Это изобретение относится, в целом, к способам индуцирования противовирусного ответа у индивидуума. В частности, это изобретение обеспечивает способы лечения индуцированных вирусом системного шока и/или расстройства дыхания у индивидуума. Способы включают введение определенных "блокирующих лимфотоксин-β средств".

Предпосылки к созданию изобретения

Некоторые вирусы, включающие вирус Sin Nombre (SNV), Эбола, Марбурга, Ласса и Денге, вызывают острые заболевания с множеством последующих симптомов: быстрое развитие заболевания, жар, системный шок и расстройство дыхания (Lacy et al. (1997) Adv. Ped.Inf. Dis. 12:21). Другим общим свойством этих инфекций является системное распространение вирусной инфекции, мишенью которой являются эндотелиальные клетки и макрофаги (Lacy et al. (1997) Adv. Ped. Inf. Dis. 12:21). Большинство из этих выявленных вирусов, за исключением SNV, были первоначально идентифицированы десятки лет назад. За время с момента их открытия эти патогены заново массово распространились во всем мире. Так, с июня 1998 г. было 183 подтвержденных случая обнаружения SNV, являющегося причиной синдрома, вызванного Хантавирусом легочного шока, в юго-западных штатах Америки из-за возрастания в популяциях оленьего хомячка. Только в 55% случаев отмечали выживание после заражения (Центры контроля заболеваний и профилактики. MMWR. 47, 44 9 (1998)). В настоящее время мало известно о патогенезе этих вирусов и о том, как эффективно лечить тысячи больных, заражаемых каждый год во всем мире, страдающих от вызванного вирусом системного шока и расстройства дыхания.

Таким образом, существует необходимость установить новые способы лечения вызванных вирусом системного шока и расстройства дыхания у индивидуума.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение решает проблемы, относящиеся к вышеописанному, представлением фармацевтических композиций и способов лечения вызванных вирусом системного шока и/или расстройства дыхания у индивидуума за счет блокады пути метаболизма лимфотоксина-β.

Способы и композиции по этому изобретению частично используют открытие, что некоторые средства, обозначенные здесь как средства, блокирующие лимфотоксин-β (ЛТ-β), могут быть применены для лечения у индивидуума вызванных вирусом системного шока и расстройства дыхания. В одном варианте осуществления изобретения к блокирующим ЛТ-β средствам относится средство, блокирующее рецептор лимфотоксина-β (ЛТ-β-Р). В предпочтительном варианте осуществления изобретения блокирующим ЛТ-β-Р средством является антитело против рецептора лимфотоксина-β или рецептора растворимого лимфотоксина-β. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения блокирующим ЛТ-β-Р средством является рекомбинантный составной (гибридный) белок ЛТ-β-Р, который имеет связывающий внеклеточный лиганд домен ЛТ-β-Р, соединенный с константным доменом иммуноглобулина с тяжелой цепью.

Вышеуказанные и другие объекты, черты, аспекты и преимущества настоящего изобретения, а также само изобретение будут лучше поняты из последующего описания предпочтительных вариантов осуществления изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает, что заражение мышей линии NZB клоном 13 вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМВ) приводит к смертности. Представлены кривая смертности мышей линии NZB, инфицированных ЛХМВ-13 (n=14), и титры вируса в различных тканях инфицированных ЛХМВ-13 (n=7) мышей через шесть дней после заражения.

На фиг. 2 представлены гистологические характеристики инфицирования ЛХМВ-13 у мышей линии NZB.

(A) Нормальное легкое при (100X, гематоксилин+эозин).

(B) Интерстициальный пневмонит с одноядерным клеточным инфильтратом и утолщением стенки альвеолы в легком, в день 5 после заражения (100X, гематоксилин+эозин).

(C) Лимфоидное истощение, клеточный некроз и облитерация структуры фолликул в селезенке (25X, гематоксилин+эозин).

(D) Более высокое увеличение, показывающее клеточный некроз и кариоректические инородные вещества в селезенке (158X, гематоксилин+эозин).

(E) Позитивные по ЛХМВ-13 эндотелиальные клетки (стрелы) и макрофаги (белые стрелы) в легком (100X, краситель железный гематоксилин).

(F) Позитивные по ЛХМВ-13 эндотелиальные клетки (стрелы) и мезотелиальные клетки (головки стрел), и макрофаги (белые стрелы) в селезенке (50X, краситель железный гематоксилин).

(G) Позитивные по ЛХМВ-13 эндотелиальные клетки в сердце (100X, краситель железный гематоксилин).

(H) Позитивные по ЛХМВ-13 клетки Купфера и синусоидальные выстилающие клетки в печени (100X, краситель железный гематоксилин).

Фиг. 3 показывает, что блокада метаболических путей передачи сигнала ЛТ-β-Р значительно увеличивает степень выживания инфицированных клоном 13 мышей линии NZB. Представлены кривые

смертности инфицированных клоном 13 мышей линии NZB, обработанных как здесь описано. Мышам линии NZB вводили внутривенно 2.5 x 10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ) клона 13, затем делали две внутрибрюшинные инъекции 250 мкг антитела TN3-19.12 в не содержащем эндотоксин забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР) (см. ссылку S) в день 1 и в день 4 после заражения. Контрольным мышам инъецировали тот же объем ЗФР, не содержащего антител, в те же самые дни. Мышей обрабатывали, как описано в ссылке R. Группе, подвергшейся тройной обработке, вводили белки TNFR55-Ig и ЛТ-β-P-Ig (TNF означает фактор некроза опухоли, Ig означает иммуноглобулин) внутрибрюшинно в количествах 200 мкг в день 0 и день 3 после инфицирования. Контрольным мышам вводили человеческое антитело, используемое в синтезе этих составных белков (AY 1943-29), в те же самые дни в таких же количествах. Мышей, получающих только ЛТ-β-P-Ig, обрабатывали идентично, за исключением того, что не делали инъекций TNFR55-Ig. Были собраны данные от нескольких экспериментов с применением только антитела против TNF (TN3-19.12), n=16 только для одного ЛТ-β-P-Ig, n=10 для группы, подвергающейся тройной обработке, (n=10 для группы, подвергающейся тройной обработке, n=22 только для ЛТ-β-P-Ig, n=10 для группы, обрабатываемой ЛТ-β-P-Ig и TNFR55-Ig, n=5 для группы, обрабатываемой антителом против TNF и TNFR55-Ig, n=6 только для антитела против TNF (TN3-19.12) и n=25 для контроля).

Фиг. 4 показывает, что блокирование метаболического пути ЛТ-β-P приводит к понижению действия Т-лимфоцитных CD8. Спленоциты от мышей различных групп обработки собирали в день 6 после заражения и окрашивали с помощью L^d-тетрамера, содержащего 9-мерный пептид NP118, как описано ранее. Приведенные значения установлены для неспецифического фонового окрашивания.

Чтобы проследить за продуцированием γ-интерферона в ответ на тот же пептид, клетки подвергали инкубированию в течение 5 ч при 37°C в присутствии NP118 при конечной концентрации 1 мкг/мл и интерлейкина-2 (IL-2). Приведенные здесь значения установлены для фоновых уровней в отсутствие пептида. Спленоциты от трех мышей, обработанных контрольным человеческим Ig, объединяли, как и те от двух мышей, обработанных ЛТ-β-P-Ig (ЛТ-β #2/3). Все другие результаты получают от отдельных мышей.

Фиг. 5 показывает, что снижение Т-лимфоцитных $CD8^+$, но не Т-лимфоцитных $CD4^+$, обращает летальные эффекты от заражения ЛХМВ-13 у мышей линии NZB. Мышей обрабатывали, как описано для снижения клеточных популяций in vivo. Кривая смертности представлена для каждой из групп обработки (n=4).

Подробное описание изобретения

Определения

Для того, чтобы яснее и точнее указать объект заявленного изобретения, представлены следующие определения для специальных терминов, примененных в прилагаемом далее описании и заявленных пунктах формулы изобретения.

Лимфотоксин-β (ЛТ-β) является представителем семейства лигандов TNF, которое также включает лиганды к Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 и рецепторам 4-IBB (Smith et al., Cell, 76, pp. 959-62 (1994)). Передача сигнала некоторыми членами семейства TNF, включая TNF, ЛТ-α, ЛТ-β и Fas, может вызвать гибель опухолевой клетки путем некроза или апоптоза (запрограммированная гибель клетки). В неонкогенных клетках взаимодействия лиганд-рецептор TNF и многих из членов семейства лигандов TNF влияют на развитие иммунной системы и иммунные ответы на различные контрольные заражения.

Лимфотоксин-β (также называемый p33) был идентифицирован на поверхности Т-лимфоцитов, линий Т-лимфоцитов, линий В-клеток и активированных лимфокином киллерных клеток (ЛАК). ЛТ-β является объектом рассматривающихся международных заявок заявителя PCT/US 91/04588, опубликована 9 января 1992 г. как заявка на международный патент WO 92/00329; и PCT/US 93/11669, опубликована 23 июня 1994 г. как заявка на международный патент WO 94/138 08, на которые здесь ссылаются.

Рецептор ЛТ-β, представитель семейства рецепторов TNF, специфически связывается с поверхностью лигандов ЛТ. ЛТ-β-P связывает гетеромерные комплексы ЛТ (преимущественно ЛТ-α1/β2 и ЛТ-α2/β1), но не связывает TNF или ЛТ-α (Crowe et al., Science, 264, pp. 707-10 (1994)). Передача сигнала ЛТ-β-P может играть роль в развитии периферического лимфоидного органа и в гуморальных иммунных ответах.

Матричные рибонуклеиновые кислоты ЛТ-β-P найдены в селезенке человека, вилочковой железе и других основных органах. Характерные особенности экспрессии ЛТ- β-P похожи на таковые, приведенные для p55-TNF-P, за исключением того, что ЛТ-β-P отсутствует на Т-лимфоцитах и линиях Т-лимфоцитов периферической крови.

