



(19) **UA** (11) **77 382** (13) **C2**
 (51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
 УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
 ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2000116864, 30.04.1999

(24) Дата начала действия патента: 15.12.2006

(30) Приоритет: 01.05.1998 US 09/071,699

(46) Дата публикации: 15.12.2006C12N 15/09
 20060101CFI20061025RMUA A61K
 38/00 20060101CLI20061025RMUA
 A61K 39/00
 20060101CLN20061025RMUA A61K
 39/002 20060101CLI20061025RMUA
 A61K 39/02
 20060101CLI20061025RMUA A61K
 39/118 20060101CLI20061025RMUA
 A61K 39/12
 20060101CLI20061025RMUA A61K
 39/21 20060101CLI20061025RMUA
 A61K 39/39
 20060101CLI20061025RMUA A61P
 31/04 20060101ALI20051220RMUA
 A61P 31/14
 20060101ALI20051220RMUA A61P
 33/00 20060101CLI20061025RMUA
 A61P 43/00
 20060101CLI20061025RMUA C07K
 14/705 20060101ALI20051008RMUA
 C12N 1/19
 20060101CLI20061025RMUA C12N
 1/21 20060101CLI20061025RMUA
 C12N 5/10
 20060101CLI20061025RMUA C12N
 15/12 20060101CLI20061025RMUA
 C12P 21/02
 20060101CLI20061025RMUA C12Q
 1/68 20060101CLI20061025RMUA

(72) Изобретатель:

Коллисон Эллен В., US,
 Чой Ин-Соо, KR,
 Уинслоу Барбара Дж., US,
 Кокран Марк Д., US

(73) Патентовладелец:

ДЗЕ ТЕКСАС ЭЙ ЭНД ЭМ ЮНИВЕРСИТИ
 СИСТЕМ, US,
 ШЕРИНГ-ПЛАУ ЛТД., CN

(86) Заявка PCT:

PCT/US99/09502, 19990430

(54) ВЫДЕЛЕННАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ ЛИГАНД CD86 КОШКИ, ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД, КЛОНИРУЮЩИЙ ВЕКТОР, ВАКЦИНА ДЛЯ МОДУЛИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У КОШКИ И СПОСОБЫ ИНДУКЦИИ ИЛИ УГНЕТЕНИЯ ИММУНИТЕТА У КОШКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует лиганд CD86 кошки, растворимый лиганд кошки или их фрагменты, которые имеют иммунорегуляторную активность. Изобретение также относится к диагностическому олигонуклеотиду, вектору, который содержит данную нуклеиновую кислоту,

вакцины для модуляции иммунного ответа у кошки, которая содержит эффективное количество полипептида, кодированного данной нуклеиновой кислотой, способу индукции иммунитета у кошки и способа усиления иммунного ответа у кошки, который предусматривает введение кошке такой вакцины, а также способа притеснения иммунного

U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2

ответа у кошки, которая предусматривает введение кошке эффективно подавляющего иммунный ответ количества растворимого полипептида, который кодируется данной нуклеиновой кислотой. Также представлены вакцины, которые дополнительно содержат иммуногены, производные от патогенов.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2006, N 12, 15.12.2006. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

UA 77382 C2

UA 77382 C2



(19) **UA** (11) **77 382** (13) **C2**
 (51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
 UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
 PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2000116864, 30.04.1999

(24) Effective date for property rights: 15.12.2006

(30) Priority: 01.05.1998 US 09/071,699

(46) Publication date: 15.12.2006C12N 15/09
 20060101CFI20061025RMUA A61K
 38/00 20060101CLI20061025RMUA
 A61K 39/00
 20060101CLN20061025RMUA A61K
 39/002 20060101CLI20061025RMUA
 A61K 39/02
 20060101CLI20061025RMUA A61K
 39/118 20060101CLI20061025RMUA
 A61K 39/12
 20060101CLI20061025RMUA A61K
 39/21 20060101CLI20061025RMUA
 A61K 39/39
 20060101CLI20061025RMUA A61P
 31/04 20060101ALI20051220RMUA
 A61P 31/14
 20060101ALI20051220RMUA A61P
 33/00 20060101CLI20061025RMUA
 A61P 43/00
 20060101CLI20061025RMUA C07K
 14/705 20060101ALI20051008RMUA
 C12N 1/19
 20060101CLI20061025RMUA C12N
 1/21 20060101CLI20061025RMUA
 C12N 5/10
 20060101CLI20061025RMUA C12N
 15/12 20060101CLI20061025RMUA
 C12P 21/02
 20060101CLI20061025RMUA C12Q
 1/68 20060101CLI20061025RMUA

(72) Inventor:
 Kollison Hellen V., US,
 Choi Insou, KR,
 Winslow Barbara J., US,
 Kokran Marc D., US

(73) Proprietor:
 THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM, US,
 SCHERING-PLOUGH LTD., CH

(86) PCT application:
 PCT/US99/09502, 19990430

(54) ISOLATED nucleic acid, which codes ligand CD86 of cat, diagnostic oligonucleotide, cloning vector, vaccine for modulation of immune response by cat and methods for induction or INHIBITION of immunity by cat

(57) Abstract:

The invention relates to isolated nucleic acid, which codes ligand CD86 of cat, soluble ligand of cat or fragments thereof, which have immune regulatory activity. The invention relates also to diagnostic oligo nucleototide, vector, which contains this nucleic acid, vaccines for modulation of immune response by cat, which contains an efficient amount of polypeptide coded

by said nucleic acid, to a method for induction of cat's immunity and a method for enhancement of immune response by cat, which provides incorporation of such vaccine to cat, and also a method for inhibition of immune response by cat, which provides incorporation to cat of efficiently inhibiting immune response amount of soluble polypeptide, being coded by said nucleic

U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2

acid. Also presented are vaccines, which contain in addition immunogenes, derivatives of pathogens.

Official bulletin "Industrial property". Book

1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2006, N 12, 15.12.2006. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



(19) **UA** (11) **77 382** (13) **C2**
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2000116864, 30.04.1999

(24) Дата набуття чинності: 15.12.2006

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 01.05.1998 US 09/071,699

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (декларційного патенту): 15.12.2006C12N 15/09
20060101CFI20061025RMUA A61K 38/00 20060101CLI20061025RMUA A61K 39/00
20060101CLN20061025RMUA A61K 39/002 20060101CLI20061025RMUA A61K 39/02
20060101CLI20061025RMUA A61K 39/118 20060101CLI20061025RMUA A61K 39/12
20060101CLI20061025RMUA A61K 39/21 20060101CLI20061025RMUA A61K 39/39
20060101CLI20061025RMUA A61P 31/04 20060101ALI20051220RMUA A61P 31/14
20060101ALI20051220RMUA A61P 33/00 20060101CLI20061025RMUA A61P 43/00
20060101CLI20061025RMUA C07K 14/705 20060101ALI20051008RMUA C12N 1/19
20060101CLI20061025RMUA C12N 1/21 20060101CLI20061025RMUA C12N 5/10
20060101CLI20061025RMUA C12N 15/12 20060101CLI20061025RMUA C12P 21/02
20060101CLI20061025RMUA C12Q 1/68 20060101CLI20061025RMUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
PCT/US99/09502, 19990430

(72) Винахідник(и):
Коллісон Еллен В. , US,
Чой Ін-Соо , KR,
Уінслоу Барбара Дж., US,
Кокран Марк Д., US

(73) Власник(и):
ДЗЕ ТЕКСАС ЕЙ ЕНД ЕМ ЮНІВЕРСИТИ СИСТЕМ,
US,
ШЕРІНГ-ПЛАУ ЛТД., CN

(54) ВИДІЛЕНА НУКЛЕЇНОВА КИСЛОТА, ЩО КОДУЄ ЛІГАНД CD86 КІШКИ, ДІАГНОСТИЧНИЙ ОЛІГОНУКЛЕОТИД , КЛОНУЮЧИЙ ВЕКТОР, ВАКЦИНА ДЛЯ МОДУЛЮВАННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У КІШКИ ТА СПОСОБИ ІНДУКЦІЇ АБО ПРИГНІЧЕННЯ ІМУНІТЕТУ У КІШКИ

(57) Реферат:

Винахід належить до виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує ліганд CD86 кішки, розчинний ліганд кішки або їх фрагменти, які мають імунорегуляторну активність. Винахід також

належить до діагностичного олігонуклеотиду, вектора, що містить дану нуклеїнову кислоту, вакцини для модулювання імунної відповіді у кішки, що містить ефективну кількість

поліпептиду, кодованого даною нуклеїною кислотою, способу індукції імунітету у кішки та способу посилення імунної відповіді у кішки, що передбачає введення кішці такої вакцини, а також способу пригнічення імунної відповіді у кішки, що передбачає введення кішці ефективно

пригнічуючої імунну відповідь кількості розчинного поліпептиду, що кодується даною нуклеїною кислотою. Також представлено вакцини, що додатково містять імуногени, похідні від патогенів.

UA 77382 C2

UA 77382 C2

Опис винаходу

5 Дана заявка має пріоритет [за патентною заявкою США N8 09/071699, поданою 1 травня 1998р.], повний зміст якої включений в дану заявку як посилання. У тексті даної заявки посилання на інші публікації приведені в дужках. Повну бібліографію для цих посилань можна знайти в кінці тексту безпосередньо перед списком послідовностей. Вміст цих публікацій в повному об'ємі включений в дану заявку як посилання з метою більш повного опису стану проблеми в тій області техніки, якої стосується даний винахід.

10 Нині відсутні ефективні вакцини для профілактики імунодефіциту сімейства котячих і інфекційного перитоніту котячих у домашніх кішок. Зараз доступні вакцини проти вірусу лейкозу котячих, однак їх ефективність залишається сумнівною, а в ряді випадків вони можуть спричиняти захворювання. Отже, в даній області техніки є потреба в агентах і композиціях, які б захищали від цих і інших захворювань, проти яких поки що немає вакцин або вже існуючі і вакцини, що звичайно застосовуються проти цих захворювань, потрібно поліпшити. Крім того, утруднена вакцинація кошенят через неможливість протистояти материнським антитілам у них. Значить, також є необхідність в безпечних і ефективних агентах для подолання таких бар'єрів.

15 Стимуляція в організмі активації і проліферації Т-лімфоцитів у відповідь на захворювання, як вважається, визначається двома взаємодіями: розпізнаванням Т-клітинного рецептора (TCR) імуногенними пептидами з участю молекул класу I головного комплексу гістосумісності (MHC) і повторна взаємодія допоміжних лігандів, таких як CD80 і CD86, з відповідними їм рецепторами - CD28 і (або) CTLA-4 - на поверхні Т-лімфоциту. 20 Ефективна взаємодія цих двох механізмів зумовлює активацію і проліферацію і CD4-позитивних, і CD8-позитивних Т-клітин і збільшення вироблення імунорегуляторних цитокінів типів Th1 і Th2. У відсутність адекватної стимуляції Т-клітин може розвиватися анергічний стан, при якому Т-клітини не здатні проліферувати і виділяти цитокіни. Протягом багатьох років ключовими регулювальниками Т-клітинних відповідей вважалися дві молекули - рецептор CD28 і його ліганди CD80 і CD86. CD28 є первинним Т-клітинним 25 стимуляторним рецептором, який за зв'язуванням з CD80 і CD86 посилює проліферацію Т-клітин і синтез цитокінів, запобігаючи загибелі Т-клітин. CTLA-4 (що також позначається як CD152), що є гомологом CD28, також стимуляторні Т-клітинні відповіді. Взаємодія між CD28, CTLA-4 і їх лігандами CD80 і CD86 в процесі 30 стимуляції є ключем до індукції і супресії імунних відповідей на захворювання в організмі загалом. Шляхом маніпулювання цими чотирма стимуляторними молекулами, мабуть, можна регулювати. Т-клітинну відповідь за шляхом активації, пригнічення або зміни. надяму, можна посилювати бажану імунну відповідь за відношенням до конкретного патогену або захворювання. Зокрема, вони можуть бути використані для вакцинації проти інфекційних захворювань, для лікування інфекційних захворювань і лікування пухлинних дегенеративних, аутоімунних і імунодефіцитних станів.

35 Т-лімфоцити імунної системи ссавців виконують і регуляторні, і ефекторні функції. Попередники Т-клітин виникають в кістковому мозку з стовбурових клітин і мігрують в тимус. У тимусі відбуваються процеси дозрівання і селекції з утворенням популяції наївних імунокомпетентних клітин, які здатні розпізнавати антиген при його презентації в поєднанні з головним комплексом гістосумісності (MHC), але при цьому не є аутореактивними. Після дозрівання в тимусі кожна Т-клітина несе клональний Т-клітинний рецептор (TCR), який 40 визначає її антигенну специфічність. Крім того, Т-клітини двох основних підкласів, що виявляються у більшості дорослих ссавців - CD4⁺ і CD8⁺, - несуть TCR, складений α - і В-субодиницями (Allison & Lanier, 1987).

45 Поліпептидна і генна організація білка TCR схожа з такою, характерною для молекул імуноглобуліну (Ig), і вона виявляє характеристики, які схожі в порівнянні з мембранозв'язаними Ig В-лімфоцитів (Allison & Lanier, 1987). Як і молекула Ig, TCR потенційно повинен розпізнавати безліч можливих антигенних послідовностей. З цієї точки зору організація і реаранжування гену TCR схожа за своєю складністю з такими в В-клітинах (Davis & Bjorkman, 1988). Як і у випадку з імуноглобулінами В-клітин, утворення ідіотипічного різноманіття Т-клітин пов'язане з наявністю множинних копій генів варіабельних доменів (V) в лінії статевих клітин, що відбуваються випадковим чином реаранжуваннями α - і В-субодиниць і з мінливістю, що зумовлюється явищами з'єднань і вставок (Davis & Bjorkman, 1988). Однак, на відміну від В-клітин, утворення різноманіття Т-клітин, мабуть, не пов'язане з соматичними мутаціями, хоч потенційний репертуар молекул TCR не поступається такому молекул Ig (Lechler et al., 1990).

50 Молекула TCR, хоч і відповідає за розпізнавання антигену, не здібна до передавання сигналу (Allison & Lanier, 1987). Конформаційні зміни TCR після зв'язування з участю антигену MHC, що знаходиться на антиген-презентуючих клітинах (APC), зумовлює передавання сигналу через нековалентний комплекс поверхневих молекул, включаючи CD3 і Z-субодиниці (Clevers et al., 1988). Зв'язування на TCR зумовлює фосфорилування CD3-комплексу, що непрямим чином приводить до внесення в клітину іонів кальцію, внаслідок чого відбувається ініціація вироблення IL-2 і IL-2R (Weiss & Littman, 1994). Цей каскад розглядається як 55 початкова подія в активації Т-клітин.

60 TCR розпізнає антиген тільки тоді, коли він презентований з участю MHC. Відомі два класи MHC-білків, які пов'язані з процесом презентування антигену на Т-клітині. Молекули класу I MHC виявляються практично на всіх ядерних клітинах тіла, і їх функцією є перенесення ендогенних, пептидів на поверхню клітин (Matsumura et al., 1992). Пептид, експресований з участю MHC класу I, розпізнається Т-клітинами, експресуючими CD 8 в скріпленні з TCR (Littman, 1987). CD8-позитивні Т-клітини виконують функцію імунного нагляду за знищенням 65 клітин, заражених вірусом, і пухлинних клітин. Розпізнавання Т-клітиною CD8⁺ "чужих" молекул (пептидів або змінених своїх пептидів, що може свідчити про розвиток пухлини) зумовлює руйнування цієї клітини, здійснюване

з участю цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL) (Berke, 1994).

Молекули класу II МНС, що представляють другу групу чинників головного комплексу гістосумісності, в нормі виявляються тільки у спеціалізованих антиген-презентуючих клітинах, включаючи В-лімфоцити, макрофаги/моноцити і дендритні клітини, хоча можлива їх індукція і в деяких інших типах клітин у відповідь на специфічні стимули (Germain, 1993). Молекула класу II МНС відповідає за презентування зовнішнього антигену на CD4-позитивну Т-клітину. Антиген, який був фагоцитований, ендодитований або пов'язаний поверхневим Ig з подальшим поглинанням клітиною, зазнає ендогенної обробки і зв'язується з молекулою класу II МНС (Ulanue, 1987). Потім така молекула виходить на поверхню клітини і стає доступною для розпізнавання її CD4-позитивними Т-клітинами α B-TCR (Littman, 1987). Розпізнавання антигену Т-клітинами CD4⁺ зумовлює вироблення цитокінів і чинників росту, необхідних для ініціації і поширення різних елементів активної імунної відповіді (Mosmann & Coffman, 1987).

Диференціювання груп Т-клітин α B-TCR визначається наявністю CD4 і CD8, що пов'язано з детермінацією функцій кожної з цих груп. Одночасна присутність CD4 і CD8 на Т-клітині виключена (Littman, 1987). Тобто в процесі селекції і дозрівання в тимусі Т-клітини- α B отримують тільки CD4 або CD8. Ці молекули забезпечують стабільність взаємодії між TCR і МНС-пов'язаним антигеном і визначають для даної Т-клітини те, яким класом молекул МНС (I або II) презентується антиген (Littman, 1987). Скріплюючий домен молекули CD4 або CD8 розпізнає відповідну неполіморфну ділянку молекули класу I або класу II (Clayberger et al., 1994). Скріплення CD4 або CD8 з цими специфічними ділянками забезпечує стабільність взаємодії TCR і МНС-зв'язаного антигену з точки зору ініціації Т-клітинної активації (Littman, 1987). Таким чином, CD4-позитивні Т-клітини функціонально взаємодіють тільки з клітинами APC, презентуючими антиген за допомогою молекул класу II і ініціюючим тим самим Т-хелперу відповідь, в той час як CD8-позитивні Т-клітини розпізнають тільки антиген, що презентується з участю молекул класу I, після зв'язування якого ініціюється цитотоксична відповідь (Germain, 1993). Два фенотипи- Т-хелпери і CTL, що розрізняються - можуть бути ідентифіковані за поверхово-клітинною експресією або CD4, або CD8.

Більшість CD4-позитивних Т-лімфоцитів загалом розглядаються як Т-хелперна популяція, хоч є і передбачуваний CD4-позитивний CTL-підтип (Yasukawa et al., 1989). CD4-позитивні Т-хелпери є основними регуляторними імунної відповіді за рахунок вироблення серії стимуляторних і супресорних цитокінів (Mosmann & Coffman, 1987). Чинники, що виробляються цими клітинами є важливими медіаторами ініціації і гуморального, тобто опосередкованого антитілами, і клітинного, тобто гіперчттевості сповільненого типу (DTH), відповідей (Mosmann & Coffman, 1987). Для того, щоб Т-клітини CD4⁺ активувалися за виробленням розчинних чинників росту, повинен відбуватися складний каскад процесів. Антиген виявляється і зазнає ендодитозу специфічними APC-клітинами, які в нормі є макрофагами (Ulanue, 1984). APC денатурують антигенний білок і розділяють його на менші фрагменти, після чого 15-18-амінокислотні пептиди зв'язуються молекулами МНС в ендоплазматчному ретикулюмі і після цього переносяться на поверхню клітини (Rotzschke et al., 1994). Перенесений на поверхню антиген стає в результаті "видимим" для Т-клітин і може бути розпізнаний групами Т-клітин, експресуючих CD4 і, які мають відповідний TCR-ідіотип (Germain, 1993). Коли відбувається точне розпізнавання антигену Т-клітиною і утворюються точні допоміжні сигнали, відбувається диференціювання "наївного" лімфоциту і запускається його клональна проліферація. За, поки що не встановленими причинами, відбувається переважне формування відповіді 1-го типу (клітинного) за відношенням до відповіді 2-го типу (гуморального) (Mosmann & Coffman, 1989).

Участь Т-хелперів є необхідними для забезпечення активності і гуморальної, і клітинної відповідей. У залежній від Т-клітин В-клітинної відповіді, необхідної для вироблення антитіл до більшості антигенів, Т-хелпери потрібні для забезпечення правильного дозрівання В-клітин (Chesnut et al., 1986). Після того, як експресований В-клітиною поверхневий Ig зв'язав антиген, відбувається інтерналізація, процесинг і вивід антигену на поверхню молекулами класу II МНС (Germain, 1993). Безпосередній міжклітинний контакт між Т-клітиною CD4⁺, що має точний TCR-ідіотип, і В-клітиною сприяє активації і проліферації цієї Т-клітини (Chesnut et al., 1986). Активованій Т-хелпер може ініціювати відповідь 2-го типу за рахунок секреції чинників, необхідних для росту і диференціювання В-клітин (Mosmann & Coffman, 1989). Цими чинниками є інтерлейкіни IL-4, IL-5 і IL-13, які здатні індукувати активацію і проліферацію В-клітин, а також важливі в процесі ізотипічного перемикавання молекул антитіл, в той час як IL-10 запобігає ініціації відповіді 1-го типу, що, в свою чергу, є чинником негативної регуляції гуморальної відповіді (Mosmann & Coffman, 1989).

Клітинні відповіді (1-й тип) індукуються не так, як гуморальні відповіді (2-й тип) (Sher et al., 1992). Після активації Т-клітин і їх дозрівання для відповіді 1-го типу цією Т-клітиною виробляються чинники, які сприяють клітинному імунітету. IL-2 є Т-клітинним чинником росту, який також активує CTL-відповіді, в той час як γ -інтерферон активує макрофаги, CTL і нейтрофіли (Wang et al., 1993).

