho činidla zacieleného na sacharidy, t. j. 4-(4-maleimidofenyl)hydrazidu kyseliny maslovej (MPBH) (Duzgunes a kol., J. Cell. Biochem. Abst. Suppl. 16E 77, 1992).

Výhody terapeutických prípravkov obsahujúcich činidlo blokujúce LT- β -R

Činidlá blokujúce LT- β -R podľa vynálezu sú schopné selektívne inhibovať imunitné efektorové mechanizmy. Inhibícia imunity sprostredkovanej protilátkami je inhibovaná rôznymi mechanizmami vrátane regulácie vytvárania GC ovplyvňovaním funkcie FDC. Ako protilátkami sprostredkovaná imunita, tak aj bunková imunita sú čiastočne inhibované reguláciou expresie adresínov a tým ovplyvňovaním pohybu a umiestňovania lymfocytov. Takže činidlo blokujúce LT- β -R bude užitočné na liečenie stavov, ktoré sú exacerbované aktivitami protilátok alebo aberantnou expresiou adresínov. Schopnosť selektívne potlačovať takto sprostredkovanú imunitnú odpoveď je užitočná na liečenie abnormalít rôznych typov bunkovej imunitnej odpovede, vrátane rôznych autoimunitných a chronických zápalových stavov.

Ako už bolo uvedené vyššie, liečenie takto sprostredkovaných imunologických stavov využíva imunomodulačné a imunosupresívne činidlá, ktoré majú pleiotropný účinok na široké spektrum bunkových typov a imunitných odpovedí. Tieto nešpecifické imunosupresívne činidlá sú spravidla vyžadované vo

vysokých a často aj toxických dávkach, ktoré spôsobujú mnoho vedľajších účinkov.

Schopnosť prípravku, ktorý inhibuje protilátkovú odpoveď, mierniť patologickú imunitnú odpoveď je dokumentovaná a podporovaná súčasným výskumom *lupus nephritis* u myší. V tejto štúdii sa ukázalo, že podanie protilátky, ktorá blokuje dráhu CD40/CD40L, inhibuje akceleráciu *lupus nephritis* indukovanú prenosom buniek indukujúcich produkciu patologických protilátok *in vivo*, a má trvalo prospešný vplyv na spontánnu chorobu ešte dlhý čas po tom, ako bola protilátka odstránená zo systému. Tieto dáta ukazujú, že činidlá blokujúce LT- β -R podľa vynálezu sú užitočné na potlačenie odvrhnutia buniek tkanivového štetu alebo orgánového transplantátu, lebo inhibujú procesy vedúce k vzniku protilátkovej odpovede.

Činidlo blokujúce LT- β -R v prípravku a spôsobe podľa vynálezu sa môže modifikovať, aby sa dosiahla požadovaná úroveň signálnej dráhy LT- β -R v závislosti od stavu, poruchy alebo choroby, ktorá sa lieči. Možno predvídať, že absolútna úroveň signálnej dráhy LT- β -R môže byť jemne nastavená tým, že sa budú meniť koncentrácie a afinity (k príslušným molekulárnym cieľom) činidiel blokujúcich LT- β -R.

Napríklad v jednom uskutočnení vynálezu sa prípravok obsahujúci rozpustné molekuly LT- β -R podal subjektu. Rozpustný receptor LT- β -R účinne súťaží s receptormi LT- β na povrchu buniek o naviazanie povrchových ligandov. Schopnosť kompetície s povrchovými ligandmi je závislá od relatívnych koncentrácií rozpustných LT- β -R a molekúl LT- β -R na bunkovom povrchu, a tiež od ich relatívnych afínit na viazanie ligandu.

Rozpustné molekuly nesúce mutácie, ktoré zvyšujú alebo znižujú väzbovú afinitu daného mutovaného rozpustného LT- β -R k povrchovému ligandu, sa môžu vytvoriť technikami rekombinantných

DNA odborníkovi dobre známymi. Veľký počet molekúl s cielenými alebo náhodnými mutáciami sa môže testovať na svoju schopnosť pôsobiť ako činidlo blokujúce LT- β -R pomocou rutinných pokusov a spôsobov opísaných v predkladanom vynáleze.

Podobne v inom uskutočnení vynálezu protilátky namierenej proti LT- β receptorom alebo proti jednej alebo viacerým podjednotkám LT ligandov pôsobia ako činidlo blokujúce LT- β -R. Schopnosť týchto protilátok blokovať signálnu dráhu receptora LT- β sa môže modifikovať mutáciou, chemickou modifikáciou alebo iným spôsobom, ktorý môže zmeniť účinné koncentrácie alebo aktivity protilátky podanej subjektu.

Schopnosť obmedziť signalizáciu (znižiť aktivitu signálnej dráhy) LT- β -R, bez toho, aby sa pritom úplne inhibovala, môže byť dôležitá na vytvorenie alebo udržanie redukovanej hladiny signálnej dráhy LT- β -R, ktorá podporuje normálnu imunitnú funkciu, zatiaľ čo inhibuje imunitné odpovede, ktoré prevyšujú normálnu úroveň alebo sú inak abnormálne.

Poškodenie génu LT- α u myši vedie k aberantnému vývoju periférnych lymfoidných orgánov (DeTongi a kol., Science 246: 703-707, 1994). Takéto myši postrádajú lymfatické uzliny a v ich slezinách chýba vo folikulách obvykle celkom jasná hranica medzi oblasťami bohatými na B bunky a T bunky. Veríme, že tento fenotyp je spojený so stratou signálnej dráhy LT- β -R indukovanej povrchovými LT, pretože podobné fenotypy sa nepozorovali, keď sa modulovala aktivita TNF-R. Schopnosť selektívne alebo čiastočne blokovať dráhu LT- β -R môže byť užitočná na liečenie abnormálneho vývoja lymfoidných orgánov v dôsledku chronických zápalov spojených s chybnou alebo nadmernou expresiou LT- β -R.