Термин "блокирующее ЛТ-β средство" относится к средству, которое может уменьшать связывание лиганда с ЛТ-β, клеточные поверхностные скопления ЛТ-β, или передачу сигнала ЛТ-β или которое может влиять на то, как сигнал ЛТ-β интерпретируется внутри клетки. Примеры блокирующих ЛТ-β средств включают антитела против ЛТ-β, растворимые молекулы ЛТ-β-P-Fc и антитела против ЛТ-α,

против ЛТ-α/β и против ЛТ-β-Р. Предпочтительно антитела не реагируют перекрестно с секретируемой формой ЛТ-α.

Термин "блокирующее ЛТ-β-рецептор средство" относится к средству, которое может уменьшать связывание лиганда с ЛТ-β-Р, образование скоплений ЛТ-β-Р на клеточной поверхности или передачу сигнала ЛТ-β-Р или которое может влиять на то, как сигнал ЛТ-β-Р интерпретируется внутри клетки. Примеры блокирующих ЛТ-β-Р средств включают растворимые молекулы ЛТ-β-Р-Fc и антитела против. ЛТ-β-Р. Предпочтительно антитела не реагируют перекрестно с секретируемой формой ЛТ-α.

Термин "антитело против рецептора ЛТ-β" относится к любому антителу, которое специфически связывается с, как минимум, одним эпитопом рецептора ЛТ-β.

Термин "антитело против ЛТ" относится к любому антителу, которое специфически связывается с, как минимум, одним эпитопом ЛТ-α, ЛТ-β или комплекса ЛТ-α/β.

Термин "лиганд ЛТ" относится к гетеромерному комплексу ЛТ или его производному, которое может специфически связываться с рецептором ЛТ-β.

Термин "передача сигнала ЛТ-β-Р" относится к молекулярным реакциям, связанным с метаболизмом ЛТ-β-Р, и к последующим молекулярным реакциям, вытекающим из этого.

Термин "связывающий лиганд домен ЛТ-β-Р" относится к участку или участкам ЛТ-β-Р, которые вовлечены в специфическое узнавание лиганда ЛТ и во взаимодействие с лигандом ЛТ.

Термин "гетеромерный комплекс ЛТ-α/β" и "гетеромерный комплекс ЛТ" относится к стабильной ассоциации между, как минимум, одной субъединицей ЛТ-α и одной или более субъединицами ЛТ-β, включая растворимые, мутантные, измененные и химерные формы одной или более субъединиц. Субъединицы могут ассоциироваться путем электростатического, вандерваальсового или ковалентного взаимодействия. Предпочтительно гетеромерный комплекс ЛТ-α/62 имеет, как минимум, две соседние субъединицы ЛТ-β и не имеет примыкающих субъединиц ЛТ-α. Когда гетеромерный комплекс ЛТ-α/β служит в качестве активирующего ЛТ-β-Р средства при анализе роста клеток, комплекс предпочтительно является растворимым и имеет стехиометрию ЛТ-α 1/β 2.

Растворимые гетеромерные комплексы ЛТ-α/62 не имеют трансмембранного домена и могут быть секретированы подходящей клеткой-хозяином, которая была преобразована для экспрессии субъединиц ЛТ-α и/ или ЛТ- β (Crowe et al., Immunol. Methods, 168, pp. 79-89 (1994)).

Термины "поверхностный комплекс ЛТ-α/62" и "поверхностный комплекс ЛТ" относятся к комплексу, включающему ЛТ-α и связанные с мембраной субъединицы ЛТ-β, включая мутантные, измененные и химерные формы одной или более субъединиц, который обнаруживается на клеточной поверхности.

"Поверхностный лиганд ЛТ" относится к поверхностному комплексу ЛТ или его производному, который может специфически связываться с рецептором ЛТ-β.

"Эффективное количество" означает количество, достаточное для того, чтобы привести к полезным или желаемым клиническим результатам. Эффективное количество может быть введено в один или более приемов. Для целей данного изобретения эффективным количеством средства, которое блокирует связывание лимфотоксина-β с его рецептором, является такое количество средства, которого достаточно, чтобы уменьшить интенсивность, стабилизировать или задержать развитие ответной реакции на вирус. В частности, средство, которого достаточно для уменьшения интенсивности, стабилизации или задержки развития индуцированных вирусом системного шока и расстройства дыхания. Определение и измерение этих показаний эффективности известны специалистам в этой области.

Понятие "индивидуум" относится к позвоночным, особенно к видам млекопитающих, и включает, но не ограничивается этим, домашних животных, животных для спорта и приматов, включая людей.

"Функциональным эквивалентом" аминокислотного остатка является (i) аминокислота, имеющая такие же реакционные свойства, что и аминокислотный остаток, который был заменен функциональным эквивалентом; (ii) аминокислота антагониста по изобретению, аминокислота, имеющая свойства, подобные свойствам аминокислотного остатка, который был заменен функциональным эквивалентом; (iii) неаминокислотная молекула со свойствами, подобными свойствам остатка аминокислоты, который был заменен функциональным эквивалентом.

Первый полинуклеотид, кодирующий белковый антагонист по изобретению, является "функционально эквивалентным" в сравнении со вторым полинуклеотидом, кодирующим белок антагониста, если он удовлетворяет, по меньшей мере, одному из следующих условий:

(a) "функциональный эквивалент" является первым полинуклеотидом, который гибридизуется со вторым полинуклеотидом в стандартных условиях гибридизации и/или дегенерируется до первой полинуклеотидной последовательности. Наиболее предпочтительно он кодирует мутантный белок, имеющий активность белка интегринового антагониста;

(b) "функциональный эквивалент" является первым полинуклеотидом, который кодирует при экспрессии аминокислотную последовательность, закодированную вторым полинуклеотидом.

Блокирующие ЛТ-β средства, используемые в изобретении, включают, но не ограничиваются этим, средства, перечисленные здесь, а также их функциональные эквиваленты. Используемый здесь термин "функциональный эквивалент" относится, таким образом, к блокирующему ЛТ-β средству или к полинуклеотиду, кодирующему блокирующее ЛТ-β средство, который оказывает такой же или улучшенный полезный эффект на реципиент, как и блокирующее ЛТ-β средство, функциональным эквивалентом которого он считается. Как поймет обычный специалист в этой области, функционально эквивалентный белок может быть получен с помощью рекомбинантных методов, например, при экспрессии "функционально эквивалентной ДНК". Соответственно, рассматриваемое изобретение охватывает блокирующее ЛТ-β средство, кодируемое встречающимися в природе ДНК, а также и неприродными ДНК, которые кодируют такой же белок, как кодируемый природной ДНК. Вследствие дегенерации нуклеотидных кодирующих последовательностей другие полинуклеотиды могут быть использованы для кодирования блокирующих ЛТ-β средств. Они включают целиком или участки вышеупомянутых последовательностей, которые изменены с помощью замещения различных кодонов, которые кодируют такой же аминокислотный остаток внутри последовательности, производя, таким образом, молчащую замену. Такие измененные последовательности рассматриваются как эквиваленты этих последовательностей. Например, Phe (F) кодируется двумя кодонами, TTC или TTT, Tyr (Y) кодируется с помощью TAC или TAT и His (H) кодируется с помощью CAC или CAT. С другой стороны, Trp (W) кодируется единственным кодоном, TGG.

Соответственно, понятно, что для данной последовательности ДНК, кодирующей отдельный интегрин, будет много вырожденных последовательностей ДНК, которые будут кодировать его. Эти вырожденные последовательности ДНК рассматриваются в рамках данного изобретения.

Термин "соединение" или "гибридный белок" относится к колинеарному ковалентному связыванию двух или более белков или их фрагментов через их индивидуальные пептидные основные цепи, наиболее предпочтительно путем генетической экспрессии полинуклеотидной молекулы, кодирующей такие белки. Предпочтительно, чтобы белки или их фрагменты были из различных источников, так что этот тип составного белка называется "химерная" молекула. Таким образом, предпочтительными гибридными белками являются химерные белки, которые включают блокирующее ЛТ-β средство или фрагмент, ковалентно связанный с второй частью, которая не является блокирующим ЛТ-β средством. Предпочтительные гибридные белки по изобретению могут включать участки интактных антител, сохраняющих антиген-связывающую специфичность, например, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты F(ab')2, фрагменты F(v), мономеры или димеры с тяжелой цепью, мономеры или димеры с легкой цепью, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, и им подобные соединения.

Наиболее предпочтительными гибридными белками являются химерные, они включают участок блокирующего ЛТ-β средства, соединенный или иначе связанный со всеми или с частью шарниров и константных областей легкой цепи иммуноглобулина, тяжелой цепи иммуноглобулина или обеих. Таким образом, изобретение представляет молекулу, которая включает: (1) участок блокирующего ЛТ-β средства, (2) второй пептид, например, пептид, который повышает растворимость или время жизни in vivo участка блокирующего ЛТ-β средства, например, член суперсемейства иммуноглобулинов или фрагмент или часть его, например, часть или фрагмент IgG, например, константную область тяжелой цепи человеческого IgGl, например, CH2, CH3, и шарниры. Конкретно, "ЛТ-β или соединение ЛТ-β-P/Ig" является белком, включающим биологически активное блокирующее ЛТ-β средство по изобретению, например, растворимый ЛТ-β-P, или его биологически активный фрагмент, связанный с N-концом цепи иммуноглобулина, где участок N-конца иммуноглобулина заменен блокирующим ЛТ-β средством. Видом ЛТ-β или соединения ЛТ-β-P/Ig является "соединение ЛТ-β-P/F_c", которое означает белок, включающий ЛТ-β-P по изобретению, связанный с, как минимум, частью константного домена иммуноглобулина. Предпочтительное соединение с F_c включает блокирующее ЛТ-β средство по изобретению, связанное с фрагментом антитела, содержащего С-терминальный домен тяжелых иммуноглобулиновых цепей.

