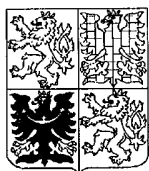


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.10.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.10.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/103662**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.09.2001**
(Věstník č. 9/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/US99/23477**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/21558**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 1272

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/395

A 61 K 38/17

A 61 K 38/19

//(C 07 K 16/28, C 07 K 14/715)

(71) Přihlašovatel:

EMORY UNIVERSITY, Atlanta, GA, US;
BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Původce:

Browning Jeff, Brookline, MA, US;
Puglielli Maryann, Atlanta, GA, US;
Ahmed Rafi, Atlanta, GA, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití činidla, které blokuje vazbu lymfotoxinu-
beta na jeho receptor, pro výrobu protivirového
léku**

(57) Anotace:

Uvedené řešení poskytuje lék k indukci antivirové odpovědi obsahující přijatelný nosič a je vhodný zejména k léčení systémového šoku a respirační insuficience způsobených virovou infekcí.

CZ 2001 - 1272 A3

Použití činidla, které blokuje vazbu lymfotoxinu- β na jeho receptor, pro výrobu protivirového léku

Toto je částečně pokračovací přihláška k prozatímní přihlášce USA č. 60/103 662 podané 9. října, 1998. Celý obsah dříve podané prozatímní patentové přihlášky je zahrnut formou odkazu v předkládané přihlášce.

Oblast techniky

Tento vynález se všeobecně týká způsobů indukce protivirové odpovědi u jedince. Tento vynález poskytuje zejména způsoby léčení viry vyvolaného systémového šoku a respirační insuficience u jedince. Způsob zahrnuje podávání určitých „přípravků blokujících lymfotoxin beta“.

Dosavadní stav techniky

Několik virů včetně Sin Nombre (SNV), Ebola, Marburg, Lassa a Dengue způsobuje akutní onemocnění s mnoha z následujících symptomů: rychlé vypuknutí choroby, horečka, systémový šok a respirační insuficience (Lacy et al., 1997, Adv. Ped. Inf. Dis., 12, 21). Dále se u těchto infekcí často vyskytuje systémové rozšíření virové infekce zaměřené na endotelové buňky a makrofágy (Lacy et al., 1997, Adv. Ped. Inf. Dis., 12, 21). Většina těchto nově se objevujících virů, s výjimkou SNV, byla poprvé identifikována v posledních desetiletích. V průběhu let po svém objevení se tyto patogeny znovu objevily při vzplanutí epidemií na celém světě. Tak od

června 1998 se vyskytlo na jihozápadě Spojených Států 183 potvrzených případů SNV, kauzativního agens tzv. hantavirového syndromu šokové plíce, díky nárůstu populace křečika dlouhooocasého. Pouze v 55 % těchto případů pacienti přežili infekci (Centers for Disease Control and Prevention, MMWR. 47, 449, 1998). Do současné doby je málo známo o patogenezi těchto virů a o tom, jak účinně léčit tisíce pacientů každý rok infikovaných na celém světě, kteří onemocní systémovým šokem vyvolaným viry a respirační insuficiencí.

Trvá tudíž potřeba najít nové způsoby léčení virového systémového šoku a respirační insuficience u jedince.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález řeší problém uvedený výše tím, že poskytuje farmaceutické přípravky vhodné k léčení virového systémového šoku a respirační insuficience u pacienta.

Použití a přípravky podle tohoto vynálezu částečně využívají objev, že určité přípravky, zde definované jako přípravky blokující lymfotoxin beta (LT- β), mohou být použity při léčení virového systémového šoku a respirační insuficience u jedince. V jednom provedení přípravek blokující LT- β je přípravek blokující receptor lymfotoxinu beta (LT- β -R). Ve výhodném provedení je LT- β -R protilátka proti receptoru lymfotoxinu-B nebo rozpustný receptor lymfotoxinu- β . V nejvýhodnějším provedení přípravek blokující LT- β -R je rekombinantní fúzní protein LT- β -R, který má extracelulární vazebnou doménu ligandu LT- β -R fúzovanou s konstantní doménou těžkého řetězce imunoglobulinu.

Výše uvedené a další cíle, charakteristické rysy, aspekty a výhody předkládaného vynálezu, jakož i samotný vynález, budou plněji pochopeny z následujícího popisu výhodných provedení.

Popis obrázků

Obrázek 1 ukazuje, že infekce myši NZB s klonem 13 LCMV má za následek úmrtnost. Křivka úmrtnosti myši NZB infikovaných LCMV-13 ($n = 14$) a virové titry myši infikovaných LCMV-13 ($n = 7$) šest dnů po infekci.

Obrázek 2 ukazuje histologický profil infekce LCMV-13 u myši NZB. A) normální plíce (100x, H+E). B) intersticiální pneumonitida s infiltráty mononukleárních buněk a ztlustěním alveolární stěny v plicích, 5 dnů po infekci (100x, H+E). C) Lymfoidní deplece, buněčná nekróza a obliterace folikulární architektury ve slezině (25x, H+E). D) větší zvětšení ukazující buněčnou nekrózu a debris pocházející z karyorexe ve slezině (158x, H+E). E) LCMV-13 pozitivní endotelové buňky (šipky) a makrofágy (bílé šipky) v plicích (100x, IHC). F) LCMV-13 pozitivní endotelové buňky (šipky) a mezotelové buňky (hlavičky šipek) a makrofágy (bílé šipky) ve slezině (50x, IHC). H) LCMV-13 pozitivní Kupfferovy buňky a buňky lemující sinusoidy v játrech (100x, IHC).

Obrázek 3 ukazuje, že blokáda $LT\beta R$ signálních drah významně zlepšuje přežívání u myši NZB infikovaných klonem 13. Jsou zde uvedeny křivky úmrtnosti pro myši NZB infikované klonem 13 ošetřené tak, jak popsáno. Myšim NZB bylo podáváno $2,5 \times 10^6$ pfu Cl 13 i.v., pak následovaly dvě i.p. injekce

obsahující 250 μg protilátky TN3-19.12 v PBS bez endotoxinu (viz odkaz S) ve dnech 1 a 4 po infekci. Kontrolním myším byla ve stejné dny podána injekce téhož objemu PBS bez protilátky. Myši byly ošetřeny tak, jak je popsáno v odkazu R. u trojitě ošetřené skupiny byly podány proteiny TNFR55-Ig a LT β R-Ig v den 0 a 3 po infekci, i.p., v množství 200 μg . Kontrolním myším byla podána lidská protilátka používaná v syntéze těchto fúzních proteinů (AY1943-29) ve stejné dny v identickém množství. Myši dostávající pouze LT β R-Ig byly ošetřovány totožně, kromě toho, že byly vynechány injekce TNFR55-Ig. Data byly sbírána z několika pokusů, samotný anti-TNF (TN3-19.12), $n = 16$ pro samotný LT β R-Ig, $n = 10$ pro trojitě ošetřovanou skupinu, $n = 22$ pro samotný LT β R-Ig, $n = 10$ pro skupinu s LT β R-Ig + TNFR55-Ig, $n = 5$ pro skupinu ošetřenou anti-TNF a TNFR55-Ig, $n = 6$ pro samotný anti-TNF (TN3-19.12) a $n = 25$ pro kontroly).

Obrázek 4 ukazuje, že blokáda LT β R dráhy má za následek snížení funkce CD8 T buněk. Splenocyty z myší v různých ošetřených skupinách byly odebrány v den 6 po infekci a obarveny s L^d tetramerem obsahujícím NP118 9mer peptid, jak dříve popsáno. Dané hodnoty jsou upraveny podle nespecifického barvení pozadí. Aby se monitorovala produkce interferonu gama jako reakce na stejný peptid, byly buňky inkubovány 5 hodin ve 37 °C v přítomnosti NP118 v konečné koncentraci 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a IL-2. Hodnoty zde dané jsou upraveny podle hodnot pozadí bez peptidu. Byly sloučeny splenocyty od tří myší ošetřených kontrolním lidským Ig, jakož i splenocyty od dvou myší s LT β R-Ig (LT beta č.2/3). Všechny další výsledky jsou od jednotlivých myší.

Obrázek 5 ukazuje, že deplece CD8⁺ T buněk, ne CD4⁺ T buněk, odvrací letální účinky infekce LCMV-13 na myši NZB. Myši byly ošetřeny tak, jak je popsáno pro depleci buněčných populací *in vivo*. Pro každou z ošetřených skupin (n = 4) je uvedena křivka úmrtnosti.

Definice

Pro jasnější a přesnější popis předmětu vynálezu jsou uvedeny následující definice specifických termínů použitých v popisu vynálezu a v patentových nárocích.

Lymfotoxin-beta (LT-beta nebo LT- β , označení užívána zaměnitelně) patří mezi ligandy rodiny TNF, kam patří také další ligandy jak např. ligandy receptorů Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 a 4-1BB (Smith et al., Cell 76, 959-62, 1994). Signální dráha zahrnující několik členů rodiny TNF, vč. TNF, LT-alfa, LT-beta a Fas, může indukovat odumírání rakovinných buněk nekrózou nebo apoptózou (tzv. programovanou buněčnou smrtí). U buněk, které nejsou tumorigenní, TNF a mnohé další interakce ligand-receptor patřící do rodiny TNF ovlivňují vývoj imunitního systému a reakci na různé imunitní podněty.

Lymfotoxin-beta (zvaný též p33) byl identifikován na povrchu T lymfocytů, T buněčných linií, B buněčných linií a lymfokinem aktivovaných zabíječských buněk (LAK, lymphokine-activated killer cells). LT-beta je předmětem současně projednávaných mezinárodních patentových přihlášek PCT/US91/04588, publikované 9. ledna 1992 jako WO 92/00329, a PCT/US93/11669, publikované 23. ledna 1994 jako WO 94/13808, které jsou formou odkazu součástí předkládané přihlášky.

LT-beta receptor (LT-beta-R, LT- β -R), člen receptorové rodiny TNF, se specificky váže na povrchové LT ligandy. LT-beta-R váže LT heteromerní komplexy (zejména LT-alfa1/beta2 a LT-alfa2/beta1), ale neváže TNF nebo LT-alfa (Crowe et al., Science 264, 707-10, 1994). Signalizace zprostředkovaná LT-beta-R hraje roli při vývoji periferních lymfoidních orgánů a v humorální imunitní reakci.

mRNA pro LT-beta-R se vyskytuje v lidské slezině, brzlíku a dalších hlavních orgánech. Profil exprese LT-beta-R je obdobný jako profil exprese publikovaný pro p55-TNF-R, s výjimkou toho, že LT-beta-R není na T buňkách periferní krve a buňkách T buněčných linií.

Termín "činidlo blokující LT-beta" označuje takové činidlo, které zeslabí vazbu ligandu na LT-beta, shlukování LT-beta na buněčném povrchu nebo signální dráhu LT-beta, nebo které způsobí změnu v tom, jak je signál LT-beta interpretován v buňce. K příkladům činidel blokujících LT-beta patří anti-LT-beta, rozpustné molekuly LT-beta-R-Fc a protilátky anti-LT-alfa, anti-LT-alfa/beta a anti-LT-beta-R. Výhodně protilátky nereagují křížově se secernovanou formou LT-alfa.