Protilátky sú rozhodujúcimi mediátormi imunitnej odpovede na patologické činidlo. Absolútna inhibícia protilátkovej odpovede môže byť teda za určitých okolností nežiaduca.

Napríklad protilátky sú vyžadované na sprostredkovanie rezistencie na infekcie extracelulárnymi baktériami, ako sú napríklad pneumokoky a hemofilus.

Schopnosť ovplyvniť hladinu vznikajúcej protilátky blokováním signalizácie $LT\beta$ -R môže byť dôležitá v maximalizácii prospešných výsledkov, ktoré sa môžu dosiahnuť ošetrením s $LT\beta$ -R blokujúcim agens podľa tohto vynálezu.

Liečebné spôsoby podľa vynálezu zahrnujú selektívnu inhibíciu odpovedí, ktoré sú celkom alebo čiastočne závislé od dráhy $LT\beta$ -R. Konkrétne liečebné použitie predkladaného vynálezu závisí od relatívneho etiologického mechanizmu procesu, ktorý má byť buď inaktivovaný, alebo podporovaný ako liečebne žiaduci proces, ako je odborníkovi zrejmé. Spôsoby podľa vynálezu teda zahrnujú v rôznych uskutočneniach podávanie liečebne účinného množstva činidla blokujúceho $LT\beta$ -R alebo $LT\beta$. Proteín použitý v týchto spôsoboch môže byť buď úplný proteín plnej dĺžky, fragmenty proteínu, alebo fúzne fragmenty. V ďalších uskutočneniach spôsoby zahrnujú podávanie rozpustného fragmentu, ako je rozpustný receptor pre lymfotoxínu- β . V ďalších výhodných uskutočneniach sa nárokovaný vynález týka podávania protilátok proti $LT\beta$ -R alebo $LT\beta$. Blokujúce činidlo podľa vynálezu sa môže podávať súčasne s liečebne účinným množstvom druhej zlúčeniny, ktorá prejavuje liečebne žiaduci účinok.

Napríklad v určitých spôsoboch na liečenie AIDS a/alebo HIV môže byť žiaduce podávať súčasne ďalšie antivírusové agens v odbore známe. Napríklad AZT alebo inhibítory proteáz. Môže byť výhodné najmä podávanie blokujúcich činidiel podľa vynálezu, výhodnejšie fúzneho proteínu $LT\beta$ -R-Ig/IgG, v kombinácii s liekovým „koktailom“ na liečbu AIDS. Tieto liekové „koktaily“ zhrnujú podávanie niekoľkých liekov pacientovi na zníženie množstva vírusu v pacientovom systéme.

Prípravky podľa vynálezu sa môžu formulovať podľa

štandardnej praxe, teda ako prípravky obsahujúce nosné vehikulum. Termín Farmaceutický prijateľný nosič sa týka jednej alebo viacerých organických alebo anorganických zložiek, prírodných alebo syntetických, ktoré môžu uľahčiť podávanie blokujúceho činidla podľa vynálezu pacientovi. Vhodné nosiče sú odborníkov známe.

Každý z prípravkov podľa vynálezu sa môže podávať akýmkoľvek spôsobom, ktorý je lekárske prijateľný. Toto môže zahŕňať injekcie parenterálnou cestou, ako je intravenózna, intravaskulárna, intraarteriálna, subkutánná, intramuskulárna, do národu, intraperitoneálna, intraventrikulárna, intraepidurálna alebo iná, a tiež perorálna, nazálna, oftalmická, rektálna alebo topická. Podávanie s predĺženým uvoľňovaním je vo vynáleze tiež špecificky zahrnuté, pomocou depotných injekcií alebo implantátov. Miestne špecifické podávanie môže byť tiež žiaduce. Odborník ľahko určí spôsoby podávania.

Blokujúce činidlá dráhy LT, ktoré sú použiteľné podľa predkladaného vynálezu, zahŕňajú protilátky funkčných derivátov rozpustného $LT\beta$ -R. Funkčné deriváty zahŕňajú fragmenty, varianty, analógy alebo chemické deriváty molekuly. Fragmentom molekuly, ako je napríklad každý z antigénov predkladaného vynálezu, je myslená každá polypeptidová podskupina molekuly. Predpokladá sa, že variant takejto molekuly zodpovedá prirodzene sa vyskytujúcej molekule v podstate podobnej buď celej molekule, alebo jej fragmentu. Analóg molekuly sa týka neprirodzene sa vyskytujúcej molekuly v podstate podobnej buď celej molekule, alebo jej fragmentu.

Varianty blokujúcich činidiel podľa vynálezu sa líšia od prirodzene sa vyskytujúcich činidiel aminokyselinovou sekvenciou alebo spôsobom, ktorý nepostihuje sekvenciu, alebo platia obe možnosti. Varianty aminokyselinovej sekvencie sa vytvárajú tak, že jedna alebo viac aminokyselín v prirodzene sa vyskytujúcich molekulách substituujú inou prirodzenou aminokyselinou,

derivátom aminokyseliny alebo aminokyselinou, ktorá sa prirodzene nevyskytuje. Obzvlášť výhodné varianty zahŕňujú najmä prirodzene sa vyskytujúce proteíny alebo biologicky aktívne fragmenty prirodzene sa vyskytujúcich proteínov, ktorých sekvencie sa líšia od sekvencie divého typu substitúciou jednej alebo viacerých konzervatívnych aminokyselín. Takého substitúcie sú odborníkovi dobre známe a majú typicky minimálny vplyv na sekundárnu štruktúru a hydrofóbnu povahu blokujúceho činidla.