Таким чином, Т-хелпери здатні опосередковувати дві принципово взаємовиключаючі відповіді. Ознака секреції цитокінів, пов'язана з ініціацією гуморальної відповіді, включає чинники, які є супресорами клітинної відповіді, і навпаки (Mosmann & Coffman, 1989). Поки не зрозуміло, що примушує Т-клітину виявляти або ознаку 1-го типу (вироблення IL-2, γ -інтерферону і лімфотоксину), або ознаку 2-го типу (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 і IL-13), хоча передбачається, що на варіант цитокінового профілю, що формується можуть впливати тип APC, яка презентує даний антиген, або розчинні чинники, що виробляються цією APC (Mosmann & Coffman, 1989). У доповнення до хелперних клітин 1-го і 2-го типів існує так званий 0-й тип хелперів, який характеризується параметрами цитокінової секреції, проміжними за відношенням до 1-го і 2-го типів (Gajewski et al., 1989). Хоча типи хелперів в основному були охарактеризовані в експериментах *in vitro*, тобто можуть

відображати культуральні артефакти, вони є важливими моделями тієї ролі, яку Т-хелпер відображає в контролі розвитку специфічних відповідей в ситуації *in vivo*.

У доповнення до CD4-позитивних Т-хелперних лімфоцитів друга популяція Т-клітин- $\alpha\beta$ складена CD8-позитивними цитотоксичними лімфоцитами (CTL). Вважається, що CTL-CD8⁺ відіграють ведучу роль в системі імунного нагляду, основна функція якої пов'язана з руйнуванням клітин, інфікованих вірусами або внутрішньоклітинними бактеріями, а також пухлинних клітин (Berke, 1994). Ці клітини також способи виробляти цитокіни, але, загалом, тільки такі, які пов'язані з індукцією клітинних відповідей (IL-2, γ -інтерферон і TNF) (Fong & Mosmann, 1990). Рецептор TCR цих клітин з участю CD8 розпізнає антиген, презентований за допомогою молекул класу I MHC (Littman, 1987). Загалом, всі ядерні клітини характеризуються поверхневою експресією молекул класу I, що презентують внутрішньоклітинно синтезовані пептиди (Matsumura, 1992). Специфічні за імунною активністю ділянки, включаючи головний мозок і сім'яники, характеризуються низьким рівнем білкового синтезу, хоч він і індукується в цих ділянках під впливом інтерферону (Moffett & Paden, 1994).

Білки, що виробляються в ендоплазматичному ретикулумі в ході нормальної життєдіяльності клітини, денатуруються, частково розщеплюються і за допомогою молекул класу I MHC виносяться на поверхню (Engelhard, 1994). Ці поліпептиди протеолітично лінеаризуються і зв'язуються у вигляді 9-12-амінокислотних епітопів молекулами класу I, які потім виносяться на поверхню цієї клітини (Engelhard, 1994). Теоретично таким чином на поверхні можуть виявитися будь-які внутрішньоклітинно синтезовані білки, тому внаслідок селекції в тимусі зумовлюється ідеальна елімінація всіх аутореактивних Т-клітин, а система імунного нагляду може виявити присутність інфікованих вірусом або трансформованих клітин (Berke, 1993). Розпізнавання чужорідних пептидів, експресованих молекулами класу I, здійснюється антиген-специфічними Т-клітинними рецепторами на поверхні CTL-CD8⁺ (Lechler et al., 1990). Для активації необхідний контакт між ефекторною клітиною і мішенню (Berke, 1994). Коли антиген, що розглядається як чужорідний, детектується рецептором TCR, взаємодія молекул стабілізується за рахунок зв'язування CD8 з молекулою класу I на поверхні інфікованої клітини (Littman, 1987). Після розпізнавання і активації Т-клітини утворюється "кон'югат" між клітиною-мішенню і ефекторною Т-клітиною, після чого ефекторна клітина знищується (Taylor & Cohen, 1992). Таким чином, в такому механізмі при зміні власних білків або при порушенні клітинних механізмів внаслідок атаки патогену пептиди стають розпізнаваними системою імунного нагляду, внаслідок чого даний елемент імунної системи забезпечить знищення хворої клітини (Berke, 1994).

Цитотоксичність, як вважається, зумовлюється одним з двох основних механізмів. Або в клітині індукується апоптоз, або вона лізується з участю цитотоксичних гранул, що секретуються CTL (Berke, 1993). Апоптоз в клітинах-мішенях індукується шляхом секреції клітинами CTL чинників, які індукують експресію генів, що зумовлюють загибель клітини (Russel, 1983). Перевагою цього механізму є відсутність лізису клітини, що знижує імовірність виходу потенційно інфекційно небезпечного вмісту цієї клітини (Nagata & Golstein, 1995). Однак, клітинний лізис може бути найбільш загальним механізмом, відповідно до якого відбувається направлене знищення клітин. Основним компонентом "цитотоксичних гранул", що виробляються клітинами CTL є білок перфорин, який "протикає" мембрани клітин-мішеней (Liu et al., 1995). Хоч існують і інші типи клітин, залучених до даної форми імунного нагляду, вважається, що CTL є основним компонентом противірусного і протипухлинного імунітету і розглядаються як необхідна ланка в захисті від конкретних патогенів (Kupfer & Singer, 1989).

Початково поверхово-клітинні білки використовувалися для розмежування конкретних клітинних популяцій. Пізніше були встановлені функціональні аспекти багатьох з цих молекул, а з урахуванням їх значення для диференціювання клітинних популяцій стала більш зрозумілою їх важлива роль в функціонуванні багатьох клітин.

Різні допоміжні молекули і молекули адгезії, які беруть участь в розвитку імунної відповіді, експресуються Т-клітинами і антиген-презентуючими клітинами (van Seventer et al., 1991). Молекули адгезії експресуються на певному рівні більшістю клітин імунної системи. Вони важливі для збереження клітин в певній ділянці і для ініціації і підтримки міжклітинних контактів (Mescher, 1992).

Два комплекси молекул адгезії - CD2/LFA-3 (CD58) і LFA-1/ICAM-1 - беруть участь в стабілізації взаємодії Т-клітин і клітин APC і посиленні активності (Springer et al., 1987). CD2 є одним з перших маркерів, експресованих попередниками Т-лімфоцитів, і існує протягом всього життя цієї клітини, в той час як LFA-1 експресується Т-клітинами пізніше і позитивно регулюється в клітинах пам'яті або за типом індукцибельності (Springer et al., 1987).

Комплекси допоміжних молекул також виявляють адгезійні властивості, але їх основною функцією, мабуть, є передавання міжклітинного сигналу після зв'язування ліганду (Anderson et al., 1988). Після встановлення взаємодії між рецептором і його лігандом відбувається така зміна конформаційної структури молекули, яка зумовлює передавання сигналу в цитоплазму однієї або обох клітин (Hutchcroft & Bierer, 1994). Сигнали, що передаються цими молекулами виконують ряд функцій для сприяння розвитку Т-клітин, однак у відсутність сигналів, опосередкованими цими молекулами, Т-клітини можуть ставати анергічними (Leung & Lindsley, 1994).

Взаємодія CD28/CD80 є основним компонентом інтенсивної імунної відповіді, опосередкованого Т-клітинами (Linsley et al., 1993a). Взаємодія допоміжних молекул CD28 з відповідним лігандом CD80 необхідна для повної активації і проліферації "наївних" Т-клітин (Linsley et al., 1991a). Також ця взаємодія, як вважається, відображає ключову роль в проліферації активованих CD4-позитивних Т-клітин пам'яті і в запобіганні апоптотичної загибелі клітин (Linsley et al., 1991a). Встановлення такої взаємодії і розшифрування його механізмів дає ключ до розуміння процесів імунітету, опосередкованого Т-клітинами.

Даний винахід стосується виділеної і очищеної ДНК, що кодує ліганд CD80 (B7-1) кішки, ліганд CD86 (B7-2)

кішки, рецептор CD28 кішки або рецептор CTLA-4 (CD152) кішки, а також векторів, що включають нуклеїнову кислоту, що кодує CD80 кішки, CD86 кішки, CD28 кішки або CTLA-4 кішки. Даний винахід стосується клітин-господарів, трансформованих CD80-кодуючими векторами, CD86-кодуючими векторами, CD28-кодуючими векторами або CTLA-4-кодуючими векторами. Даний винахід стосується поліпептидів, що кодуються нуклеїновою кислотою CD80 кішки, CD86 кішки, CD28 кішки або CTLA-4 кішки.

Даний винахід стосується вакцини, що містить ефективну кількість поліпептидів, що кодуються нуклеїновою кислотою CD80 кішки, CD86 кішки, CD28 кішки або CTLA-4 кішки. Також даний винахід стосується вакцин, які додатково містять імуногени, похідні від патогенів. Даний винахід стосується вакцин, здатних посилювати імунну відповідь. Також даний винахід стосується вакцин, здатних пригнічувати імунну відповідь.

Фіг.1А. Нуклеотидна і амінокислотна послідовності CD80 (B7-1) кішки (TAMU) (SEQ ID NO: 1 і 2).

Фіг.1В. Спектр гідрофобності амінокислотної послідовності CD80 (B7-1) кішки (TAMU).

Фіг.2А. Нуклеотидна і амінокислотна послідовності CD80 (B7-1) кішки (SYNTRO) (SEQ ID NO: 3 і 4).

Фіг.2В. Спектр гідрофобності амінокислотної послідовності CD80 (B7-1) кішки (SYNTRO).

Фіг.3А. Нуклеотидна і амінокислотна послідовності CD86 (B7-2) кішки (SEQ ID NO: 5 і 6).

Фіг.3В. Спектр гідрофобності амінокислотної послідовності CD86 (B7-2) кішки.

Фіг.4А. Нуклеотидна і амінокислотна послідовності CD28 кішки (SEQ ID NO: 7 і 8).

Фіг.4В. Спектр гідрофобності амінокислотної послідовності CD28 кішки.

Фіг.5А. Нуклеотидна і амінокислотна послідовності CTLA-4 (CD 152) кішки (SEQ ID NO: 9 і 10).

Фіг.5В. Спектр гідрофобності амінокислотної послідовності CTLA-4 (CD 152) кішки.

Даний винахід представляє виділену нуклеїнову кислоту, що кодує ліганд CD80 кішки або розчинний ліганд CD80 кішки. Також даний винахід представляє виділену нуклеїнову кислоту, що кодує ліганд CD86 кішки або розчинний ліганд CD86 кішки. Також даний винахід представляє виділену нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор CD28 кішки або розчинний рецептор CD28 кішки. Також даний винахід представляє виділену нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор CTLA-4 кішки або розчинний рецептор CTLA-4 кішки.

У одному з здійснень даний винахід представляє нуклеїнову кислоту, що кодує ліганд CD80 кішки, який характеризується амінокислотною послідовністю, показаною на Фіг.1А, починаючи із залишку метіоніну і закінчуючи залишком треоніну (SEQ ID NO: 1). У іншому здійсненні даний винахід представляє нуклеїнову кислоту, що кодує ліганд CD86 кішки, який характеризується амінокислотною послідовністю, показаною на фіг. 3А, починаючи із залишку метіоніну і закінчуючи залишком глутаміну (SEQ ID NO: 5). Ще в одному здійсненні даний винахід представляє нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор CD28 кішки, який характеризується амінокислотною послідовністю, показаною на Фіг.4А, починаючи із залишку метіоніну і закінчуючи залишком серину (SEQ ID NO: 7). У іншому здійсненні даний винахід представляє нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор CTLA-4 кішки, який характеризується амінокислотною послідовністю, показаною на Фіг.5А, починаючи із залишку метіоніну і закінчуючи залишком аспарагіну (SEQ ID NO: 9).

У здійсненні винаходу, що описується вище нуклеїновою кислотою є ДНК або РНК. У іншому здійсненні ДНК є кДНК або геномною ДНК.

Даний винахід представляє олігонуклеотид, що складається принаймні з 12 нуклеотидів, що характеризується комплементарністю за відношенням до унікальної послідовності, що є в складі нуклеїнової кислоти, що кодує CD28, CD80, CD86 або CTLA-4, описаної вище. У іншому здійсненні даного винаходу представляється олігонуклеотид, що складається принаймні з 15 або 16 нуклеотидів, який характеризується комплементарністю за відношенням до унікальної послідовності, присутньої в складі нуклеїнової кислоти, що кодує CD28, CD80, CD86 або CTLA-4, описаної вище.

У іншому здійсненні винаходу, що описується вище представляється олігонуклеотид, який помічений міткою, що визначається. У одному із здійснень міткою, що виявляється є радіоактивний ізотоп, флуорофор або біотин. У іншому здійсненні такий олігонуклеотид виборче метилований.

Даний винахід представляє вектор, що включає нуклеїнову кислоту, що кодує ліганд CD80 кішки або розчинний ліганд CD80 кішки. У іншому здійсненні даного винаходу представляється плазмідний вектор, позначений PSI-B7-1/871-35 [Колекція ATCC, депозитарний N8 209817]. Ця плазміда була депонована [в Американську колекцію типових культур (ATCC) 29 квітня 1998 року (адреса якої - 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20108-0971, США)] відповідно за Будапештською угодою про Міжнародні правила депонування мікроорганізмів для цілей здійснення процедури патентування.

Даний винахід представляє вектор, що включає нуклеїнову кислоту, що кодує ліганд CD86 кішки або розчинний ліганд CD86 кішки. У іншому здійсненні даного винаходу представляється плазмідний вектор, позначений B7-2# 19-2/011298 [ATCC, депозитарний №209821]. Ця плазміда була депонована [в Американську колекцію типових культур (ATCC) 29 квітня 1998 року (адреса якої -10801 University Boulevard, Manassas, VA 20108-0971, США)] відповідно за Будапештською угодою про Міжнародні правила депонування мікроорганізмів для цілей здійснення процедури патентування.

Даний винахід представляє вектор, що включає нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор CD28 кішки або розчинний рецептор CD28 кішки. У іншому здійсненні даного винаходу представляється плазмідний вектор, позначений PSI-CD28-#7/1 00296 [ATCC, депозитарний №209819]. Ця плазміда була [депонована в Американську колекцію типових культур (ATCC) 29 квітня 1998 року (адреса якої - 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20108-0971, США)] відповідно за Будапештською угодою про Міжнародні правила депонування мікроорганізмів для цілей здійснення процедури патентування.

Даний винахід представляє вектор, що включає нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор CTLA-4 кішки або розчинний рецептор CTLA-4 кішки. У іншому здійсненні даного винаходу представляється плазмідний вектор,

позначений СТЛА-4-# 1/091997 [АТСС, депозитарний №209820]. Ця плазмідна була депонована [в Американську колекцію типових культур (АТСС) 29 квітня 1998 року (адреса якої -10801 University Boulevard, Manassas, VA 20108-0971, США)] у відповідності за Будапештською угодою про Міжнародні правила депонування мікроорганізмів для цілей здійснення процедури патентування.

Даний винахід представляє описаний вище вектор, який додатково включає промотор, функціонально приєднаний до нуклеїнової кислоти. У іншому здійсненні даний винахід представляє клітину-господаря, яка несе будь-який із згаданих вище векторів. У одному із здійсненні такою клітиною-господарем, несучою один із згаданих вище векторів, є еукаріотична або прокаріотична клітина. У іншому здійсненні клітиною-господарем є клітини *E.coli*, клітини дріжджів, клітини *COS*, клітини *PC12*, клітини *CHO* або клітини *GH4C1*.

Даний винахід представляє поліпептид, що кодується нуклеїновою кислотою ліганду *CD80* кішки або розчинним ліганду *CD80* кішки. У здійсненні даного винаходу представляється поліпептид, що кодується нуклеїновою кислотою ліганду *CD86* кішки або розчинним лігандом *CD86* кішки. У іншому здійсненні даного винаходу представляється поліпептид, що кодується нуклеїновою кислотою рецептора *CD28* кішки або розчинного рецептора *CD28* кішки. Даний винахід представляє поліпептид, що кодується нуклеїновою кислотою рецептора *-CTLA-4* кішки або розчинного рецептора *CTLA-4* кішки.

У іншому здійсненні даного винаходу представляється спосіб продукції згаданих вище поліпептидів шляхом культивування клітини-господаря, яка експресує ці поліпептиди, і виділення цих поліпептидів, що отримуються таким чином.

Даний винахід представляє вакцину, що містить ефективну кількість згаданих вище поліпептидів і відповідного носія. У іншому здійсненні винаходу представляється вакцина, в складі якої ефективна кількість згаданого вище поліпептиду і відповідного носія є кількістю від приблизно 0,01мг до приблизно 100мг на 1 дозу. У іншому здійсненні винаходу представляється вакцина, в якій ефективна кількість згаданого вище поліпептиду і відповідного носія є кількістю від приблизно 0,25мг на 1кг ваги тіла кішки на день до приблизно 25мг на 1кг ваги тіла кішки на день.

Далі даний винахід представляє згадану вище вакцину, яка додатково містить імуноген, похідний від патогену. У іншому здійсненні винаходу такий імуноген в складі вакцини походить від котячого патогену, вірусу сказу, хламідії, *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, бліх або бактерійних патогенів. У іншому здійсненні винаходу представляється вакцина, в складі якої патогеном є вірус імунодефіциту котятчих (*FIV*), вірус лейкозу котятчих (*FeLV*), вірус інфекційного перитоніту котятчих (*FIP*), вірус панлейкопенії котятчих, каліцивірус котятчих, реовірус котятчих 3-го типу, ротавірус котятчих, коронавірус котятчих, респіраторно-носинциціальний вірус котятчих, вірус саркоми котятчих, герпесвірус котятчих, вірус хвороби Борна кішок або котятчий паразит.

Також даний винахід представляє спосіб індукції імунітету у кішок, який включає введення кішці дози вакцини, що містить будь-який з імуногенів, що вказувалися вище. Також даний винахід представляє спосіб посилення імунної відповіді у кішки, який включає ефективну дозу поліпептиду, імуногену і відповідного носія. Даний винахід представляє спосіб введення згаданої вище вакцини підшкірно, внутрішньом'язово, системно, місцево або перорально.

У іншому здійсненні даного винаходу представляється спосіб пригнічення імунної відповіді у кішки, який включає введення цій кішці ефективної за пригніченням імунної відповіді кількості поліпептиду, що кодується нуклеїновою кислотою *CTLA-4* кішки. У іншому здійсненні винаходу представляється спосіб пригнічення імунної відповіді у кішки, що включає введення цій кішці ефективної за пригніченням імунної відповіді кількості розчинного поліпептиду, що кодується *CD80* кішки, *CD86* кішки або *CD28* кішки.

У іншому здійсненні даного винаходу представляється спосіб пригнічення імунної відповіді у кішки шляхом введення поліпептиду, що кодується нуклеїновою кислотою *CTLA-4* кішки, в кількості від приблизно 0,25мг на 1кг ваги тіла на день до 25мг на 1кг ваги тіла на день. У іншому здійсненні винаходу представляється спосіб пригнічення імунної відповіді у кішки шляхом введення поліпептиду, що кодується *CD80* кішки, *CD86* кішки або *GD28* кішки, в кількості від приблизно 0,25мг на 1кг ваги тіла на день до 25мг на 1кг ваги тіла на день.

Також даний винахід представляє спосіб пригнічення імунної відповіді у кішки з діагнозом аутоімунного захворювання або у кішки-реципієнта пересадки тканини або органу шляхом введення цій кішці ефективної за пригніченням імунної відповіді кількості поліпептиду, що кодується нуклеїновою кислотою *CTLA-4* кішки.

Даний винахід також представляє спосіб пригнічення імунної відповіді у кішки з діагнозом аутоімунного захворювання або у кішки-реципієнта пересадки тканини або органу шляхом введення цій кішці ефективної за пригніченням імунної відповіді кількості поліпептиду, що кодується *CD80* кішки, *CD86* кішки або *CD28* кішки.

Даний винахід представляє виділену і очищену кДНК *CD80* (*B7-1*) довжиною приблизно 941 нуклеотидів. Винахід також представляє виділений і очищений поліпептид *CD80* кішки, що складається приблизно з 292 амінокислот, що є зв'язаною з мембранною або зрілою формою з молекулярною масою 33,485кДа, ізоелектричною точкою приблизно $pI=9,1$ і загальним зарядом при $pH=7,0$ рівним 10. Коекспресія *CD80* з коstimуляторною молекулою *CD28* і з пухлинним антигеном або антигеном патогенного організму виявляє здібність до активації або посилення активації Т-лімфоцитів, індукуючи тим самим вироблення імуностимулюючих цитокінів, і до регуляції росту інших клітинних типів. Коекспресія *CD80* з коstimуляторною молекулою *CTLA-4* виявляє здібність до регуляції активації Т-лімфоцитів.

Даний винахід представляє виділену і очищену кДНК *CD86* (*B7-2*) довжиною приблизно 1176 нуклеотидів. Також винахід представляє виділений і очищений поліпептид *CD86* кішки, що складається приблизно з 320 амінокислот, що є зв'язаною з мембранною або зрілою формою з молекулярною масою 36,394кДа, ізоелектричною точкою приблизно $pI=9,19$ і загальним зарядом при $pH=7,0$ рівну 11,27. Коекспресія *CD86* з коstimуляторною молекулою *CD28* і з пухлинним антигеном або антигеном патогенного організму виявляє

здібність до активації або посилення активації Т-лімфоцитів, індукуючи тим самим вироблення імуностимулюючих цитокинів, і до регуляції росту інших клітинних типів. Коекспресія CD86 з костимуляторною молекулою СТЛА-4 виявляє здібність до регуляції активації Т-лімфоцитів.

5 CD80 або CD86 кішки за даним винаходом були отримані з нативних або рекомбінантних джерел. CD80 або CD86 кішки за даним винаходом включають нативну і зв'язану з мембраною форму або форму, що секретується, яка втратила трансмембранний домен.