Под "стандартными условиями гибридизации" подразумевают соли и температурные условия, в основном, эквивалентные 0,5 x SSC до примерно 5 x SSC (SSC означает раствор цитрата и хлорида натрия) и 65°C как для гибридизации, так и для промывки. Термин "стандартные условия гибридизации", используемый здесь, является поэтому действующим определением и охватывает интервал условий гибридизации. Условия, требующие большей точности, могут, например, включать гибридизацию с использованием буфера для скрининга бляшек (0,2% поливинилпирролидона, 0,2% Ficoll^R 400; 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 50 мМ трис-HCl (pH 7.5); 1M NaCl; 0,1% пирофосфата натрия; 1% додецилсульфата натрия); 10% сульфата декстрана и 100 мкг/мл денатурированной, обработанной ультразвуком при 65°C в течение 12-20 ч ДНК спермы лосося, и промывку 75 мМ NaCl/7.5 мМ цитратом натрия (0,5 x SSC) / 1% додецилсульфатом натрия при 65°C. Условия, требующие соблюдения меньшей точности, могут, например, включать гибридизацию с использованием буфера для скрининга бляшек, 10% сульфата декстрана и 110 мкг/мл денатурированной обработанной ультразвуком при 55°C в течение 12-20 ч ДНК спермы лосося, и промывку 300 мМ NaCl/30 мМ цитратом натрия (2.0 x SSC) / 1% додецилсульфатом

натрия при 55°C. Смотрите также Current Protocols in Molecular Biology, изд. John Wiley & Sons, Inc. Нью-Йорк, разделы 6.3.1-6.3.6, (1989).

"Терапевтическая композиция", как упоминается здесь, характеризуется как включающая белки по изобретению и другие биологически совместимые ингредиенты.

Терапевтическая композиция может содержать наполнители, как, например, воду, минералы и носители, например, белок.

II. Описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения.

Настоящее изобретение частично обусловливается открытием, что блокирующие ЛТ-β средства могут вызвать противовирусный ответ у индивидуума. Было обнаружено, что лечение индивидуума, инфицированного вирусом, может значительно увеличить степень выживания индивидуума. Конкретно, было показано, что лечение инфицированных ЛХМВ-13 мышей линии NZB с помощью блокирующего ЛТ-β средства, как, например, гибридной белок ЛТ-β-Р-Ig, повышало степень выживания на 73%.

В настоящее время лечение болезней, вызванных вирусами Эбола, Денге, SNV и другими вирусами, упомянутыми здесь, является превентивным, использующим действие, относящееся к передаче заболевания. Для этих высокопатогенных вирусов не существует вакцин. Рибавирин, аналог гуанидина, был применен в качестве противовирусного лекарства такого рода к некоторым из этих инфекций с воспроизводимым эффектом, подтвержденным только при лечении геморрагической лихорадки Ласса, когда использовался на раннем этапе болезни (M.D. Lacy and R.A. Smego, Adv. Ped. Inf. Dis., 12, 21 (1997)). Данные авторов показывают, что некоторые патологии, связанные с этими вирусами, могут быть иммуноопосредствованными. Блокада системы ЛТ могла бы значительно увеличить возможность выживания путем временного уменьшения числа специфичных к вирусу Т-лимфоцитных CD8 и их функциональности. Клинические исследования, использующие некоторые средства блокирования пути метаболизма TNFα, уже в процессе разработки для лечения некоторых недомоганий (H.I. Pass, D. Mew, H.A. Pass, et al., Chest Surg. Clin. N. Amer. 5, 73 (1995)). Есть уверенность, что лечение с помощью ЛТ-β-Р-Ig следует рассматривать для дальнейшего исследования на моделях животного с целью возможного использования в исследованиях на людях, включая больных с острыми, быстро прогрессирующими вирусными инфекциями, включающими шок и/ или расстройство дыхания.

Блокирующие ЛТ-β средства

В одном варианте осуществления данного изобретения блокирующее ЛТ-β средство включает антитело, направленное против ЛТ-β, которое ингибирует передачу сигнала ЛТ-β. Предпочтительно антитело против ЛТ-β является моноклональным антителом. Ингибирующие антитела против ЛТ-β и другие блокирующие ЛТ-β средства могут быть идентифицированы с использованием методов скрининга, которые определяют способность одного или более средств соединяться с лигандом ЛТ или ингибировать эффекты передачи сигнала ЛТ-β на клетки.

В другом варианте осуществления данного изобретения блокирующее ЛТ-β средство включает блокирующее рецептор ЛТ-β (ЛТ-β-Р) средство. В предпочтительном варианте осуществления изобретения блокирующим ЛТ-β-Р средством является антитело против ЛТ-β-Р, которое ингибирует передачу сигнала ЛТ-β-Р. Предпочтительно антитело против ЛТ-β-Р является моноклональным антителом. Одним из таких ингибирующих моноклональных антител против ЛТ-β-Р является моноклональное антитело BDA8. Ингибирующие антитела против ЛТ-β-Р и другие блокирующие ЛТ-β-Р средства могут быть идентифицированы с использованием методов скрининга, которые определяют способность одного или более средств либо связываться с ЛТ-β-Р или лигандом ЛТ, либо ингибировать эффекты передачи сигнала ЛТ-β-Р на клетки.

Один метод скрининга использует цитотоксические эффекты передачи сигнала ЛТ-β-Р на опухолевые клетки, несущие ЛТ-β-Р. Опухолевые клетки подвергаются действию одного или более активирующих ЛТ-β-Р средств, чтобы индуцировать передачу сигнала ЛТ-β-Р. Активирующие ЛТ-β-Р средства включают гетеромерные комплексы ЛТ-α/62 (предпочтительно растворимый ЛТ-α 1/β 2) в присутствии γ–интерферона (IFNγ) или активирующее антитело против ЛТ-β-Р (см. ниже; также описано в поданной заявителем одновременно рассматриваемой заявке США с регистрационным номером 08/378,968).

Антитела и другие средства, которые могут блокировать передачу сигнала ЛТ-β-Р, выбираются на основании их способности ингибировать цитотоксический эффект передачи сигнала ЛТ-β-Р на опухолевые клетки в следующем анализе:

1) Опухолевые клетки, например, клетки HT29, культивируются от трех до четырех дней в ряде ячеек с культурой клеток ткани, содержащих среды и как минимум одно активирующее ЛТ-β-Р средство, в присутствии или отсутствии серийных разведений исследуемого средства;

2) К смеси опухолевых клеток добавляют краситель для жизнеспособных клеток, измеряющий митохондриальную функцию, как, например, 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид, тиазолиловый синий (MTT), и смесь подвергают реакции в течение нескольких часов;

3) Оптическую плотность смеси в каждой ячейке количественно оценивают при длине волны света 550 нм (ОП 550). ОП 550 пропорциональна числу опухолевых клеток, остающихся в каждой ячейке в

присутствии активирующего ЛТ-β-Р средства и исследуемого блокирующего ЛТ-β-Р средства. Средством или комбинацией средств, которые при таком анализе могут уменьшить активируемую ЛТ-β-Р цитотоксичность опухолевой клетки, как минимум, на 20%, является блокирующее ЛТ-β-Р средство в рамках настоящего изобретения.

Любое средство или комбинация средств, активирующие передачу сигнала ЛТ-β-Р, могут быть использованы в вышеописанном анализе для идентификации блокирующих ЛТ-β-Р средств. Активирующие ЛТ-β-Р средства, которые индуцируют передачу сигнала ЛТ-β-Р (как, например, активирующие антитела против ЛТ-β-Р) могут быть отобраны на основе их способности только одних или в комбинации с другими средствами потенциировать цитотоксичность опухолевой клетки, используя анализ опухолевых клеток, описанный выше.

Другим методом для отбора блокирующего ЛТ-β-Р средства является проверка способности предполагаемого средства к прямому вмешательству в связывание ЛТ-лиганд-рецептор. Средством или комбинацией средств, которые могут блокировать связывание лиганд-рецептор по меньшей мере на 20%, является блокирующее ЛТ-β-Р средство в рамках данного изобретения.

Любые из ряда анализов, которые определяют силу связывания лиганд-рецептор, могут быть использованы для проведения конкурентных испытаний с предполагаемыми блокирующими ЛТ-β-Р средствами. Силу связывания между рецептором и лигандом можно измерить при использовании ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) или радиоиммунного анализа (RIA). Специфическое связывание может также быть измерено с помощью введения флуоресцентной метки в комплексы антитело-антиген и проведения анализа клеточной сортировки с возбуждением флуоресценции (FACS), или осуществления других подобных иммунологических методов, техника проведения которых хорошо известна в данной области.

Взаимодействие при связывании лиганд-рецептор может быть также измерено с помощью прибора BIAcore TM (фирма Pharmacia Biosensor), использующего определение плазмонного резонанса (Zhou et al., Biochemistry, 32, pp. 8193-98 (1993); Faegerstram and O'Shannessy, "Surface plasmon resonance detection in affinity technologies", in Handbook of Affinity Chromatography, p.p. 229 - 52, Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк (1993)).

Технология BIAcore TM позволяет присоединить рецептор к целевой поверхности и поместить над этим лиганд. Определение плазмонного резонанса дает прямую количественную оценку количества массы, связанной с поверхностью в реальном времени. Методика определяет константы скорости и связывания, и отделения и, таким образом, константа диссоциации лиганд-рецептор и константа сродства могут быть непосредственно определены в присутствии или отсутствии предполагаемого блокирующего ЛТ-β-Р средства.

С помощью любой из этих или других методик определения взаимодействий рецептор-лиганд можно оценить способность блокирующего ЛТ-β-Р средства, одного или в комбинации с другими средствами, ингибировать связывание поверхностных или растворимых лигандов ЛТ с поверхностными или растворимыми молекулами ЛТ-β-Р. Такие анализы могут также быть использованы для испытания блокирующих ЛТ-β-Р средств или производных таких средств (например, слитые соединения, химеры, мутанты и химически измененные формы), одних или в комбинации, для оптимизации способности такого измененного средства блокировать активацию ЛТ-β-Р.