V ďalších uskutočneniach predkladaného vynálezu môžu mať varianty so substitúciami aminokyselín, ktoré sú menej konzervatívne, za následok tiež požadované deriváty, napríklad vyvolaním zmien v náboji, konformácii a iných biologických vlastnostiach. Takéto substitúcie napríklad zahŕňujú substitúciu hydrofóbných aminokyselinových zvyškov hydrofilnými, substitúciu zvyšku cysteínom alebo prolínom, substitúciu zvyšku s rozsiahlym postranným reťazcom zvyškom s malým postranným reťazcom alebo substitúciu zvyšku s celým negatívnym nábojom zvyškom s celým pozitívnym nábojom. Pokiaľ sa nedá výsledok danej substitúcie predpovedať s istotou, môžu sa deriváty testovať spôsobmi tu opísanými, aby sa určila prítomnosť alebo neprítomnosť žiaducich vlastností.

Varianty v rozsahu vynálezu zahŕňujú proteíny a peptidy s aminokyselinovými sekvenciami, ktoré majú aspoň 80 % homológiu s blokujúcim činidlom podľa predkladaného vynálezu. Výhodnejšie je sekvenčná homológia aspoň 90 % alebo aspoň 95 %. S cieľom určovania homológie je dĺžka porovnávaných sekvencií aspoň 20 aminokyselinových zvyškov. Varianty v rozsahu vynálezu tiež zahŕňujú každé blokujúce činidlo, ktoré 1) má aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je aspoň na 40 % homologická so sekvenciou blokujúceho činidla, a ktorá tiež 2) v optimálnej polohe pri porovnaní („alignment“) so sekvenciou blokujúceho činidla podľa vynálezu má aspoň 80 % svojich cysteínových zvyškov „zrovnaných“ s cysteínmi blokujúceho činidla podľa vynálezu.

Vo vynáleze sú tiež činidlá, ktoré sa špecificky viažu k

blokujúcim činidlám podľa vynálezu, vrátane ligandov a protilátok.

Nasledujú konkrétne príklady ilustrujúce rozpustné $LT\beta$ receptory, anti-LT ligandy a protilátky anti- $LT\beta$ -R podľa vynálezu a spôsoby použité na ich charakterizáciu. Tieto príklady by nemali byť chápané ako obmedzujúce. Príklady sú tu uvedené len s cieľom vysvetliť a ilustrovať vynález a predkladaný vynález je obmedzený len patentovými nárokmi.

Príklad 1

Príprava rozpustných ľudských $LT\beta$ -R receptorov v podobe fúzných proteínov s imunoglobulínovým Fc

Sekvencia cDNA ľudského klonu izolovaná z ľudskej knižnice 12p transkribovaných sekvencií odvodená zo somatických hybridných buniek (Beans a kol., Genomics 16: 214-218, 1993) sa vložila do GeneBank a až neskôr bola identifikovaná ako sekvencia kódujúca ľudský $LT\beta$ -R. Úplná sekvencia cDNA ľudského $LT\beta$ -R je dostupná od roku 1992 v GeneBank ako položka č. L04270.

Extracelulárna doména $LT\beta$ -R až po transmembránovú oblasť (obrázok 1) sa amplifikovala metódou PCR z cDNA klonu pomocou primérov obsahujúcich miesta pre reštrikčné enzýmy NotI a SalI na svojich 5' a 3' -koncoch (Browning a kol., J. Immunol. 154:33-46, 1995). Amplifikovaný produkt sa naštiepil NotI a SalI, prečistil a ligoval sa do vektoru pMDR901 linearizovaného NotI, spolu so SalI-NotI fragmentom kódujúcim Fc úsek ľudského IgG1. Výsledný vektor obsahoval gén dihydrofolátreduktázy a fúzneho proteínu $LT\beta$ -R-Ig, každý s osobitným promótorom.

Vektor sa elektroporáciou vniesol do buniek CHO dhfr- a štandardným spôsobom sa izolovali klony rezistentné voči

metotrexátu. LT- β -R-Ig bol secernovaný do média a na výber bunkových línií produkujúcich najvyššiu hladinu receptorového fúzneho proteínu sa použil test ELISA. Vysokoprodukčná bunková línia sa potom kultivovala vo veľkom a upravené médium sa zbieralo. Čistý LT- β receptorový fúzny proteín sa získal prečistením pomocou afinitnej chromatografie s proteín A-sefarózou.

Príklad 2

Príprava rozpustných myších LT- β receptorov v podobe fúznych proteínov s imunoglobulínom.

Úplný cDNA klon myšieho LT- β -R sa pripravil ligáciou fragmentov 5'NotI/ApaLI a 3'ApaLI/NotI z dvoch čiastočných izolátov cDNA do NotI miesta vektoru pCDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). Sekvencia tohto cDNA klonu je prístupná v GeneBank ako položka č. U29173. Porovnaním s inou sekvenciou myšieho LT- β -R nájdenou v GeneBank pod číslom L3842 sa nenašli žiadne rozdiely v sekvencii.

Rozpustný fúzny proteín „myši LT- β -R/ludský IgG1“ sa pripravil tak, že pomocou PCR sa amplifikoval klon s úplnou cDNA mLT- β -R s primérmí 5'AACTGCAGCAGCGGCCCATGCGCCTGCCC 3' a 5'GACTTTGTCGACCATGCTCCTGGCTCTGGGGG 3'. Amplifikovaný produkt sa prečistil a naštiepil NotI a Sall a ligoval sa spoločne so Sall/NotI fragmentom Fc ľudského IgG1 do NotI linearizovaného a fosfatázou ošetreného vektora SAB132, čím vznikol vektor JLB122. NotI kazeta obsahujúca mLT- β -R-Fc sa na stálu expresiu preniesla do NotI miesta plazmidu pMDR901 a tak vznikol vektor PSH001, ktorý sa transfekoval do CHO buniek, ako bolo publikované (Browning a kol., J. Immunol. 154: 33-46, 1995). Bunkové klony secernujúce „myši LT- β -R-ludský Ig“ sa identifikovali testom ELISA. Čistý LT- β receptorový fúzny proteín sa získal

prečistením zo supernatantu CHO buniek pomocou afinitnej chromatografie s proteín A-sefarózou (Pharmacia) a použil sa v nasledujúcich príkladoch.