Даний винахід представляє виділену і очищену кДНК CD28 довжиною приблизно 689 нуклеотидів. Також винахід, представляє виділений і очищений поліпептид CD28 кішки, що складається приблизно з 221 амінокислот, що є зв'язаним з мембранною або зрілою формою з молекулярною масою 25,319кДа, ізоелектричною точкою приблизно $pI=9,17$ і сумарним зарядом при $pH=7,0$ рівним 9,58.

10 Також даний винахід представляє виділену і очищену кДНК СТЛА-4 довжиною приблизно 749 нуклеотидів. Також винахід представляє виділений і очищений поліпептид СТЛА-4 кішки, що складається приблизно з 223 амінокислот, що є зв'язаним з мембранною або зрілою формою з молекулярною масою 24,381кДа, ізоелектричною точкою приблизно $pI=6,34$ і сумарним зарядом при $pH=7,0$ рівним -0,99.

15 У іншому аспекті даний винахід представляє спосіб посилення імунної відповіді у кішки на імуноген, що досягається введенням цього імуногену до, після або по суті одночасно з CD80 кішки або CD86 кішки разом з CD28 кішки або СТЛА-4 кішки або без них в кількості, ефективній при підсиленні імунної відповіді.

20 У іншому аспекті даного винаходу представляється спосіб пригнічення імунної відповіді у кішки на імуноген, що досягається введенням цього імуногену до, після або по суті одночасно з CD80 кішки або CD86 кішки разом з CD28 кішки або СТЛА-4 кішки або без них або з антисмисловою РНК або ДНК, частково або повністю кодуєчих CD80 кішки або CD86 кішки, або CD28 кішки, або СТЛА-4 кішки, в кількості, ефективній при пригніченні імунної відповіді.

25 У наступному аспекті даного винаходу представляється вакцина для індукції імунної відповіді у кішок на імуноген, що містить цей імуноген і кількість CD80, ефективна при посиленні імунної відповіді. Імуноген є похідним, наприклад, від котячих патогенів, таких як вірус імунодефіциту кішки, вірус лейкозу кішки, парвовірус кішки, коронавірус кішки, лептовірус кішки і подібне.

30 У іншому аспекті даного винаходу представляється вакцина для індукції імунної відповіді у кішки на імуноген, що досягається введенням ДНК або РНК імуногену і ДНК або РНК допоміжних молекул CD80, CD86, CD28 кішки в будь-якому поєднанні, які кодуєть білки або білкові фрагменти, в кількості, ефективній при модуляції імунної відповіді.

35 Білок CD80 кішки характеризується амінокислотною послідовністю, яка на 59% і 46% ідентична поліпептидам людини і миші, відповідно. Білок CD86 кішки характеризується амінокислотною послідовністю, яка на 68% і 64% ідентична таким білкам людини і кролика, відповідно. Білок CD28 кішки характеризується амінокислотною послідовністю, яка на 82% і 74% ідентична поліпептидам людини і миші, відповідно. Білок СТЛА-4 кішки характеризується амінокислотною послідовністю, яка на 88% і 78% ідентична поліпептидам людини і миші, відповідно. Білки CD80 або CD86 миші або людини не можуть функціонально замінити котячі білки CD80 або CD86. Отже, білки CD80 кішки, CD86 кішки, CD28 кішки і СТЛА-4 кішки є новими реагентами, необхідними для контролю імунітету у кішок.

40 Даний винахід охоплює Т-клітинні регуляторні допоміжні молекули - CD80 (B7-1) або CD86 (B7-2), або CD28, або СТЛА-4 (CD152) домашніх кішок. Даний винахід представляє виділені і очищені нуклеїнові кислоти, що кодуєть частково або повністю CD80 кішки, CD86 кішки, CD28 кішки і СТЛА-4 кішки, рівно як і поліпептиди CD80, CD86, CD28 або СТЛА-4, очищені або з нативних, або з рекомбінантних джерел. Вироблені відповідно за даним винаходом CD80, CD86, CD28 або СТЛА-4 кішки використовують для підвищення ефективності котячих вакцин проти пухлин і патогенних організмів, а також як лікарський засіб для лікування вірусних і бактерійних хвороб домашніх кішок. Вироблені відповідно за даним винаходом CD80, CD86, CD28 або СТЛА-4 кішки також використовують для ослаблення захворювання за рахунок надактивних, гіперактивних або перенаправлених імунних відповідей.

Нуклеїнові кислоти, вектори, трансформанти

50 Послідовності кДНК, що кодуєть CD80 кішки (SEQ ID NO: 1), CD86 кішки (SEQ ID NO: 5), CD28 кішки (SEQ ID NO: 7) або СТЛА-4 кішки (SEQ ID NO: 9) показані на Фіг.1-5, а розшифровані амінокислотні послідовності CD80 кішки (SEQ ID NO: 2), CD86 кішки (SEQ ID NO: 6), CD28 кішки (SEQ ID NO: 8) або СТЛА-4 кішки (SEQ ID NO: 10) показані на Фіг.1-5. Ідентифікація цих котячих поліпептидів таких як CD80, CD86, CD28 або СТЛА-4 засновується на певному рівні гомології амінокислотних послідовностей і гомологічних поліпептидів людини або миші, або кролика, і на здатності поліпептидів CD80 або CD86 зв'язуватися з рецептором CD28 кішки (див. нижче) або з СТЛА-4 і активувати або стимулювати, або будь-яким іншим чином регулювати активацію Т-лімфоцитів. Більш того не обмежуючись будь-якою теорією, передбачається, що поліпептиди CD80 кішки або CD86 кішки також виявляють одну або більше з наступної біологічної активності: активація клітин NK (нативні клітини-кілери), стимуляція дозрівання В-клітин, активація обмежених за МНС цитотоксичних Т-лімфоцитів, проліферація огрядних клітин, взаємодія з рецепторами цитокинів і індукція імунорегулюючих цитокинів.

60 Через виродженість генетичний код (тобто наявності більше за один кодон, що кодує деякі амінокислоти) послідовності ДНК, що не співпадають з показаними на Фіг.1-5, також можуть кодувати амінокислотні послідовності CD80, CD86, CD28 або СТЛА-4 кішки, показані на Фіг.1-5. Такі "інші ДНК" включають ті послідовності, які включають "структурно консервативні" зміни, при яких зміна одного або більшого числа нуклеотидів в складі даного кодону не приводить до зміни амінокислоти, що кодується цим кодоном. Більш того даний амінокислотний залишок в поліпептиді часто може бути змінений без зміни загальної конформації і

функції нативного поліпептиду. Такі "функціонально консервативні" варіанти включають, тим самим не обмежуючись, заміну амінокислоти на амінокислоту, що характеризується схожими фізико-хімічними параметрами, такими як, наприклад, кислі, основні, гідрофобні, гідрофільні, ароматичні і подібні властивості (наприклад, заміна лізину на аргінін, аспарагінової кислоти на глютамінову кислоту або гліцину на аланін). Крім того, амінокислотні послідовності додаються або віддаляються без порушення біологічної активності даної молекули. Наприклад, додаткові амінокислотні послідовності додають або з N-, або з C-кінця, які служать мітками для очищення даного білка, такими як полігістидинові мітки (тобто для забезпечення одноетапного очищення даного білка, після чого їх видаляють хімічним або каталітичним шляхом). З іншого боку, додаткові послідовності надають додатковий сайт поверхневого зв'язування або будь-яким іншим шляхом змінюють специфічність CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки відносно клітин-мішеней, наприклад, шляхом додання антиген-зв'язуючого сайту для антитіл.

кДНК CD80 кішки або CD86 кішки, або CD28 кішки, або CTLA-4 кішки, що попадають в об'єм даного винаходу, відповідають послідовностям, показаним на фіг. 1-5, структурно-консервативним варіантам ДНК, послідовностям ДНК, що кодують функціонально-консервативні варіанти поліпептидів, і їх комбінацій. Даний винахід охоплює фрагменти CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки, які виявляють ефективну міру біологічної активності як окремо, так і в поєднанні з іншими послідовностями або компонентами. Як буде пояснено далі, в компетенції фахівця в даній області техніки передбачити результати маніпуляцій послідовностями CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 і встановити, або буде даний варіант CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки виявляти відповідну стабільність і біологічну активність відносно даного застосування, або визначити параметри, які порушують активність за зв'язуванням цих молекул, що обумовить підвищення ефективності. Кожний з CD80 і CD86 кішки зв'язується з корецептором CD28 або корецептором CTLA-4. Цього можна досягти шляхом експресії і очищення варіантних поліпептидів CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 в рекомбінантної системи і оцінки їх Т-стимуляторної активності і (або) активності за активацією росту в клітинних культурах і у тварин з подальшим тестуванням на можливе застосування. Варіант CD80 тестують за його біологічною активністю за функціональним зв'язуванням з рецепторами CD28 або CTLA-4. Варіант CD86 тестують за його біологічною активністю за функціональним зв'язуванням з рецепторами CD28 або CTLA-4. Схожим чином варіант CD28 або варіант CTLA-4 тестують за їх біологічною активністю.

Також даний винахід охоплює ДНК CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки (і поліпептиди), похідні від інших видів котячих, включаючи, але тим самим не обмежуючись, домашніх кішок, левів, тигрів, гепардів, рисей і т.д. Гомологи CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки за відношенням до показаного на Фіг.1-5 можуть бути легко ідентифіковані шляхом скринінгу бібліотек кДНК або геномних клонотек з метою ідентифікації клонів, які гібридизуються із зондами, що включають повністю або частково послідовність, показану на Фіг.1-5. З іншого боку, експресійні бібліотеки піддають скринінгу з використанням антитіл, які розпізнають CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки. Поза зв'язком з будь-якою теорією можна вважати, що гени CD80 або CD86 кішки інших видів котячих будуть принаймні на 70% гомологічні генам CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки. Також в об'єм даного винаходу попадають ДНК, які кодують гомологи CD80, CD86, CD28 або CTLA-4, що визначаються як поліпептиди, що кодуються ДНК, які характеризуються принаймні приблизно 25%-вим рівнем ідентичності з амінокислотними послідовностями CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки.

Загалом, в маніпуляціях нуклеїновими кислотами відповідно даному винаходу використовуються методи, які добре відомі в науці, такі як ті, які описані, [наприклад, в Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed.. Cold Spring Harbor або "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel, Brent, Kingston, More, Feidman, Smith & Stuhl, Greene Publ. Assoc, Wiley-Interscience, NY, 1992].

Даний винахід охоплює послідовності кДНК і РНК в смислового і антисмислового порядках. Також винахід охоплює послідовності геномної ДНК CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки і фланкуючі послідовності, включаючи, але тим самим не обмежуючись, регуляторні послідовності. Нуклеїнові послідовності, що кодують поліпептиди CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки, також зв'язують з гетерологічними послідовностями, включаючи промотори, енхансери, регуляторні елементи, сигнальні послідовності, сигнали поліаденілування, інтрони, 5'- і 3'-некодуючі сегменти і подібне. Транскрипційними регуляторними елементами, які функціонально пов'язані з послідовностями кДНК CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки, є без будь-яких обмежень послідовності, здатні контролювати експресію генів, похідні від прокариотичних клітин, еукариотичних клітин, вірусів прокариот, вірусів еукариот і будь-яких їх комбінацій. Також в даній області техніки відомі і інші гетерологічні регуляторні послідовності.

Нуклеїнові кислоти за даним винаходом модифікують із застосуванням методів, відомих в даній області техніки, з метою зміни їх стабільності, розчинності, афінності зв'язування і специфічності. Наприклад, послідовності метилують селективним чином. Також нуклеотидні послідовності за даним винаходом модифікують міткою, здатною забезпечувати ефективний прямий або непрямий сигнал. Прикладами міток є радіоактивні ізотопи, флуоресцентні молекули, біотин і подібне.

Також даний винахід представляє вектори, які включають нуклеїнові кислоти, що кодують поліпептиди CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 частково або повністю. Такими векторами є, наприклад, плазмі дні вектори, призначені для експресії в різних прокариотичних і еукариотичних організмах-господарях. Переважно вектори також включають промотор, функціонально приєднаний до ділянок, що кодують CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки. Котячі CD80, що кодуються, CD86, CD28 або CTLA-4 експресуються з використанням будь-яких відповідних векторів і клітин-господарів відповідно до описаного в даному тексті і у відповідності з відомим фахівцям в даній області техніки.

Відповідними векторами для використання в практиці даного винаходу є, тим самим не обмежуючись,

УЕр352, pcDNA1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pRc/CMV (Invitrogen) і pSFVI (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Одним з переважних за використанням в даному винаході вектором є pSFVI. Відповідними клітинами-господарями є клітини E.coli, клітини дріжджів, клітини COS, клітини PC12, клітини CHO, клітини GH4C1, клітини BHK-21 і клітини меланофорів амфібій. Клітини BHK-21 є переважними клітинами-господарями з точки зору використання в практиці даного винаходу. Відповідними векторами для конструювання "голої" ДНК або для "генетичної вакцинації", є, тим самим не обмежуючись, pTarget (Promega, Madison, WI), pSI (Promega, Madison, WI) і pcDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Нуклеїнові кислоти, що кодують поліпептиди CD80, CDS6, CD2S або CTLA-4 кішки, також вносять в клітини за допомогою рекомбінантних прийомів. Наприклад, таку послідовність вносять в клітину з допомогою мікроін'єкції, забезпечуючи гомологічну рекомбінацію за сайтом локалізації ендогенного гену, що кодує такий поліпептид, його аналог або псевдоген, або послідовності, що характеризується істотним рівнем гомології з геном, що кодує CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки. Також можуть бути використані інші рекомбінантні методи, такі як забезпечення негомологічної рекомбінації і делегування ендогенного гену шляхом гомологічної рекомбінації, особливо в геномі плюрипотентної клітини.

Даний винахід представляє спосіб посилення у кішки імунної відповіді на імуноген, що досягається введенням імуногену до, після або по суті одночасно з CD80 або CD86 кішки поряд з CD28 кішки або CTLA-4 кішки або без них в кількості, ефективній при підсиленні імунної відповіді.

Даний винахід представляє спосіб посилення у кішки імунної відповіді на імуноген, що досягається введенням експресуючого вектора, який включає похідний від котячого патогену імуноген, до, після або по суті одночасно з CD80 або CD86 кішки поряд з CD28 кішки або CTLA-4 кішки або без них, в кількості, ефективній при підсиленні імунної відповіді.

Даний винахід представляє спосіб перенаправлення у кішки імунної відповіді на імуноген, що досягається введенням експресуючого вектора, який включає похідний від котячого патогену імуноген, до, після або по суті одночасно з CD80 або CD86 кішки поряд з CD28 кішки або CTLA-4 кішки або без них, в кількості, ефективній при підсиленні імунної відповіді.

Даний винахід представляє спосіб пригнічення у кішки імунної відповіді на імуноген, що досягається введенням експресуючого вектора, який включає похідний від котячого патогену імуноген, до, після або по суті одночасно з CD80 або CD86 кішки поряд з CD28 кішки або CTLA-4 кішки або з антисмисловий РНК або ДНК, що кодує CD80 кішки, CD86 кішки, CD28 кішки або CTLA-4 кішки, в кількості, ефективній при пригніченні імунної відповіді.

Даний винахід представляє вакцину для індукції у кішки імунної відповіді на імуноген(и), що містить імуноген і ефективну кількість CD80 кішки або CD86 кішки разом з CD28 кішки або CTLA-4 кішки або без них, для посилення імунної відповіді або CD80 кішки або CD86 кішки разом з CTLA-4 кішки для пригнічення імунної відповіді. У іншому здійсненні за даним винаходом представляється вакцина, що містить експресуючий вектор, що включає гени, що кодують імуноген(и) котячих патогенів, і гени CD80, CD86 разом з CD28 кішки або CTLA-4 кішки або без них, для посилення або пригнічення імунної відповіді.

Поліпептиди CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки

Ген CD80 кішки (кДНК і відповідна їй амінокислотна послідовність показані на Фіг.1 і 2) кодує поліпептид, що складається приблизно з 292 амінокислот. Ген CD86 кішки (кДНК і відповідна їй амінокислотна послідовність показані на Фіг.3) кодує поліпептид, що складається приблизно з 320 амінокислот. Ген CD28 кішки (кДНК і відповідна їй амінокислотна послідовність показані на Фіг.4) кодує поліпептид, що складається приблизно з 221 амінокислот. Ген CTLA-4 кішки (кДНК і відповідна їй амінокислотна послідовність показані на Фіг.5) кодує поліпептид, що складається приблизно з 223 амінокислот.

Очищення CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки з натуральних або рекомбінантних джерел проводять із застосуванням методів, добре відомих в даній області техніки, включаючи, але тим самим не обмежуючись, іонообмінну хроматографію, обернено-фазну хроматографію на колонках C4, гель-фільтрацію, ізоелектричне фокусування, афінну хроматографію і подібне. У переважному здійсненні велика кількість біологічно активного білка CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки отримують шляхом конструювання рекомбінантної послідовності ДНК, що включає кодує ділянку CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки, яка в загальній кодуєчій рамці об'єднана з послідовністю, що кодує 6 С-кінцевих залишків гістидину в репліконі pSFVI (Gibco BRL). мРНК, що кодується цією плазмідною синтезують із застосуванням методів, добре відомих фахівцям в даній області техніки, і вносять в клітини лінії BHK-21 методом електропорації. Клітини виробляють і секретують процесійовані глікозилізовані поліпептиди CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки, що включають С-кінцевий гексагістидин. Модифіковані котячі поліпептиди CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 очищають з клітинного супернатанту методом афінної хроматографії з використанням гістидин-зв'язуючої смоли (His-bind: Novagen, Madison, WI).

Поліпептиди CD80 кішки або CD86 кішки, виділені з будь-яких джерел, модифікують із застосуванням методів, відомих в даних області техніки. Наприклад, котячі CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 фосфорилують або дефосфорилують, глікозилують або деглікозилують і подібне. Найбільш застосовними модифікаціями є ті, які змінюють розчинність, стабільність, а також специфічність і афінність зв'язування у CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки.

Химерні молекули CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки

Даний винахід охоплює отримання химерних молекул, що утворюються фрагментами котячих CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 в будь-якому поєднанні. Наприклад, внесення сайту зв'язування CTLA-4 замість сайту зв'язування CD28 повинне підвищити афінність зв'язування CD28 із збереженням посиленої імунної відповіді.

У одному здійсненні сайти зв'язування CD80 або CD86 на молекулах CTLA-4 і CD28 замінюються таким

чином, що сайт зв'язування на CD28 замінюється на сайт зв'язування CTLA-4. Вплив химерної молекули CD28, що включає сайт зв'язування CTLA-4, пов'язаний з підвищенням афінності CD28 у відношенні CD80 або CD86 і підвищенням міри посилення імунної відповіді. У альтернативному здійсненні химерні молекули CD80 і CD28 або CD86 і CD28 або їх фрагменти є зв'язаними з мембранами формами і поліпшують властивості цих молекул при підсиленні імунної відповіді. У іншому здійсненні химерні молекули CD80 і CTLA-4 або CD86 і CTLA-4 або їх фрагменти є зв'язаними з мембранами формами, які є молекулами, більш ефективними при пригніченні імунної відповіді. У іншому здійсненні химерні молекули CD80 і CTLA-4 або CD86 і CTLA-4 або їх фрагменти є зв'язаними з мембранами формами, які перенаправляють імунну відповідь з досягненням бажаного ефекту.

Антитіла, специфічні у відношенні CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки

Даний винахід охоплює антитіла, специфічні у відношенні поліпептидів CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки, ідентифікованих відповідно до описаного вище. Антитілами є поліклональні або моноклональні антитіла, що розділяють CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки і інші білки, що ідентифікують їх функціональні домени і подібне. Такі антитіла отримують стандартними способами за допомогою методів і композицій, [описаних у Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab.], а також з використанням імунологічних і гібридомних методів, відомих в даній області техніки. У разі використання нативних або синтетичних пептидів, похідних від CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки, для індукції у кішки CD80-, CD86-, CD28- або CTLA-4-специфічної імунної відповіді ці пептиди стандартним чином з'єднують з відповідним носієм, таким як гемоціанін слизня (KLH), і вводять з відповідним ад'ювантом, таким як ад'юванти Фройнда.

Переважно відібрані пептиди з'єднують з носієм, маючим "лізинову серцевину", по суті відповідну методам Tan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5409-5413. Такі антитіла, особливо так звані антиідіотипічні антитіла "внутрішньої відповідності", також приготують з використанням відомих методів.

У одному із здійсненні очищені котячі CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 використовують для імунізації мишей, після чого у них видаляють селезінку і спленоцити використовують для отримання клітинних гібридів з мієломними клітинами з метою отримання клонів секретуючих антитіло клітин у відповідності зі стандартними методами даної області техніки. Отримані в результаті моноклональні антитіла, що секретуються такими клітинами, піддають скринінгу в тестах *in vitro* на наступну активність: зв'язування з котячими білками CD80, CD86, CD28 або CTLA-4, пригнічення активності CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 за зв'язуванням рецепторів і пригнічення Т-клітинної стимуляторної активності CD80, CD86, CD28 або CTLA-4.