Termín "činidlo blokující LT-beta-receptor" označuje takové činidlo, které naruší vazbu ligandu k LT-beta-R, shlukování LT-beta-R na buněčném povrchu nebo signalizaci LT-beta-R, nebo které ovlivní to, jak je signál LT-beta-R interpretován v buňce. K příkladům činidla blokujícího LT-beta-R patří rozpustné molekuly LT-beta-R-Fc a protilátky anti-LT-beta-R. Výhodně protilátky nereagují křížově se secernovanou formou LT-alfa.

Termín "protilátka anti-LT-beta receptor" popisuje jakoukoliv protilátku, která se specificky váže k alespoň jednomu epitopu receptoru LT-beta.

Termín "protilátka anti-LT" popisuje jakoukoliv protilátku, která se specificky váže k alespoň jednomu epitopu LT-alfa, LT-beta nebo komplexu LT-alfa/beta.

Termín "LT ligand" znamená heteromerní komplex LT nebo jeho derivát, který se specificky váže na receptor LT-beta.

Termín "signální dráha LT-beta-R" nebo stručně "signalizace LT-beta-R" označuje molekulární reakce spojené s celou metabolickou dráhou přenosu signálu LT-beta-R a další molekulární reakce, které na ni navazují.

Termín "vazebná doména pro LT-beta-R ligand" popisuje část nebo části LT-beta-R, která(é) se účastní specifického rozpoznání a interakce s LT ligandem.

Termíny "LT-alfa/beta heteromerní komplex" nebo $LT-\alpha/\beta$ heteromerní komplex" a "LT heteromerní komplex" popisují stabilní spojení alespoň jedné podjednotky LT-alfa ($LT-\alpha$) a jedné nebo více podjednotek LT-beta ($LT-\beta$), včetně rozpustných, mutovaných, změněných a chimérických forem jedné nebo více podjednotek. Podjednotky se spojují elektrostatickými, van der Waalsovými nebo kovalentními interakcemi. Heteromerní komplex $LT-\alpha/\beta$ má výhodně alespoň dvě přilehlé podjednotky LT-beta a postrádá přilehlé podjednotky LT-alfa. Když heteromerní komplex $LT-\alpha/\beta$ slouží jako činidlo aktivující LT-beta-R v testu buněčného růstu, je komplex výhodně rozpustný a má stechiometrii $LT-\alpha 1/\beta 2$.

Rozpustné heteromerní komplexy LT-alfa/beta postrádají transmembránovou doménu a mohou být secernovány vhodnou hostitelskou buňkou, která byla upravena metodami genového inženýrství tak, aby exprimovala podjednotky LT-alfa a/nebo LT-beta (Crowe et al., J. Immunol. Methods 168: 79-89, 1994).

Termíny "povrchový komplex LT-alfa/beta2 " a "povrchový LT komplex" označují komplex, obsahující podjednotky LT-alfa a podjednotky LT-beta vázané na membránu, včetně mutovaných, pozměněných a chimérických forem jedné nebo více podjednotek, kterýžto komplex je prezentován na povrchu buňky. "Povrchový LT ligand" znamená povrchový LT komplex nebo jeho derivát, který se specificky váže na receptor LT-beta.

Termín "účinné množství" označuje množství, které je dostatečné k tomu, aby bylo dosaženo prospěšného nebo požadovaného klinického účinku. Účinné množství může být podáno prostřednictvím jednoho nebo několika podání. Ve smyslu předkládaného vynálezu, účinné množství činidla, které blokuje vazbu lymfotoxinu beta na jeho receptor, je takové množství činidla, které je dostatečné k tomu, aby zmírnilo, stabilizovalo nebo zpozdilo vývoj virové reakce. Konkrétně které je dostatečné k tomu, aby zmírnilo, stabilizovalo nebo zpozdilo vývoj virem indukovaného systémového šoku a respirační insuficience. Detekce a měření těchto indikátorů účinnosti jsou odborníkovi známy.

Termín „jedinec“ označuje obratlovce, zejména příslušníka některého druhu savců, a zahrnuje také domácí zvířata, zvířata chovaná pro sport a primáty, včetně člověka (příčemž tento výčet není omezující).

„Funkční ekvivalent“ aminokyselinového zbytku je I) aminokyselina, která má stejné reaktivní vlastnosti jako aminokyselina, která byla nahrazena funkčním ekvivalentem, II) aminokyselina antagonisty podle vynálezu, aminokyselina mající podobné vlastnosti jako aminokyselina, která byla nahrazena funkčním ekvivalentem, III) molekula jiná než aminokyselina, která má podobné vlastnosti jako aminokyselinový zbytek, který byl nahrazen funkčním ekvivalentem.

První polynukleotid kódující proteinového antagonistu podle vynálezu je „funkční ekvivalent“ ve srovnání s druhým polynukleotidem kódujícím antagonistický protein, jestliže splňuje alespoň jednu z následujících podmínek:

a) „Funkční ekvivalent“ je první polynukleotid, který hybridizuje s druhým polynukleotidem za standardních hybridizačních podmínek a/nebo jde o degenerovanou sekvenci vzhledem k sekvenci prvního polynukleotidu. Nejvýhodněji kóduje mutantní protein, který má aktivitu proteinového antagonisty integrinu.

b) „Funkční ekvivalent“ je první polynukleotid, který kóduje expresi aminokyselinové sekvence kódované druhým polynukleotidem.

LT-beta blokující činidla podle vynálezu zahrnují, avšak bez omezení na tento výčet, činidla zde uvedená a jejich „funkční ekvivalenty“. Termín „funkční ekvivalent“ podle vynálezu tedy znamená LT-beta blokující činidlo nebo polynukleotid kódující LT-beta blokující činidlo, které má stejné nebo zlepšené účinky na příjemce jako LT-beta

blokující činidlo, jehož je funkčním ekvivalentem. Odborníkovi je zřejmé, že funkčně ekvivalentní protein je možné připravit technikami genového inženýrství (rekombinantní DNA), např. tak, že se exprimuje funkčně ekvivalentní DNA. Tudíž předkládaný vynález zahrnuje LT-beta blokující činidlo kódované přirozeně se vyskytující DNA stejně tak jako DNA, která se přirozeně nevyskytuje a která kóduje stejný protein, jako je kódován přirozeně se vyskytující DNA. Vzhledem k degeneraci nukleotidových kódujících sekvencí mohou být užity i jiné sekvence kódující LT-beta blokující činidlo. K takovým sekvencím patří části nebo celé sekvence, které jsou změněny substitucí různých kodonů, které v rámci sekvence kódují stejnou aminokyselinu, což je tzv. umlčená záměna. Takové změněné sekvence jsou považovány za ekvivalenty uvedených sekvencí. Tak např. aminokyselina Phe (P) je kódována dvěma různými kodony, TTC nebo TTT, aminokyselina Tyr (Y) je kódována buď TAC nebo TAT a aminokyselina His je kódována buďto CAC nebo CAT. naproti tomu aminokyselina Trp je kódována jen jediným kodonem, a sice TGG. Tudíž odborníkovi je zřejmé, že pro danou sekvenci DNA kódující určitý integrin existuje mnoho degenerovaných sekvencí, které ho taktéž kódují. Tyto degenerované sekvence spadají ztaky do rozsahu předkládaného vynálezu.

Termín „fúzní protein“ nebo stručně „fúze“ označuje kolineární kovalentní spojení dvou nebo více proteinů nebo jejich fragmentů prostřednictvím jejich individuálních peptidových řetězců, nejvýhodněji prostřednictvím genové exprese polynukleotidové molekuly kódující tyto proteiny. Výhodně jsou proteiny nebo jejich fragmenty jsou z různých

zdrojů, tento typ fúzního proteinu je pak nazýván „chimérickou“ molekulou. Výhodné fúzní proteiny jsou chimérické molekuly, které obsahují LT-beta blokující činidlo nebo jeho fragment kovalentně spojený s druhou složkou, která je odlišná od LT-beta blokujícího činidla. Výhodné fúzní proteiny podle vynálezu obsahují část intaktních protilátek, které si uchovávají antigeně-vazebnou specifitu, např. fragmenty typu Fab, Fab', F(ab')₂ a F(v), a monomery nebo dimery těžkých řetězců, monomery nebo dimery lehkých řetězců, dimery sestavené z jednoho lehkého a jednoho těžkého řetězce a podobně.

Nejvýhodnější fúzní proteiny jsou chimérické a obsahují složku tvořenou LT-beta blokujícím činidlem fúzovanou nebo jinak spojenou s celou nebo částí kloubového a konstantního úseku imunoglobulinového lehkého řetězce, těžkého řetězce nebo obou. Takže vynález se týká molekuly, která obsahuje:

- 1) složku tvořenou LT-beta blokujícím činidlem,
- 2) druhý peptid, např. takový, který zvyšuje rozpustnost nebo biologický poločas *in vivo* složky LT-beta blokujícího činidla, např. je to člen „superrodiny“ imunoglobulinů nebo jeho fragment nebo část, např. fragment IgG, např. konstantní úsek těžkého řetězce lidského IgG1, např. CH₂, CH₃ a kloubový úsek. Specificky „LT-beta nebo LT-beta-R/Ig fúze“ je protein obsahující biologicky aktivní LT-beta blokující činidlo podle vynálezu (např. rozpustný LT-beta-R, nebo jeho biologicky aktivní fragment navázaný k N-konci imunoglobulinového řetězce, kde N-konec imunoglobulinového řetězce byl nahrazen LT-beta blokujícím činidlem. Druhem LT-beta nebo LT-beta-R/Ig fúze je LT-beta-R/Fc fúze, což je protein obsahující LT-beta-

R podle vynálezu svázaný s alespoň částí konstantní domény imunoglobulinu. Výhodná Fc fúze obsahuje LT-beta blokuující činidlo podle vynálezu svázané s fragmentem protilátky obsahujícím C-koncovou doménu těžkého imunoglobulinového řetězce.

Termín „standardní hybridizační podmínky“ označuje takové podmínky koncentrace solí a teploty, které jsou v podstatě ekvivalentní podmínkám 0,5xSSC až 5xSSC a teplota 65°C jak pro hybridizaci tak pro následné promývání. Termín „standardní hybridizační podmínky“ užívaný v předkládaném popisu je tedy operační definice a zahrnuje tedy určité rozpětí hybridizačních podmínek. Podmínky s vyšší stringencí jsou např. podmínky hybridizace v pufru pro screening plaků (0,2% polyvinylpyrrolidon, 0,2% Ficoll 400, 0,2% hovězí sérový albumin, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1M NaCl, 0,1% hydrogenfosforečnan sodný, 1% SDS) s 10% dextransulfátem a 100 µg/ml denaturované sonikované DNA ze spermatu lososa při 65 °C po 12 až 20 hodin, následovaná promýváním v 75mM NaCl/7,5mM citrát sodný (0,5xSSC)/1%SDS při 65°C. Podmínky s nižší stringencí jsou např. podmínky hybridizace v pufru pro screening plaků s 10% dextransulfátem a 110 µg/ml denaturované sonikované DNA ze spermatu lososa při 55 °C po 12 až 20 hodin, následovaná promýváním v 300mM NaCl/30mM citrát sodný (2xSSC)/1%SDS při 55°C (viz např. Current Protocols in Molecular Biology, John Willey and Sons, Inc., New York, 6.3.1 - 6.3.6., 1989).