Príklad 3

Imunohistochemická analýza myšej sleziny po opakovaných injekciách LT- β -R-Ig

4-5 týždňov staré myši dostali 6 injekcií, jednu týždenne, LT β -R-Ig (100 μ g i.p.) a boli imunizované so SRBC v deň šiestej injekcie fúzneho proteínu. Myši potom dostali ďalšiu injekciu LT β -R-Ig alebo LFA-3-Ig č. deň po podnete SRBC. Zvieratá sa usmrtili 10. deň po podnete SRBC a odobrali sa im orgány na analýzu štruktúry. Lavý stĺpec na obrázku 2 predstavuje rezy sleziny zo zvierat ošetrených LFA-3-Ig (A, C, E, G, I) a pravý stĺpec zo zvierat ošetrených LT β -R-Ig (B, D, F, H, J). Acetónom zmrazené rezy sleziny sa dvojmo značili s biotinylovaným anti-myším B220 a anti-myšími CD4 protilátkami (A a B), potom nasledovalo zodpovedajúce druhé značenie so streptavidínom označeným alkalickou fosfatázou (purpurová modrá, tmavé sfarbenie) a s myším anti-krysím Ig označeným chrenovou peroxidázou (svetlohnedé sfarbenie). Ďalšia séria zmrazených rezov sa značila protilátkami ER-TR-9 (na detekciu MZM, C a D), MOMA-1 (na detekciu matalofilných makrofágov, E a F), MECA-367 (špecifické pre MAdCAM-1, G a H) a ER-TR-7 (na ofarbenie retikulárnych fibroblastov, I a J), potom nasledovalo druhé značenie myším anti-krysím Ig označeným chrenovou peroxidázou (hnedé sfarbenie). Tieto obrázky predstavujú značenie rezov z minimálne šiestich zvierat. Zväčšenie 10 x.

Príklad 4

Účinok $LT\beta$ -R-Ig a ligandu anti-CD40 na tvorbu GC a značenie FDC

Zvieratá sa ošetrili rovnako, ako už bolo opísané v príklade 3 s $LT\beta$ -R-Ig alebo LFA-3-Ig. Ďalšia skupina zvierat sa ošetrila s MR (anti-myší ligand CD40, 250 μ g/injekcia, intraperitoneálne) v deň -1, na 1. a 3. deň, dostali SRBC v deň 0 a boli usmrtené na 10. deň. Acetónom fixované rezy sleziny zvierat ošetrovaných s LFA-3-Ig (obrázok 3, ľavý stĺpec, A a D) alebo $LT\beta$ -R-Ig (stredný stĺpec, B a E), alebo MR (pravý stĺpec, C a F) sa značili biotínom označeným arašidovým aglutinínom (PNA, horný riadok, A, B a C), alebo s FDC-M1 (spodný riadok, E, E a F), potom nasledovalo druhé značenie so streptavidínom označeným chrenovou peroxidázou a s myším anti-kryšim Ig označeným chrenovou peroxidázou v uvedenom poradí (hnedé sfarbenie). Značenie PNA marginálnej zóny je ukázané šípkou v A a C. Tvorba GC je ukázaná bielou hviezdikou v A. Značenie na FDC je ukázané čiernou šípkou v D a F. Tieto obrázky predstavujú značenie rezov z aspoň štyroch zvierat. Zväčšenie 10 x.

Príklad 5

Expresia adresínu v lymfatických uzlinách (LN) myši ošetrovaných *in utero* a kontinuálne po narodení $LT\beta$ -R-Ig

V týchto pokusoch sa používali potomkovia načasovane breživých myší Balb/c, ktorým sa na 14. a 17. deň gestácie *i.v.* injikovalo 200 μ g proteínov receptora Ig. Po narodení sa potomkom injikovalo *i.p.* raz týždenne 100 μ g $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig alebo LFA-3-Ig. Hladiny fúzných proteínov zostávali počas života 10 μ g/ml alebo viac, ako sa zisťovalo testom ELISA (dáta neuvedené). Obrázok 4: panely A, B, G, H značenie lymfatických uzlín myši ošetrovaných s $LT\beta$ -R-Ig, panely C, D značenie lymfatických uzlín

myši ošetrených s LFA3-Ig, panely E, F značenie lymfatických uzlín myši ošetrených s TNF-R55-Ig. Panely A, C, E, G sú mezenterické lymfatické uzliny značené protilátkou MECA367 na detekciu slizničného adresínu MAdCAM-1. Panely B, D, H, F sú periférne (brachiálne) lymfatické uzliny značené protilátkou MECA79 špecifickou pre adresíny periférnych LN (PNAds). Panely G, H sú lymfatické uzliny ž dní starých myši vystavených len $LT\beta$ -R-Ig *in utero*. Všetky obrázky sú vo zväčšení 50x.

Príklad 6

Lokalizácia lymfocytov a expresia makrofágových markerov v lymfatických uzlinách (LN) myši ošetrených *in utero* a kontinuálne po narodení $LT\beta$ -R-Ig

Myši sa ošetrili *in utero* a kontinuálne po narodení tak, ako bolo opísané v príklade 5, s $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig alebo LFA-3-Ig. Rezy Ln sa potom označili protilátkami špecifickými pre markery exprimované makrofágmi alebo s mAb CD4. Aby sa identifikovali oblasti prekryvu T a B bunkových zón, použila sa obrazová analýza. Obrázok 5: panely A, D, G sú značenia BD220/CD4 myši ošetrených $LT\beta$ -R-Ig, LFA-3-Ig a TNF-R55-Ig, v uvedenom poradí. fluorescenčné obrázky sa analyzovali pomocou software na obrazovú analýzu. Panely B, E, H sú značenia na sialoadhezín a panely C, f, I sú značenia na MOMA-1.