Антитіла до CD80 кішки, до CD86 кішки, до CD28 кішки і до CTLA-4 кішки використовують для ідентифікації і кількісного аналізу котячих CD80, CD86, CD28 або CTLA-4, застосовуючи такі імунологічні тести, як ТІФА, РІА і подібне. Антитіла до CD80 кішки, до CD86 кішки, до CD28 кішки і до CTLA-4 кішки також використовують для імунологічного виснаження екстрактів CD80 кішки, CD86 кішки, CD28 кішки або CTLA-4 кішки. Крім того, ці антитіла можуть бути використані для ідентифікації, виділення і очищення котячих CD80, CD86, CD28 або CTLA-4, що походять від різних джерел, і для досліджень за субклітинним і гістохімічним картуванням.

Застосування

Ліганд CD80 (B7-1) кішки, ліганд CD86 (B7-2) кішки, рецептор CD28 кішки або рецептор CTLA-4 (CD 152) кішки, вироблені відповідно за даним винаходом, можуть бути ефективно використані як вакцина для профілактики інфекційного захворювання або сприяння росту у гомологічних або гетерологічних видів котячих. Наприклад, коекспресія CD80 або CD86 з костимуляторними молекулами CD28 або CTLA-4 в будь-якому поєднанні з пухлинним антигеном або антигеном патогенного організму. Коекспресія CD80 або CD86 з кішки з рецептором CTLA-4 кішки забезпечує здатність пригнічувати активацію Т-лімфоцитів і пригнічувати імунну відповідь. Конкретним прикладом повинна бути коекспресія CD80 або CD86 з імуногенами, похідними від вірусів FIV, FeLV або FIP, з вірусного вектора або ДНК-експресуючого вектора, який, у разі введення у вигляді вакцини, буде активувати, посилювати або регулювати проліферацію CD4-позитивних і CD8-позитивних Т-лімфоцитів і індукувати вироблення імунорегуляторних цитокінів, таких як IL-2, IFN- γ , IL-12, TNF α , IL-6 і т.п. Іншим конкретним прикладом повинна бути експресія CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 з вірусного вектора або ДНК-експресуючого вектора, який, у разі введення у вигляді лікарського засобу, буде регулювати або перенаправляти імунну відповідь.

Посилення імунітету за рахунок взаємодії котячих CD80 або CD86 з CD28 або CTLA-4 або пригнічення імунної відповіді за рахунок взаємодії котячих CD80 або CD86 з CTLA-4 забезпечує переваги в природному процесі регуляції в більшій мірі, ніж при доданні чужорідних субстанцій, які б надавали множинні і навіть шкідливі впливи на здоров'ї загалом або протягом тривалого часу. Молекули CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 вводять нарівні з іншими рекомбінантними молекулами, такими як ті, які кодують антигени, що є бажаними з точки зору індукції імунітету. Ген CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки вбудовують до складу експресуючого вектора і інфікують ним або трансфіціюють клітину-мішень з подальшою експресією генного продукту в цій клітині-мішені так, що він прикріплюється до плазмалеми цієї клітини-мішені або антиген-презентуючої клітини або секретується у зовнішнє для цієї клітини-мішені або антиген-презентуючої клітини середовище. Експресуючий вектор, такий як плазміда, вірус Semliki Forest, поксивірус або герпесвірус, переносить ген в антиген-презентуючу клітину. Ген CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки або фрагменти цих генів в будь-якому поєднанні вбудовують в склад ДНК- або РНК-експресуючого вектора і ін'єкують кішці з експресією даного генного продукту у кішки у вигляді "голої" ДНК/РНК або генетичної вакцини. Коекспресія імуногену і CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 в клітині-мішені або в організмі кішки зумовлює активацію, посилену активацію або регуляцію Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів і інших клітин. З іншого боку, експресований білок може бути введений після експресії з плазміди. Котячі білки CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 в нормі функціонують, будучи прикріпленими до мембрани клітини, як допоміжні молекули клітинної мембрани, але можуть бути презентованими і в інших

формах, зокрема, у відсутності в їх складі "мембранних якорів".

У одному здійсненні CD80 кішки і CD86 кішки розчинні ("вільні" в клітинних і позаклітинних рідинах) за рахунок втрати трансмембранного домену або гідрофобної ділянки і взаємодіють з коstimуляторними молекулами CD28 або CTLA-4, що знаходяться або в зв'язаній з мембраною, або в розчинній формі. У іншому варіанті CD80 кішки і CD86 кішки знаходяться в зв'язаній з мембраною формі, а коstimуляторні молекули CD28 або CTLA-4 - в розчинній формі, тобто не мають трансмембранного домену або гідрофобної ділянки. Розчинні CD28 або CTLA-4, що переважно знаходяться в формі димерів, застосовуються для лікування кішок, зв'язаного з імуносупресією, опосередкованої Т-клітинами. Розчинні CD28 або CTLA-4 запобігають відторганню пересаженої тканини і можуть бути використані для лікування аутоімунного захворювання. Конкретні розчинні CD28 або CTLA-4 застосовуються для профілактики реакції "трансплантат проти господаря" при пересадках кісткового мозку. Розчинні CD28 або CTLA-4 запобігають зв'язуванню клітини, несучої мембранні форми котячих лігандів CD80 або CD86.

Структурно консервативні і функціонально консервативні варіанти ДНК і поліпептидів CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки або біологічно активний фрагмент або субфрагмент CTLA-4 об'єднують в загальній рамці зчитування з іншою послідовністю, такою як цитокін, інтерлейкін, інтерферон, колоніестимулюючий чинник, антиген патогенного мікроорганізму, антитіло або необхідна для очищення послідовність, така як полігістидинова мітка, або ген-репортер, такий як гени lacZ і uidA E.coli, або зелений флуоресцентний білок.

Вакцини

Даний винахід охоплює способи і композиції для підвищення ефективності імунної відповіді у домашніх кішок. У цьому здійсненні котячі CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 використовують разом з імуногеном, відносно якого бажано індукувати імунну відповідь. Наприклад, до складу вакцин для кішок, що містять імуногени таких патогенів, як вірус імунодефіциту котячих і вірус лейкозу котячих, і інші патогенів, такі як парвовірус котячих, лептовірус котячих і коронавірус котячих, бажано включити CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки з метою регуляції міри і ефективності імунної відповіді. Для цієї мети котячі CD80, CD86, CD28 або CTLA-4, очищені з нативних або рекомбінантних джерел відповідно до описаного вище, включають до складу вакцинної композиції в концентрації, що знаходиться в діапазоні від приблизно 0,01 до 100,0мг на одну вакцинацію однієї кішки.

Фахівцям в даній області техніки відомі комерційні джерела вакцин для кішок (Compendium of Veterinary Pharmaceuticals, 1997), які можуть бути використані в поєднанні з даним винаходом для отримання більш ефективної вакцини.

Вакцина для індукції і регуляції у кішки імунної відповіді на імуноген- містить імуноген і ефективну кількість CD80 кішки або CD86 кішки разом з CD28 кішки або CTLA-4 кішки або без них для посилення імунної відповіді або CD80 "кішки або CD86 разом з CTLA-4 кішки для пригнічення імунної відповіді.

Імуноген вибирають з групи, яка включає, тим самим не обмежуючись, котячі патогени, такі як вірус імунодефіциту котячих, вірус лейкозу котячих, вірус інфекційного перитоніту котячих, вірус панлейкопенії котячих (парвовірус), каліцивірус котячих, реовірус 3-го типу котячих, ротавірус котячих, коронавірус котячих (інфекційний перитоніт), вірус сказу, респіраторно-синцитіальний вірус котячих, вірус саркоми котячих, герпесвірус котячих (вірус ринотрахеїту), вірус хвороби Борна кішок, хламідії, Toxoplasmosis gondii, паразити кішок, Dirofilaria immitis, блохи, бактерійні патогени і подібне.

Регуляція росту або регуляція активації клітинного типу, такого як Т-лімфоцит, визначає те, що регуляторна відповідь або стимулює, або пригнічує ріст клітин. Регуляція імунної відповіді у кішки визначає те, що ця імунна відповідь або стимулюється, або пригнічується в зв'язку з лікуванням захворювання або впливом на інфекційний агент у кішки.

Експресія CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки окремо або в будь-якому поєднанні частин або цілого в складі експресуючого вектора, що включає ген(и) котячих імуногенів для цілей введення у вигляді генетичної вакцини або "голої ДНК-вакцини". Векторами є, тим самим не обмежуючись, pTarget (Promega, Madison, WI), pcDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) [J.J. Donnelly et al., 1997; Hassett & Whitton, 1996].

Гени або фрагменти генів CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 окремо або в поєднанні, повнорозмірні або часткові, можуть бути вбудовані або трансфіційовані в геном кішки або іншого ссавця. Така інтеграція генів або фрагментів цих генів, яка може бути досягнута з використанням ретровірусного вектора, може бути використана для цілей генотерапії.

Даний винахід представляє способи і композиції для підвищення стійкості до захворювання у домашніх кішок, для застосування в медичних і (або) комерційних цілях. У цьому здійсненні CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки, що експресуються окремо або в будь-якому поєднанні, повнорозмірні або часткові, і в поєднанні з генами, що кодують котячі імуногени, або без цього, вводять кішці з використанням відповідного способу введення. Для сприяння росту або стійкості до захворювання котячі CD80, CD86, CD28 або CTLA-4, що експресуються окремо або в будь-якому поєднанні, вводять у вигляді композиції в концентрації, що варіюється від приблизно 0,01 до 100,0мг на 1 дозу вакцини на 1 кішку, переважно в композиції в концентрації від приблизно 0,25мг/кг на день до приблизно 25мг/кг на день. Повинно бути зрозуміло, що потрібна кількість CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки може бути визначена за допомогою рутинних тестів, добре відомих в даній області техніки, так, щоб встановити схему дозування і частоти їх введення і порівняти групи експериментальних одиниць або суб'єктів за кожною точкою такої схеми.

Відповідно до даного винаходу нативні або рекомбінантні котячі CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 приготують з фізіологічно прийнятним носієм, таким як, наприклад, фосфатно-сольовий буфер або деіонізована вода. Дана композиція також може містити наповнювачі, включаючи мастячі компоненти,

пластифікатори, підсилювачі поглинання, бактерициди і подібне, що добре відомо в даній області техніки. Поліпептиди CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 кішки за даним винаходом вводять будь-яким ефективним шляхом, включаючи, тим самим не вичерпуючись, внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньом'язовий, черезм'язовий, місцевий або пероральний шлях. Для підшкірного введення, наприклад, доза включає котячий CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 в стерильному фізіологічному розчині. Для перорального або інгаляційного введення котячі CD80, CD86, CD28 або CTLA-4 упаковують на мікро- або макрорівнях, наприклад, в ліпосоми або мікросфери. Також можуть бути використані шкірні бляшки (або інші форми з повільною секрецією).

Приклад 1А

Клонування кДНК CD80 (B7-1)-TAMU, CD86 (B7-2), CD28 і CTLA-4 кішки

Послідовності котячих CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD28 і CTLA-4 клонували спочатку шляхом ампліфікування методом ОТ-ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція з ревертуванням, або із зворотною транскриптазою) ділянки між двома послідовностями, які досить консервативні для того, щоб сформувати вироджені праймери, взаємодіючі з котячою мРНК. Джерелом мРНК були моноядерні клітини периферичної крові (PBMC), простимульовані конканаваліном-А принаймні протягом 16 годин. Отриманий ПЛР-продукт секвенували. Отриману послідовність використовували для конструювання праймерів для RACE (швидка ампліфікація кДНК-кінців). 5'-Кінець ампліфікували спочатку з отриманням кДНК із зворотним праймером, комплементарним заново секвенованій консервативній ділянці. Олігонуклеотид лігували на 3'-кінець кДНК (комплемет 5'-кінцю мРНК). Ця послідовність була сайтом зв'язування для прямого прайм ера, який сумісний за ПЛР із зворотним ПЛР-праймером, відповідним іншій ділянці нової секвенованої ділянки. Виродженні праймери використали в неодноразових циклах "гніздових" реакцій для отримання 3'-кінцевої послідовності. Цей праймер для ПЛР конструювали для взаємодії з послідовністю нового секвенованого сегмента. Продукти або секвенували напряму, або клонували в клонуєчий вектор TA і секвенували з отриманої плазміді. Повнорозмірну кодуючу рамку (ORF) клонували шляхом ампліфікації по всій її довжині з використанням праймерів, сконструйованих за параметрами відомих послідовностей. ORF клонували і секвенували трічі. ORF B7-1 субклонували в плазміді рSI, що включає промотор SV40, і плазміді SFV. Плазміді рSI використали для встановлення функціональної взаємодії B7-1 з котячим CD28.

ДНК-праймери, що використовувалися для ОТ-ПЛР кДНК CD80 (B7-1) кішки, були такими:

Прямий праймер: 5'-CGCGGATCCGCACCATGGGTACCGCAGCAAAGTGGAAAAC-3' (SEQ ID NO: 11)

Зворотний праймер: 5'-CCTAGTAGAGAAGAGCTAAAGAGGC-3' (SEQ ID NO: 12) (див. вище повний перелік праймерів для кДНК CD28).

ДНК-праймери, що використовувалися для ОТ-ПЛР кДНК CD28 кішки, були такими:

Прямий праймер: 5'-CGCGGATCCACCGGTAGCACAATGATCCTCAGG-3' (SEQ ID NO: 13)

Зворотний праймер: 5'-CGCGGATCCTCTGGATAGGGGTCCATGTCAG-3' (SEQ ID NO: 14) (див. вище повний перелік праймерів для кДНК CD28).

ДНК-праймери, що використовувалися для ОТ-ПЛР кДНК CTLA-4 кішки, були такими:

1. Вироджені праймери для першого ПЛР-продукту (672 нуклеотиду):

Deg-5'-P: 5'-ATGGCTT(C)GCCTTGGATTT(C)CAGC(A)GG-3' (SEQ ID NO: 15)

Deg-3'-P: 5'-TCAATTG(A)ATG(A)GGAATAAAATAAGGCTG-3' (SEQ ID NO: 16)

2. 5'- Кінцева послідовність CTLA-4 (455 нуклеотидів): вироджені ген-специфічні (GSP) "гніздові" ген-специфічні (NGSP) праймери:

Перший раунд ПЛР:

Deg-5'-P: 5'-TGTTGGGTTTC(T)G(A)CTCTG(A)CTT(C)CCTG-3' (SEQ ID NO: 17)

3'- GSP: 5'-GCATAGTAGGGTGGTGGGTACATG-3' (SEQ ID NO: 18)

"Гніздова" ПЛР з ПЛР-продуктом, отриманим в першому раунді:

Deg-5'-P: 5'- TGTTGGGTTTC(T)G(A)CTCTG(A)CTT(C)CCTG-3' (SEQ ID NO: 19)

3'- NGSP: 5'-ACATGAGCTCCACSTTGAG-3' (SEQ ID NO: 20).

3. 3'- Кінцева послідовність CTLA-4: адапторний праймер-1 (API; Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA); "гніздовий" адапторний праймер (AP2; Clontech Lab.), ген-специфічний праймер (GSP) і "гніздовий" ген-специфічний праймер (NGSP):

3'-RACE:

API: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEQ ID NO: 21)

5'-GSP: 5'-GTGAATATGGGTCTTCAGGCAATG-3' (SEQ ID NO: 22)

3'- Гніздова RACE з продуктом 3'-RACE:

AP2: 5'- ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' (SEQ ID NO: 23)

5'- NGSP: 5'-GAAATCCGAGTGACTGTGCTGAG-3' (SEQ ID NO: 24).

4. Праймери для повнорозмірного гену CTLA-4:

Fel CTLA-4 5'-праймер: 5'-AACCTGAACACTGCTCCATAAAG-3' (SEQ ID NO: 25)

Fel CTLA-4 3'-праймер: 5'- GCCTCAGCTCTTAGAAATTGGACAG-3' (SEQ ID NO: 26).

ДНК-праймери, що використовувалися для ОТ-ПЛР кДНК CD86 (B7-2) кішки, були такими:

1. Вироджені праймери для першого ПЛР-продукту (423 нуклеотиду):

Deg-5'-P: 5'-TAGTATTTTGGCAGGACCAGG-3' (SEQ ID NO: 27)

Deg-3'-P: 5'- CTGTGACATTATCTTGAGATTTTC-3' (SEQ ID NO: 28).

2. Вироджені праймери для другого ПЛР-продукту (574 нуклеотиду):

Deg-5'-P: 5'-GA(G)CA(T)GCACT(A)ATGGGACTGAG-3' (SEQ ID NO: 29)

Deg-3'-P: 5'-CTGTGACATTATCTTGAGATTTTC-3' (SEQ ID NO: 30).

3. 5'- Кінець CD86: API, AP2 (Clontech Lab.), вироджений 3'- ген-специфічний (GSP) і 3'-"гніздовий" ген-специфічний (NGSP) праймери:

5'- RACE:

API: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEQ ID NO: 31)

3'- GSP: 5'-TGGGTAACCTTGTATAGATGAGCAGGTC-3' (SEQ ID NO:32).

"Гніздова" 5'-RACE з ПЛР-продуктом 5'-RACE:

AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' (SEQ ID NO: 33)

3'-NGSP: 5'-CACCTTCACTCAACTTCCAACCAC-3' (SEQ ID NO:34).

4. 3'-Кінцева послідовність B7-2: праймери API, AP2, 5'-GSP і 5'-NGSP:

3'-RACE:

API: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEQ ID NO: 35)

5'- GSP: 5'-GGACAAGGGCACATACACTGTTTC-3' (SEQ ID NO: 36).

"Гніздова" 3'-RACE з ПЛР-продуктом 3'-RACE:

AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' (SEQ ID NO: 37)

5'-NGSP: 5'-CAGTGCTTGCTAACTTCAGTCAACC-3' (SEQ ID NO: 38).

Повнорозмірний ген CD86:

Прямий праймер Fel-B72 (I): 5'-CGGGAATGTCACTGAGCTTATAG-3' (SEQ ID NO: 39)

Зворотний праймер Fel-B72 (1176): 57- GATCTTTTTCAGGTTAGCAGGGG-3' (SEQ ID NO: 40).

Приклад 1B

Клонування CD80 (B7-1)-Syntro/SPAN; плазмідна 917-19-8/16

Відбирали клітини котячої селезінки і культивували їх з конканаваліном-A протягом 5 годин. Після цього клітини центрифугували, промивали в ФСБ і використовували для виділення тотального пулу РНК в системі RNeasy (Qiagen). Тотальну РНК обробляли ДНКазою-1 (Boehringer Mannheim) з метою видалення ДНК, що забруднює препарат РНК. Потім з цих препаратів виділяли мРНК з використанням кульок Oligotex (Qiagen, Santa Clara, CA) і високошвидкісних колонок. З матриць мРНК синтезували ДНК-копії в присутності випадкових гексамерів, dNTP, RNAsin, зворотної транскриптази (Promega) і зворотно-транскриптазного буфера (Promega) з інкубацією протягом 30 хвилин при 42 °C. Потім для отримання дволанцюгових молекул повнорозмірного кДНК-клонів кодуєчої рамки (ORF) B7-1 кішки застосовували ПЛР зі смисловим праймером 5/97.50 (5'-ATGGGTACGACGAAAGTG-3') (SEQ ID NO: 41) і антисмисловим праймером 5/97.51 (5'-СТАТГТАГАСAGGTGAGATC-3') (SEQ ID NO: 42), dNTP, кДНК B7-1 (перший ланцюг), сульфатом магнію, полімеразою Vent (Gibco BRL) і Vent-полімеразного буфера (Gibco BRL). Умови ПЛР: 1 цикл 15 секунд при 94°C; 35 циклів - 30 секунд при 94°C, 2 хвилини при 48°C, 2 хвилини при 72°C; 1 цикл добудування при 72°C протягом 10 хвилин. ПЛР здійснювали в 1%-вій низькоплавкій агарозі і виділяли ДНК-фрагменти, відповідні очікуваному розміру ORF B7-1, очищали в гелі (набір реактивів для гелю-очищення Qiagen, Santa Clara, CA) і клонували в плазмідну рCR-BLUNT з використанням набору Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA). ДНК, екстраговану з резистентних до канаміцину бактерійних колоній, піддавали попередньому скринінгу на присутність унікального NheI-сайту (що є в складі CD80 [B7-1])-(TAMU кішки). Вставки розміром 800-900 пар нуклеотидів (п.н.), що мали NheI-сайт, секвенували методом флуоресцентного автоматичного секвенування на відповідному обладнанні фірми Perkin-Elmer-Cetus (Applied Biosystems Inc.). Плазмідний вектор і B7-1, генспецифічні праймери, похідні від раніше клонованого гену B7-1, використали для отримання послідовності рCR-Blunt: праймери - 1/97.36 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (SEQ ID NO: 43) і 1/97.37 (5'-AATACGACTCACTATAGG-3') (SEQ ID NO: 44). Специфічні для гену B7-1 праймери -12/96.22 (5'-AACACCATTTCATCATCCTTT-3') (SEQ ID NO: 45), 1/97.33 (5'-ATACAAGTGTATTTGCCATTGTC-3') (SEQ ID NO: 46), 12/96.20 (5'-AGCTCTGACCAATAACATCA-3') (SEQ ID NO: 47), 12/96.21 (5'-ATTAGAAATCCAGTTCAGTCTGCT-3') (SEQ ID NO: 48), 1/97.32 (5'-TCATGTCTGGCAAAGTACAAG-3') (SEQ ID NO: 49), 11/96.32 (5'-ATTCACTGACGTACCGA-31') (SEQ ID NO: 50) 11/96.31 (5'-AAGGCTGTGGCTCTGA-3') (SEQ ID NO: 51). Були ідентифіковані два клони, які включають повнорозмірну послідовність CD80, відповідну початковій послідовності CD80, за винятком двох точкових мутацій. Одна така мутація амінокислотну послідовність не змінювала. Інша мутація приводила до заміни лейцину на ізолейцин. Отриманий внаслідок клон CD80 кішки був позначений 917-19.8/16 (CD80-Syntro/SPAN).