„Terapeutický přípravek“ v předkládaném popisu je definován tak, že obsahuje proteiny podle vynálezu a další biologicky kompatibilní přísady. Terapeutický přípravek podle

vynálezu obsahuje excipienty jako je např. voda, minerály a nosiče jako jsou např. proteiny.

Popis výhodných provedení

Předkládaný vynález je částečně založen na objevu, že přípravek blokující LT-B může indukovat protivirovou odpověď u jedince. Bylo zjištěno, že ošetření jedince infikovaného virem může značně zvýšit přežívání jedince. Specificky bylo ukázáno, že ošetření myši NZB infikovaných LCMV-13 přípravkem blokujícím LT-B, jako je například LT β R-Ig fúzní protein, zvýšilo jejich přežívání na 73 %.

Současná léčba virů Ebola, Dengue, SNV a dalších virů zde uvedených je prevence prostřednictvím školení o přenosu nemocí. Pro tyto vysoce patogenní viry neexistují vakcíny. Byl použit ribavirin, analog guanidinu, jako generický protivirový lék při několika z těchto infekcí s reprodukovatelným úspěchem doloženým pouze v léčbě horečky vyvolané virem Lassa, když byl použit na začátku onemocnění (Lacy, M.D., a Smego, R.A. Adv. Ped. Inf. Dis., 12, 21, 1997). Data původců ukazují, že patologické změny sdružené s těmito viry mohou být částečně zprostředkované imunitou. Blokáda LT systému by mohla vysoce zvýšit šanci na přežití prostřednictvím přechodného snížení počtu CD8 T buněk specifických pro virus a snížení jejich funkčnosti. Pro léčbu několika onemocnění již probíhají klinické zkoušky, které používají několik prostředků blokování dráhy TNF α (Pass, H.I., Mew, D., et al., Chest surg. Clin. N. Amer., 5, 73, 1995). Původci věří, že léčba LT β R-Ig by se měla vzít do úvahy při dalším testování na zvířecích modelech pro eventuelní použití v klinických zkouškách s lidmi zapojujících pacienty s akutními, rychle postupujícími

virovými infekcemi zahrnujícími šok a/nebo respirační insuficienci.

Přípravky blokující LT- β

V jednom provedení tohoto vynálezu obsahuje přípravek blokující LT- β protilátku (Ab) namířenou proti LT- β , která inhibuje signalizaci LT- β . Výhodně je protilátka anti-LT- β monoklonální protilátka (mAb). Inhibiční anti-LT- β protilátka a další LT- β blokující přípravky mohou být identifikovány s použitím metod screeningu, které detekují schopnost jednoho nebo více přípravků vázat se k LT ligandu nebo inhibují účinky LT- β signalizace na buňky.

V dalším provedení tohoto vynálezu přípravek blokující LT- β obsahuje přípravek blokující receptor LT- β (LT- β -R). Ve výhodném provedení přípravek blokující LT- β -R je protilátka (Ab) namířená proti LT- β -R, která inhibuje signalizaci LT- β -R. Výhodně je protilátka anti-LT- β -R monoklonální protilátka (mAb). Jedna taková inhibiční monoklonální protilátka anti-LT- β -R je BDA8 mAb. Inhibiční anti-LT- β -R Ab a další přípravky blokující LT- β -R mohou být identifikovány s použitím metod screeningu, které detekují schopnost jednoho nebo více přípravků vázat se buď k LT- β -R nebo LT ligandu nebo inhibují účinky LT- β -R signalizace na buňky.

Jedna metoda screeningu využívá cytotoxických účinků LT- β -R signalizace na nádorové buňky nesoucí LT- β -R. Nádorové buňky jsou vystaveny jednomu nebo více přípravkům aktivujícím LT- β -R, aby se indukovala signalizace LT- β -R. Přípravky aktivující LT- β -R zahrnují LT- α / β 2 heteromerní komplexy (výhodně rozpustné LT- α 1/ β 2) v přítomnosti IFN-gama

nebo aktivující anti-LT- β -R Ab (viz níže, také popsáno v současně projednávané přihlášce USA č. 08/378 968 stejných přihlašovatelů).

Protilátky a další přípravky, které mohou blokovat signalizaci LT- β -R, jsou vybírány na základě jejich schopnosti inhibovat cytotoxický účinek signalizace LT- β -R na nádorové buňky v následujícím testu:

1) nádorové buňky, jako například buňky HT29, jsou pěstovány tři až čtyři dny v řadách jamek pro tkáňové kultury obsahujících médium a alespoň jeden přípravek aktivující LT- β -R v přítomnosti řadového ředění testovaného přípravku nebo bez něj,

2) ke směsi nádorových buněk je přidáno vitální barvivo, které odráží funkci mitochondrií, jako například MTT, a ponechá se reagovat několik hodin,

3) optická denzita směsi v každé jamce je kvantifikována při vlnové délce 550 nm (OD550). OD550 je proporcionální k počtu nádorových buněk zbývajících při přítomnosti přípravku aktivujícího LT- β -R a testu přípravku blokujícího LT- β -R v každé jamce. Přípravek nebo kombinace přípravků, které mohou snížit cytotoxicitu nádorové buňky aktivovanou LT- β -R o alespoň 20 % v tomto testu, je přípravek blokující LT- β -R v rozsahu tohoto vynálezu.

Každý přípravek nebo kombinace přípravků, které aktivují signalizaci LT- β -R může být použit ve výše uvedeném testu pro identifikaci přípravků blokujících LT- β -R. Přípravky aktivující LT- β -R, které indukují signalizaci LT- β -R (jako například aktivující anti-LT- β -R mAb) mohou být vybrány na základě jejich schopnosti, samotných nebo v kombinaci s dalšími přípravky, potencovat cytotoxicitu nádorových buněk s použitím testu s nádorovými buňkami popsaným výše.

Další způsob selekce přípravku blokujícího LT- β -R je monitorování schopnosti předpokládaného přípravku přímo interferovat s vazbou LT-ligand-receptor. Přípravek nebo kombinace přípravků, které mohou blokovat vazbu ligand-receptor o alespoň 20 %, je přípravek blokující LT- β -R v rozsahu tohoto vynálezu.

Pro provádění kompetitivních testů s předpokládanými přípravky blokujícími LT- β -R může být použit každý z celé řady testů, které měří sílu vazby ligand-receptor. Síla vazby mezi receptorem a ligandem může být měřena s použitím enzymatického imunotestu (ELISA) nebo radioimunotestu (RIA). Specifická vazba může být také měřena prostřednictvím fluorescenčně značených komplexů protilátka-antigen a prováděním analýzy třídění buněk fluorescenčně značených (FACS) nebo prováděním dalších takových imunodetekčních metod, které jsou všechny technikami v oboru známými.

Vazebná interakce ligand-receptor může být také měřena přístrojem BIAcore™ (Pharmacia Biosensor), který využívá detekci plazmonovou rezonancí (Zhou et al., Biochemistry, 32, 8193-98, 1993, Faegerstram a O'Shanessy, „Surface plasmon resonance detection in affinity technologies“, in Handbook of Affinity Chromatography, 229-52, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993).

Technologie BIAcore™ umožňuje navázat receptor na povrch zlata a nalít přes něj ligand. Detekce plazmonovou rezonancí dává přímou kvantifikaci množství hmoty navázané na povrch v reálném čase. Tato technika poskytuje rychlostní konstanty v obou směrech reakce, a tudíž může být přímo určena disociační konstanta ligand-receptor a afinitní konstanta v přítomnosti a nepřítomnosti předpokládaného přípravku blokujícího LT- β -R.

Každou touto nebo dalšími technikami pro měření interakcí receptor-ligand může být vyhodnocena schopnost přípravku blokujícího LT- β -R, samotného nebo v kombinaci s dalšími přípravky, inhibovat vazbu povrchových nebo rozpustných LT ligandů na povrchové nebo rozpustné molekuly LT- β -R. Tyto testy mohou být také použity k testování přípravků blokujících LT- β -R nebo derivátů těchto přípravků (např. fúze, chiméry, mutanty a chemicky změněné formy), samotných nebo v kombinaci, pro optimalizaci schopnosti takto změněných přípravků blokovat aktivaci LT- β -R.

Přípravky blokující LT- β -R v jednom provedení tohoto vynálezu obsahují rozpustné molekuly receptoru LT- β . Sekvence extracelulární části lidského LT- β -R, která kóduje vazebnou doménu ligandu, je ukázána na obrázku 1 patentu USA č. 5 925 351, zahrnutého zde formou odkazu. s použitím informace o sekvenci z obrázku 1 patentu USA č. 5 925 351 a technikami rekombinantní DNA, v oboru známými, mohou být klonovány funkční fragmenty kódující vazebnou doménu ligandu LT- β -R do vektoru a exprimovány v příslušném hostiteli, aby produkovaly rozpustné molekuly LT- β -R. Rozpustné molekuly LT- β -R, které mohou kompetovat s nativními receptory LT- β o vazbu LT ligandu podle testů zde popsaných, jsou vybírány jako přípravky blokující LT- β -R.

Rozpustný receptor LT- β obsahující aminokyselinové sekvence vybrané ze sekvencí ukázaných na obrázku 1 patentu USA č. 5 925 351 mohou být připojeny k jedné nebo více heterologním proteinovým doménám („fúzní doména“), aby zvýšily *in vivo* stabilitu receptorového fúzního proteinu, nebo modulovaly jeho biologickou aktivitu či lokalizaci. Výhodně jsou ke konstrukci receptorových fúzních proteinů používány stabilní plazmatické proteiny, které mají typický

biologický poločas v krevním oběhu delší než 20 hodin. Tyto plazmatické proteiny bez omezení zahrnují: imunoglobuliny, sérový albumin, lipoproteiny, apolipoproteiny a transferin. Sekvence, které mohou zacílit rozpustnou molekulu LT- β -R ke konkrétní buňce nebo typu tkáně, mohou být také připojeny k vazebné doméně ligandu LT- β -R, aby vznikl specificky lokalizovaný rozpustný LT- β -R fúzní protein. Celá nebo funkční část LT- β -R extracelulární oblasti (obrázek 1 z patentu USA č. 5 925 351) obsahující vazebnou doménu ligandu LT- β -R může být fúzována ke konstantní oblasti imunoglobulinu, jako Fc doména lidského těžkého řetězce IgG1 (Browning et al., J. Immunol., 154, 33-46, 1995). Rozpustné fúzní proteiny receptoru-IgG jsou běžné imunologické reagenty a metody jejich konstrukce jsou v oboru známy (viz např. patent USA č. 5 225 538). Funkční vazebná doména ligandu LT- β -R může být fúzována s Fc doménou imunoglobulinu (Ig) pocházejícího ze třídy nebo podtřídy imunoglobulinu jiné než IgG1. Fc domény protilátek patřících do různých Ig tříd nebo podtříd mohou aktivovat odlišné sekundární efektorové funkce. Aktivace nastává, když je Fc doména navázána analogickým Fc receptorem. Sekundární efektorové funkce zahrnují schopnost aktivovat komplementový systém, přestoupit placentu a vázat různé mikrobiální proteiny. Vlastnosti různých tříd a podtříd imunoglobulinů jsou popsány v Roitt et al. (Immunology, 4.8, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3. vyd., 1993). Kaskáda enzymů komplementu může být aktivována Fc doménami na antigen navázanými IgG1, IgG3 a IgM protilátkami. Fc doména IgG2 se zdá být méně účinná a Fc domény IgG4, IgA, IgD a IgE jsou při aktivaci komplementu neúčinné. Může se tudíž vybrat Fc doména na základě toho, zda jsou její přidružené sekundární efektorové funkce žádoucí pro konkrétní

imunitní odpověď nebo nemoc léčenou fúzním proteinem LT- β -R-Fc. Když by bylo výhodné poškodit nebo usmrtit cílovou buňku nesoucí ligand LT, může se pro vytvoření fúzního proteinu LT- β -R-Fc vybrat obzvláště aktivní Fc doména (IgG1). Nebo, když by bylo žádoucí zacílit fúzi LT- β -R-Fc na buňku bez spuštění komplementového systému, může být vybrána inaktivní Fc doména IgG4.