Príklad 7

Účinok ošetrenia pomocou $LT\beta$ -R-Ig na protilátkovú odpoveď na SRBC

Myšiam Balb/c sa injikoval $LT\beta$ -R-Ig, ľudský Ig alebo PBS nasledujúcim spôsobom: Obrázok 6A: myši dostali 6 injekcií, ako bolo opísané pre obrázok 2 (príklad 3). Zvieratám sa odobrala krv na 7. deň (čierne stĺpce) a 14. deň (pruhované stĺpce) po

imunizácii SRBC. Obrázok 6: zvieratá dostali fúzne proteíny v deň -7 a deň 0. SRBC sa podali v deň 0 a zvieratám sa odoberala krv na 7. deň (čierne stĺpce), na 14. deň (pruhované stĺpce) a 30. deň (biele stĺpce). Obrázok 6C: zvieratá dostali fúzne proteíny raz v deň 0, v rovnakú dobu ako imunizáciu SRBC. Krv sa odoberala na 7. deň (čierne stĺpce), 14. deň (pruhované stĺpce) a 34 deň (šedé stĺpce).

Titer SRBC-špecifických IgM a IgG sa určoval analýzou v hemaglutinačných testoch. Titer je definovaný ako obrátená hodnota posledného riedenia séra, pre ktoré sa deteguje hemaglutinácia, a je znázornený na logaritmickú stupnici so základom 2 (1 = riedenie 1/15 séra). Výsledky sú zobrazené ako priemer so štandardnou odchýlkou zo 4 rôznych zvierat v skupine.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Činidlo blokujúce LT- β -R na použitie na zmenu humorálnej imunitnej odpovede zvierata.
2. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 1, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že sa vyberie zo skupiny obsahujúcej: rozpustný receptor lymfotoxínu β , protilátku namierenú proti receptoru LT- β a protilátku namierenú proti povrchovému ligandu LT.
3. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 1, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že zvieratom je cicavec.
4. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 3, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že cicavcom je človek.
5. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 2, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje rozpustný receptor lymfotoxínu- β s väzbovou doménou pre ligand, ktorá sa môže selektívne viazať na povrchový ligand LT.
6. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 5, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že rozpustný receptor lymfotoxínu- β obsahuje doménu Fc ľudského imunoglobulínu.
7. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 2, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu protilátku namierenú proti receptoru LT- β .
8. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 7, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že sa podáva v množstve, ktoré je dostatočné na pokrytie (vysýtenie) buniek pozitívnych na LT- β

receptory počas 1 až 14 dní.

9. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 7, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu protilátku BDA8 proti ľudskému LT- β -R (anti-ľudský LT- β -R mAb BDA8).

10. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 2, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu protilátku namierenú proti povrchovému ligandu LT.

11. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 10, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že sa podáva v množstve, ktoré je dostatočné na pokrytie (vysýtenie) buniek pozitívnych na povrchový ligand LT počas 1 až 14 dní.

12. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 10, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že protilátka je namierená proti podjednotke povrchového ligandu LT.

13. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 12, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu protilátku B9 proti ľudskému LT- β (anti-ľudský LT- β mAb B9).

14. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 10, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu protilátku namierenú proti myšiemu povrchovému ligandu LT.

15. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 1, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že sa inhibuje humorálna imunitná odpoveď.

16. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 1, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že pacient je infikovaný ľudským vírusom imunodeficiencie.

17. Činidlo blokujúce LT- β -R na použitie na liečenie, prevenciu

alebo elimináciu ľudského vírusu imunodeficiencie u cicavca.

18. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 17, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že sa vyberie zo skupiny obsahujúcej rozpustný receptor lymfotoxínu- β , protilátku namierenú proti receptorom LT- β a protilátku namierenú proti povrchovému ligandu LT.

19. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 18, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje rozpustný receptor lymfotoxínu- β s väzbovou doménou pre ligand, ktorá sa môže selektívne viazať na povrchový ligand LT.

20. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 19, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že rozpustný receptor obsahuje doménu Fc ľudského imunoglobulínu.

21. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 17, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu protilátku namierenú proti LT- β -R.

22. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 21, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu protilátku BDA8 proti ľudskému LT- β -R (anti-ľudský LT- β -R mAb BDA8).

23. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 17, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že obsahuje monoklonálnu protilátku namierenú proti povrchovému ligandu LT.

24. Činidlo blokujúce LT- β -R podľa nároku 17, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že sa ďalej súčasne podá s ďalším antivírusovým činidlom.

25. Farmaceutický prípravok na liečenie odvrhnutia štepu v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje terapeuticky

účinné množstvo činidla blokujúceho LT- β -R a terapeuticky účinné množstvo činidla blokujúceho CD40L.

26. Prípravok podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že činidlo blokujúce LT- β -R je LT- β -R/IgG a činidlo blokujúce CD40L je zlúčenina anti-CD40L.

27. Farmaceutický prípravok na liečenie AIDS alebo HIV v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje AZT, inhibítor proteázy a činidlo blokujúce LT- β -R.

28. Prípravok podľa nároku 27, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že blokujúce činidlo je fúzny proteín LT- β -R/IgG.

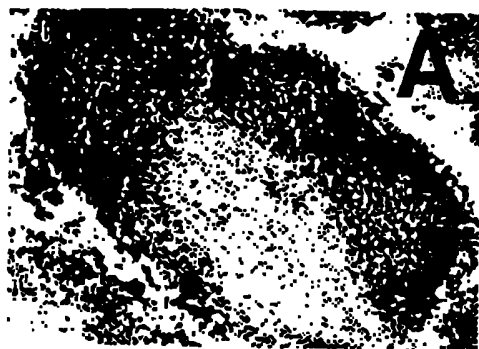
29. Prípravok podľa nároku 26, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zlúčenina anti-CD40L je monoklonálna protilátka.