Блокирующие ЛТ-β-Р средства в одном варианте осуществления этого изобретения включают растворимые молекулы рецептора ЛТ-β. Последовательность внеклеточного участка человеческого ЛТ-β-Р, которая кодирует связывающий лиганд домен, представлена на фиг. 1 патента США № 5925351, приведенном здесь в качестве ссылки. Используя информацию о последовательности в фиг. 1 патента США № 5925351 и методики рекомбинантной ДНК, хорошо известные в данной области, функциональные фрагменты, кодирующие связывающий лиганд домен ЛТ-β-Р, могут быть клонированы в вектор и экспрессированы в подходящем хозяине для получения растворимой молекулы ЛТ-β-Р. Растворимые молекулы ЛТ-β-Р, которые могут конкурировать с нативными рецепторами ЛТ-β за связывание лиганда ЛТ согласно описанным здесь испытаниям, отбираются в качестве блокирующих ЛТ-β-Р средств.

Рецептор растворимого ЛТ-β, включающий аминокислотные последовательности, выбранные из представленных на фиг. 1 патента США № 5925351, может быть присоединен к одному или более ксеногенных белковых доменов ("гибридный домен") для повышения in vivo стабильности гибридного белка рецептора или для модуляции его биологической активности или локализации. Предпочтительно, устойчивые белки плазмы, которые обычно имеют полупериод существования при кровообращении более 20 ч, используются для конструирования гибридных белков рецептора. Такие белки плазмы включают, но не ограничиваются этим: иммуноглобулины, сывороточный альбумин, липопротеины, аполипопротеины и трансферрин. Последовательности, которые могут нацелить растворимую молекулу ЛТ-β-Р на особый тип клеток или тканей, могут также быть присоединены к связывающему лиганд домену ЛТ-β-Р для создания специфически локализованного составного белка растворимого ЛТ-β-Р. Вся или функциональная часть внеклеточной области ЛТ-β-Р (фиг. 1 патента США № 5925351), включающая связывающий ли-

ганд домен ЛТ-β-Р, может быть соединена с константной областью иммуноглобулина, подобно домену Fc тяжелой цепи IgGl человека (Browning et al., J. Immunol., 154, pp. 33-46 (1995)). Растворимые гибридные белки рецептор - IgG являются обычными иммунологическими реагентами, и методы их построения известны в данной области (см., например, патент США № 5225538).

Функциональный связывающий лиганд домен ЛТ-β-Р может быть присоединен к иммуноглобулиновому домену Fc, производному иммуноглобулинового класса или подкласса, другого, нежели IgGl. Домены Fc антител, которые принадлежат к различным классам или подклассам Ig, могут активировать различные вторичные эффекторные функции. Активация происходит, когда домен Fc связан родственным рецептором Fc. Вторичные эффекторные функции включают способность активировать систему комплемента, скрещивать плаценту и связывать различные микробные белки. Описаны свойства различных классов и подклассов иммуноглобулинов у Roitt et al., Immunology, p. 4.8 (Mosby-Year Book Europe Ltd., 3-ье издание, 1993). Ферментный каскад комплемента может быть активирован доменами Fc связанных антигеном антител IgGl, IgG3 и IgM. Домен Fc IgG2 оказывается менее эффективным, и домены Fc IgG4, IgA, IgD и IgE являются неэффективными при активировании комплемента. Так, можно выбрать домен Fc на основании того, желательны ли связанные с ним вторичные эффекторные функции для определенного иммунного ответа или лечится ли заболевание гибридным белком ЛТ-β-Р-Fc. Если было бы выгодно повредить или убить несущую лиганд ЛТ клетку-мишень, можно было бы выбрать особенно активный домен Fc (IgGl) для приготовления составного белка ЛТ-β-Р-Fc. Альтернативно, если было бы желательно нацелить гибридной белок ЛТ-β-Р-Fc на клетку без запуска системы комплемента, мог бы быть выбран домен Fc неактивного IgG4.

Описаны мутации в доменах Fc, которые уменьшают или ликвидируют связывание с рецепторами Fc, и активация комплемента (S. Morrison, Annu. Rev. Immunol., 10, pp. 239-65 (1992)). Эти или другие мутации могут быть использованы, одни или в комбинации, для оптимизации активности домена Fc, применяемого для построения составного белка ЛТ-β-Р- Fc.

Продуцирование гибридного белка растворимого человеческого ЛТ-β-Р, включающего связывающие лиганд последовательности, соединенные с доменом Fc человеческого иммуноглобулина (чЛТ-β-Р-Fc), описывается в примере 1 патента США № 5925351, приведенный здесь в качестве ссылки. Одна линия клеток CHO (яичник китайского хомячка), приготовленная согласно примеру 1, которая секретирует чЛТ-β-Р-Fc, называется "hLT-β; R-hGl CHO#14". Образец этой линии был депонирован 21 июля 1995 г в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (Роквилл, штат Мэриленд) согласно условиям Будапештского Договора и ей был присвоен инвентарный номер CRL 11965.

Получение растворимой составной молекулы мышиного ЛТ-β-Р (мЛТ-β-Р-Fc) описывается в примере 2 патента США № 5925351, приведенный здесь в качестве ссылки. Линия клеток CHO, приготовленная согласно примеру 2 патента США 5925351, которая секретирует мЛТ-β-Р-Fc, называется "mLT-β; R-hGl CHO#1.3.BB". Образец этой линии был депонирован 21 июля 1995 года в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (Роквилл, штат Мэриленд) в соответствии с условиями Будапештского Договора и ей был присвоен инвентарный номер CRL 11964.

Различные аминокислотные остатки, образующие место соединения гибридного белка рецептор-Ig, могут изменять структуру, устойчивость и основную биологическую активность гибридного белка рецептора растворимого ЛТ-β. Одна или несколько аминокислот могут быть добавлены к С-концу выбранного фрагмента ЛТ-β-Р для модификации места соединения с отобранным гибридным доменом.

N-конец гибридного белка ЛТ-β-Р также может изменяться путем изменения положения, при котором отобранный фрагмент ДНК ЛТ-β-Р расщепляется по концу 5' для вставки в рекомбинантный экспрессирующий вектор. Стабильность и активность каждого гибридного белка ЛТ-β-Р может быть протестирована и оптимизирована с использованием обычной техники экспериментирования и анализов для выбора блокирующих ЛТ-β-Р средств, описанных здесь.

Используя последовательности связывающего лиганд домена ЛТ-β-Р внутри внеклеточного домена, представленного на фиг. 1, можно также построить варианты аминокислотной последовательности для модификации сродства рецептора растворимого ЛТ-β или составного белка к лиганду ЛТ.

Растворимые молекулы ЛТ-β-Р по изобретению могут конкурировать за поверхностное связывание лиганда ЛТ с эндогенной клеточной поверхностью рецепторов ЛТ-β. Представляется, что любая растворимая молекула, включающая связывающий лиганд домен ЛТ-β-Р, который может конкурировать с клеточными поверхностными рецепторами ЛТ-β за связывание лиганда ЛТ, является блокирующим ЛТ-β-Р средством, которое попадает в рамки настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения антитела против рецептора человеческого ЛТ-β действуют в качестве блокирующих ЛТ-β-Р средств для использования при лечении состояний, которые наблюдаются у индивидуумов, включая человека, или при риске вызываемых вирусом системного шока и расстройства дыхания. Антитела против ЛТ-β-Р по этому изобретению могут быть поликлональными или моноклональными (mAB) и могут быть модифицированы с целью оптимизации их способности бло-

кировать передачу сигнала ЛТ-β-Р, их in vivo биологической доступности, стабильности или других желательных свойств.

Сыворотки с поликлональными антителами против рецептора человеческого ЛТ-β готовят с применением принятых методик путем инъецирования животных, как, например, козы, кролики, крысы, хомяки или мыши, подкожно составным белком чЛТ-β-Р-Fc (пример 1 из патента США № 5925351) в полном адъюванте Фрейнда с последующей активной иммунизацией путем внутрибрюшинной или подкожной инъекции в неполном адъюванте Фрейнда. Поликлональные анти-сыворотки, содержащие желаемые антитела против рецептора ЛТ-β, подвергают скринингу с использованием принятых иммунологических методик.

Моноклональные антитела мыши против составного белка чЛТ-β-Р-Fc получают, как описано в патенте США № 5925351, пример 5. Линия клеток гибридомы (BD.A8.AB9), продуцирующая мышиные моноклональные антитела BDA8 против чЛТ-β-Р была депонирована 12 января 1995 г. в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) в соответствии с условиями Будапештского Договора и ей был присвоен инвентарный номер ATCC HB11798.

Различные формы антител против ЛТ-β-Р могут быть также получены с использованием стандартных методик рекомбинантной ДНК (Winter and Milstein, Nature, 349, pp. 293-99 (1991)). Например, могут быть сконструированы "химерные" антитела, в которых связывающий антиген домен из антитела животного соединяется с константным доменом человека (например, Cabilly et al., патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, pp. 6851-55 (1984)). Химерные антитела уменьшают наблюдаемые иммуногенные ответы, вызываемые антителами животных, когда используются при клиническом лечении людей. Кроме того, могут быть синтезированы рекомбинантные "гуманизированные антитела" (близкие человеческим антитела), которые узнают ЛТ-β-Р. Гуманизированные антитела являются химерами, включающими главным образом последовательности человеческого IgG, в которые вставлены участки, ответственные за специфическое связывание антигена (например, заявка на международный патент WO 94/04679). Животных подвергают иммунизации желаемым антигеном, выделяются соответствующие антитела, и удаляется часть последовательностей вариабельных участков, ответственных за специфическое связывание антигена. Участки, связывающие антигены животного происхождения, затем клонируются в соответствующее положение генов человеческих антител, в которых связывающие антиген участки подверглись делеции. Гуманизированные антитела минимизируют использование гетерологичных (межвидовых) последовательностей в человеческих антителах, и менее привлекательны для получения иммунных ответов у подвергающегося лечению субъекта.