Mutace Fc domén, které snižují nebo eliminují vazbu k Fc receptorům a aktivaci komplementu byly popsány (S. Morrison, *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 239-65, 1992). Pro optimalizaci aktivity Fc domény použité ke konstrukci fúzního proteinu LT- β -R-Fc, mohou být použity tyto nebo jiné mutace, samotné nebo v kombinaci.

Produkce rozpustného lidského fúzního proteinu LT- β -R obsahujícího vazebné sekvence ligandu fúzované k Fc doméně lidského imunoglobulinu (hLT- β -R-Fc) je popsána v příkladu 1 patentu USA č. 5 925 351, zahrnutého zde formou odkazu. Jedna linie CHO vytvořená podle příkladu 1, která sekretuje hLT- β -R-Fc, byla nazvána „hLT beta;R-hG1 CHO#14“. Vzorek této linie byl uložen 21. července 1995 v Americké sbírce mikroorganismů (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD) v souladu s ustanoveními Budapeštské smlouvy a bylo mu přiřazeno ATCC přístupové číslo CRL 11965.

Tvorba rozpustné myší fúzní molekuly LT- β -R (mLT- β -R-Fc) je popsána v příkladu 2 patentu USA č. 5 925 351 zahrnutého zde formou odkazu. Linie CHO vytvořená podle příkladu 2 patentu USA č. 5 925 351, která sekretuje mLT- β -R-Fc, byla nazvána „mLT beta;R-hG1 CHO#1.3.BB“. Vzorek této linie byl uložen 21. července 1995 v Americké sbírce mikroorganismů (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD)

v souladu s ustanoveními Budapeštské smlouvy a bylo mu přiřazeno ATCC přístupové číslo CRL 11964.

Odlišné aminokyselinové zbytky tvořící styčný bod fúzního proteinu receptor-Ig mohou měnit strukturu, stabilitu a výslednou biologickou aktivitu rozpustného fúzního proteinu LT- β -receptor. K C-koncové části vybraného fragmentu LT- β -R může být přidána jedna nebo více aminokyselin, aby se modifikoval styčný bod vybranou fúzní doménou.

N-koncová oblast fúzního proteinu LT- β -R může být také obměněn změnou pozice, ve které je vybraný DNA fragment LT- β -R štěpen na svém 5' konci pro inzerci do rekombinantního expresního vektoru. Stabilita a aktivita každého fúzního proteinu LT- β -R může být testována a optimalizována s použitím rutinních pokusů a testů pro selekci přípravků blokujících LT- β -R zde popsaných.

S použitím sekvencí vazebné domény ligandu LT- β -R v extracelulární doméně ukázané na obrázku 1 mohou být také konstruovány varianty aminokyselinové sekvence pro modifikaci afinity rozpustného receptoru LT- β nebo fúzního proteinu pro LT ligand. Rozpustné LT- β -R molekuly tohoto vynálezu mohou kompetovat o vazbu povrchového LT ligandu s endogenními LT- β receptory buněčného povrchu. Předvídá se, že každá rozpustná molekula obsahující vazebnou doménu LT- β -R ligandu, která může kompetovat s LT- β receptory buněčného povrchu o vazbu LT ligandu je přípravek blokující LT- β -R, který spadá do oblasti předkládaného vynálezu.

V dalším provedení tohoto vynálezu protilátky namířené proti lidskému LT- β receptoru (anti-LT- β -R Ab) působí jako přípravky blokující LT- β -R pro použití v léčbě stavů, které vystavují jedince, včetně člověka, riziku virového

systémového šoku a respirační insuficience. Protilátky anti-LT- β -R podle tohoto vynálezu mohou být polyklonální nebo monoklonální (mAb) a mohou být modifikovány tak, aby se optimalizovala jejich schopnost blokovat signalizaci LT- β -R, jejich biologická dostupnost *in vivo*, jejich stabilita nebo další žádoucí vlastnosti.

Polyklonální protilátková séra namířená proti lidskému receptoru LT- β jsou připravována s použitím obvyklých technik podáváním subkutánních injekcí zvířatům, jako jsou například kozy, králíci, laboratorní potkani, křečci nebo myši, tyto injekce obsahují fúzní protein lidský LT- β receptor-Fc (příklad 1 patentu USA č. 5 925 351) v kompletním Freundově adjuvans, a pak následuje upomínací intraperitoneální nebo subkutánní injekce s nekompletním Freundovým adjuvans. Screening polyklonálních antisér, která obsahují požadované protilátky namířené proti receptoru LT- β , je prováděn pomocí obvyklých imunologických postupů.

Myší monoklonální protilátky (mAb) namířené proti fúznímu proteinu lidský LT- β -R-Fc jsou připraveny tak, jak je popsáno v patentu USA č. 5 925 351, příklad 5. Hybridomová buněčná linie (BD.A8.AB9), která produkuje myší anti-lidskou LT- β -R mAb BDA8, byla uložena 12. ledna, 1995, v Americké sbírce mikroorganismů (American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) podle Budapeštské smlouvy a bylo jí přiřazeno ATCC přístupové číslo HB11798.

Různé formy anti-LT- β -R protilátek mohou být také vytvářeny s použitím standardních technik rekombinantní DNA (Winter a Milstein, *Nature*, 349, 293-99, 1991). Například mohou být konstruovány „chimérické“ protilátky, ve kterých vazebná doména antigenu ze zvířecí protilátky je spojena

s lidskou konstantní doménou (např. Cabilly et al., patent USA č. 4 816 567, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-55, 1984). Chimérické protilátky snižují pozorované imunogenní odpovědi vyvolané zvířecími protilátkami, když jsou použity v klinické léčbě u lidí. Kromě toho mohou být syntetizovány rekombinantní „humanizované“ protilátky, které rozpoznávají LT- β -R. Humanizované protilátky jsou chiméry obsahující většinou lidské IgG sekvence, do kterých byly vloženy oblasti odpovědné za specifickou vazbu antigenu (viz např. WO 94/04679). Zvířata jsou imunizována požadovaným antigenem, jsou izolována odpovídající protilátky a je odstraněna část sekvencí variabilní oblasti zodpovědných za specifickou vazbu antigenu. Vazebné oblasti antigenu pocházející ze zvířete jsou pak klonovány do příslušné pozice lidských protilátkových genů, ve kterých byly odstraněny oblasti vázající antigen. Humanizované protilátky minimalizují použití heterologních (mezidruhových) sekvencí v lidských protilátkách a je méně pravděpodobné, že vyvolají imunitní odpovědi u léčeného pacienta.

Konstrukce různých tříd rekombinantních anti-LT- β -R protilátek může být také uskutečněna vytvářením chimérických nebo humanizovaných protilátek obsahujících anti-LT- β -R variabilní domény a lidské konstantní domény (CH1, CH2, CH3) izolované z odlišných tříd imunoglobulinů. Například anti-LT- β -R IgM protilátky se zvýšenou valencí místa vázajícího antigen mohou být rekombinantně produkovány klonováním vazebného místa antigenu do vektorů nesoucích konstantní oblasti lidského řetězce mu (Arulanandam et al., J. Exp. Med., 177, 1439-50, 1993, Lane et al., Eur. J. Immunol., 22, 2573-78, 1993, Traunecker et al., Nature, 339, 68-70, 1989). Kromě toho mohou být použity standardní

techniky rekombinantní DNA pro alteraci vazebné afinity rekombinantních protilátek s jejich antigeny pomocí změny aminokyselinových zbytků v blízkosti míst vázajících antigen. Afinita pro vazbu antigenu humanizované protilátky může být zvýšena mutagenezí na základě molekulového modelování (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 10029-33, 1989, WO 94/04679).

Může být žádoucí zvýšit nebo snížit afinitu anti-LT- β -R Ab pro LT- β -R v závislosti na typu cílové tkáně nebo předvídaném konkrétním léčebném schématu. Například může být výhodné léčit pacienta konstantními hladinami anti-LT- β -R Ab se sníženou schopností signalizovat prostřednictvím dráhy LT- β u semi-profylaktického léčení. Podobně inhibiční anti-LT- β -R Ab se zvýšenou afinitou pro LT- β -R mohou být výhodné u krátkodobé léčby.

Očekává se, že testováním dalších protilátek namířených proti lidskému receptoru LT- β mohou být identifikovány další anti-LT- β -R protilátky, které působí jako přípravky blokující LT- β -R u lidí, pro léčbu stavů, které vystavují jedince, včetně člověka riziku virového systémového šoku a respirační insuficience, při použití rutinních pokusů a testů zde popsaných.

Další výhodné provedení tohoto vynálezu zahrnuje přípravky, které obsahují protilátky namířené proti LT ligandu, které působí jako přípravky blokující LT- β -R. Jak je popsáno výše pro anti-LT- β -R Ab, anti-LT ligand protilátky, které působí jako přípravky blokující LT- β -R, mohou být polyklonální nebo monoklonální, a mohu být modifikovány podle rutinních postupů tak, aby se modulovaly jejich vlastností pro vazbu antigenu a jejich imunogeničnost. Anti-LT protilátky podle tohoto vynálezu mohou být vytvořeny proti

buď jedné nebo dvěma LT podjednotkám individuálně, včetně rozpustných, mutovaných alterovaných a chimérických forem LT podjednotky. Jestliže jsou jako antigen použity LT podjednotky, jsou to výhodně podjednotky LT- β . Jestliže jsou použity podjednotky LT-alfa, preferuje se, že výsledné anti-LT-alfa protilátky vážou povrchový LT ligand a nereagují zkříženě se sekretovanou LT-alfa či nemodulují aktivitu TNF-R (podle testů z příkladu 3 patentu USA č. 5 925 351).