30. Prípravok podľa nároku 29, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že protilátka je protilátka 5c8.

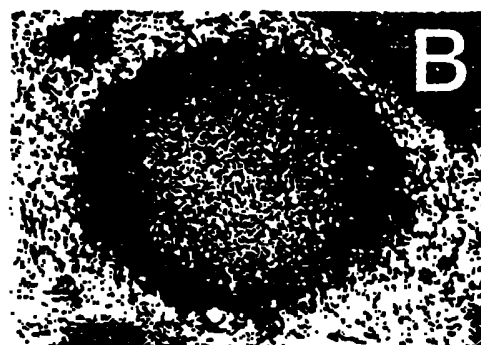
Obr. 1

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

2/10



Obr. 2A



Obr. 2B



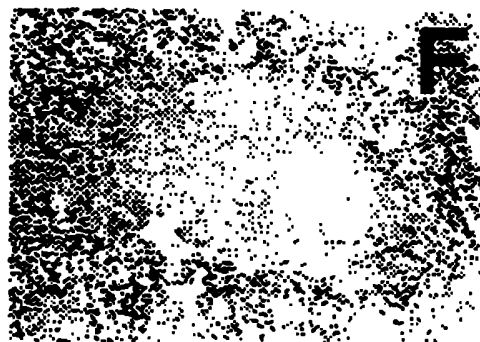
Obr. 2C



Obr. 2D



Obr. 2E

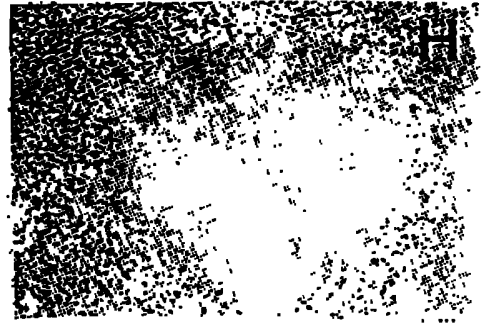


Obr. 2F

3/10



Obr. 2G



Obr. 2H



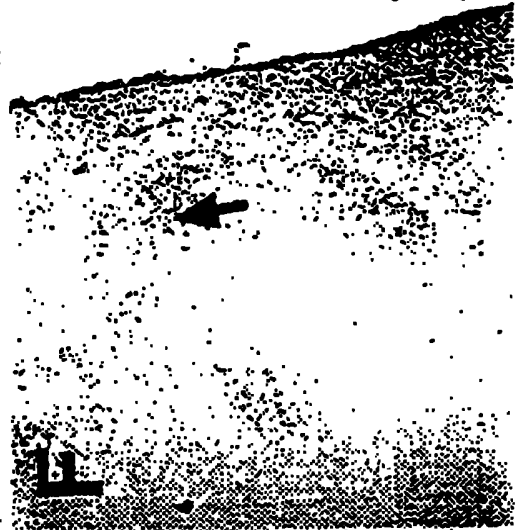
Obr. 2I



Obr. 2J

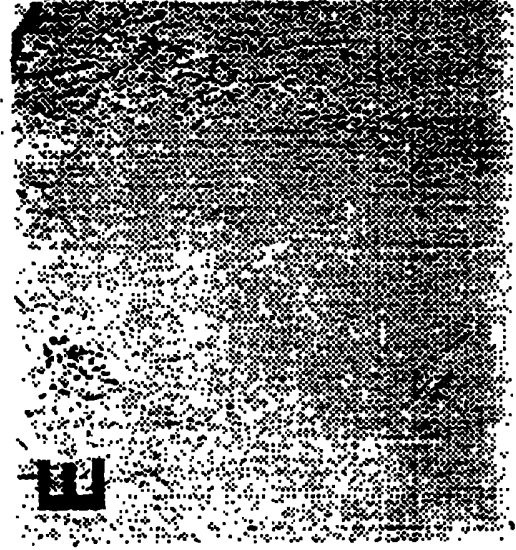
4/10

Obr. 3C



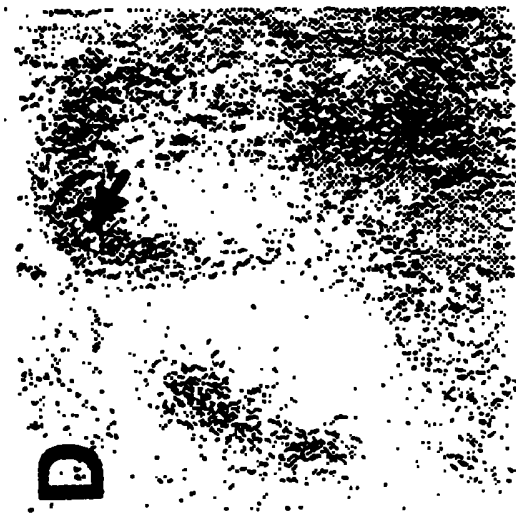
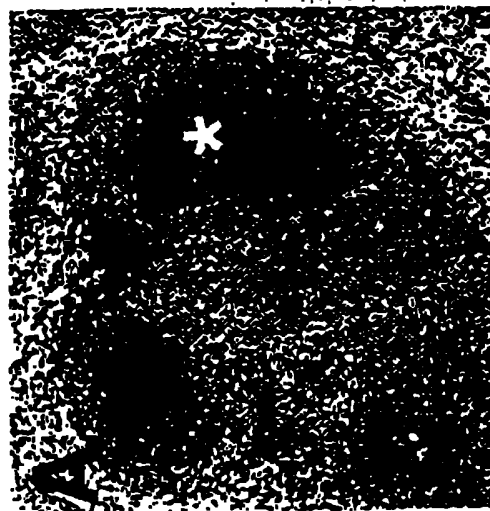
Obr. 3F