Создание различных классов рекомбинантных антител против ЛТ-β-Р может быть также осуществлено при получении химерных или гуманизированных антител, включающих вариабельные домены против ЛТ-β-Р и человеческие константные домены (CH1, CH2, CH3), выделенные из различных классов иммуноглобулинов. Например, антитела IgM против ЛТ-β-Р с увеличенными валентностями связывающего антиген сайта могут быть получены рекомбинантно путем клонирования связывающего антиген сайта в векторы, несущие константные области человеческой цепи mu (Arulanandam et al., J. Exp. Med., 177, pp. 1439-50 (1993); Lane et al., Eur. J. Immunol., 22, pp. 2573-78 (1993); Traunecker et al., Nature, 339, pp. 68-70 (1989)). Кроме того, могут быть применены стандартные методики рекомбинантной ДНК, чтобы изменить сродство к связыванию рекомбинантных антител с их антигенами путем изменения аминокислотных остатков вблизи от связывающих антигены сайтов. Сродство к связыванию антигена гуманизированного антитела может быть увеличено с помощью мутагенеза, основанного на молекулярном моделировании (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, pp. 10029-33 (1989); WO 94/04679).

Может оказаться желательным увеличить или уменьшить сродство к ЛТ-β-Р антител против ЛТ-β-Р, зависящее от типа ткани, являющейся мишенью, или от особо предусмотренного графика лечения. Например, для случаев полупрофилактического лечения может быть полезным лечить больного с использованием постоянных уровней антител против ЛТ-β-Р с пониженной способностью передавать сигнал по метаболическому пути ЛТ-β. Таким же образом ингибирующие антитела против ЛТ-β-Р с повышенным сродством к ЛТ-β-Р могут быть полезны для кратковременного лечения.

Исследуя другие антитела, направленные против рецептора человеческого ЛТ-β, ожидают, что дополнительные антитела против ЛТ-β-Р, которые действуют как блокирующие ЛТ-β-Р средства у человека, могут быть определены для лечения состояний, которые наблюдаются у индивидуумов, включая человека, или при риске их появления, для лечения индуцированных вирусом системного шока и расстройства дыхания при использовании обычных методов эксперимента и описанных здесь анализов.

Другой предпочтительный вариант осуществления этого изобретения включает композиции и способы, которые включают антитела, направленные против лиганда ЛТ, которые функционируют в качестве блокирующих ЛТ-β-Р средств. Как описано выше для антител против ЛТ-β-Р, антитела против лиганда ЛТ, которые действуют в качестве блокирующих ЛТ-β-Р средств, могут быть поликлональными или моноклональными и могут быть модифицированы в соответствии с обычными процедурами для модуляции их свойств, касающихся связывания антигена, и их иммуногенности. Антитела против ЛТ по данно-

му изобретению могут быть представлены против любой одной из двух субъединиц ЛТ в отдельности, включая растворимые, мутантные, измененные и химерные формы субъединиц ЛТ. Если субъединицы ЛТ используются в качестве антигена, они предпочтительно являются субъединицами ЛТ-β. Если используются субъединицы ЛТ-α, преимущественно результирующие антитела против ЛТ-α соединяются с поверхностным лигандом ЛТ и не реагируют перекрестно с секретируемым ЛТ-α или не модулируют активность TNF-R (согласно опытам, описанным в примере 3 патента США № 5925351).

Альтернативно, могут быть предоставлены антитела, направленные против гомомерного (ЛТ-β) или гетеромерного (ЛТ-α/62) комплекса, включающего одну или более субъединиц ЛТ, и подвергнуты скринингу на активность в качестве блокирующих ЛТ-β-Р средств. Предпочтительно комплексы ЛТ-α1/β2 используются как антигены. Как обсуждалось выше, предпочтительно имеющиеся в результате антитела против ЛТ-α 1/β 2 связываются с поверхностным лигандом ЛТ, не присоединяясь к секретированному ЛТ-α и не воздействуя на активность TNF-R.

Продуцирование поликлональных антител против человеческого ЛТ-α описывается в находящейся одновременно на рассмотрении заявке заявителя (WO 94/13808). Также были описаны моноклональные антитела против ЛТ-α и ЛТ-β (Browning et al., J. Immunol., 54, pp. 33-46 (1995)). Мышиные моноклональные антитела против человеческого ЛТ-β были получены, как описано в примере 6 патента США № 5925351. Линия гибридомных клеток (B9.C9.1), которая продуцирует мышиное моноклональное антитело B9 против человеческого ЛТ-β-Р, была депонирована 21 июля 1995 г. в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) в соответствии с условиями Будапештского Договора и ей был присвоен инвентарный номер ATCC 11962.

Моноклональные антитела хомяка против мышиного ЛТ-α/62 получали, как описано в примере 7 патента США № 5925351. Линия клеток гибридомы (BB.F6.1), продуцирующая моноклональное антитело BB.F6 хомяка против мышиного ЛТ-α/62, была депонирована 21 июля 1995 г. в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) в соответствии с условиями Будапештского Договора и ей был присвоен инвентарный номер ATCC MB11963.

Был разработан анализ клеточного сортинга с возбуждением флуоресценции (FACS) для скрининга антител, направленных против субъединиц ЛТ и комплексов ЛТ, которые могут действовать как блокирующие ЛТ-β-Р средства, как описано в примерах 6 и 7 патента США № 5925351. В этом опыте гибридной белок в виде растворимого чЛТ-β- Р - Fc прибавляют к PMA-активированным клеткам II-23, которые экспрессируют поверхностные комплексы ЛТ (Browning et al., J. Immunol., 154, pp. 33-46 (1995)), в присутствии возрастающих количеств исследуемого антитела. Антитело, которое может ингибировать взаимодействие рецептор-лиганд ЛТ-β, по меньшей мере на 20%, отбирается в качестве блокирующего ЛТ-β-Р средства.

Использование комплекса ЛТ-α/β предпочтительнее, чем субъединицы ЛТ, в качестве антигена для иммунизации животного может привести к более эффективной иммунизации или в результате может привести к антителам, имеющим более высокое сродство к поверхностному лиганду ЛТ. Понятно, что путем иммунизации с помощью комплекса ЛТ-α/62 могут быть выделены антитела, которые узнают аминокислотные остатки как на субъединицах ЛТ-α, так и на субъединицах ЛТ-β (например, остатки, которые образуют щель ЛТ-α/62). Исследуя антитела, направленные против гетеромерных комплексов человеческого ЛТ-α/62, ожидается, что могут быть определены дополнительные антилимфотоксиновые антитела, которые действуют в качестве блокирующих ЛТ-β-Р средств у людей, с использованием обычных методик эксперимента и описанных здесь анализов.

Применение

Описанные здесь композиции вводятся в эффективной дозе способами, пригодными для лечения вызванных вирусом системного шока и расстройства дыхания у индивидуума. Определение предпочтительной фармацевтической лекарственной формы и терапевтически эффективный дозовый режим для данного применения хорошо ясны из описанного, принимая во внимание, например, состояние и вес больного, длительность желательного лечения и переносимость больным лечения.

Дозы около 1 мг/кг растворимого ЛТ-β-Р считаются подходящими исходными точками для оптимизации лечебных доз.

Определение терапевтически эффективной дозы также может быть осуществлено с помощью экспериментов in vitro, в которых измеряют концентрацию блокирующего ЛТ-β-Р средства, требующуюся для покрытия клеток-мишеней (позитивные по ЛТ-β-Р или по лиганду ЛТ клетки в зависимости от блокирующего средства) от 1 до 14 дней. Описанные здесь анализы связывания рецептор-лиганд могут быть использованы для контролирования реакции покрытия клеток. Позитивные по ЛТ-β-Р или по лиганду ЛТ клетки могут быть отделены от активированных лимфоцитных популяций при использовании FACS. Основываясь на результатах этих анализов связывания in vitro, может быть выбран диапазон подходящих концентраций блокирующего ЛТ-β-Р средства для испытания на животных в соответствии с описанными здесь опытами.

Введение растворимых молекул ЛТ-β-Р, антител против лиганда ЛТ и против ЛТ-β-Р по изобретению, одних или в комбинации, включая выделенные и очищенные формы антител и комплексов, их солей или их фармацевтически приемлемых производных, может быть осуществлено при использовании любого из принятых способов введения средств, проявляющих иммуносуппрессивную активность.

Фармацевтические композиции, используемые при такой терапии, могут также находиться в виде множества форм. Формы включают, например, твердые, полутвердые и жидкие лекарственные формы, как, например, таблетки, драже, порошки, жидкие растворы или суспензии, суппозитории и инъецируемые растворы и растворы для вливания.

Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения.

Способы введения могут включать пероральное, парентеральное, подкожное, внутривенное введение, введение в место повреждения или местное применение. Растворимые молекулы ЛТ-β-Р, антитела по изобретению против лиганда ЛТ и против ЛТ-β-Р могут, например, быть помещены в стерильные, изотонические лекарственные формы с или без кофакторов, которые стимулируют поглощение или стабильность. Лекарственная форма предпочтительно является жидкой или может быть лиофилизованным порошком. Например, растворимые молекулы ЛТ-β-Р, антитела против лиганда ЛТ и против ЛТ-β-Р по изобретению могут быть разбавлены с помощью буфера для лекарственной формы, включающего 5 мг/мл моногидрата лимонной кислоты, 2,7 мг/мл тринатриевой соли лимонной кислоты, 41 мг/мл маннита, 1 мг/мл глицина и 1 мг/мл полисорбата 20. Этот раствор может быть лиофилизирован, может храниться при охлаждении и может быть восстановлен перед введением с помощью стерильной воды для инъекций (по фармакопее США).