Alternativně mohou být vytvořeny protilátky namířené proti homomernímu (LT- β) nebo heteromernímu (LT-alfa/ β 2) komplexu obsahujícímu jednu nebo více LT podjednotek a může být proveden screening jejich aktivity coby přípravků blokujících LT- β -R. Výhodně jsou jako antigen použity komplexy LT-alfa 1/beta 2. Jak je uvedeno výše, preferuje se, že výsledné anti-LT-alfa 1/beta 2 protilátky vážou povrchový LT ligand bez vazby k sekretovanému LT-alfa a bez ovlivnění TNF-R aktivity.

Produkce polyklonálních anti-lidských LT-alfa protilátek je popsána v současně projednávané přihlášce stejných původců (WO 94/13808). Byly také popsány monoklonální anti-LT-alfa a anti-LT-beta protilátky (Browning et al., J. Immunol., 54, 33-46, 1995). Myší anti-lidské LT-beta mAb byly připraveny tak, jak je popsáno v příkladu 6 patentu USA č. 5 925 351. Hybridomová buněčná linie (B9.C9.1), která produkuje myší anti-lidskou LT- β -R mAb B9 byla uložena 21. července 1995 v Americké sbírce mikroorganismů (American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) podle Budapeštské smlouvy a bylo jí přiřazeno ATCC přístupové číslo 11962.

Monoklonální anti-myší LT-alfa/ β 2 protilátky byly připraveny tak, jak je popsáno v příkladu 7 patentu USA č. 5 925 351. Hybridomová buněčná linie (BB.F6.1), která

produkuje křeččí anti-myši LT-alfa/ β 2 mAb BB.F6 byla uložena 21. července 1995 v Americké sbírce mikroorganismů (American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) podle Budapeštské smlouvy a bylo jí přiřazeno ATCC přístupové číslo MB11963.

Test s tříděním fluorescenčně značených buněk (FACS) byl vyvinut pro screening protilátek namířených proti LT podjednotkám a LT komplexům, které mohou působit jako přípravky blokuující LT- β -R, jak je popsáno v příkladech 6 a 7 patentu USA č. 5 925 351. V tomto testu je přidán rozpustný lidský LT- β -R-Fc fúzní protein k II-23 buňkám aktivovaným PMA, které exprimují povrchové LT komplexy (Browning et al., J. Immunol., 154, 33-46, 1995), v přítomnosti stoupajícího množství testované protilátky. Protilátka, která může inhibovat interakci LT- β -R-ligand o alespoň 20 %, je vybrána jako přípravek blokuující LT- β -R.

Použití spíše komplexu LT-alfa/beta než LT podjednotky jako antigenu pro imunizaci zvířete může vést k účinnější imunizaci nebo může mít za následek protilátky, které mají větší afinitu pro povrchový LT ligand. Je možné, že při imunizaci s komplexem LT-alfa/ β 2 mohou být izolovány protilátky, které rozpoznávají aminokyselinové zbytky na obou podjednotkách, LT-alfa a LT-B (např. zbytky, které tvoří zářez v molekule LT-alfa/ β 2). Očekává se, že testováním protilátek namířených proti heteromerním komplexům lidského LT-alfa/ β 2 mohou být při použití rutinních pokusů a testů zde popsaných identifikovány další anti-LT protilátky, které působí jako přípravky blokuující LT- β -R.

Podávání

Přípravky zde popsané jsou podávány v účinné dávce ve způsobech léčení virového systémového šoku a respirační insuficience u jedince. Určení výhodné farmaceutické formulace a terapeuticky účinného režimu dávek u dané aplikace je v rozsahu znalosti odborníka, který vezme do úvahy například stav a hmotnost pacienta, rozsah požadované léčby a toleranci pacienta k léčbě. Je očekáváno, že dávky přibližně 1 mg/kg rozpustného LT- β -R budou vhodným výchozím bodem pro optimalizaci léčebných dávek.

Určení terapeuticky účinné dávky může být také stanoveno provedením *in vitro* pokusů, které měří koncentraci přípravku blokujícího LT- β -R požadovanou pro pokrytí cílových buněk (LT- β -R nebo LT ligand-pozitivních buněk v závislosti na blokujícím přípravku) po dobu 1 až 14 dnů. Pro monitorování reakce pokrývání buněk mohou být použity zde popsané testy vazby receptor-ligand. LT- β -R nebo LT-ligand-pozitivní buňky mohou být separovány od populací aktivovaných lymfocytů s použitím FACS. Na základě výsledků těchto *in vitro* vazebných testů může být vybráno rozmezí vhodné koncentrace přípravku blokujícího LT- β -R pro testování na zvířatech podle testů zde popsaných.

Podávání rozpustných molekul LT- β -R, anti-LT ligandu a protilátek anti-LT- β -R podle tohoto vynálezu, samotných nebo v kombinaci, včetně izolovaných a purifikovaných forem protilátek nebo komplexů, jejich solí nebo jejich farmaceuticky přijatelných derivátů, může být prováděno s použitím jakéhokoliv obvykle přijímaného způsobu podávání přípravků, které projevují imunosupresivní aktivitu.

Farmaceutické přípravky používané při těchto léčbách mohou být také v celé řadě forem. Ty zahrnují například pevné, polotuhé a tekuté dávkové formy, jako například tablety, pilulky, prášky, tekuté roztoky nebo suspenze, čípky a roztoky pro injekce a infúze. Výhodná forma závisí na zamýšleném způsobu podávání a terapeutické aplikaci.

Způsoby podávání mohou zahrnovat podávání perorální, parenterální, subkutánní, intravenózní, podávání do lézí nebo topické podávání. Rozpustné molekuly LT- β -R, anti-LT ligandu a anti-LT- β -R Ab podle tohoto vynálezu mohou být například umístěny do sterilních, izotonických formulací s kofaktory, které stimulují vychytávání nebo stabilitu nebo bez těchto kofaktorů. Formulace jsou výhodně tekuté nebo mohou být ve formě lyofilizovaného prášku. Například rozpustné molekuly LT- β -R, anti-LT ligandu a anti-LT- β -R Ab podle tohoto vynálezu mohou být naředěny formulačním puforem obsahujícím 5,0 mg/ml monohydrátu kyseliny citronové, 2,7 mg/ml citrátu trojsodného, 41 mg/ml manitu, 1 mg/ml glycinu a 1 mg/ml polysorbátu 20. Tento roztok může být lyofilizován, uskladněn při chlazení a rekonstituován před podáváním sterilní vodou pro injekce (USP).

Přípravky také výhodně zahrnují obvyklé farmaceuticky přijatelné nosiče v oboru známé (viz například Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. vyd., 1980, Mac Publishing Company). Tyto farmaceuticky přijatelné nosiče mohou zahrnovat další medicínální přípravky, nosiče, genetické nosiče, adjuvans, excipienty apod., jako například lidský sérový albumin nebo přípravky plazmy. Přípravky jsou výhodně ve formě jednotkové dávky a jsou obvykle podávány jednou nebo vícekrát denně.

Farmaceutické přípravky podle tohoto vynálezu mohou být také podávány s použitím mikrosfér, lipozomů, dalších

mikropartikulárních podávacích systémů nebo přípravků s prodlouženým (řízeným) uvolňováním umístěných v postižené tkáni, blízko ní nebo jinak v kontaktu s postiženou tkání nebo v krevním oběhu. Vhodné příklady nosičů s prodlouženým uvolňováním zahrnují semipermeabilní polymerové matrice ve formě tvarovaných předmětů, jako jsou například čípky nebo mikrotobolky. Implantovatelné nebo mikrotobolkové matrice s prodlouženým uvolňováním zahrnují polylaktidy (patent USA č. 3 773 319, EP 58 481), kopolymery kyseliny L-glutamové a ethyl-L-glutamátu (Sidman et al., *Biopolymers*, 22, 547-56, 1985), poly(2-hydroxyethyl-methakrylát) nebo ethylenvinylacetát (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15, 167-277, 1981, Langer, *Chem. Tech.*, 12, 98-105, 1982).

Lipozomy obsahující rozpustné molekuly LT- β -R, anti-LT ligand a anti-LT- β -R Abs podle tohoto vynálezu, samotné nebo v kombinaci, mohou být připraveny známými metodami (viz, např. DE 3 218 121, Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3688-92, 1985, Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4030-34, 1980, patent Spojených Států č. 4 485 045 a 4 544 545). Obvykle jsou lipozomy malého (přibližně 200-800 Å) unilamelárního typu, ve kterém je obsah lipidů větší než přibližně 30 mol% cholesterolu. Podíl cholesterolu je vybrán tak, aby kontroloval optimální rychlost uvolňování rozpustné molekuly LT- β -R, anti-LT ligandu a anti-LT- β -R Abs.

Rozpustné molekuly LT- β -R, anti-LT ligand a anti-LT- β -R Ab podle tohoto vynálezu mohou být také připojeny k lipozomům obsahujícím jiné přípravky blokující LT- β -R, imunosupresivní přípravky nebo cytokiny pro modulaci blokující aktivity LT- β -R. Připojení molekul LT- β -R, anti-LT ligandu a anti-LT- β -R Ab k lipozomům může být prováděno každým známým zesíťovacím činidlem, jako jsou například heterobifunkční

zesíťovací činidla, která jsou široce používána k připojování toxinů nebo chemoterapeutických přípravků k protilátkám pro cílené podávání. Konjugace k lipozomům se může také provádět s použitím zesíťovacího činidla namířeného na sacharidy hydrazidu 4-(4-maleimidofenyl)butyrové kyseliny (MPBH) (Duzgunes et al., J. Cell. Biochem., Abst. Suppl. 16E 77, 1992).

Přípravky blokující LT- β -R podle tohoto vynálezu mohou být modifikovány tak, aby se dosáhla žádoucí hladina signalizace LT- β -R v závislosti na stavu, poruše nebo léčené nemoci. Předvídá se, že absolutní úroveň signalizace LT- β -R může být jemně laděna manipulací koncentrace a afinity přípravků blokujících LT- β -R k jejich příslušným molekulovým cílům. Například v jednom provedení tohoto vynálezu jsou pacientovi podávány přípravky obsahující rozpustné molekuly LT- β -R. Rozpustný receptor LT- β může účinně kompetovat s receptory LT- β buněčného povrchu o vazbu povrchových LT ligandů. Schopnost kompetovat s povrchovými LT ligandy závisí na relativních koncentracích rozpustných a povrchových molekul LT- β -R a na jejich relativních afinitách pro vazbu ligandu.

Rozpustné molekuly LT-beta-R nesoucí mutace, které zvyšují nebo snižují vazebnou afinitu mutantní rozpustné molekuly LT-beta-R a povrchového LT-ligandu, mohou být připraveny standardními metodami genového inženýrství (rekombinantní DNA), které jsou odborníkovi známy. Velký počet molekul s místně cílenými nebo náhodnými mutacemi může být testován na jejich schopnost působit jako LT-beta-R blokující činidla rutinními experimenty a metodami popsány zde. Podobně v jiném provedení vynálezu protilátky namířené buďto proti

LT-beta receptoru nebo jedné nebo více podjednotkám LT-ligandu působí jako LT-beta blokující činidla. Schopnost těchto protilátek blokovat signalizaci LT-beta receptoru může být modifikována mutacemi, chemickou modifikací nebo jinými metodami, které mění účinnou koncentraci nebo aktivitu protilátky podávané subjektu.