Obr. 3B



Obr. 3E

Obr. 3A



Obr. 3D

5/10



Obr. 4A



Obr. 4C

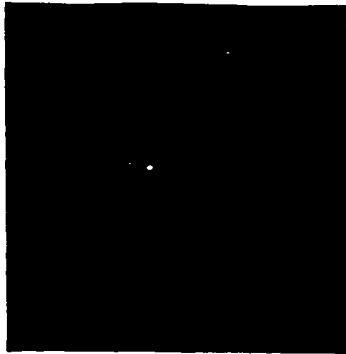


Obr. 4E

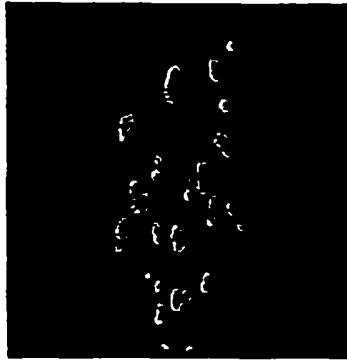


Obr. 4G

6/10



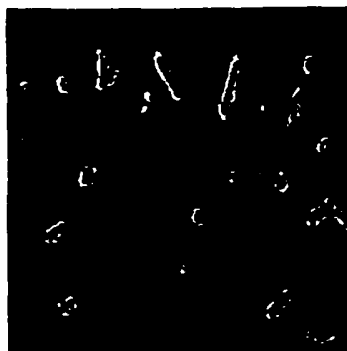
Obr. 4B



Obr. 4D



Obr. 4F



Obr. 4H

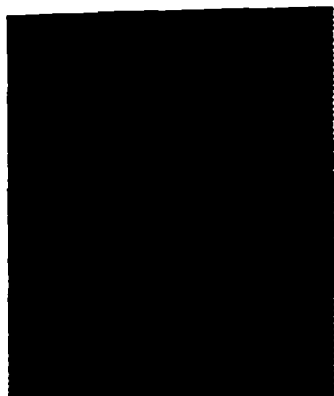
7/10



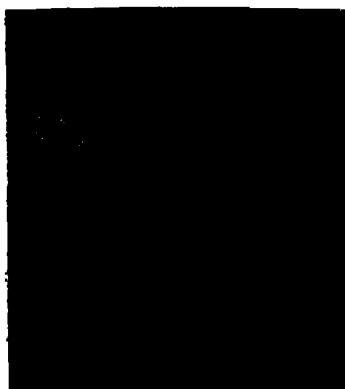
Obr. 5C



Obr. 5F



Obr. 5B



Obr. 5E