Для полегшення клонування гену CD 80 (B7-1) кішки, що знаходиться за будь-яким промотором вірусу віспи (поксivirusу), включаючим EcoRI- і BamHI-сайти клонування, два нових праймери були сконструйовані таким чином, щоб внести рестрикційні EcoRI- і BamHI-сайти клонування за 5'- і 3'-кінцями кодуєчої рамки CD80, відповідно. Ці два праймери були такими: прямий праймер 1/97.43 (5'-TGCAGAATTCGGGTACGACGAAAGTGG-3') (SEQ ID NO: 52) і зворотний праймер 1/97.6 (5'-GCTAGGATCCAATCTATGTAGACAGGTGAGAT-3') (SEQ ID NO: 53). Отриманий ПЛР-фрагмент розщеплювали рестриктазами - EcoRI і BamHI і клонували до складу вектора O1L-SPV (за Ascl-сайтом в послідовності геномного HindIII-фрагмента M поксivirusу свиней - SPV) з отриманням рекомбінантного вірусу SPV. У результаті була отримана касета 930-23. A1 - вектор O1L-SPV, що включає кодуєчу рамку CD80 кішки, що знаходиться за синтетичним "пізно-раннім" промотором LP2EP2 геному SPV і що примикає до касети маркерного гену lacZ E.coli, що знаходиться під контролем синтетичного промотора пізнього гену LP2. Плазмідний вектор 930-23. A1 котрансфікували разом з SPV-001 з отриманням рекомбінантного вірусу SPV, експресуючого білок B7-1 кішки і B-галактозидазу E.coli.

Приклад 1C

Субклонували CD28 в гомологічний поксivirusному геному вектор

Кодуючий сегмент гену CD28 ампліфікували з допомогою ПЛР з синтетичними праймерами, що включають стандартні сайти клонування, що повинно полегшити клонування CD28 за будь-яким промотором геному поксвірусу в ході конструювання специфічного вектора, гомологічного поксвірусу. Синтетичні праймери були сформовані так, щоб внести EcoRI- і BglII-сайти клонування за 5'- і 3'-кінцями ПЛР-фрагмента, відповідно. Ці два праймери були такими: прямий праймер 7/97.1 (5'-GATGAATTCCATGATCCTCAGGCTGGGCTTCT-3') (SEQ ID NO: 54) і зворотний праймер 7/97.2 (5'-GATCAGATCTCAGGAACGGTATGCCGCA-3') (SEQ ID NO: 55). Отриманий внаслідок проведення ПЛР ДНК-фрагмент розщеплювали рестриктазами EcoRI і BglII і клонували до складу вектора 01L-SPV з метою отримання рекомбінантного поксвірусу. Була отримана касета 930-26. A1 - вектор 01L-SPV, що включає (за Accl-сайтом у послідовності геномного HindIII-фрагмента M поксвірусу свиней) кодуючу рамку CD28 кішки, що знаходиться за синтетичним "пізно-раннім" промотором LP2EP2 геному SPV і що примикає до касети маркерного гену lacZ E.coli, що знаходиться під контролем синтетичного промотора пізнього гену LP2. Гомологічний плазмідний вектор 930-26. A1 котрансфікували разом з SPV-001 з отриманням рекомбінантного вірусу SPV, експресуючого білок CD28 кішки і B-галактозидазу E.coli.

Приклад 2

Характеристика кДНК і поліпептидів CD80 (B7-1)-TAMU, CD86 (B7-2), CD28, CTLA-4 і CD80 (B7-1)-Syntro/SPAN кішки

Виділена і очищена кДНК CD80 (B7-1) кішки довжиною приблизно 941 нуклеотидів складає відкриту рамку, що кодує котячий поліпептид CD80, що складається приблизно з 292 амінокислот, у вигляді нативної зв'язаної з мембраною або зрілої форми з молекулярною масою приблизно 33,485кДа, ізоелектричною точкою 9,1 і сумарним зарядом 10,24 при pH=7,0. Трансмембранний домен цього білка орієнтовно доводиться на амінокислоти 241-271.

Котячі CD80-TAMU і CD80-Syntro/SPAN - це кДНК і відповідні поліпептиди, які були виділені незалежно один від одного з двох різних джерел, і при цьому їх нуклеотидні і амінокислотні послідовності трохи розрізняються. Джерелом мРНК CD80-TAMU були моноядерні клітини периферичної крові кішки, простимульовані конканаваліном-A, а джерелом мРНК CD80-Syntro/SPAN були спленоцити кішки, простимульовані конканаваліном-A. Відмінність за послідовністю кДНК між CD80-TAMU і CD80-Syntro/SPAN пов'язана з нуклеотидними замінами T→C в 351-м положенні і C→A в 670-м положенні. За амінокислотною послідовністю заміна 351-го нуклеотиду є несмисловою, а заміна 670-го нуклеотиду приводить до заміни нейтральної амінокислоти на нейтральну - лейцину на ізолеїцин - в 224-м положенні поліпептиду.

Виділена і очищена кДНК CD86 (B7-2) кішки складається приблизно з 1176 нуклеотидів, відповідаючи відкритій рамці, кодуючої поліпептид CD86 кішки, що складається з приблизно 320 амінокислот, у вигляді нативної пов'язаної з мембраною або зрілою формою з молекулярною масою приблизно 36,394кДа, ізоелектричною точкою 9,19 і сумарним зарядом 11,27 при pH=7,0.

Виділена і очищена кДНК CD28 кішки складається приблизно з 689 нуклеотидів, відповідаючи відкритій рамці, кодуючої поліпептид CD28 кішки, що складається з приблизно 221 амінокислоти, у вигляді нативної пов'язаної з мембраною або зрілою формою з молекулярною масою приблизно 25,319кДа, ізоелектричною точкою 9,17 і сумарним зарядом 9/58 при pH=7,0.

Виділена і очищена кДНК CTLA-4 кішки складається приблизно з 749 нуклеотидів, відповідаючи відкритій рамці, кодуючої поліпептид CTLA-4 кішки, що складається з приблизно 223 амінокислот, у вигляді нативної пов'язаної з мембраною або зрілою формою з молекулярною масою приблизно 24,381кДа, ізоелектричною точкою 6,34 і сумарним зарядом -0,99 при pH=7,0.

Коекспресія CD80 з коstimуляторною молекулою CD28 або CTLA-4 і з пухлинним антигеном або антигеном патогенного організму зумовлює здатність активувати або посилювати активацію Т-лімфоцитів, зокрема, лімфоцитів пулу Th-1, і активувати ріст інших типів клітин. Коекспресія CD80 з коstimуляторною молекулою CTLA-4 зумовлює здатність пригнічувати активацію Т-лімфоцитів, зокрема, лімфоцитів пулу Th-1. Коекспресія CD86 з коstimуляторною молекулою CD28 або CTLA-4 і з пухлинним антигеном або антигеном патогенного організму зумовлює здатність активувати або посилювати активацію Т-лімфоцитів, зокрема, лімфоцитів Th-1, і активувати ріст інших типів клітин. Коекспресія CD86 з коstimуляторною молекулою CTLA-4 зумовлює здатність пригнічувати активацію Т-лімфоцитів, більш конкретно лімфоцитів Th-1.

Рівень ідентичності нуклеотидних і амінокислотних послідовностей	CD80 кішки	CD86 кішки	CD28 кішки	CTLA-4 кішки
1	2	3	4	5
Гомолог людини (% ідентичності нуклеотидної послідовності)	77	72	85	88
Гомолог людини (% ідентичності амінокислотної послідовності)	59	68	82	88
Гомолог миші (% ідентичності нуклеотидної послідовності)	62	-	77	79
Гомолог кролика (% ідентичності нуклеотидної послідовності)	46	-	74	78
Гомолог кролика (% ідентичності нуклеотидної послідовності)	-	67/64	84/84	-
Гомолог курки (% ідентичності нуклеотидної/аміно кислотної послідовності)	-	-	59/50	-

Приклад 3

Використання котячих CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD28 і CTLA-4 у вакцинах

Наступні експерименти були проведені з метою оцінки, що підсилює імунітет активності котячих CD80, CD86, CD28 і CTLA-4 в складі вакцин для кішок.

У одній з процедур кішкам у віці 8 тижнів внутрішньом'язово ін'єкували по 100мкг плазміді, що включає кДНК, що кодує котячі молекули CD80, CD86, CD28 і CTLA-4, в суміші з плазмідом, що включає кДНК вірусних

генів env і gag вірусу FIV або env і gag вірусу FeLV, або, з іншого боку, внутрішньом'язово ін'єкували по 100мкг плазмід, що включає кДНК, експресуючої попарні комбінації CD80/CD28 або CD80/CTLA-4, або CD86/CD28, або CD86/CTLA-4, в суміші з плазмідом, що включає кДНК вірусних генів env і gag (FIV) або env і gag (FeLV). Контрольні особини ін'єкцій CD80, CD86, CD28 і CTLA-4 не отримували. Кішок заздалегідь заражали вірулентними штамами FeLV або FIV і аналізували симптоми захворювання відповідно до описаного вище.

Внаслідок початкового інфікування було встановлено, що кішки, яким вводили вектор з кДНК котячих CD80, CD86, CD28 і CTLA-4 і вектор з кДНК генів FIV або генів FeLV, виявили 100%-ву захищеність від захворювання в порівнянні з тваринами, яким вводили тільки вектор, що включає кДНК генів FIV або генів FeLV: в цій групі стійкість до захворювання становила 75%.

У іншій процедурі кішкам у віці 8 тижнів внутрішньом'язово ін'єкували від 0,1 до 100мг очищеного білка котячих молекул CD80, CD86, CD28 і CTLA-4 або, в іншому варіанті, - попарні комбінації CD80 або CD86 в поєднанні з CD28 або CTLA-4, з використанням рекомбінантних векторів, що включають кДНК, описаних вище, а також внутрішньом'язово ін'єкували від 0,1 до 100мкг вакцини, що містить білки env і gag вірусу FIV або білки env і gag вірусу FeLV. Контрольним особинам ін'єкції CD80, CD86, CD28 і CTLA-4 не проводили. Кішок заздалегідь заражали вірулентними штамами FeLV або FIV і регулярно аналізували розвиток захворювання у них. Отримані результати показали істотно знижену захворюваність у кішок, яким вводили очищений білок CD80, CD86, CD28 і CTLA-4 разом з вірусною вакциною FIV або FeLV, в порівнянні з кішками, що отримували вакцину, що містить тільки білки FIV або FeLV.

Приклад 4

Використання котячих CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD28 і CTLA-4 для пригнічення і запобігання росту пухлинних клітин

Пухлинні клітини кішки трансфікували вектором, експресуючим CD80 або CD86 кішки в поєднанні або з CD28, або з CTLA-4. Трансфіковані пухлинні клітини знову вводили тій же кішці, і присутність CD80, CD86, CD28 і CTLA-4 на поверхні пухлинної клітини посилювала неспецифічну імунну відповідь у відношенні і трансфікованих, і нетрансфікованих пухлинних клітин, що приводило до знищення локалізованих і метастазуючих пухлинних клітин. У іншій процедурі вектори, експресуючі CD80 або CD86 кішки в поєднанні або з CD28, або з CTLA-4, безпосередньо ін'єкували кішці в пухлину, внаслідок чого спостерігалася неспецифічна імунна відповідь відносно пухлинних клітин, що приводила до знищення як локалізованих, так і метастазуючих пухлинних клітин.

Приклад 5

Клоновані і секвензовані кДНК CD80 кішки
Вступ

У доповнення до цитокінів деякі поверхнево-клітинні молекули, як було показано, можуть посилювати або пригнічувати певну імунну відповідь. CD80 (B7-1) є допоміжною молекулою, яка зв'язується на відповідному їй рецепторі на поверхні Т-лімфоцитів (Freeman et al., 1989). Така взаємодія забезпечує доставку повторних стимулів, що в поєднанні з первинним сигналом, опосередкованим розпізнаванням Т-клітинним рецептором антигену, презентованого з участю молекул МНС, зумовлює активацію і проліферацію Т-клітин (Allison & Lanier, 1994). Хоча білок CD80 уперше був описаний як антиген В-лімфоцитів, потім було встановлено, що він експресується рядом клітинних типів, в основному, що мають властивість презентування антигену (Freeman et al., 1989).

У приматів і гризунів молекула CD80 - поліпептид з молекулярною масою 60кДа, що складається приблизно з 290 амінокислот (Freedman et al., 1987; Freeman et al., 1989). Підтвердження передбачуваної амінокислотної послідовності вказує на характеристики, у відповідності з якими вона є членом імуноглобулінового суперсімейства (IgSF) (Peach et al., 1995). Вона складена двома позаклітинними імуноглобуліно-подібними (IgSF) доменами, гідрофобним трансмембранним доменом і коротким цитоплазматичним "хвостом" (Freeman et al., 1989). Позаклітинний домен зрілого білка складається з 124 N-кінцевих залишків варіабельного (V) IgSF-домену і потім з 100 амінокислот константного (C-подібного) IgSF-домену (Freeman et al., 1989). У складі гомолога CD80 людини є 8 потенційних сайтів М-глікозилування, і, хоч зрілий білок характеризується істотним рівнем глікозилування, ці вуглеводні залишки, як вважається, не пов'язані з процесами зв'язування з рецепторами CD28 або CTLA-4, тому що вони орієнтовані в протилежну від передбачуваного домену зв'язування сторону (Vajorath et al., 1994). Більш того видалення вуглеводних залишків, мабуть, не впливає на здібність до зв'язування, в зв'язку з чим передбачається, що їх функції пов'язані з підвищенням розчинності позаклітинної частини даної молекули (Linsley et al., 1994a).

CD80 зв'язується на двох різних рецепторах, експресованих в різний час процесу Т-клітинної активації. Рецептор CD28 виявляється у різних тімоцитів, "наївних" і активованих Т-клітин, і для нього була продемонстрована участь в активації і проліферації Т-клітин (Aruffo, 1987). Другий рецептор для CD80 - CTLA-4 - звичайно виявляється пізніше на повністю активованих Т-клітинах (Linsley et al., 1991b). Хоча роль CTLA-4 поки точно не визначена, передбачається, що ця молекула може діяти як чинник супресії активної, що вже є Т-клітинної відповіді (Hutchcroft & Bierer, 1996).

Сама молекула CD80, мабуть, не здібна до передавання сигналу. Її цитоплазматичний сегмент відносно малий і не включає амінокислот, для яких була б підтверджена сигнальна і каталітична функція (Hathcock et al., 1994). Відсутність консерватизму в структурі цитоплазматичних ділянок у пептидів людини і миші також узгодиться з вірогідною відсутністю сигнальних функцій у білка CD80, який активний лише при зв'язуванні з рецепторами CD28 або CTLA-4 (Linsley et al., 1994a).

Взаємодія між CD80 і CD28, як було показано, є необхідною для переходу "наївних" Т-клітин в активований стан, що ініціює первинну Т-клітинну відповідь (Damie et al., 1988). Хоча CD80 був уперше знайдений на

активованих В-клітинах (Freedman et al., 1987), після цього він був виявлений у більшості груп специфічних антиген-презентуючих клітин, включаючи макрофаги і моноцити (Freedman et al., 1987), клітини Лангерганса (Symington et al., 1993), дендритні клітини (Liu et al., 1992), активовані Т-клітини (Razi-Wolf et al., 1992) і різні пухлинні клітини (Chen et al., 1992). Присутність молекули CD80 на клітинах APC, як було підтверджено, є важливою для активації і СО4-позитивних, і CD8-позитивних Т-клітин (Allison & Lanier, 1994; Bellone et al., 1994). Хоч-ця молекула в нормі в значній кількості присутня тільки на специфічних-APC, в лініях клітин деяких пухлин було встановлене посилення вироблення сигнальної молекули (Chen et al., 1992).

Передбачається, що внаслідок трансформації в деяких пухлиннородних лініях має місце посилення експресії CD80. У цих пухлинних лініях, похідних не від антиген-презентуючих клітин, рівно як і в деяких іморталізованих клітинних лініях CD80 є поверхневим білком, експресованим на такому рівні, який достатній для зумовлення повної активації Т-клітин (Chen et al., 1992). Хоча кінетика експресії не чітка, можливо, похідна від пухлинних клітин CD80 може бути відповіддю на "онкогенний шок" і відображати еволюційний механізм, за допомогою якого імунна система здатна видаляти трансформовані або пухлиннорідні клітини (Antonia et al., 1995).

Роль взаємодії CD28-B7 вважається ключовою в процесі первинної активації Т-клітин. Розпізнавання антигену з участю молекул MHC Т-клітинними рецепторами недостатнє для ініціації оптимальної проліферації і активації Т-клітин (Schwartz, 1992). TCR-стимуляція при відсутності допоміжних сигналів може приводити до анергії або зниження реактивності Т-клітинних популяцій (Jenkins et al., 1987). Зв'язування молекули CD28 на Т-клітині з молекулою CD80 на антиген-презентуючій клітині розглядається як передавання другого сигналу, необхідного для Т-клітинної активації (Schwartz, 1992). Коли рецептори TCR завантажені, у відсутність такого другого сигналу "наївні" клітини не активуються і можуть стати анергічними (Lanier et al., 1995). Така принципова роль взаємодії CD28-CD80 була виразно виявлена не тільки для процесу активації "наївних" клітин CD4⁺, але також і в клонах CD4⁺ Th1 і Th2 і для "наївних" Т-клітин CD8⁺ похідних від малих лімфоцитів периферичної крові, що знаходяться в стані спокою (Linsley et al., 1993a).

Як і у випадку з сімейством рецепторів CTLA-4/CD28, також є принаймні ще один додатковий рецептор, що має відношення до CD80. Дослідження, в яких намагалися виявити значення CD80 для первинної імунної відповіді, поставили ряд питань через те, що, хоч внесення CTLA-4Ig пригнічувало імунні відповіді, навпаки, додавання моноклонального антитіла (mAb) до CD80, як здавалося, не зумовлювало схожого ефекту (Lenschow et al., 1993). При отриманні лінії мишей, "вимкнених" за геном CD80, несподівано була встановлена наявність другого рецептора CTLA-4/CD28 (Freeman et al., 1993). Передбачили, що такі миші повинні мати схожий фенотип з раніше отриманими мишами, "вимкненими" за CD28, у яких була неадекватна Т-клітинна відповідь (Freeman et al., 1993). Однак було встановлено, що "вимкнені" за CD80 миші формують нормальну відповідь, а їх клітини APC здатні формувати повторний сигнал, необхідний для дозрівання Т-клітин (Freeman et al., 1993). На основі цих даних було передбачено існування другого рецептора, який зрештою і був виділений. Подальше виявлення родинного рецептора CD86 (B7-2 або B7-0), як представляється, знімає ту суперечність, яка виникла в аналізі "вимкнених" за CD80 мишей, а в поєднанні зі схожістю структури і параметрів зв'язування воно вказує на можливість того, що ці молекули характеризуються спільністю функцій! походження (Hathcock et al., 1994).

CD86 (B7-2) виявляє певний рівень схожості з CD80, зокрема, за структурою позаклітинних доменів IgSF-V і IgSF-C (Freeman et al., 1993). Сумарний рівень гомології цих молекул, однак, менший за 25%, при тому, що консервативні залишки зосереджені на протилежних кінцях обох позаклітинних доменів (Bajorath et al., 1994). Хоч зв'язуючий сегмент не був встановлений ні для однієї з цих молекул, гомологія послідовностей дозволила виділити ділянку, перспективну з точки зору встановлення потенційної сайту взаємодії (Linsley et al., 1994a). Незважаючи на відсутність консерватизму, CD80 і CD86 характеризуються схожими параметрами зв'язування на обох рецепторах, хоч CD86 характеризується більш швидким вивільненням з рецептора CTLA-4 (Linsley et al., 1995a).

CD86, мабуть, характеризується схожими параметрами експресії в порівнянні з CD80, будучи експресованим на активованих В-клітинах, Т-клітинах, макрофагах і моноцитах (Azuma et al., 1993a). Однак, динаміка експресії цих двох молекул в невеликій мірі розрізняється (Hathcock et al., 1994). Загалом, CD86 з'являється раніше в процесі активної імунної відповіді в порівнянні з CD80 і можливо експресується моноцитами за конститутивним типом (Freeman et al., 1991). Хоча CD80 може з'являтися через 24 години після початкової стимуляції, CD86 з'являється на ранньому етапі відповіді або взагалі експресується мієлоїдними клітинами постійно на невисокому рівні (Hathcock et al., 1994). Ці два поверхневих білки зумовлюють схожі внутрішньоклітинні реакції, будучи зв'язані на відповідних ним рецепторах на поверхні Т-клітин як CD4⁺, так і CD8⁺ (Lanier et al., 1995). Мабуть, відсутні будь-які відмінності в здатності кожної з цих молекул ініціювати активацію і проліферацію Т-клітин або індукувати активність CTL (Hathcock et al., 1994). Таким чином, дані, що є підтвердженням, що обидві молекули ініціюють схожий сигнальний каскад після їх зв'язування рецепторами CD28 або CTLA-4, відповідно (Hathcock et al., 1994). Хоч, як представляється, кінетика зв'язування обох цих молекул зі своїми рецепторами однакова і при цьому відсутні будь-які прояви, що розрізняються, поки не зрозуміле еволюційне значення існування такої системи "пара лігандів/пара рецепторів" (Lanier et al., 1995).