Užití

Obecně lze říci, že LT-beta blokující činidlo podle vynálezu je užitečné k indukci antivirové reakce u jedince, a to tím, že se jedinci podá účinné množství LT-beta blokujícího činidla a farmaceuticky přijatelný nosič. Virová reakce, kterou lze takto léčit, může být způsobena kterýmkoliv ze známých virů, zejména (avšak výčet není omezující) SNV (Sin Nombre virus), Ebola, Marburg, Lassa a Dengue.

Ekvivalenty

Předkládaný vynález může být realizován v řadě specifických provedení při zachování vynálezecké myšlenky nebo nutných charakteristik vynálezu. Následující specifická provedení vynálezu je proto třeba považovat za ilustrativní příklady, které předkládaný vynález nijak neomezují. Předmět vynálezu je tedy definován připojenými nároky, nikoliv popisem, a všechny modifikace, které významem spadají do rozsahu ekvivalentů nárokovaného řešení jsou také předmětem vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Nádorový nekrotický faktor (TNF α) hraje klíčovou roli ve zprostředkování akutní šokové reakce při infekci viry nebo jinými imunogeny (K.C.F. Sheehan, N.H. Ruddle, a R.D. Schreiber., J. Immunol., 142, 3884 (1989); G.W.H. Wong a D.V. Goeddel Nature 323, 819 (1986); B.Beutler, I.W. Milsark, A. Cerami, 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)). Při epizodách horečky Dengue zahrnujících šok jsou hladiny TNF α v séru pacientů zvýšeny stejně jako hladiny rozpustného 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)).

Původci měřili hladiny TNF α v séru myši infikovaných variantou lymfocytárního viru choriomeningitidy, LCMV klon 13 (LCMV-13) (HH, II). Bylo zjištěno, že hladiny TNF α v séru těchto myši byly právě těsně nad detekčním limitem použitého testu až do 4. dne po infekci (hladiny TNF α v séru byly měřeny ELISA testem firmy Genzyme Corporation, katalog. č. 80-2802-00). 5. a 6. den po infekci, kdy nemoc dosahuje vrcholu, hladiny TNF α v séru se zvýšily 3 až 6 x nad normální hladiny (data nejsou uvedena). Bylo proto rozhodnuto blokovat funkci TNF α užitím monoklonální protilátky TN3-19.12, o které je známo, že váže oba secernované TNF α , čímž snižuje hladinu u myši, jak bylo ověřeno ELISA testem (K.C.F. Sheehan, N.H.

Ruddle, a R.D. Schreiber., J. Immunol., 142, 3884 (1989)
G.W.H. Wong a D.V. Goeddel Nature 323, 819 (1986); B.
Beutler, I.W. Milsark, A. Cerami, 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); D.B. Bethell, K. Flobbe, C.X.T. Phuong,
et al., J. Infect. Dis., 177, 778 (1998)). Sérové hladiny
TNF α v séru byly měřeny ELISA testem firmy Genzyme
Corporation, katalog. č. 80-2802-00). Myši NZB dostaly
intravenózní (i.v.) dávku $2,5 \times 10^6$ pfu viru Cl 13
následovanou dvěma i.p. injekcemi s 250 μ g protilátky TN3-
19.12 v PBS zcela bez endotoxinů (viz odkaz na S) 1. den a
totéž 4. den po infekci. Kontrolní myši dostaly stejný den
injekce stejného objemu PBS bez protilátky. Toto léčení
(anti-TNF) mělo jen malý vliv na přežívání myši (viz obr. 3).
Lymfotoxin alfa (LT α), známý také jako TNF β , ačkoliv sdílí
identické receptory a mnoho biologických účinků s TNF α , není
rozpoznáván touto protilátkou (F. Mackay, P.R. Bourdon, D.A.
Griffiths, et al. J. Immunol. 159, 3299 (1997)). Je možné, že
pro zvýšení míry přežívání by bylo potřeba zacílit jak TNF α
tak i LT α . K otestování této hypotézy byla užita výše zmíněná
monoklonální protilátka TN3-19.12 a receptorový fúzní
protein, ve kterém byla extracelulární doména receptoru TNF
p55 fúzována s doménami CH2 a CH3 lidského imunoglobulinu
IgG1 (TNFRSS-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, I. Douglas, A. Ngam-ek, et al., J. Immunol., 154:33

(1995). Myši byly léčeny jak bylo popsáno v odkazu R. Ve třikrát léčené skupině byly proteiny TNFR55-Ig a LT-beta-R-Ig podány i.p. 0. a 3. den po infekci v dávce 200 pg. Kontrolní myši dostaly dávku lidské protilátky použité při syntéze uvedených fúzních proteinů (AY 1943-29) ve stejný den a ve stejném množství. Myši, které dostaly samotný LT-beta-R-Ig byly léčeny stejně, až na to, že injekce TNFR55-Ig byla vynechána. Toto léčení také nezvýšilo významně míru přežívání NZB myši infikovaných LCMV-13 (viz skupiny anti-TNF a TNFR55-Ig).

Membránová forma lymfotoxinu, heteromer $LT\alpha$ a $LT\beta$ nerozpoznává TNFR-75 nebo TNFR-55, ale váže se na třetí receptor LT-beta-R (15). Byl proto pro další použití vybrán fúzní protein obsahující extracelulární doménu LT-beta-R také navázanou na domény CH2 and CH3 lidského IgG1 (LT-beta R-Ig). Léčení myši užitím monoklonální protilátky anti-TNF α , TNFR55-Ig a LT-beta-R-Ig (trojité léčení) nebo TNFR55-Ig a LT-beta-R-Ig vedlo k dramatickému zvýšení přežívání o 80 % a 70 %, v uvedeném pořadí. Naproti tomu pouze 20 % myši léčených monoklonální protilátkou anti-TNF α a TNFR55Ig přežívalo infekci. V současnosti byl identifikován druhý ligand pro LT-beta-R nazývaný 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)). Bylo ukázáno, že LIGHT se váže na mediátor vstupu infekce herpetickým virem (HVEM), což je transmembránový protein typu I s významnou homologií se členy rodiny TNF, které jsou exprimovány na aktivovaných CD4 a CD8 T buňkách (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)). Na základě zde uvedených výsledků lze odvodit, že prevence signalizace LT-beta-R a potenciálně HVEM navázáním LT-beta2/alfa1 a LIGHT prostřednictvím LT-beta-R-Ig bylo pravděpodobně odpovědné za většinu pozorovaného účinku ve skupině podrobené „trojitému“ léčení.

Tato hypotéza byla potvrzena léčením myši NZB infikovaných LCMV-13 samotným fúzním proteinem LT-beta-R-Ig. Míra přežívání myši v této skupině (73%) byla téměř tak vysoká jako ve skupině podrobené „trojitému“ léčení (obr. 3). Tyto údaje tak ve svém souhrnu poprvé demonstrovaly, že signální dráha LT-beta-R a/nebo HVEM se podílejí na průběhu akutní letální nemoci, jejíž součástí je systémový šok a respirační insuficience.

Ve snaze určit mechanismus přežívání, na kterém je založeno léčení blokováním LT-beta, bylo provedeno současné barvení CD8/tetramer na NP118 specifické T buňky, dominantní epitop NZB LD systému, a intracelulární barvení na tvorbu interferonu gama splenocyty stimulovanými peptidem NP118 na vzorcích z myši NZB infikovaných LCMV-13, které byly léčeny kontrolní protilátkou, samotným LT-beta-R-Ig nebo „trojitým“ léčením. Obr. 4 ukazuje snížení počtu CD8 T buněk specifických na NP118, přičemž největší účinek je vidět u myši podrobených trojitému léčení. U myši léčených kontrolní protilátkou pouze 10 % pozitivních na tetramery aktivně produkovalo interferon gama. Výskyt anergických T buněk v průběhu infekce LCMV-13 byl již dříve dokumentován a je pravděpodobně vyvolán vysokou hladinou virového antigenu u myši (obr. 1). U myši léčených LT-beta-R-Ig nejenže klesl

počet buněk specifických pro NP118, ale také procento buněk produkujících interferon gama byla sníženo. tento efekt byl dokonce ještě výraznější u myši podrobených trojitému léčení. Takže je pravděpodobné, že CD8 kompartment je zdrojem letální reakce NZB na infekci LCMV-13. Známa skutečnost, že aktivované buňky CD8 prezentují LT-beta2/alfa1 je v souladu s touto hypotézou (Y. Abe, A. Horiuchi, Y. Osuka, et al., *Lymph. Ctyok. Res.*, 11, I 15 (1992); C.F. Ware, P.D. Crowe, M.H. Grayson, et al., *J. Immunol.*, 149, 3881 (1992); J.L. Browning, A. Ngam-ek, P. Lawcon, et al., *Cell*, 72, 847 (1993)). Po potvrzení výše uvedené hypotézy byly NZB m odstraněny CD8 nebo CD4 pozitivní T buňky in vivo (samci myši NZB dostaly i.v. dávku $2,5 \times 10^6$ pfu LCMV-13 a poté dvě i.p. injekce po 500 μ l protilátky proti T buňkám. Monoklonální protilátka Lyt2.43 byla použita k odstranění CD8+ T buněk a protilátka GK1.5 (M1) byla použita k odstranění CD4+ T buněk. Obě zmíněné protilátky byly připraveny precipitací se síranem amonným ze supernatantu hybridomů a dialýzou proti PBS. Analýza FACS byla užita u několika myši pro ověření toho, že T buňky byly odstraněny. Odstranění CD4 T buněk nezvýšilo přežívání. Naproti tomu odstranění CD8 T buněk vedlo ke 100% přežívání při absenci příznaků nemoci podobně jako u myši léčených LT-beta-R-Ig (Obr. 5). protože virové titry v některých tkáních myši s odstraněnými CD8 buňkami byly vyšší než u léčených, je pravděpodobné, že příčinou smrti byla toxická imunitní reakce zprostředkovaná CD8 T buňkami spíše než destrukce tkání virovou infekcí.

U myši NZB infikovaných vysokou intravenózní dávkou LCMV-13 se často vyvíjí akutní, rychle postupující nemoc,

která má řadu společných znaků s virovými infekcemi jako je Ebola, Marburg, Lassa, Dengue a Sin Nombre. Letalita těchto nemocí je závislá na přítomnosti CD8+ T buněk, o kterých je známo, že když jsou aktivovány, exprimují TNF α , LT α a LT β . Ačkoliv je to povzbudivé zjištění, léčení virové infekce odstraněním CD8+ T buněk nelze doporučit. Takové léčení by vedlo k tomu, že pacienti by pak byly náchylní k jiným oportunním infekcím. Kromě toho, jelikož vymizení viru je nepravděpodobné v přítomnosti cytotoxických T buněk, existuje značné riziko tolerance viru pacientem po novém vytvoření CD8+ kompartmentu.

Bylo ukázáno, že blokování signální dráhy LT-beta-R/HVEM podáváním LT-beta-R-Ig představuje účinné léčení, které je svou povahou dočasné, a které dovoluje rychlý návrat homeostázy po ukončení (Mackay a Browning, nepublikováno). Takto léčené přežívající myši eliminovaly nakonec virus v testovaných tkáních (data neuvedena) a již déle nejevily známky nemoci.