Композиции также предпочтительно включают общепринятые фармацевтически приемлемые носители, хорошо известные в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980, Mac Publishing Company). Такие фармацевтические приемлемые носители могут включать другие медицинские средства, носители, генетические носители, адъюванты, наполнители и т.д., как, например, альбумин человеческой сыворотки или препараты плазмы. Композиции предпочтительно бывают в виде единичной дозы и обычно вводятся один или несколько раз в день.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут также быть введены с использованием микросфер, липосом, других систем доставки в виде твердых микрочастиц или лекарственных форм с длительным высвобождением, помещенных вблизи или связанных иным образом с пораженными тканями или кровотоком. Подходящие примеры носителей с длительным высвобождением включают полупроницаемые полимерные матрицы в виде оформленных предметов, как, например, суппозитории или микрокапсулы. Имплантируемые или микрокапсульные матрицы с длительным высвобождением включают полилактиды (патент США № 3773319, европейский патент EP 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этилового эфира L-глутаминовой кислоты (Sidman et al., Biopolymers, 22, pp. 547-56 (1985)); поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или этиленвинилацетат (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15, pp. 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12, pp. 98-105 (1982)).

Липосомы, содержащие растворимые молекулы ЛТ-β-Р, антитела против лиганда ЛТ и против ЛТ-β-Р по изобретению, одни или в комбинации, могут быть получены хорошо известными методами (см., например, патент ФРГ № 3218121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, pp. 3688-92 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, pp. 4030-34 (1980); патенты США №№ 4485045 и 4544545). Обычно липосомы являются липосомами малого (примерно 200 - 800 ангстрем) одноламеллярного типа, в которых содержание липидов более чем около 30 мол.% холестерина. Относительное содержание холестерина выбирается для регулирования оптимальной скорости высвобождения растворимой молекулы ЛТ-β-Р, антитела против лиганда ЛТ и против ЛТ-β-Р.

Растворимые молекулы ЛТ-β-Р, антитела против лиганда ЛТ и против ЛТ-β-Р по этому изобретению могут быть также присоединены к липосомам, содержащим другие блокирующие ЛТ-β-Р средства, иммуносуппрессивные средства или цитокины для модулирования активности блокирования ЛТ-β-Р. Присоединение молекул ЛТ-β-Р, антител против лиганда ЛТ и против ЛТ-β-Р к липосомам может быть осуществлено с помощью любого известного, образующего поперечные связи средства, как, например, гетеробифункциональные поперечно сшивающие средства, которые были широко использованы для присоединения токсинов или химиотерапевтических средств к антителам для нацеленной подачи. Конъюгация с липосомами может быть также осуществлена с использованием действующего в отношении углеводов, образующего поперечные связи реагента, гидразида 4-(4-малеимидофенил)масляной кислоты (MPBH) (Duzgunes et al., J. Cell. Biochem. Abst. Suppl. 16E 77 (1992)).

Блокирующие ЛТ-β-Р средства композиций и способы этого изобретения могут быть модифицированы для получения желаемого уровня передачи сигнала ЛТ-β-Р, зависящего от состояния, нарушения или заболевания, которое подвергается лечению. Представляется, что абсолютный уровень передачи сигнала ЛТ-β-Р может быть тонко отрегулирован, манипулируя концентрацией и сродством блокирующих ЛТ-β-Р средств к их соответствующим молекулярным мишеням. Например, в одном варианте осуществления этого изобретения субъекту вводятся композиции, включающие растворимые молекулы ЛТ-

β-Р. Рецептор растворимого ЛТ-β может эффективно конкурировать с клеточными поверхностными рецепторами ЛТ-β за связывание поверхностных лигандов ЛТ. Способность конкурировать с поверхностными лигандами ЛТ зависит от относительных концентраций растворимых и клеточных поверхностных молекул ЛТ-β-Р и от их относительного сродства к связыванию лиганда.

Растворимые молекулы ЛТ-β-Р, являющиеся прибежищем мутаций, которые повышают или понижают сродство к связыванию такого мутантного растворимого ЛТ-β-Р с поверхностным лигандом ЛТ, могут быть получены с использованием стандартных методик рекомбинантной ДНК, хорошо известных специалистам в этой области. Большое число молекул с сайт-направленными или случайными мутациями может быть исследовано на их способность действовать в качестве блокирующих ЛТ-β-Р средств, используя рутинное экспериментирование и описанные здесь методики. Аналогично, в другом варианте осуществления этого изобретения антитела против либо рецептора ЛТ-β либо одной или более субъединиц лиганда ЛТ действуют как блокирующие ЛТ-β-Р средства. Способность этих антител блокировать передачу сигнала рецептора ЛТ-β может быть модифицирована путем мутации, химической модификации или с помощью других методов, которые могут менять эффективную концентрацию или активность антитела, доставляемого субъекту.

Применение

Фактически методы по настоящему изобретению могут быть использованы для стимулирования противовирусного ответа у индивидуума, включая введение индивидууму эффективного количества блокирующего ЛТ-β средства и фармацевтически приемлемого носителя. Ответная реакция на вирус, которая требует лечения, может быть вызвана любым числом известных вирусов, включая, но не ограничиваясь этим, SNV, вирусы Эбола, Марбурга, Ласса и Денге.

Эквиваленты

Изобретение может быть осуществлено в других специфических формах, не отступая при этом от духа или его основных характеристик. Вышеописанные варианты осуществления изобретения должны поэтому рассматриваться во всех отношениях как иллюстрирующие, а не ограничивающие изобретение, изложенное здесь. Рамки изобретения, таким образом, указываются пунктами формулы изобретения, а не изложенным выше описанием, и предполагается, что все изменения, которые имеют место в пределах смысла и диапазона эквивалентности пунктов формулы изобретения, здесь охватываются.

Пример

Фактор некроза опухоли (TNFα) играет ключевую роль в облегчении острых шоковых реакций на вирусные инфекции и другие иммуногены (K.C.F. Sheehan, N.H. Ruddle and R.D. Schreiber., J. Immunol., 142, 3884 (1989); G.W.H. Wong and D.V. Goeddel, Nature, 323, 819 (1986); B. Beutler, I.W. Milsark, A. Cerani, Science, 229, 869 (1985); F. Mackay, P.R. Bourdon, D.A. Griffiths et al., J. Immunol., 159, 3299 (1997); P.D. Crowe, T.L. VanArsdale, B.N. Walter et al., Science, 264, 707 (1994)). При приступах лихорадки Денге, включающих шок, уровни TNFα в сыворотке больных повышены, как и уровни растворимого TNFR-75 (D.Hober et al., J. Trop. Med. Hyg., 48, 324 (1993); D.B. Bethell, K. Flobbe, C.X.T. Phuong et al., J. Infect. Dis., 177, 778 (1998)). Измерялись уровни TNFα в сыворотке мышей, инфицированных формой вируса лимфоцитарного хориоменингита, LCMV, клон 13 (LCMV-13) (HH, II) . Было обнаружено, что уровни TNFα в сыворотке инфицированных LCMV-13 мышей были как раз выше уровня обнаружения в анализе до дня 4 после инфицирования (уровни TNFα в сыворотке измеряли с помощью анализа ELISA (Genzyme Corporation, номер по каталогу 80-2802-00)). В день 5 и 6, когда заболевание достигает пика, уровни растворимого TNFα в сыворотке становились в 3-6 раз выше нормальных (данные не приведены). Поэтому выбрали блокирование функции TNFα с использованием моноклонального антитела, TN3-19.12, которое, как известно, связывает оба секретированных TNFa, вызывая, таким образом, очищение от него у мыши, что подтверждено анализом ELISA (K.C.F. Sheehan, N.H. Ruddle and R.D. Schreiber., J. Immunol., 142, 3884 (1989); G.W.H. Wong and D.V. Goeddel, Nature, 323, 819 (1986); B. Beutler, I.W. Milsark, A. Cerani, Science, 229, 869 (1985); F. Mackay, P.R. Bourdon, D.A. Griffiths et al., J. Immunol., 159, 3299 (1997); P.D. Crowe, T.L. VanArsdale, B.N. Walter et al., Science, 264, 707 (1994); D. Hober et al., J. Trop. Med. Hyg., 48, 324 (1993); B. Bethell, K. Flobbe, C.X.T. Phuong et al., J. Infect. Dis., 177, 778 (1998)). Уровни TNFα в сыворотке измеряли с помощью анализа ELISA (Genzyme Corporation, номер по каталогу 80-2802-00). Мышам линии NZB вводили внутривенно 2.5 x 10^6 бляшкообразующих единиц клона 13, а затем делали две внутрибрюшинных инъекции, содержащих 250 мкг антитела TN3-19.12 в свободном от эндотоксина ЗФР (см. ссылку S), в 1-ый и 4-ый день после инфицирования. Контрольных мышей инъецировали таким же объемом ЗФР без антитела в те же дни. Такое лечение (анти-TNF) оказывало малый эффект на степень выживания этих мышей (фиг. 3). Лимфотоксин-α (ЛТ-α), также известный как TNFβ, хотя и разделяет идентичные рецепторы и многие из его биологических эффектов с TNFα, не распознается этим антителом (F. Mackay, P.R. Bourdon, D.A. Griffiths et al., J. Immunol., 159, 3299 (1997)). Возможно, что для увеличения степени выживания требуются в качестве мишени и TNFα, и ЛТ-α. Для проверки этой гипотезы использовали вышеупомянутое моноклональное антитело TN3-19.12 и составной белок рецептора, который связывал внеклеточный домен рецептора TNFp55 с доменами CH2 и CH3 че-