CD80 спочатку був описаний як маркер В-клітин, і високі рівні CD80, і CD86 виявляються на В-клітинах, стимульованих ліпополісахаридом (ЛПС), анти-Ig, анти-СО40, конканаваліном-А (Кон-А), цАМФ, ІЛ-2 і ІЛ-4 (Hathcock et al., 1994). Як було показано, в В-клітинах мишей γ -інтерферон і ІЛ-5 посилюють вироблення CD86, хоч поки немає аналогічних даних для людини або для CD80 в зв'язку з вказаними імунорегуляторами (Azuma et al., 1993a). Динаміка експресії в В-клітинах у цих двох молекулах декілька різна. CD86 експресується майже відразу після стимуляції (6 годин), в той час як CD80 відсутній майже 24 години і аж до 48-ї години не

досягає піку своєї експресії (Lenschow et al., 1993). Вважається, що позитивна регуляція CD80 на В-клітинах знаходиться під контролем сигнальних механізмів, опосередкованими молекулами класу ІІМНС (Nabavi et al., 1992). Два інших поверхнево-клітинних рецепторів також, мабуть, важливі в зв'язку з експресією CD80. Перехресне зв'язування CD40, експресованого на В-клітинах, з Іg або Т-клітинами, експресуючими відповідний рецептор, зумовлює посилення експресії CD80 (Azuma et al., 1993b), в той час як перехресне зв'язування Fc-рецептора зумовлює зниження експресії обох молекул (Barcy et al., 1995).

CD40 і ліганд цього рецептора CD40L, як передбачалося, є елементами механізму, що бере участь в регуляції експресії CD80 на клітинах APC (Page et al., 1994). CD40 експресований в різних типах клітин, включаючи В-лімфоцити, моноцити, дендритні клітини, фібробласти і ендотеліальні клітини людини, і може позитивно регулюватися на цих клітинах з присутністю γ -інтерферону (de Boer et al., 1993). Ліганд CD40 (CD40L) експресується активованими CD4-позитивними Т-клітинами. Зв'язування CD40 і CD40L, як було показано, посилює експресію CD80 клітинами APC, хоч, мабуть, це не індукує експресію в інших типах клітин, експресуючих даний рецептор, включаючи ендотеліальні клітини (Page et al., 1994).

Молекули CD80 і CD86, хоч і виявляють лише 25%-вий рівень амінокислотної схожості одна з одною, мають структурну схожість і розглядаються як "віддалено-родинні" (Freeman et al., 1993). Гомологічні залишки сконцентровані в складі імуноглобуліно-подібних доменів при невеликій кількості консервативних залишків в складі трансмембранного і цитоплазматичного доменів (June et al., 1995). Передбачається, що сімейство, що включає продукти генів B7, також, в доповнення до CD80 і CD86, охоплює бутирофілін (BT), глікопротеїн мієлін/олігодендроцитів (MOG), МНС-аналог курки - B-G (Linsley et al., 1994b). BT, MOG і B-G кодуються генами, що входять в геномний комплекс МНС, що вказує на вірогідний еволюційний зв'язок між головним комплексом гістосумісності і необхідними коstimуляторними молекулами (Linsley et al., 1994b).

Т-лімфоцити миші, що знаходяться в стані спокою і людини на низькому рівні експресують CD86, в той час як Т-клітини миші і людини (і Т-клітинні клони), активовані дією антитіл до CD3, експресують CD80 і CD86 на істотному рівні (Hathcock et al., 1994). Експресія і CD80, і CD86 на активованих Т-клітинах може відображати здатність цих Т-клітин проліферувати за механізмом аутокринної коstimуляції (Azuma et al., 1993b). Цікаво, що, як було показано, CD80 позитивно регулюється на ВІЛ-інфікованих CD4-позитивних Т-клітинах при одночасній негативній регуляції CD28. Передбачається, що це є вірогідним механізмом вірусного передавання у випадку, коли неінфіковані Т-клітини CD4⁺ ініціюють опосередкований взаємодією CD28/CD80 контакт з інфікованими лімфоцитами (Haffar et al., 1993).

Моноцити периферичної крові людини на низькому рівні експресують CD80 і на високому рівні - CD86, в той час як обробка чинником GM-CSF або γ -інтерфероном приводить до інтенсифікації поверхневої експресії і CD80, і CD86 (Barcy et al., 1995). ЛПС є могутнім індуктором експресії CD80 в моноцитах периферичної крові людини (Schmittel et al., 1994). Поки немає даних про очеревинні макрофаги людини, в той час як відомо, що макрофаги миші, що перебувають в стані спокою експресують CD80 і CD86 на низьких рівнях (Freeman et al., 1991; Hathcock et al., 1994). Стимуляція ЛПС і γ -інтерфероном макрофагів мишей збільшує рівень поверхневої експресії, хоч γ -інтерферон в поєднанні з інтерлейкіном-10 знижує рівень синтезу обох цих рецепторів (Ding et al., 1993).

Дендритні клітини селезінки на низькому рівні експресують обидві молекули, а клітини Лангерганса на низькому рівні експресують CD86, хоч при культивуванні є тенденція до посилення експресії в обох типах клітин (Larsen et al., 1994). При культивуванні дендритних клітин CD86, мабуть, підлягає впливу більш могутньої, а також більш ранньої позитивної регуляції, що може грати важливу роль в опосередкуванні сигнальних шляхів в цих клітинах (Hathcock et al., 1994). Цікаво, що, хоч ІL-10 не впливає на експресію CD80 дендритними клітинами, він активний за негативною регуляцією експресії CD86 (Buelens et al., 1995). Повідомлялося (O'Doherty et al., 1993), що, хоча початкові рівні CD80 в дендритних клітинах дуже низькі, після їх дозрівання рівень, що є CD80 підвищується. Експресія CD80 клітинами Лангерганса пригнічується і ІL-10, і γ -інтерфероном, хоча обробка колоніє-стимулюючим чинником гранулоцитів/макрофагів ревертує пригнічення, викликане γ -інтерфероном, але не пригнічення, викликане ІL-10 (Ozawa et al., 1996).

Як було показано, у людини і миші специфічні цитокіни здійснюють контроль експресії і CD80, і CD86. Інтерлейкін-4 є могутнім індуктором CD86 і в меншій мірі індуктором CD80 в В-клітинах (Stack et al., 1994), в той час як γ -інтерферон посилює експресію CD86 в різних типах клітин, включаючи В-клітини, моноцити і макрофаги (Hathcock et al., 1994). Хоч, як видно, γ -інтерферон зумовлює посилення експресії CD80 в моноцитах, він може приводити до ослаблення експресії а макрофагах. ІL-10, навіть в присутності γ -інтерферону, ослабляє експресію CD80 і CD86 (Ding et al., 1993). Така взаємодія може відображати вірогідний механізм перемикання Т_H1-відповіді (DTH) на Т_H2-відповідь (гуморальна). Однак, ІL-10 не впливає на експресію CD80 в дендритних клітинах (Buelens et al., 1995). Це, крім того, може відображати роль цих молекул в регуляції груп Т-хелперів, оскільки вважається, що дендритні клітини грають важливу роль в ініціації імунної відповіді 2-го типу. Інтерлейкін-7 посилює експресію CD80 в Т-клітинах, хоча його вплив в інших типах клітин поки не визначений (Yssel et al., 1993), в той час як було встановлено, що експресія CD80 В-клітинами опосередковується за рахунок перехресного зв'язування з TNF-рецептором p75, а експресія може бути збільшена в присутності ІL-4 (Ranheim & Kipps, 1995). Цікаво, що TNF належить до того ж сімейства молекул, що і CD40 - інший потенційний ініціатор експресії CD80. Мабуть, GM-CSF посилює поверхневу експресію CD80 дендритними клітинами і клітинами Лангерганса, в той час як γ -інтерферон зумовлює посилення вироблення тільки CD86 в цих клітинах (Larson et al., 1994).

Довгий час вважалось, що розпізнавання, зв'язування і лізис трансформованих і інфікованих вірусом

клітин-мішеней CD8-позитивними цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTL) опосередковуються тільки за рахунок TCR-розпізнавання чужорідних пептидів, експресованих в зв'язку з молекулами класу I MHC (Berke, 1993). Недавно було встановлено, що ряд поверхово-клітинних молекул, експресованих і CTL, і клітинами-мішенями, необхідний для того, щоб відбулася повна взаємодія (Mescher, 1992). Ключовим учасником даної взаємодії є CD80 і відповідний йому рецептор CD28. Допоміжний сигнал, що генерується взаємодією B7-CD28, необхідний для того, щоб малі CD8-позитивні лімфоцити, що перебувають в стані спокою диференціювалися в літичний стан (Mescher, 1992). Цікаво, що після диференціювання CTL цей повторний сигнал перестає бути необхідним для вияву літичних властивостей (Hodge et al., 1994).

Довгий час був відомий, що CTL є ключовими медіаторами протівірусного імунітету. У людини в разі зараження вірусом імунодефіциту (ВІЛ) довготривала відсутність симптомів захворювання зв'язується з високими рівнями CTL пам'яті CD8⁺, специфічними відносно вірусних білків Gag, Pol і Env, і дуже низьким числом копій ВІЛ-ДНК і РНК в моноядерних клітинах периферичної крові (Rinaldo, 1995). Навпаки, у хворих на пізніх стадіях СНІД число CTL пам'яті (mCTL) різко знижене (Zanussi et al., 1996). Узгодженість цих даних вказує на те, що CTL пам'яті можуть бути основним чинником контролю інфекції в організмі-реципієнті і можуть грати ключову роль в формуванні імунітету у неінфікованих осіб (Zanussi et al., 1996). Крім того, патогенетичні зв'язки з ВІЛ-інфекцією відображають вірогідну роль CD80 і CD28 в розвитку СНІДу.

Також було висловлене припущення, що CD80 бере участь в патогенезі ВІЛ-інфекції (Haffar et al., 1993). У нормі Т-клітини експресують CD80, але на невисокому рівні і тільки після активації (Schwartz, 1992). У модельному аналізі ВІЛ-інфекції *in vitro* в алостимульованих лініях первинних Т-клітин було показано, що CD28 регулюється негативно, а експресія CD80, очевидно, посилюється нарівні з МНС СИ (Haffar et al., 1993). Хоч точні механізми цих процесів поки не визначені, можна передбачити існування двох механізмів можливої ушкоджуючої дії. Присутність CD80 на поверхні разом з молекулами класу II може зумовлювати інтенсифікацію контактів між інфікованими Т-клітинами і неінфікованими CD4-позитивними клітинами (Haffar et al., 1993). Хоча така взаємодія може приводити до підвищення інтенсивності обміну між цими Т-клітинами, іншою функцією може бути підвищення CTL-опосередкованого розпізнавання і знищення клітин за рахунок генерування повторного сигналу внаслідок взаємодії CD80 на поверхні інфікованої клітини з рецептором CD28, що експресується CD8-позитивною Т-клітиною (Haffar et al., 1993). Це може прискорювати скорочення популяції лімфоцитів CD4⁺, що корелює з маніфестацією захворювань, пов'язаних з СНІДом (Haffar et al., 1993).

І у миші, і у людини експресія білків сімейства B7 розглядається як важливий чинник імунного розпізнавання трансформованих клітин (Chen et al., 1992). Хоча експресія була встановлена в деяких типах трансформованих клітин, більшість пухлин в нормі не експресують CD80 або CD86, що тим самим робить неймовірним те, що у разі експресії потенційно імуногенного пухлинного антигену буде мати місце повноцінне його розпізнавання Т-клітинами (Chen et al., 1993). Однак експерименти з трансфекції з використанням молекули CD80 з метою посилення цитолізу пухлинних клітин виявилися успішними (Hodge et al., 1994).

Ретровірусні і засновані на вірусі коров'ячої віспи вектори, експресуючі функціональну молекулу CD80, були використані для трансфекції злоякісних клітин (Li et al., 1994; Hodge et al., 1994). Ці клітини, експресуючі CD80 в доповнення до поганого (в нормі) розпізнаваних пухлинних антигенів, після цього зворотно вносили донору, що, як передбачалося, приведе до виникнення клітинної імунної відповіді у відношенні пухлинних антигенів, експресованих на клітинах злоякісних пухлин (Townsend & Allison, 1993). Результати цих експериментів з різними формами пухлин виявилися на диво високоефективними. У багатьох випадках організм-реципієнт формував могутню клітинну відповідь проти злоякісної пухлини, контролюючи або знищуючи її (Hodge et al., 1994). Подальша реінтродукція в організм донора пухлинних клітин, що мають поверхневу молекулу CD80 або позбавлених її, зумовлює схожі рівні протипухлинного імунітету (Hodge et al., 1994). Таким чином, вважається, що після встановлення імунної пам'яті молекула CD80 не є необхідною для підтримки відповіді або для ініціації її у випадку реінтродукції (Hodge et al., 1994). Ці експерименти показали, що молекула CD80 є ефективним медіатором клітинного імунітету і що в конкретних типах пухлин клітинні відповіді можуть бути індуковані за вірогідним контролем злоякісних новоутворень і запобіганням рецидивам (Hodge et al., 1994).

Посилення експресії CD80 може мати негативні наслідки, що виявляється в розвитку деяких форм аутоімунітету. Вважається, що CD80 у взаємодії з IL-12 є важливим на ранніх стадіях розвитку розсіяного склерозу і зумовлює стимуляцію Т-клітин і розвиток DTH (Windhagen et al., 1995). Експериментально викликаний аутоімунний енцефаломієліт (ЕАЕ) може бути частково пригнічений введенням немембранного CTLA-4Ig експериментальному об'єкту. Пригнічення демієлінізації при блокуванні взаємодії CD28/CD80 відображає вірогідну роль цієї взаємодії в загостренні захворювання (Arima et al., 1996).

Важливість молекули CD80 в розвитку ефективної імунної відповіді очевидна. Хоча кДНК, що кодує цей білок, була виділена у гризунів і приматів, вона не була раніше виявлена в інших таксономічних групах ссавців. Кішка є поширеною домашньою твариною і потенційною моделлю ретровірусних захворювань. Клонування імунологічних чинників у кішок надають важливий інструмент ветеринарних досліджень, зокрема, в зв'язку з дослідженнями розвитку і профілактики захворювань у інших видів організмів.

Матеріали і методи

Виділення початкового фрагмента

мРНК була екстрагована з моноядерних клітин периферичної крові (PBMC), простимульованих протягом 16 годин Кон-А з використанням реагенту для РНК-екстракції RNeasy (Qiagen, Crawley, UK). Початково кДНК була синтезована на матриці цієї РНК за допомогою зворотної транскриптази (OH), де як зворотний праймер використали оліготимідин. РНК і оліго-dT нагрівали до 75°C протягом 3 хвилин з метою видалення повторних

структур. Потім додавали OH, dNTP, буфер і дистильовану воду і отриману суміш інкубували протягом 1 години при 42°C. Після цієї інкубації зразок нагрівали до 95°C протягом 5 хвилин з метою інактивації OH. Вироджені праймери, похідні від консенсусних ділянок в складі опублікованих нуклеотидних послідовностей CD80 людини і миші (GeneBank, Gaithersburg, MA), використовували потім для початкової ампліфікації з складу даного гену 344-нуклеотидного фрагмента, що кодує центральний сегмент в складі константного домену:

прямий праймер B7-2: GGC CCG AGT A (CT) A AGA ACC GGA C

зворотний праймер B7-3: CAG (AT)TT CAG GAT C (CT)T GGG AAA (CT)TG (SEQ ID NO: 56).

Для ампліфікації даного продукту використали протокол полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з "гарячим стартом" з Taq-полімеразою. Спочатку реакційну суміш без Taq-полімерази нагрівали до 95°C протягом 5 хвилин (етап "гарячого старту") з метою запобігання утворення димерів між праймерами. Полімеразу додавали перед початком температурного циклу. Потім ПЛР-реакцію нагрівали до 95°C на 30 секунд з метою дисоціації дволанцюгової ДНК. Потім реакцію охолоджували до 42°C на 30 секунд для забезпечення відпалення вироджених праймерів. Відносно низька температура відпалювання полегшувала зв'язування праймерів у разі їх не 100% гомологічності з мішенню. Потім реакцію нагрівали до 72°C на 45 секунд, що є оптимальною температурою для активності Taq-полімерази, що забезпечує добудування (подовження ланцюга) праймеру і копії протилежного ланцюга ДНК. Даний температурний цикл повторювали 30 разів. Після цих 30 циклів заключний етап проводили при 72°C на протязі 7 хвилин з метою полегшення добудування будь-яких неповних продуктів. Після візуалізації в 1%-вому агарозному гелі отриманий продукт лігували протягом ночі при 16°C до складу клонуючого вектора TA (Invitrogen, San Diego, CA) для подальшого секвенування. За 2мкл лігаційної реакції використали для трансформації компетентних клітин InvaF'. Трансформовані бактерії наносили смугами на пластини LB (50мкг/мл ампіциліну), покриті 40мкл розчином 50мкг/мл X-Gal. На наступний день відбирали колонії білого кольору і інокували їх в 5мл культурального середовища LB, що містить 100мкг/мл ампіциліну, і культивували протягом ночі при 37°C при обертанні з швидкістю 225об./хв.

Міні-препарування проводили на матеріалі нічних культур з метою виявлення клонів, які несуть плазмиду з вставкою при правильній орієнтації. Плазмиду екстрагували з культур з використанням стандартної процедури лужного лізису з подальшим очищенням ДНК шляхом екстракції сумішшю фенолу і хлороформу (Maniatis et al., 1982). ДНК осаджали 2 об'ємами етанолу і потім розщеплювали рестриктазою EcoRI. Результати цього розщеплення візуалізували в 1%-вому агарозному гелі з метою ідентифікації колоній, несучих плазмиду, що включає вставку в правильній орієнтації. Потім таку плазмиду очищали від позитивних клонів і секвенували з використанням реактивів для секвенування методом термінації ланцюга з ³⁵S-міткою за Сейнджером (Sequenase, US Biochemicals, Cleveland, OH) або методом циклічного секвенування з кінцевою флуоресцентною міткою (Perkin Elmer, Norwalk, CT). За даними нуклеотидної послідовності кДНК специфічні зворотні і прямі праймери були сконструйовані для використання в методі "швидкої ампліфікації кінців кДНК" (5'-RACE) і для виділення 3'-послідовності в поєднанні з виродженими праймерами з складу 3'-нетрансльованого сегмента (UTR).

Виділення 5'-сегмента

Ампліфікаційний протокол кДНК Marathon (Clontech, Palo Alto, CA) використовували для одержання 5'-послідовності даного гену мРНК була виділена з РВМС, простимульованих протягом 12 годин Кон-А і одночасно протягом 4 годин - ліпополісахаридом. мРНК екстрагували з використанням реагенту для екстракції РНК ULTRASPEC (Biotex, Houston, TX). кДНК отримали з використанням "якірного праймера" оліго-dT з виродженими нуклеотидами за 5'-кінцем для полегшення зв'язування цього праймера з далеким 5'-кінцем поліаденілового "хвоста". Потім кДНК транскрибували відповідно до описаного вище. Специфічні лінкери лігували на цю кДНК з використанням ДНК-лігази фагу T4. ПЛР "вниз від точки лігування" здійснювали на матриці кДНК з використанням внутрішнього зворотного праймера, специфічного у відношенні початково ампліфікованої ділянки:

B7-284: TTA TAC TAG GGA CAG GGA AG (SEQ ID NO: 58)

B7-190: AGG CTT TGG AAA ACC TCC AG (SEQ ID NO: 59), -

і якірного праймера, комплементарного лігуючої лінкерної послідовності. Параметри ПЛР "вниз від точки" з химерною полімеразою KlenTaq (Clontech, Palo Alto, CA) були такими: 5 хвилин при 95°C - 1 цикл; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 72°C і 45 секунд при 68°C - 5 циклів; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 65°C і 45 секунд при 68°C - 5 циклів; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 60°C і 45 секунд при 68°C - 25 циклів. 1мкл даної реакції розчиняли в 50мкл води і 5мкл отриманих розведень потім використали для "гніздової" ПЛР (5 хвилин при 95°C - 1 цикл; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 65°C і 45 секунд при 68°C - 30 циклів, з полімеразою KlenTaq) з лінкер-специфічним якірним праймером і ген-специфічним зворотним праймером, розташованим з 5'-сторони за відношенням до початкового праймеру.

B7-20: TTG TTA TCG GTG ACG TCA GTG (SEQ ID NO: 60)

B7-135: CAA TAA CAT CAC CGA AGT CAG G (SEQ ID NO: 61).

По 20мкл кожної реакції візуалізували в 1,5%-вому агарозному гелі і точний за розміром фрагмент вирізали з гелю. кДНК екстрагували і очищали з агарози шляхом центрифугування зрізу гелю через розпилювач гелю і фільтр Micropure з порами 0,22мкм (Amicon, Beverly, MA). Потім очищену ДНК прямо секвенували з використанням секвенування з кінцевою флуоресцентною міткою (Perkin Elmer, Norwalk, CN).

Виділення 3'-сегменту

3'-Сегмент даного гену виділяли шляхом підбору п'яти ген-специфічних праймерів за послідовністю 344-нуклеотидного фрагмента раніше і секвенуваної 5'-ділянки:

B7-S220: GTC ATG TCT GGC AAA CTA CAA G (SEQ ID NO: 62)
B7-50: CAC TGA CGT CAC CGA TAA CCA C (SEQ ID NO: 63)
B7-140: CTG ACT TCG GTG ATG TTA TTG G (SEQ ID NO: 64)
B7-550: GCC ATC AAC ACA ACA GTT TCC (SEQ ID NO: 65)
B7-620: TAT GAC AAA CAA CCA TAG CTT C (SEQ ID NO: 66).