Tyto údaje poprvé ukázaly, že LT-beta-R signalizace hraje důležitou roli v antivirové reakci a funkci CD8 T buněk. Lymfotoxinový systém je těsně spojen s organizací lymfoidní architektury nejpravděpodobněji prostřednictvím kontroly exprese několika chemokinů, které řídí organizaci T a B buněk (Chaplin et al. Curr. opin. Immunol. 10, 289 (1998), J. Cyster, v tisku). Zralý funkční stav folikulárních dendritických buněk je udržován konstantní signalizací B buněk a tyto buňky mizí do jednoho dne po potlačení LT-beta-R signalizace. Tyto buňky jsou kritické pro prezentaci antigenu kompartmentu T a B buněk. Opodstatněnou

spekulací tedy je, že nějaký aspekt prezentace antigenu CD8 buňkám nebo správné umístění těchto buněk v chemokinovém gradientu v průběhu dozrávání jsou narušeny při zablokování LT-beta-R signalizace. Předchozí studie funkce LT byly zaměřeny především na biologii B buněk a jejich zapojení ve funkci T buněk se nepředvíдалo. Každý LT má další funkce a z tyto údaje také odrážejí úlohu nového ligandu LIGHT. Jakou úlohu hrají HVEM a LIGHT v rozvoji nemocí zde popsaných zatím zůstává nejasné.

PATENTOVÉ NÁROKY

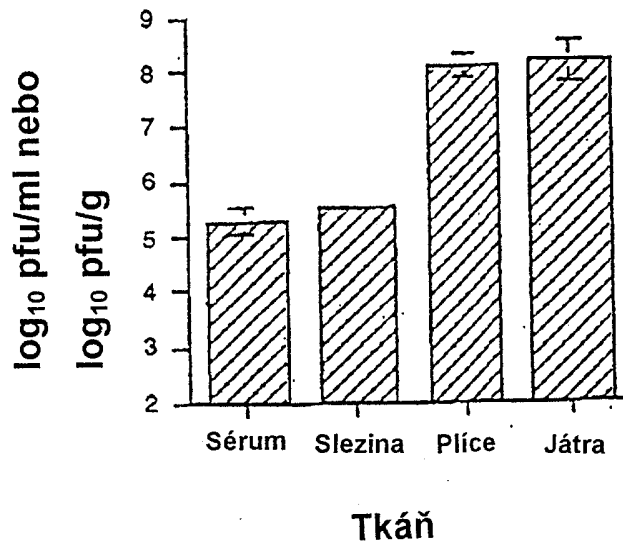
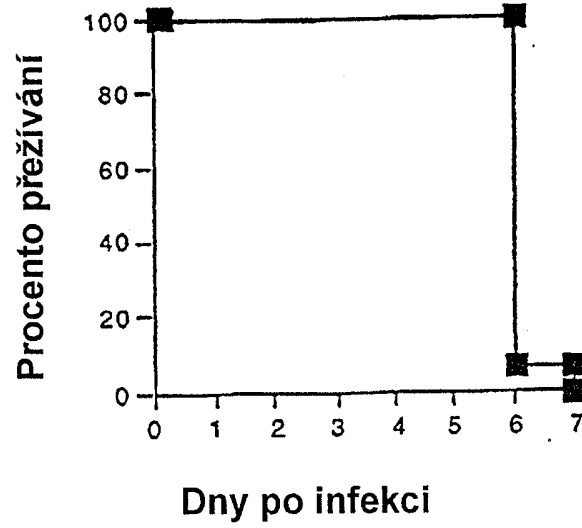
1. Použití činidla, které blokuje vazbu lymfotoxinu- β na jeho receptor, pro výrobu léku k indukci protivirové reakce u jedince, přičemž lék obsahuje účinné množství činidla a farmaceuticky přijatelný nosič.
2. Použití podle nároku 1, kde činidlo je činidlo blokující LT- β -R.
3. Použití podle nároku 2, kde činidlo je protilátka proti receptoru lymfotoxinu- β nebo rozpustný receptor lymfotoxinu- β
4. Použití podle nároku 3, kde činidlo je fúzní protein lymfotoxin- β -receptor/Ig.
5. Použití podle nároku 1, kde činidlo je rozpustný lymfotoxin- β nebo protilátka proti lymfotoxinu- β .
6. Použití činidla, které blokuje signální dráhu receptoru lymfotoxinu- β a/nebo HVEM, pro výrobu léku k indukci protivirové reakce u jedince, přičemž lék obsahuje účinné množství činidla.
7. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kde jedinec byl infikován virem Sin Nombre, Ebola, Marburg, Lassa nebo Dengue.