Obr. 5A



Obr. 5D

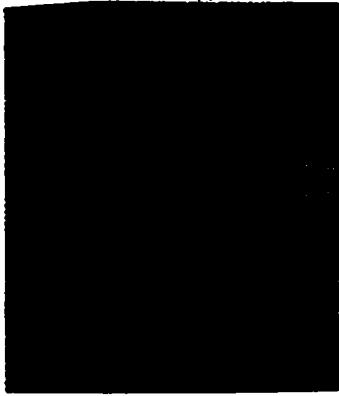
0 1 2 3

4 5 6 7

8/10



Obr. 5I

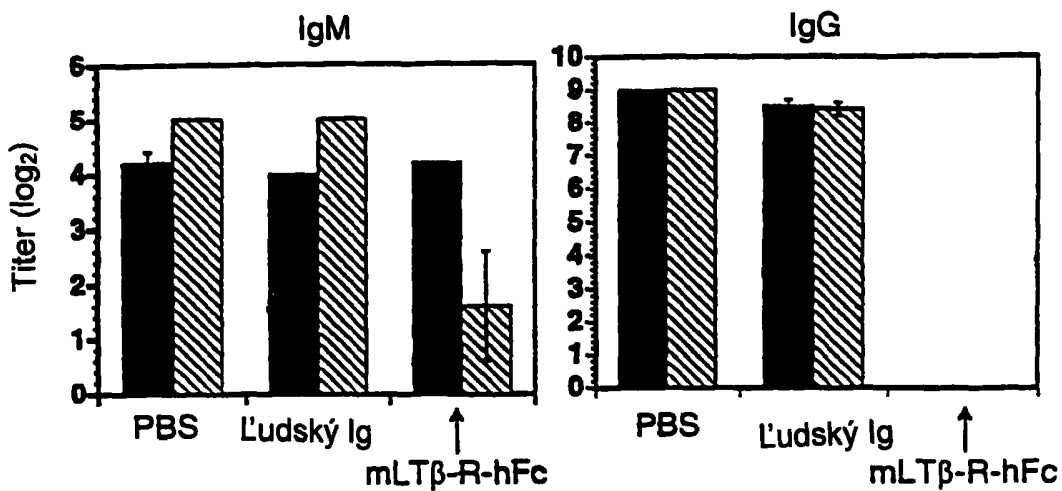


Obr. 5H

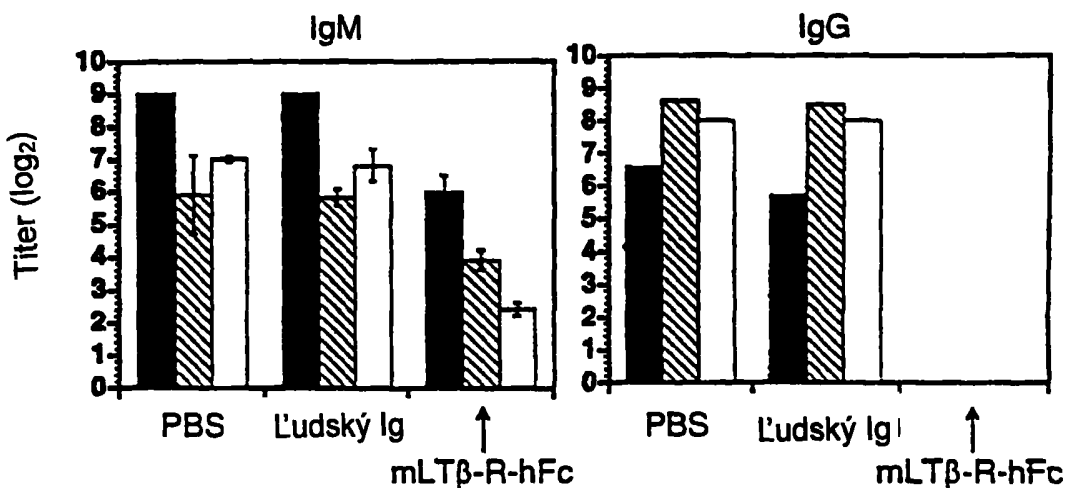


Obr. 5G

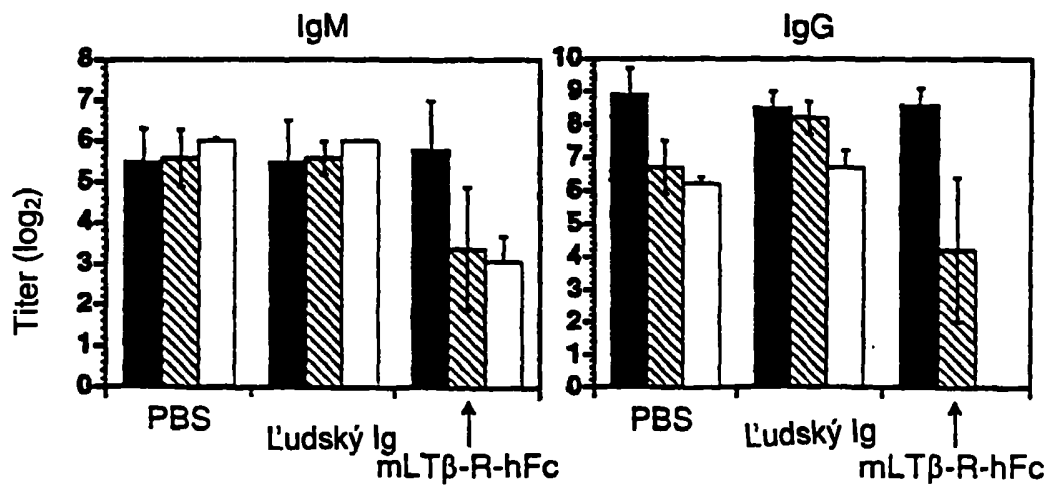
9/10



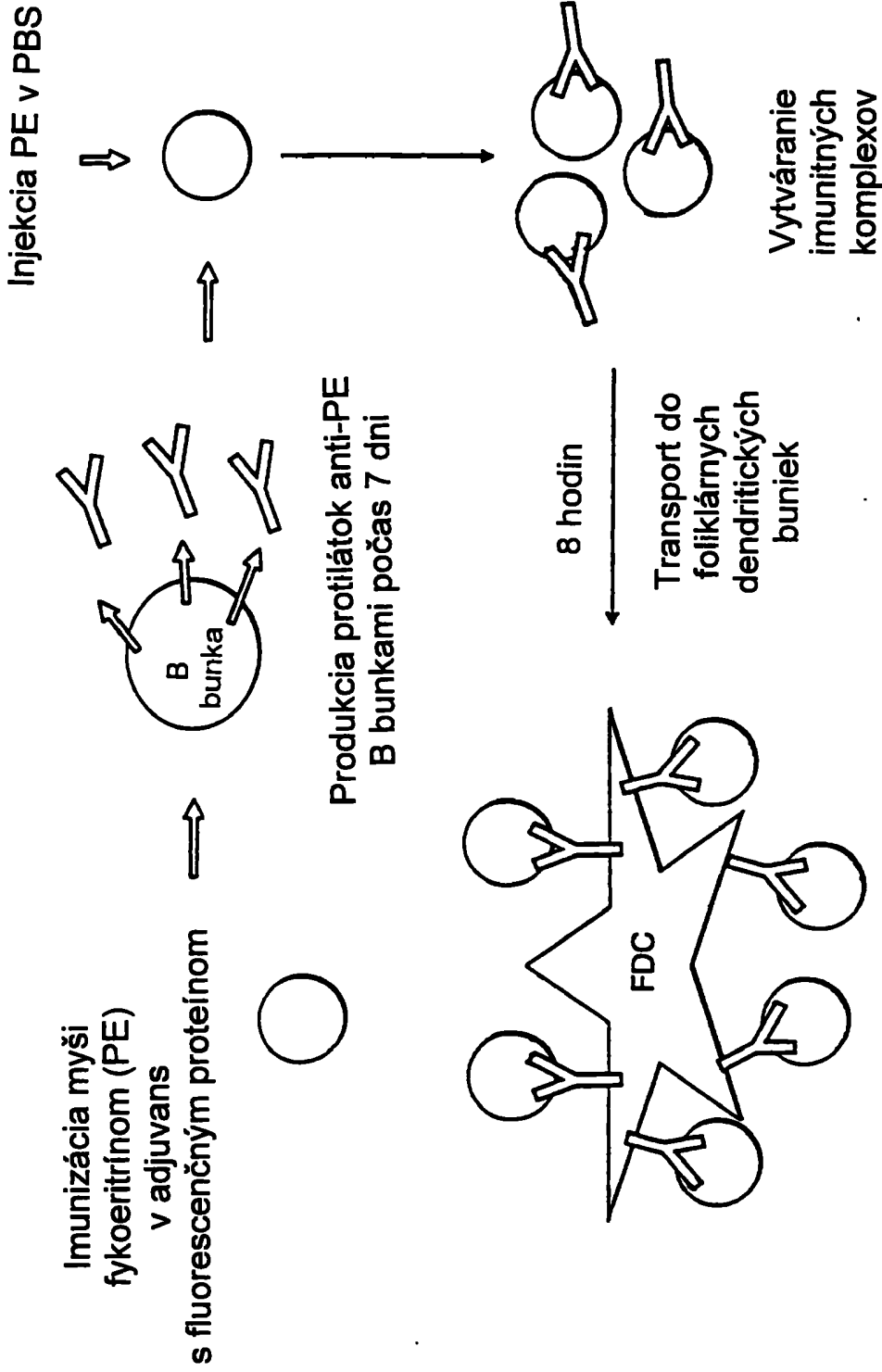
Obr. 6A



Obr. 6B



Obr. 6C



Imunitné komplexy zachytené na FDC
Priame pozorovanie fluorescence

Obr. 7