Потім виродженні зворотні праймери підбирали за консенсусними ділянками 3'-UTR гени CD80 людини і миші:

B7-1281: G(A/G)A AGA (A/T)TG CCT CAT GA(G/T) CC (SEQ ID NO: 67)

B7-1260: CA(C/T) (A/G)AT CCA ACA TAG GG (SEQ ID NO:68).

кДНК були отримані на матеріалі РНК, екстрагованих за допомогою ULTRASPEC (Biotex, Houston, TX), виділених із РВМС, простимульованих Кон-А і ЛПС відповідно до описаного вище. Якірний праймер олиго-dT використовували як вихідний зворотний праймер для транскрипції РНК у кДНК. ПЛР із полімеразою Таq проводили на матриці отриманої кДНК із використанням специфічних прямих праймерів вироджених зворотних праймерів (5 хвилин при 95°C 1 цикл; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 42°C і 45 секунд при 72°C - 30 циклів; 72°C на протязі 7 хвилин). Два раунди "гніздових" ПЛР-реакцій були необхідні для того, щоб одержати єдиний фрагмент правильного розміру. Одержаний продукт вирізуали з 1,5%-го агарозного гелю, очищали відповідно до описаного вище і секвенували методом секвенування з кінцевою флуоресцентною міткою (Perkin Elmer, Norwalk, CN).

За даними секвенування 5'- і 3'-сегментів конструювали праймери, які б дозволили ампліфікувати ділянку, що кодує повнорозмірну відкриту рамку гену CD80 кішки:

B7-START: ATG GGT CAC GCA GCA AAG TGG (SEQ ID NO: 69)

B7-960: CCT AGT AGA GAA GAG CTA AAG AGG C (SEQ ID NO: 12).

Була використана раніше отримана на матеріалі РВМС кДНК, для якої відома наявність у ній ДНК, що кодує шуканий ген. У цій реакції ПЛР (5 хвилин при 95°C - 1 цикл; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 42°C і 45 секунд при 72°C - 30 циклів; 72°C на протязі 7 хвилин) використовували химерну полімеразу KlenTaq - цей "збірний" фермент зберігає деяку 5'-екзонуклеазну активність, що дозволяє знизити частоту випадкових помилок, що часто відбуваються при проведенні ПЛР із полімеразою Таq. У реакції ампліфікували 960-нуклеотидний фрагмент, що клонували до складу клонуючого вектора ТА (InVitrogen, San Diego, CA) і секвенували відповідно з раніше описаним. В остаточній послідовності шуканого гену були враховані кДНК від двох різних тварин. Кожен нуклеотид у послідовності цього гену незалежно перевіряли принаймні за трьома різними послідовностями, отриманими в окремих ПЛР-реакціях, з метою зниження імовірності неточностей, що походять від помилок, індукованих самою ПЛР.

Результати

РНК, екстраговану з тканин експериментальної кішки НК5, використовували для вихідних спроб ампліфікувати ген CD80, однак ця кішка після цього була умертвлена і наступні продукти брали від інших тварин. У вихідній ампліфікації РНК клітин РВМС кішки НК5, простимульованих Кон-А, одержали 344-нуклеотидний продукт, що виявляв 70%-вий рівень ідентичності з геном CD80 людини. Праймери були специфічні у відношенні до ділянки в центрі послідовності, що кодує, відповідний константний імуноглобуліноподібний домен. Хоча в цих вихідних експериментах використовували додаткові виродженні праймери з метою ампліфікації ділянок, які б кодували більш значний сегмент пептиду, тільки при сполученні праймерів В7-2 (прямий) і В7-3 (зворотний) одержали продукт придатного розміру. Наступні експерименти, у яких ці додаткові виродженні праймери використовували поряд з ген-специфічними праймерами, виявилися безуспішними. Отже, і 5'-, і 3'-ділянки повинні бути виділені з застосуванням інших методів.

Групу із шести нових ген-специфічних праймерів сформували на матеріалі даних секвенування, проведеного на вихідному продукті (прямі: В7-20, В7-135, В7-284, В7-190; зворотні: В7-140, В7-50). В наслідку зворотні праймери використовували в ПЛР-методі 5'-RACE, що деякою мірою подібний з методом, що застосовувався для успішної ампліфікації 5'-сегмента молекули CD28. Однак при використанні цього методу продукти не були отримані.

В ампліфікаційній системі для кДНК Marathon RACE (Clontech, Palo Alto, CA) успішно ампліфікували ділянку, що відповідає 5'- послідовності, що кодує. РНК, похідна від клітин ЕК6, простимульованих Кон-А, була успішно ампліфікована за допомогою даного протоколу. Вихідну ампліфікацію здійснили з праймерами В7-284 і В7-3 і якірним праймером АРІ. У цій реакції не було отримано виразного єдиного бенда, тому з використанням цього продукту як матриці провели "гніздові" реакції з використанням праймерів В7-20 і В7-135 як "гніздових" (тобто внутрішніх стосовно попередніх праймерів) зворотних праймерів і якірного праймера АРІ як прямого праймера. Продукт придатної довжини одержали в кожній з цих реакцій.

Дані, отримані при прямому секвенуванні продуктів реакції RACE, дозволили домогтися повної ідентичності на ділянках довжиною 20 і 135 п.н., відповідно, які перекривалися з вихідним секвенованим продуктом довжиною 344 п.н. Продукти подовжували від відомої 5'-ділянки через старт-кодон АТГ гену кішки в сторону 5'-нетрансльованого сегмента. Ідентичність 5'-послідовності, що кодує, похідної від цих продуктів, і 5'-ділянки гену CD80 людини була меншою, чим ідентичність, обумовлена між 344-нуклеотидним сегментом гену кішки і аналогічною ділянкою гену людини. Було встановлено, що подібна втрата гомології виявляється між послідовностями людини і миші за тими ж самими сегментами. Порівняння даних за послідовностями ділянок за межами сегмента, що кодує, показало подальше виразне зниження рівня консерватизму (дані не включені).

Нову групу вироджених праймерів, що кодують 3'-нетрансльовану ділянку, синтезували за параметрами консенсусних ділянок у межах 3'-UTR послідовностей людини і миші. За допомогою цих праймерів успішно

ампліфікували кДНК, що транскрибується з РНК, виділеної з РВМС, простимульованих Кон-А, узятих від кішки ED3. На відміну від вихідної ампліфікації, для одержання кінцевого продукту необхідно було провести серію "гніздових" реакцій. У первинних реакціях ПЛР, у яких використовувалися ці вироджені праймери і якірні праймери з меж 344-нуклеотидної послідовності і 5'-сегмента, не вдалося в результаті одержати виразні ідентифіковані бенди. Однак, "гніздові" реакції при використанні розведеного первинного продукту і додаткових специфічних 5'-праймерів дозволили одержати продукт, що кодує 3'-ділянку, що залишилася.

Після секвенування 3'-продукту було встановлено, що за межами константного Ig-подібного домену рівень ідентичності знову знижувався. Дистальний кінець послідовності, що кодує, вказав на дуже низький рівень ідентичності, що ще більш знижувався після стоп-кодону.

На матеріалі 3'-послідовності сконструювали зворотний праймер, що виходив за межі послідовності, що кодує, починаючи з 960-го нуклеотиду. З цією конструкцією в сполученні з праймером, що покриває старт-кодон, ампліфікували продукт очікуваного розміру. Секвенування кінцевого продукту показало, що усі раніше встановлені ділянки дійсно перекриваються, і отриманий фрагмент являє собою неприривну і повну нуклеотидну послідовність гену CD80 кішки.

Для ампліфікації кінцевого продукту зразки ампліфікували на матеріалі РНК, виділеної з РВМС, простимульованих Кон-А, узятих у тварин ED3 і ЕК6. Принаймні два продукти від кожної тварини секвенували повністю, а кожний з нуклеотидних сайтів був перевірений і підтверджений принаймні за трьома правильно ліченими послідовностями. Продукт, отриманий від тварини ЕК6, потім клонували до складу клонуючого вектора ТА для наступного маніпулювання і як еталон. Повнорозмірна нуклеотидна послідовність представлена на Фіг.8.

Фрагмент довжиною 960 нуклеотидів включає старт-кодон за 1-им положенням, стоп-кодон за положенням 888 і додатково 72 нуклеотиди 3'-нетрансльованої ділянки. Серед продуктів, що одержали і секвенували в ході встановлення повнорозмірного фрагмента, були секвеновані додаткові 5'- і 3'-ділянки (дані не показані).

Секвенування ділянки, розташованої вище старт-кодону, на матеріалі продуктів 5'-RACE, показало, що кодон АТG, визначений у положеннях 1-3, є першим сайтом, що кодує (метіонін) у рамці зчитування і займає аналогічне положення в послідовностях миші і людини. Стоп-кодон, що знаходиться в положенні 888, також, як підтверджується, знаходиться в подібному положенні в раніше секвенованих генах. Порівняння послідовностей продемонструвало рівні ідентичності 77% і 62% з опублікованими нуклеотидними послідовностями генів CD80 людини, і миші, відповідно Рівень гомології з послідовностями інших приматів і гризунів порівнюємо з рівнями, встановленими для людини і миші, відповідно. У кожного з видів рівень ідентичності з геном CD86 був меншим за 25%.

З використанням комп'ютерного пакету програм для аналізу ДНК MacVector (IBI, Rochester, NY) нуклеотидну послідовність "трансльували" в амінокислотну послідовність. У результаті такого розшифрування визначили 292-амінокислотний пептид, подібний за розміром, з білками і миші, і людини, хоча і не ідентичний їм. Сигнальний сегмент, як передбачається охоплює перші 25 амінокислот. Позаклітинний домен даної молекули складений 115 амінокислотами домену, подібного з варіабельним імуноглобуліновим доменом (до 139-го залишку), і 110 амінокислотами домену, подібного до константного імуноглобулінового домену (приблизно до 240-го залишку). Трансмембранний домен, що складений залишками 241-271, переходить у короткий цитоплазматичний "хвіст", що складається з 21 амінокислот. Як і в молекулі людини, поліпептид кішки включає 8 потенційних сайтів N-глікозилування, хоча їхнє розташування не ідентичне Рівень гомології між білками кішки, людини і миші істотно менший, за рівень ідентичності відповідних нуклеотидних послідовностей (таблиця 1).

Порівняння рівнів гомології послідовностей CD80 кішки, миші і людини		
Вид	Відсоток гомології з послідовністю кішки	
	Нуклеотидна	Амінокислотна
Людина	77%	59%
Миша	62%	46%

Порівняння передбачуваної амінокислотної послідовності CD80 кішки з передбачуваною послідовністю людини вказує на те, що велика частина гомологічності цих двох молекул зосереджена в константному домені (амінокислоти 140-240). Існує незначна гомологія між цими пептидами за сигнальним сегментом і вона відсутня за межами IgV-подібного домену. Як уже зазначалося, консерватизм істотний у послідовності константного домену, однак ця ідентичність майже не виходить за його межі, і дуже низький рівень гомології виявляється за трансмембранним доменом і цитоплазматичним "хвостом" пептиду кішки і аналогічних ділянок у молекулі людини.

Порівняння генів CD80 кішки, людини і миші з генами CD86 миші і людини показує, що, хоча існує дуже обмежений рівень гомології між цими двома членами сімейства B7, амінокислоти, що розглядаються як діагностичні для генів сімейства B7, зберігаються і у складі білка кішки. Ці молекули включають залишки, що приблизно беруть участь у просторовому укладанні ("фолдингу") і складають сайт зв'язування.

Хоча рівень гомології між послідовностями CD80 людини і кішки не настільки великий, як рівень ідентичності між молекулами CD28, порівняння отриманих графіків гідрофобності показує, що, хоча і існує ряд замінів амінокислот у конкретній амінокислотній послідовності, ці зміни часто є гомологічними і, очевидно, не змінюють поверхневих характеристик даного пептиду.

Обміркування

Рівні ідентичності нуклеотидних послідовностей кішки і людини, а також кішки і миші CD80 середні, хоча рівень такої гомології не переноситься на пептид. Передбачається, що, хоча генетичний код і є виродженим, у деяких молекулах (наприклад, у CD28) розходження між нуклеотидними послідовностями в істотному ступені не змінюють пептид, у випадку ж CD80 консерватизм амінокислотної послідовності в цілому не настільки критичний, а, отже, зміни за довжиною цієї молекули в ході еволюції "більш припустимі".

Хоча в цілому нуклеотидні послідовності виявляють середній рівень ідентичності, існують визначені труднощі у виділенні повнорозмірної послідовності. Вихідний продукт CD80 був отриманий за константним доменом цієї молекули - тобто за тією ділянкою, що виявляє найвищий рівень консерватизму в послідовності кДНК даного виду. Праймери, що маркують цю ділянку і дозволяють ефективно апліфікувати продукт, одержали простим чином, у результаті чого 344-нуклеотидний фрагмент охопив найбільш консервативну ділянку IgC-подібності. На жаль, через відсутність гомології в послідовностях сигнального сегмента, цитоплазматичного домену і 3'-UTR для виділення послідовностей цих ділянок потрібно прикласти більше зусиль. Наявність даних за секвенуванням центральної ділянки білка, однак, дозволяє визначити відправну точку, від якої можуть бути визначені інші ділянки цієї молекули. CD80 кішки являє відмінний приклад того, як шляхом одержання короткого фрагмента шуканої молекули і застосовуючи методи RACE і виродженні праймери в сполученні з якірними праймерами, що відповідають встановленому сегменту, може бути досить легко отримана повнорозмірна послідовність цієї молекули.

Порівняння передбачуваної амінокислотної послідовності цих клонованих молекул CD80 показує відсутність загальної гомології. Поліпептиди миші і людини виявляли менш чим 50%-вий рівень гомології за амінокислотними послідовностями. Це порівняне з 59%-вим рівнем ідентичності при порівнянні білків кішки і людини і 46%-вий рівень ідентичності поліпептидів кішки і миші, що, можливо, відображає еволюційне споріднення цих видів. Порівняння профілів, що пророкують, гідрофільності амінокислот кішки і людини, що дозволяють визначити ті залишки, що були порушені або переміщені через їх відносну гідрофільність, показало, що, хоча на рівні амінокислотної послідовності конкретні амінокислоти могли і не зберегтися, ці зміни, очевидно, носили відносно консервативний характер. Це вказує на ймовірне збереження ознаки гідрофільності/гідрофобності даної молекули, що, виходить, може відповідати подібному за структурою в цілому поліпептиду. Для поверхнево-клітинного білка, мабуть, характерна наявність конкретних амінокислот, що безпосередньо залучені в процес зв'язування, а також інших амінокислот, що потрібні тільки для того, щоб підтримувати структуру, необхідну для забезпечення взаємодії із сайтом зв'язування.

Хоча існують розбіжності амінокислотних залишків у молекулах CD80 у примата, гризуна і кішки, проте зберігаються ознаки IgSF. Молекула CD80 кішки включає кінцеві IgC-подібний домен і IgV-подібний домен, розташовані проксимально стосовно ділянки, асоційованої з мембраною. Як і у випадку з рівнем консерватизму при порівнянні CD80 миші і кішки, рівень ідентичності константних ділянок вищий, ніж при порівнянні варіабельних ділянок (Freeman et al., 1989). У цілому, консерватизм варіабельного домену перевищує 50%, у той час як цей показник для константного сегмента перевищує 70%, при тому, що коротка ділянка амінокислот 164-198 (та сама ділянка, за яким був виділений вихідний 344-нуклеотидний фрагмент) характеризується найбільшим рівнем ідентичності. Ця центральна 56-амінокислотна ділянка (залишки 165-221) у складі константного домену виявляє 87%-вий рівень гомології між послідовностями людини і кішки, при тому, що на 28-нуклеотидній ділянці (залишки 171-198) існує тільки одне розходження. Також ця ділянка котячої послідовності виявляє істотний рівень гомології в порівнянні з відповідними залишками поліпептиду миші. Гідрофільна природа амінокислот на цій ділянці вказує на високий ступінь імовірності експресії на поверхні клітин, а з урахуванням визначеного рівня консерватизму між видами - на ймовірну участь у взаємодіях "ліганд-рецептор". Було припущено, що IgC-частина даної молекули прямо залучена в презентування едального домену до зв'язування на рецепторі (Peach et al., 1995). Однак експериментальним чином встановили, що для здійснення ефективного зв'язування необхідні і константний, і варіабельний домен (Peach et al., 1995). Концентрація гомологічних залишків у IgC-ділянці позаклітинних доменів, поряд з високим рівнем дивергенції трансмембранного і цитоплазматичного доменів, розглядається як додатковий доказ ролі CD80 як ліганду в більшому ступені, ніж фактора, здатного виробляти сигнал.

Як і в людини, і в миші, CD80 кішки характеризується високим рівнем глікозилування. Вуглеводневі залишки, як вважається, не беруть участь прямо в зв'язуванні, однак можуть сприяти підвищенню розчинності позаклітинного сегмента цієї молекули (Peach et al., 1995). З восьми потенційних сайтів глікозилування, що виявляються в послідовності пептиду людини, сім розташовані в положеннях, ідентичних таким у білку кішки. Сайт, розташований у 39-м положенні амінокислотної послідовності кішки, не відтворений у молекулі CD80 людини, у той час як існує сайт у 232-м положенні, відсутній у послідовності кішки (Freedman et al., 1987). У молекулі миші існує сім сайтів глікозилування, тільки два з яких знаходяться в ідентичних положеннях, хоча в принципі вони розташовані в тих же ділянках молекули, що і у молекулах кішки і людини (Freeman et al., 1989). Подібність у числі і положенні сайтів глікозилування, як можна вважати, відображає важливість відповідних мотивів для функціонування даної молекули.

Існує широке коло можливих способів застосування молекули CD80 кішки. Відповідно до обміркованого вище, ця молекула є ключевим елементом забезпечення точності в розвитку відповіді зрілих Т-клітин. Контроль експресії даного гену і на рівні РНК, і на рівні білка повинний допомогти встановити шлях, за яким імунна система кішки взаємодіє з інфекцією. З'ясування того, як ця система впливає на конкретні патогени, з урахуванням даних, одержуваних при дослідженнях інших модельних систем, дасть новий погляд на параметри імунної системи людини. Крім того, внесок у вивчення можливостей маніпуляції імунною системою кішки, що є одним з найбільш розповсюджених видів домашніх тварин, додасть ветеринарії нові імпульси.

Важливим перспективним застосуванням, передбачуваним для молекули CD80 в інших видах, є індукція пухлин-специфічного імунітету шляхом внесення гену CD80 у трансформовані клітини з наступною реінтродукцією донору з метою індукції протипухлинного імунітету, опосередкованого лімфоцитами CTL (Townsend & Allison, 1993). Як зазначалося вище, вважається, що результатом поверхневої експресії CD80 пухлинними клітинами є специфічна CTL-відповідь, спрямована на зляксісну пухлину (Hodge et al., 1994). Крім того, в організмі-господарі утвориться популяція клітин пам'яті, що походить від CD8-позитивних Т-клітин (Hodge et al., 1994). Хоча даний підхід у цілому спрямований на протипухлинний імунітет, за аналогією його також можна поширити на розвиток противірусного імунітету.

Як обговорювалося вище, довгостроковий латентний стан синдрому придбаного імунodefіциту розглядається як наслідок вихідного формування могутньої CTL-опосередкованої імунної відповіді на ВІЛ-інфекцію (Landay et al., 1994). Передбачається, що ті хворі, які протягом довгого часу не виявляють симптомів СНІДу після зараження ним, здатні формувати і підтримувати сильний CTL-клітинний імунітет, спрямований проти ВІЛ.

Хоча більшість сучасних вакцин спрямовані на формування гуморальної імунної відповіді, однак якщо вакцина здатна індукувати розвиток популяції mCTL, спрямованої на віруси ВІЛ і FIV, те ця популяція повинна забезпечувати захист, подібний такому, який характерний для довгострокового безсимптомного СНІДу. Введення новим індивідуумам "генної" вакцини, у складі якої білки FIV об'єднані з білком CD80, повинне приводити до поверхневої експресії коstimуляторної молекули в сполученні з презентацією вірусних епітопів FIV, забезпечуваної молекулами MHC Cl. У випадку успіху це повинно привести до проліферації популяції FIV-специфічних лімфоцитів mCTL. Після наступного впливу вірулентного вірусу у вакцинованих індивідуумів буде відбуватися індукція відповіді на клітини, які були інфіковані даним вірусом, знищуючи їх до того, як цей вірус буде здатний розмножуватися і почне руйнувати компоненти імунної системи.

Приклад 6

Клоновані і секвеновані КДНК CD28 кішки

Введення

CD28 є поверхнево-клітинним глікопротеїном, що у нормі експресований у виді гомодимеру, складеного ідентичними субодинаціями з молекулярною масою 44 кда, з'єднаними дисульфідними зв'язками. Він входить в імуноглобулінове суперсімейство і характеризується наявністю єдиної позаклітинної варіабельної (V) ділянки, трансмембранного домену і короткого цитоплазматичного "хвоста" (Aruffo & Seed, 1987). Хоча ця молекула глікозилізована, вуглеводневі складові, очевидно, не беруть участь у зв'язуванні і приблизно забезпечують підвищення розчинності позаклітинного домену (Peach et al., 1994). КДНК, що кодує пептиди людини, пацюка, миші і кролика і аналогічна молекула курки були раніше клоновані і секвеновані (Linsley et al., 1995a).