8. Použití podle nároku 7, kde činidlo je fúzní protein lymfotoxin- β -receptor/Ig.

05.04.01

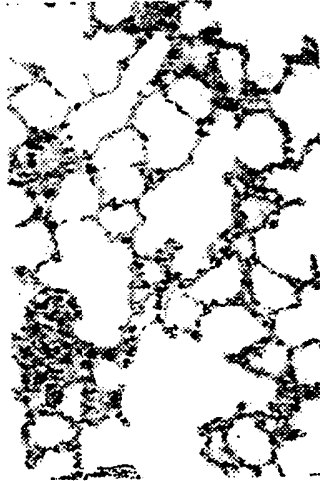
PV 2001-1272

1 / 8

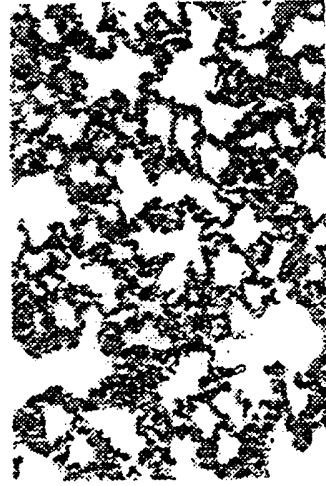


Obr. 1

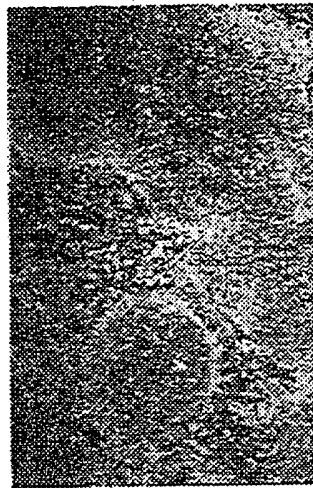
2 / 2



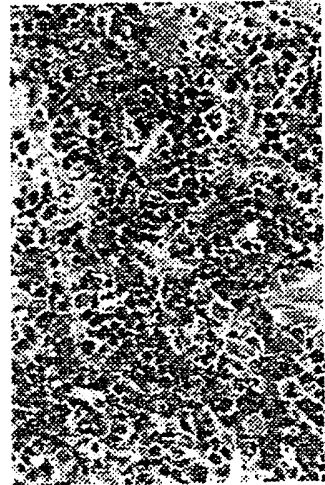
Obr. 2A



Obr. 2B

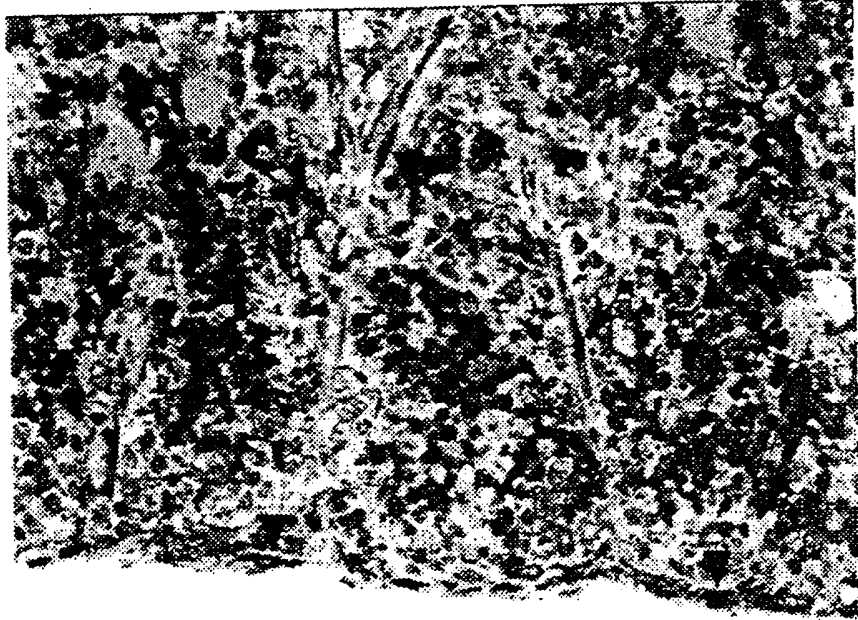


Obr. 2C

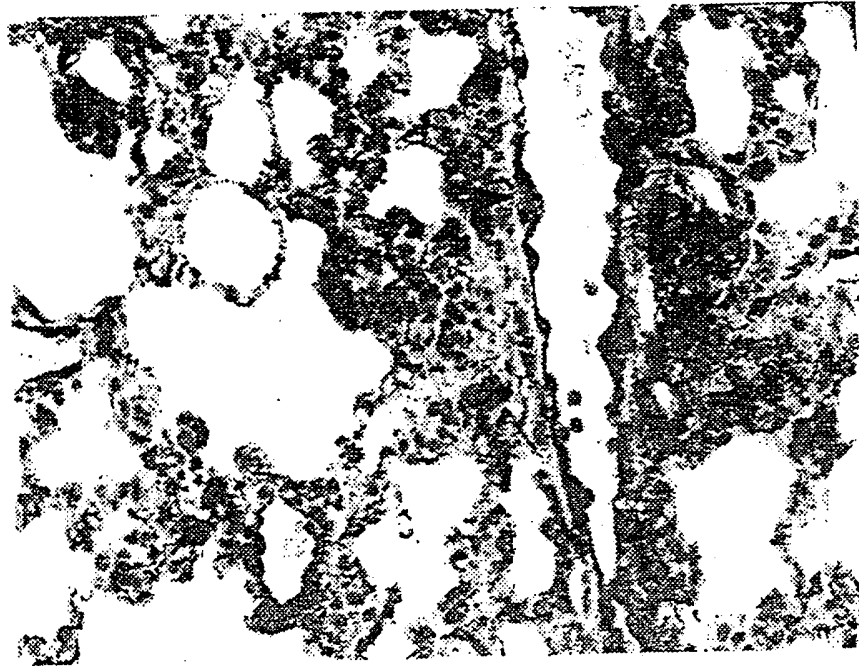


Obr. 2D

3/4



Obr. 2F

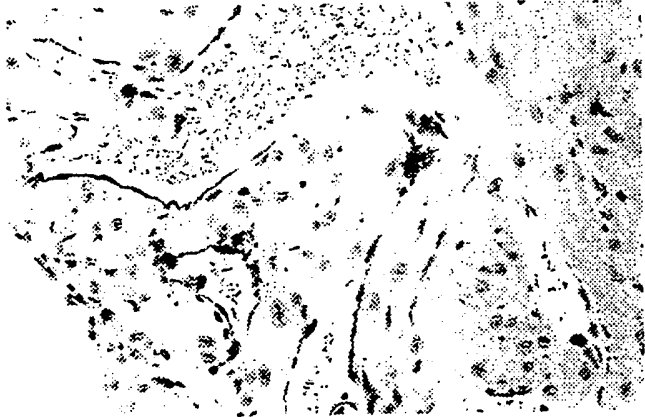


Obr. 2E

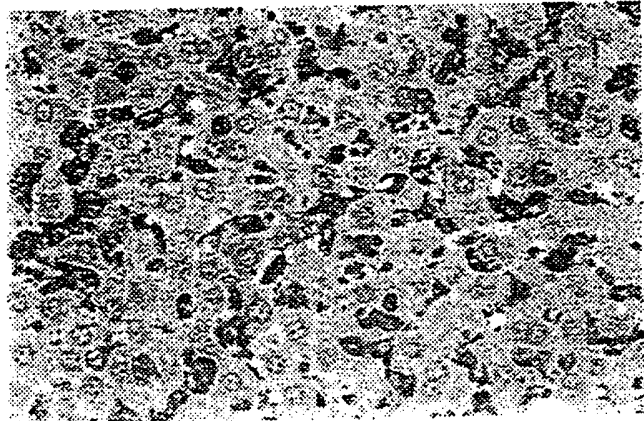
05.04.01

7V 2001-1242

4 / 7



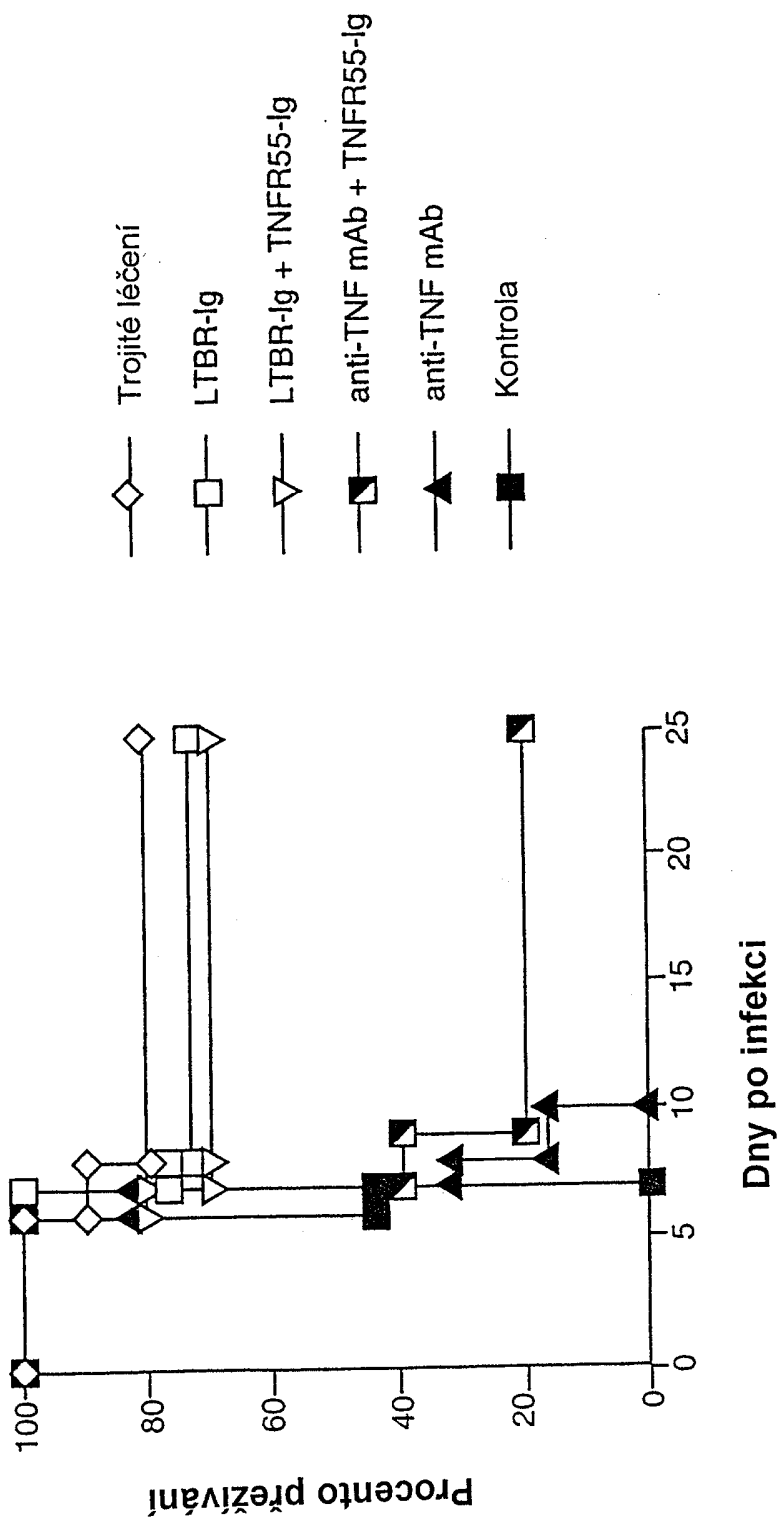
Obr. 2G

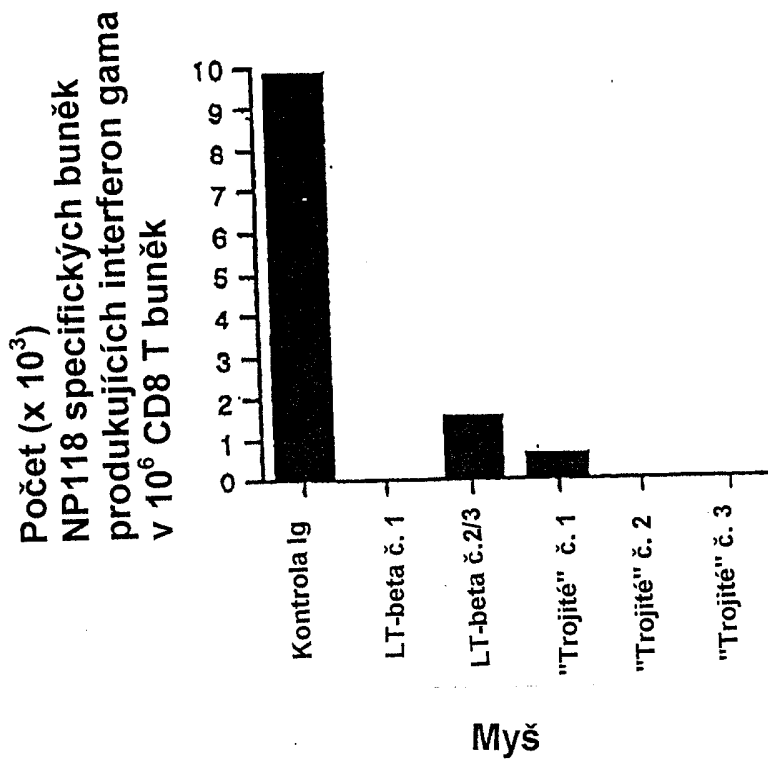
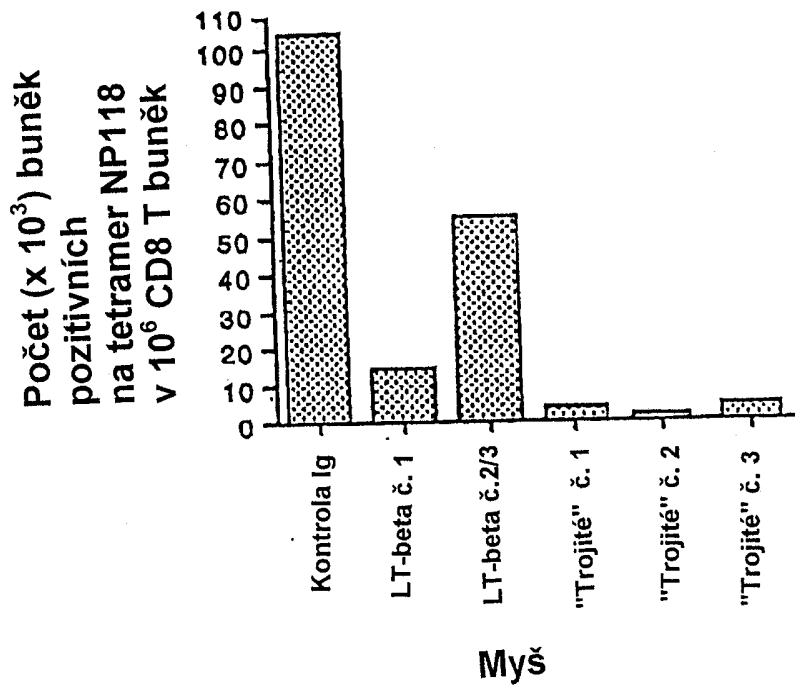


Obr. 2H

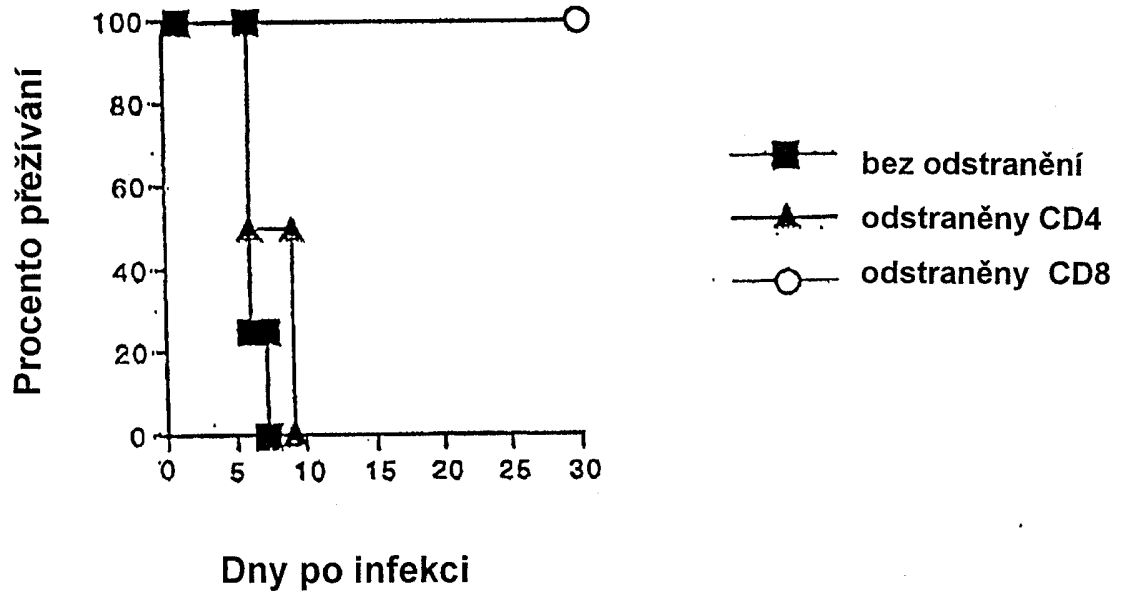
5 / 4

Obr. 3





Obr. 4



Obr. 5