ловеческого IgGl (TNFR55-Ig)(W.R. Force, B.N. Walter, C. Hession et al., J. Immunol., 155, 5280 (1995); G.T. Miller, P.S. Hochman, W. Meier et al., JEM., 178, 211 (1993); J.L. Browning, L. Dougas, A. Ngamek et al., J. Immunol., 154:33 (1995)). Мышей обрабатывали, как описано в ссылке R. В группе тройной обработки белки TNFR55-Ig и ЛТ-β-Р - Ig вводили внутрибрюшинно в количестве 200 мкг в день 0 и в день 3 после заражения. Контрольным мышам вводили человеческое антитело, используемое в синтезе этих составных белков (AY 1943-29), в те же дни в идентичных количествах. Мышей, получающих только ЛТ-β-Р-Ig, обрабатывали идентично, за исключением того, что не делали инъекций TNFR55-Ig. Эта обработка также существенно не меняла степени выживания инфицированных LCMV-13 мышей линии NZB (см. группу с анти-TNF и TNFR55-Ig). Мембранная форма лимфотоксина, гетеромер ЛТ-α и ЛТ-β, не распознает TNFR-75 или TNFR-55, а скорее связывается с третьим рецептором, называемым ЛТ-β-Р (15). Авторы выбрали для использования составной белок, содержащий внеклеточный домен ЛТ-β-Р, также связанный с доменами CH2 и CH3 человеческого IgGl (ЛТ-β-Р-Ig). Обработка мышей моноклональным антителом против TNFα, TNFR55-Ig и ЛТ-β-Р-Ig (тройная обработка или TNFR55-Ig и ЛТ-β-Р-Ig) приводила к резкому увеличению выживания, к 80% и 70%, соответственно. Наоборот, только 20% мышей, обработанных моноклональным антителом против TNFα и TNFR55-Ig, выжили после заражения. Недавно был идентифицирован второй лиганд для ЛТ-β-Р, LIGHT (D.N. Mauri, R. Ebner, R.I. Montgomery et al., Immunity 8, 21 (1998); R.I. Montgomery, M.S. Warner, B. Lum et al., Cell 87, 427 (1996)). Было также показано, что LIGHT связывает медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), трансмембранный белок типа I с существенной гомологией к членам семейства TNFR, что экспрессируется на активированных Т-лимфоцитных CD4 и CB8 (D.N. Mauri, R. Ebner, R.I. Montgomery et al., Immunity 8, 21 (1998); R.I. Montgomery, M.S. Warner, B. Lum et al., Cell 87, 427 (1996)). Основываясь на представленных здесь результатах, предотвращение передачи сигнала ЛТ-β-Р и возможно передачи сигнала HVEM при связывании ЛТ-$\beta_2\alpha_1$ и LIGHT с помощью ЛТ-β-Р-Ig, вероятно, является ответственным за большую часть эффекта, наблюдаемого для группы тройной обработки. Авторами была подтверждена эта гипотеза путем обработки зараженных LCMV-13 мышей линии NZB именно гибридным белком ЛТ-β-Р-Ig. Степень выживания мышей в этой группе (73%) была почти так же высока, как и в группе тройной обработки (фиг. 3). Взятые вместе, эти данные представляют первое доказательство того, что путь передачи сигнала ЛТ-β-Р и/или HVEM вовлечен в расклад острого летального заболевания, включающего системный шок и расстройство дыхания.

В попытке определить механизм выживания после обработки путем блокировки ЛТ-β на образцах инфицированных LCMV-13 мышей линии NZB, которые были обработаны контрольным антителом, одним ЛТ-β-Р-Ig или подвергнуты тройной обработке, были проведены как совместное окрашивание CD8/тетрамера для специфичных к NP118 Т-лимфоцитов, доминантного эпитопа CD8 в системе NZB L^D, так и внутриклеточное окрашивание продуцирования интерферона-γ (INFγ) спленоцитами, стимулированными пептидом NP118. На фиг. 4 показано уменьшение числа специфичных к NP118 Т-лимфоцитных CD8, наблюдаемое с наибольшим эффектом у мышей, подвергнутых тройной обработке. У мышей, обработанных контрольным антителом, только 10% позитивных по тетрамеру клеток активно продуцировали INFγ. Появление анергических Т-лимфоцитов при инфицировании LCMV-13 было ранее подтверждено документально и, по-видимому, происходит благодаря высоким уровням вирусного антигена у мыши (фиг. 1). Не только уменьшалось число специфичных к NP118 клеток у обработанных ЛТ-β-Р-Ig мышей, но также уменьшался процент клеток, продуцирующих INFγ. Этот эффект был даже больше выражен в группе тройной обработки. Таким образом, возможно, что компартмент CD8 может быть источником такого летального ответа мышей линии NZB на заражение LCMV-13. Тот факт, что активированные CD8 обнаруживают ЛТ-$\beta_2\alpha_1$, соответствует этой гипотезе (Y. Abe, A.Horiuchi, Y. Osuka et al., Lymph. Ctyok. Res., 11, 115 (1992); C.F. Ware, P.D. Crowe, M.H. Grayson et al., J. Immunol., 149, 3881 (1992); J. L. Browning, A. Ngam-ek, P. Lawton et al., Cell, 72, 847 (1993)). Для поддержки этого утверждения у инфицированных мышей линии NZB истощали запас позитивных по CD8 или CD4 Т-лимфоцитов in vivo (самцам мышей линии NZB вводили внутривенно 2.5 x 10^6 бляшкообразующих единиц LCMV-13, а затем вводили дважды внутрибрюшинно по 500 мкл антитела против Т-лимфоцитов. Моноклональное антитело Lyt2.43 было использовано для уменьшения Т-лимфоцитных $CD8^+$, в то время, как антитело GK1.5 (Ml) было использовано для уменьшения Т-лимфоцитных $CD4^+$. Оба антитела получали при осаждении сульфатом аммония из надосадочных жидкостей от гибридом и последующем диализе против ЗФР. Был применен FACS-анализ для контролирования уменьшения у некоторых из мышей). Уменьшение содержания Т-лимфоцитных CD4 не увеличивало выживания. В противоположность этому, уменьшение содержания Т-лимфоцитных CD8 приводило к 100% выживанию при отсутствии симптомов болезни в отличие от обработанных ЛТ-β-Р-Ig мышей (фиг. 5). Так как титры вируса в некоторых тканях мышей с уменьшенным содержанием CD8 были выше, чем у необработанных мышей, похоже, что гибель была результатом токсического иммунного ответа, опосредованного Т-лимфоцитными CD8, а не результатом деструкции тканей вирусной инфекцией.

Как здесь указывалось, что у мышей линии NZB, инфицированных внутривенно высокой дозой LCMV-13, развивается острое, быстро прогрессирующее заболевание, имеющее несколько общих черт с заражениями, вызванными вирусами Эбола, Марбурга, Ласса, Денге и SNV. Летальный исход при этом заболевании зависел от присутствия Т-лимфоцитных $CD8^+$, которые, как известно, экспрессируют при активировании TNFα, ЛТ-α и ЛТ-β. Хотя это и является ободряющим открытием, лечение вирусной инфекции путем уменьшения Т-лимфоцитных $CD8^+$ было бы нецелесообразным. Такое лечение могло бы оставить больных незащищенными по отношению к другим возможным инфекциям. Кроме того, поскольку удаление вирусов едва ли имеет место в отсутствии цитотоксических Т-лимфоцитов, риск больного, который приобрел толерантность к вирусу, при восстановлении компартмента $CD8^+$ очень реален. Было показано, что блокировка путей метаболизма ЛТ-β-Р/HVEM путем введения ЛТ-β-Р-Ig является эффективным лечением, которое транзиторно по природе, с быстрым возвращением к гомеостазу, как только лечение прекращается (Маскау и Browning, неопубликованные данные). У выживших мышей, обработанных таким образом, в конце концов выводился вирус из исследуемых тканей (данные не приведены) и больше не наблюдалось признаков заболевания.

Эти данные являются первой демонстрацией того, что передача сигнала ЛТ-β-Р играет важную роль в противовирусных ответах и в действии Т-лимфоцитного CD8. Лимфотоксиновая система тесно связана с организацией лимфоидной структуры, наиболее вероятно через регулирование экспрессии некоторых хемокинов, которые направляют структуру Т- и В-клеток (Chaplin et al., Curr. Opin. Immunol., 10, 289 (1998), J. Cyster, в печати). Зрелый функциональный статус фолликулярных дендритных клеток поддерживается постоянной передачей сигнала В-клеток и эти клетки исчезают в течение одного дня после прекращения передачи сигнала ЛТ-β-Р. Эти клетки являются необходимыми для представления антигена компартментам В- и Т-клеток. Разумная гипотеза состоит в том, что некоторый аспект представления антигена клеткам с CD8 или подходящее расположение этих клеток в хемокиновом градиенте во время созревания предотвращается при нарушении передачи сигнала ЛТ-β-Р. Ранние исследования функции ЛТ фокусировались главным образом на биологии В-клеток, и рассмотрение функции Т-лимфоцитов не предусматривалось. Либо ЛТ имеет дополнительные функции, либо эти данные отражают роль нового лиганда LIGHT. Какую роль могут играть HVEM и LIGHT в развитии задокументированного здесь заболевания остается в настоящее время неясным.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индуцирования противовирусного ответа у индивидуума, страдающего от вызванного вирусом системного шока и/или расстройства дыхания, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей средство, блокирующее лимфотоксин-β (ЛТ-β), или средство, блокирующее рецептор лимфотоксина-β (ЛТ-β-Р), и фармацевтически приемлемый носитель.

2. Способ по п.1, согласно которому средство, блокирующее ЛТ-β, представляет собой антитело против ЛТ-β или растворимый ЛТ-β.

3. Способ по п.1, согласно которому средство, блокирующее ЛТ-β-Р, представляет собой антитело против ЛТ-β-Р, связывающее ЛТ-β-Р или рецептор растворимого ЛТ-β, или гибридный белок "рецептор лимфотоксина-β/иммуноглобулин (Ig-слитый белок)".

4. Способ по пп.1-3, отличающийся тем, что указанный индивидуум инфицирован вирусом Sin Nombre, вирусом Эбола, вирусом Марбурга, вирусом Ласса или Денге.

5. Способ лечения индуцированного вирусом системного шока у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей средство, блокирующее лимфотоксин-β (ЛТ-β) или рецептор лимфотоксина-β (ЛТ-β-Р), и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Способ по п.5, согласно которому средство, блокирующее ЛТ-β, представляет собой антитело против ЛТ-β или растворимый ЛТ-β.

7. Способ по п.5, согласно которому средство, блокирующее ЛТ-β-Р, представляет собой антитело против ЛТ-β-Р, связывающее ЛТ-β-Р или рецептор растворимого ЛТ-β, или гибридный белок "рецептор лимфотоксина-β/иммуноглобулин (Ig-слитый белок)".

8. Способ лечения вирусной инфекции, вызывающей у индивидуума системный шок и/или расстройство дыхания, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей средство, блокирующее лимфотоксин-β (ЛТ-β), или средство, блокирующее рецептор лимфотоксина-β (ЛТ-β-Р), и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Способ по п.8, согласно которому средство, блокирующее ЛТ-β, представляет собой антитело против ЛТ-β или растворимый ЛТ-β.

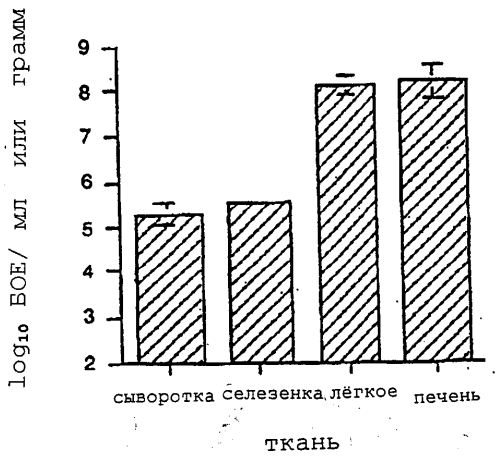
10. Способ по п.8, согласно которому средство, блокирующее ЛТ-β-Р, представляет собой антитело против ЛТ-β-Р, связывающее ЛТ-β-Р или рецептор растворимого ЛТ-β, или гибридный белок "рецептор лимфотоксина-β/иммуноглобулин (Ig-слитый белок)".

11. Способ лечения индуцированного вирусом расстройства дыхания у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей средство, блокирующее

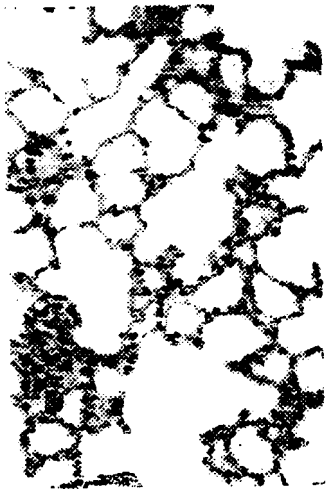
лимфотоксин-β (ЛТ-β), или средство, блокирующее рецептор лимфотоксина-β (ЛТ-β-Р), и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Способ по п.11, согласно которому средство, блокирующее ЛТ-β, представляет собой антитело против ЛТ-β или растворимый ЛТ-β.

13. Способ по п.11, согласно которому средство, блокирующее ЛТ-β-Р, представляет собой антитело против ЛТ-β-Р, связывающее ЛТ-β-Р или рецептор растворимого ЛТ-β, или гибридный белок "рецептор лимфотоксина-β/иммуноглобулин (Ig-слитый белок)".



Фиг. 1



Фиг. 2А

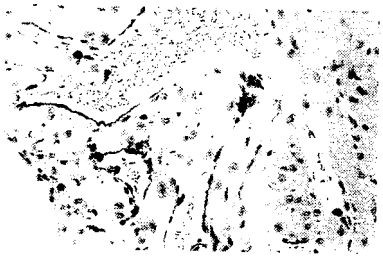
Фиг. 2B

Фиг. 2C

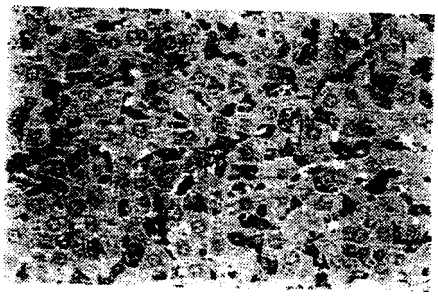
Фиг. 2D

Фиг. 2E

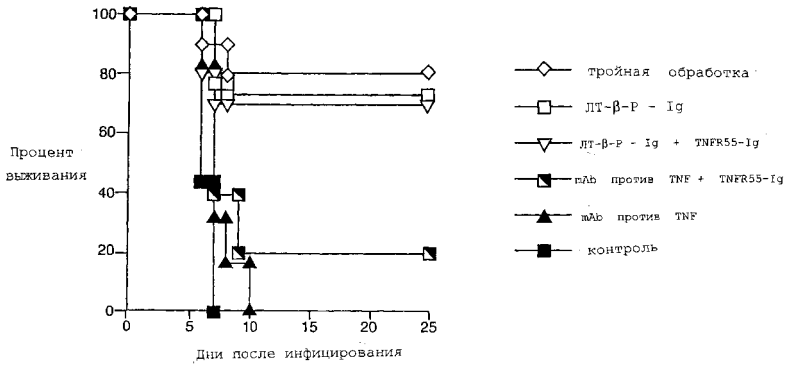
Фиг. 2F



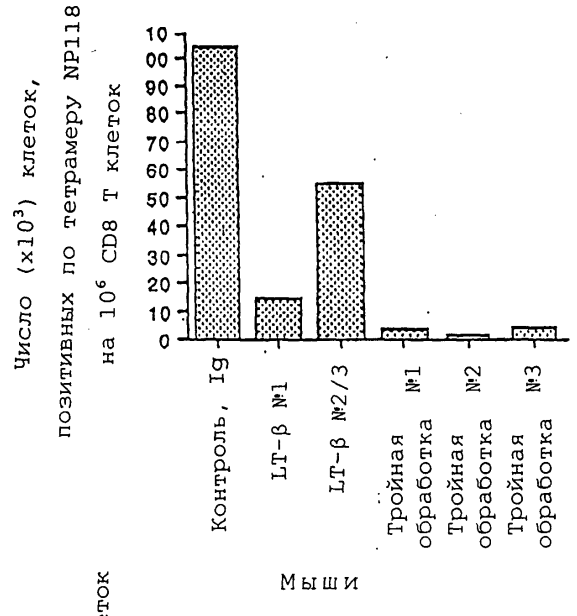
Фиг. 2G

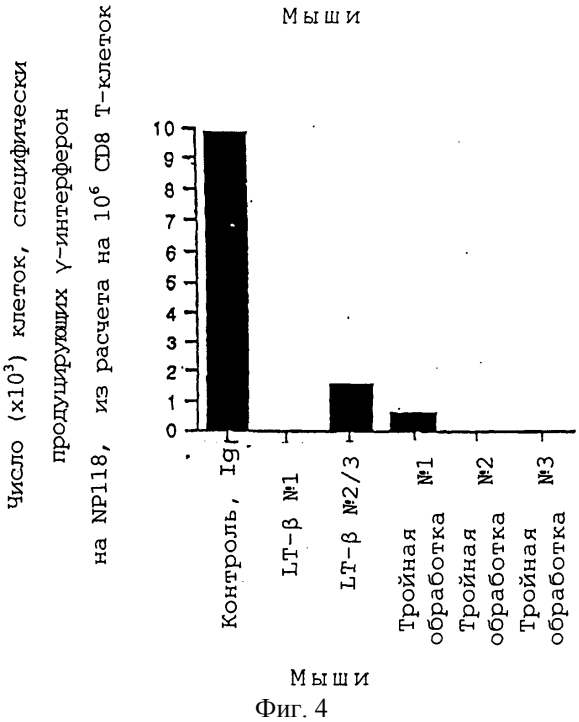


Фиг. 2H

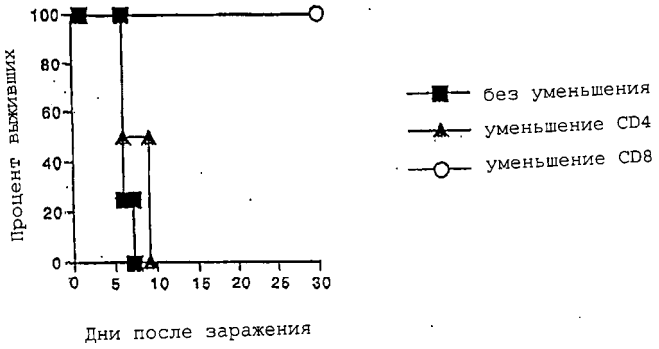

Процент выживания
Дни после инфицирования
тройная обработка
ЛТ-β-Р - Ig
ЛТ-β-Р - Ig + TNFR55-Ig
mAb против TNF + TNFR55-Ig
mAb против TNF
контроль

Фиг. 3


Число (x10³) клеток, позитивных по тетрамеру NP118 на 10⁶ CD8 Т клеток
Контроль, Ig
LT-β №1
LT-β №2/3
Тройная обработка №1
Тройная обработка №2
Тройная обработка №3
Мыши


Число (x10³) клеток, специфически продуцирующих γ-интерферон на NP118, из расчета на 10⁶ CD8 Т-клеток
Контроль, Ig
LT-β №1
LT-β №2/3
Тройная обработка №1
Тройная обработка №2
Тройная обработка №3
Мыши

Фиг. 4


Процент выживших
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
Дни после заражения
без уменьшения
уменьшение CD4
уменьшение CD8

Фиг. 5