CD28 виявляється в більшості тимоцитів CD4⁺/CD8⁺ і периферичних Т-клітин CD4⁺/CD8⁺ і характеризується посиленням експресії у відповідь на стимуляцію α CD3, TGA і ФМА і пригніченням її в результаті зв'язування з антитілом до CD28 (Linsley et al., 1993b). Незабаром після відкриття цього білка з'ясувалося, що CD28 відображає важливу роль у регуляції активації Т-клітин CD4⁺/CD8⁺ (June et al., 1990). На додаток до стимулювання активації і проліферації Т-клітин також було встановлено, що формування такого вторинного сигналу індукуює цитолітичну активність CTL (Azuma et al., 1993c).

CD28 експресується на ранніх етапах дозрівання Т-клітин. У той час як незрілі CD3-негативні клітини негативні і за CD28, проміжні клітини CD4⁺/CD8⁺ експресують цей білок на низькому рівні, а зрілі CD3-позитивні тимоцити CD4⁺/CD8⁺ експресують CD28 на високому рівні (Turka et al., 1991). У людини після дозрівання даний рецептор виявляється майже у всіх Т-клітинах CD4⁺ і більш чим у половини Т-клітин CD8⁺ (Turka et al., 1991), а також майже у всіх Т-лімфоцитів мишей (June et al., 1990). Після активації Т-клітин поверхнева експресія підсилюється, у той час як зв'язування даної молекули з відповідним їй лігандом або специфічними моноклональними антитілами обумовлює в активованих клітинах негативну регуляцію даного гену і на транскрипційному, і на трансляційному рівнях (Linsley et al., 1993a). Хоча CD28 виявляється в основному на лімфоцитах Т-клітинних популяцій, цей білок, як повідомлялося, виявляється в плазмацитомах кісткомозкових біопсійних пробах (Kozber et al., 1987) і експресується в культурах лінії лейкозних клітин, подібних до натуральних клітин-кілерів (Azuma et al., 1992).

CD28 виявляє визначений ступінь структурної гомології з іншим 87-рецептором - CTLA-4: вони обоє стосуються підродини в групі білків IgSF (Linsley et al., 1995a). Ці дві молекули включають позаклітинний IgV-домен, єдиний трансмембранний домен і короткий цитоплазматичний сигнальний домен (Araffo et al., 1987). Хоча сумарний рівень гомології між цими двома молекулами складає тільки 31%, існують дві короткі ділянки і специфічні залишки, що цілком інваріантні в цих двох молекулах: це відображає ймовірну важливу роль даних мотивів у розпізнаванні лігандів B7 і підтримці структурної цілісності (Leung & Linsley, 1994). Гексапептидний мотив MYPPPY зберігається у всіх виділених членів сімейства рецепторів CD28/CTLA-4 (Peach et al., 1994). Він картирується в CD3-подібній випетленій ділянці даних молекул; у випадку його мутування відбувається зниження авідності за зв'язуванням і у CD28, і в CTLA-4 (Peach et al., 1994). Ця ділянка, як передбачалося, служить потенційним сайтом зв'язування лігандів у складі обох білків - CD28 і CTLA-4, однак невідомо, або є ця ділянка прямим сайтом зв'язування ліганду B7 або ж він представляє структурні мотиви, що непрямим чином залучені в зв'язування (Peach et al., 1994). Незважаючи на консерватизм залишків у послідовностях CD28 і CTLA-4, CTLA-4 зв'яже CD80 і CD86 з більш високою авідністю, чим CD28 (Ellis et al., 1996). Таким чином, хоча в активованих Т-клітинах in vitro CTLA-4 експресований на рівні лише 2-3% від такого в CD28, він зв'яже ліганди з більшою в 20 разів авідністю (Linsley et al., 1995).

Хоча молекули CTLA-4 і CD28 еволюційно родинні і мають загальні ліганди, проте їхні функції і сигнальні здібності, очевидно, диференційовані (Balazano et al., 1992). Порівняння сигнальних ділянок у складі кожної з цих молекул не відображає істотний рівень ідентичності: отже, ці молекули ініціюють різні сигнальні механізми (Hutchcroft & Bierer, 1996).

У той час як CD28 експресований Т-клітинах, що знаходяться в стані спокою і позитивно регулюється на початку відповіді на активацію, експресія CTLA-4 досягає піку через 48 годин після активації і повертається на вихідний рівень через 96 годин після активації (Linsley et al., 1992a). Експресія CTLA-4, як передбачається, погоджується з негативною регуляцією CD28 (Lindsten et al., 1993). Крім того, сигнальні механізми, опосередковані зв'язуванням лігандів рецептором CD28, очевидно, відіграють важливу роль в інтенсифікації експресії CTLA-4 (Linsley et al., 1993a). Т-клітини, що негативні за CD28, не експресують CTLA-4 у відповідь на стимуляцію ФМА або джерелом іонів кальцію (Lindsten et al., 1993).

Повна послідовність подій в опосередкованому CD28 сигнальному шляху поки не визначена, хоча існує гіпотеза про склад цього каскаду процесів (Hutchcroft & Bierer, 1996).

Було висловлене припущення про те, що сигнальний механізм CD28 залучає мобілізацію внутрішньоклітинного кальцію, метаболізм фосфатидилінозитулу і індукцію фосфорилування білків за залишками тирозину (Hutchcroft & Bierer, 1996).

Цитоплазматичний "хвіст" молекули CD28 включає визначені мотиви, для яких передбачається участь у внутрішньоклітинних сигнальних процесах після зв'язування лігандів CD80 або CD86 (June et al., 1994). Внутрішньоцитоплазматична ділянка, яка складається з 41 амінокислот не має виявленої каталітичної активності, тому що не включає внутрішньоклітинних мотивів "тирозинової активації" (як у послідовності TCR) або залишків цистеїну, необхідних для зв'язування цитоплазматичних тирозинкіназ сімейства Src (June et al., 1994). Однак деякі із сайтів потенційного глікозилування в складі виділених послідовностей консервативні (Hutchcroft & Bierer, 1996). Внутрішньоклітинна каталітична, активність і міжбілкові взаємодії часто регулюються за шляхом диференційованого фосфорилування білків, хоча ферменти, які б забезпечували таку активність рецептора CD28, поки не визначені (Lu et al., 1992). Консенсусний мотив YMXM, наявний у складі цитоплазматичного домену, є передбачуваним сайтом Src-гомології фосфотизованого зв'язування (домен SH2), що визначає, в свою чергу, зв'язування фосфатидилінозитол-3-кінази (кінази PI3) (Prasad et al., 1995). Хоча це є лише одним з можливих сигнальних механізмів для участі CD28, було показано, що активність кінази PI3 не корелює з активністю IL-2; але тому що збільшення вироблення IL-2 є первинним наслідком сигнальної активності CD28, то представляється, що інші механізми впливають на активність, що обумовлюється внутрішньоклітинними сигнальними процесами (June et al., 1994).

Хоча значення цих процесів поки цілком не розшифроване, коstimуляція CD28 приводить до посилення вироблення цитокінів Т-клітинами. У CD28-позитивних Т-клітинах, активованих дією антитіл до CD3 або ФГА, анти-CD28 обумовлює перевищення вихідного рівня РНК ряду цитокінів, включаючи IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, фактор некрозу пухлин (TNF α), лімфотоксин, γ -інтерферон і фактор гранулоцитів-моноцитів, що колоніє-стимулює, (GM-CSF), так само як і рецептор інтерлейкіну-2 (Lenschow et al., 1996). Підвищення вихідного вмісту мРНК обумовлюється і підвищенням рівня транскриптів, і інтенсифікацією самої транскрипції (Hutchcroft & Bierer, 1996). Хоча коstimуляція CD28 уперше була описана в клонах CD4-позитивних Т-клітин (Martin et al., 1986), зараз відомо, що CD28 бере участь в активації багатьох типів клітин. Коstimуляція цього механізму, як було показано, регулює в субпопуляціях "наївних" Т-клітин CD4⁺ вироблення γ -інтерферону, цитокінів Th1-відповіді і вироблення IL-4, що є цитокіном Th2-відповіді (Seder et al., 1994). Коstimуляторний механізм за участю CD28 також важливий для активації CTL CD8⁺, хоча, очевидно, він не є необхідним для ефекторної фази знищення клітин за участю CTL (Hodge et al., 1994). Цікаво, що CD28 також приблизно відіображає роль у процесах ВІЛ-інфекції. У культивованих лімфоцитах, що походять від деяких пацієнтів з позитивною реакцією на СНІД, зв'язування CD28 з моноклональним антитілом може підсилювати розмноження вірусу ВІЛ (Asjo et al., 1993).

У приматів і гризунів вторинний сигнал, утворений у результаті зв'язування CD80 з CD28, чітко вказує на його роль у вихідній активації Т-клітин (Aruffo & Seed, 1987). Недавно отримані дані, однак, дозволяють припустити, що основний наслідок такої взаємодії може бути спрямований на забезпечення проліферації за рахунок пригнічення апоптозу (Lenschow et al., 1996). Т-клітини, які знаходяться в стані спокою і в G₀-фазі росту, можуть активуватися шляхом утворення комплексу TCR, однак вони не здатні проліферувати або секретувати IL-2 під час відсутності, зв'язування CD28: такий ефект називають анергією (Linsley et al., 1991a). Зрілі Т-клітини можуть активуватися винятково за зв'язуванням TCR з молекулами МНС на поверхні клітин APC, однак це в кінцевому рахунку приводить до активації індукованої клітинної загибелі, тобто до апоптозу (Radvanyi et al., 1996). Хоча інші вторинні взаємодії (наприклад, коstimуляція ICAM-1) можуть формувати допоміжні сигнали до проліферації, передбачається, що CD28-опосередкована коstimуляція є унікальним механізмом, що запобігає наступному виникненню клоніальної анергії і апоптозу (Linsley et al., 1993a). Було показано, що CD28 може брати участь у регуляції генів, для яких відома залученість у захисті Т-лімфоцитів від апоптозу (Boise et al., 1995). Постійне посилення експресії bcl-X_L було виявлене в Т-клітинах, коstimульованих зв'язуванням на рецепторі CD28 (Boise et al., 1995). Вважається, що коstimуляція CD28 може стабілізувати мРНК bcl-X_L, з яким транслюється білок, що запобігає апоптозу (Radvanyi et al., 1996).

Зв'язування на CD28, як було показано, сприяє посиленню вироблення різних цитокінів Т-хелперами у відповідях і 1-го, і 2-го типів (Lenschow et al., 1996). Також передбачається, що ця взаємодія бере участь у формуванні конкретних типів Т-хелперов. "Наївні" CD4-позитивні Т-лімфоцити повинні в нормі формувати фенотип Th1, якщо вони активувалися під час відсутності сигнального шляху, опосередкованого зв'язуванням CD28/CD80 (Lenschow et al., 1996). Це може мати непряме значення у виробленні IL-4, індукованої додаванням

екзогенного IL-2, у той час як роль сигналів CD28 у виробленні IL-2 раніше вже була підтверджена (Seder et al., 1994). Проведені дослідження на мишах, "виключених" за геном CD28, додатково підтвердили роль цього рецептора в диференціюванні клітин Th2.

Миші, що є гомозиготними нульовими мутантними за CD28, були отримані Шахіняном зі співавторами з метою встановлення того, як тварина адаптується до інфекції під час відсутності вторинного сигналу, генерованого CD28 (Shahinian et al., 1993). Цей ген був зруйнований в ембріональних стовбурних клітинах шляхом часткового заміщення другого екзону геном резистентності до неоміцину (Shahinian et al., 1993). Було показано, що миші, гомозиготні за "виключеним" геном, не експресують CD28 на своїх Т-клітинах, у той час як гетерозиготні особини CD28 (-/+), як було встановлено, характеризуються зниженою поверхневою експресією цього рецептора (Shahinian et al., 1993). Стимуляція мітогеном Т-клітин, похідних від гомозиготних "виключених" за CD28 мишей, послабляє проліферацію Т-клітин і вироблення цитокінів, що може бути лише частково відновлено дією екзогенного IL-2 (Shahinian et al., 1993). Було показано, що високоочищені Т-клітини не активуються пектинами під час відсутності клітин APC (Ulanue, 1984). На матеріалі названому "виключеною" лінією було показано, що взаємодія CD28/CD80 необхідна для прояву мітогенної активності Т-клітинних лектинів (Shahinian et al., 1993). Також було виявлено, що дана взаємодія є важливим для опосередкування переключення ізотипів В-клітин у відповідь надію антигену (Shahinian et al., 1993). На відміну від "виключених" за CD80 мишей, функціональна роль CD28 може бути встановлена із застосуванням генноінженерної технології "вимикання генів". Про мишей, "виключених" за геном CTLA-4, поки не повідомлялося, однак миші, понадекспресуючі CTLA-4 Ig, уже були досліджені (Lane et al., 1994). Як і передбачалося, фенотипічні характеристики цієї лінії мишей подібних до ознак ліній, дефіцитних за CD28 (Lane et al., 1994). Хоча ізольовані Т-клітини виробляють нормальну кількість Г-інтерферону, після стимуляції виявляється істотно менша кількість IL-4 (Ronchese et al., 1994). Це приводить до нездатності В-клітин ініціювати або підтримувати точну гуморальну імунну відповідь (Ronchese et al., 1994). Хоча відомі різні передбачувані шляхи диференціювання Th1 і Th2, взаємодія CD28/B7 чітко впливає на диференціювання підгруп Т-лімфоцитів.

Стабілізація мРНК інтерлейкіну-2 може відігравати ключову роль у зв'язуванні на CD28, однак деякі інші цитокіни, як було показано, прямо або опосередковано впливають на цю взаємодію (Linsley et al., 1991a). Медіатори запалення IL-1 α , IL-6 і TNF α виробляються популяціями Т-клітин пам'яті у відповідь на сигнал молекул CD28, у той час як у популяціях "наївних" клітин виробляється тільки IL-1 α (Cerdan et al., 1991; van Kooten et al., 1991). Експресія IL-4 також регулюється за участю сигнального механізму CD28 (Seder et al., 1994). Також зазначена взаємодія забезпечує позитивну регуляцію IL-5, IL-10 і IL-13, що є важливими медіаторами гуморальної відповіді (de Waal Malefyt et al., 1993; Minty et al., 1993). Крім того, фактори, що колоніє-стимулюють, і фактори росту, включаючи GM-CSF, CSF-1 і IL-3, і хемотаксичні фактори, включаючи IL-8, позитивно регулюються за участю сигналу, генерованого рецептором CD28 (Harlan et al., 1995).

З врахуванням того, що вище зазначалося ймовірно використання CD80 в індукції протипухлинного імунітету, існує ряд інших потенційних способів клінічного застосування CD28 і CD80. Запобігання взаємодії між CD28 і CD80, як було показано в модельній системі гризунів, сприяє профілактиці або лікуванню ряду аутоімунних захворювань, профілактиці відторгнення органів або прояву реакції "трансплантат проти господаря", а також профілактиці секреції цитокінів, асоційованої із сепсисом (Harlan et al., 1995; Nickoloff et al., 1993; Thomas et al., 1994; Zhou et al., 1994). Додавання CTLA-4 Ig з метою блокування взаємодії CD28/CD80 у мишей може запобігати симптомам вовчаночного типу в мишей лінії NZB/NZW і частково захищати від летального EAE і від летального нефриту в пацюків (Harlan et al., 1995). Хоча даний імунотерапевтичний підхід у відношенні аутоімунних захворювань для людини поки не застосовувався, було встановлено, що в медичній практиці при біопсіях у пацієнтів із псоріазом і ревматоїдним артритом виявляється експресія CD80, у той час як у нормальних біопсійних пробах така експресія відсутня (Nickoloff et al., 1993; Thomas et al., 1994). При пересадженнях кісткового мозку і органів у мишей і в модельних експериментах на людині *in vitro* додавання CTLA-4 Ig і запобігання взаємодії CD28/B7 може обумовлювати принаймні частковий захист від відторгнення органу, прояву реакції "ТПХ" або індукцію антиген-специфічної стійкості (Harlan et al., 1995). Нарешті, секреція цитокінів і прояв сепсису, що може приводити до зараження крові і септичного шоку, можуть бути відвернені в мишей шляхом прижиттєвого введення CTLA-4 Ig (Zhou et al., 1994). Маніпуляції взаємодією CD28/CD80 дозволяють глибше зрозуміти процеси Т-клітинної стимуляції і дозволяють наблизитися до вирішення різних проблем.

Матеріали і методи

Виділення вихідного фрагмента CD28

мРНК екстрагували з лімфоцитів периферичної крові тварини НК5, простимульованих протягом 16 годин Кон-А, з використанням реагенту для РНК-екстракції RNeasy (Biotex, Houston, TX). В завершення кДНК синтезували на матриці виділеної РНК з зворотною транскриптазою (ОТ), використовуючи як 3'-праймери оліго-dТ. РНК і оліго-dТ нагрівали до 75°C на 3 хвилини для видалення вторинних структур. Потім додавали ОТ, dNTP, буфер і дистильовану воду і отриману суміш інкубували протягом 1 години при 42°C. Після інкубації зразок нагрівали до 95°C на 5 хвилин з метою інактивації ОТ. Вироджені праймери, похідні від консенсусних сегментів, знайдених в опублікованих нуклеотидних послідовностях CD28 людини, миші і кролика (GenBank, Bethesda, MD), потім використовували для вихідної ампліфікації 673-нуклеотидного фрагмента кодуєчого велику частину відкритої рамки:

CD28-113: CAA CCT TAG CTG CAA GTA CAC (SEQ ID NO: 70)

CD28-768: GGC TTC TGG ATA GGG ATA GG (SEQ ID NO: 71).

Метод ПЛР "з гарячим стартом" на основі використання Taq-полімерази застосовували для ампліфікації

продукту (5 хвилин при 95°C - 1 цикл; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 48°C і 45 секунд при 72°C - 30 циклів; 7 хвилин при 72°C - 1 цикл). Потім отриманий фрагмент візуалізували в 1%-вому агарозному гелі і лігували до складу клонуючого вектора TA (InVitrogen, San Diego, CA) і секвенували відповідно до описаного вище. На основі послідовності кДНК були отримані специфічні 3'-праймери, що синтезували для використання в методі 5'-RACE:

CD28-190: CGG AGG TAG AAT TGC ACT GTC C (SEQ ID NO: 72)

CD28-239: ATT TTG CAG AAG TAA ATA TCC (SEQ ID NO: 73).

Виділення 5'-сегмента

Модифікований за GIBCO протокол методу 5'-RACE (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) використовували для одержання 57-послідовності молекули, що залишилася, CD28 кішки. РНК екстрагували з РВМС, простимульованих протягом 16 годин Кон-А. Зворотний ген-специфічний праймер використовували для синтезу першого ланцюга кДНК. РНК і цей праймер нагрівали до 75°C на 5 хвилин з наступним додаванням інших ОТ-реагентів. Після денатурації отриману суміш охолоджували до 4°C і додавали реакційний буфер, хлорид магнію, dNTP, дитіотреїтол і зворотну транскриптазу Superscript (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Суміш з ОТ інкубували при 42°C на протязі 30 хвилин і потім нагрівали до 70°C на протязі 15 хвилин з метою денатурації ОТ. Потім додавали РНКазу суміш і реакцію інкубували при 55°C на протязі 10 хвилин, з метою видалення залишків РНК і запобігання неправильного добудування за участю термінальної трансферази (Td). Потім кДНК очищали з використанням центрифужної колонки GlassMax (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) з метою видалення не включавшихся нуклеотидів і праймера. Потім очищену кДНК, елуйовану з даної колонки, замикали за допомогою Td. Td використовували для додавання 20-30-нуклеотидного дезоксицитидинового "хвоста" до кДНК. Цей фермент додавали до суміші очищеної кДНК, хлориду магнію, реакційного буфера і dCTP після 3-хвилинної денатурації кДНК при 95°C. Реакцію інкубували при 37°C на протязі 10 хвилин і фермент потім інактивували нагріванням до 70°C на протязі ще 10 хвилин. кДНК із приєднаним "хвостом" ампліфікували з використанням Таq-полімерази в реакції ПЛР із "гарячим стартом" (5 хвилин при 95°C; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 55°C і 45 секунд при 72°C - 35 циклів; 72°C на протязі 7 хвилин). Праймерами для цієї реакції були зворотний праймер, відповідний 5'- ділянці праймера для синтезу кДНК, і якірний праймер, специфічний для dC-лінкера і який складається, в основному, з залишків dG і невеликого числа dl. 1мкл цієї реакції розбавляли додаванням 50мкл води і 5мкл отриманої суміші потім використовували для "гніздової" ПЛР (5 хвилин при 95°C - 1 цикл; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 55°C і 45 секунд при 72°C - 30 циклів; з химерною полімеразою KlenTaq) з якірним прямим праймером dG/dl і додатковим верхнім "гніздовим" ген-специфічним зворотним праймером. 30мкл "гніздової" реакції потім візуалізували в 1,5%-вому агарозному гелі і точний фрагмент вирізавали з гелю. кДНК очищали відповідно до описаного вище з використанням гель-розпилювача Amicon і фільтра Micropure (Amicon, Beverly, MA) . Очищений зразок кДНК секвенували методом секвенування з кінцевою флуоресцентною міткою (Perkin Elmer, Norwalk, CN) . На матеріалі завершених фрагментів визначили консенсусну послідовність. На основі цієї послідовності була синтезована пара праймерів, що відповідали повнорозмірній кодуючій рамці гену CD28 кішки:

Прямий feCD28: CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG (SEQ ID NO: 13)

Зворотний feCD28: CGC GGA TCC TCT GGA TAG GGG TCC ATG TCA G (SEQ ID NO: 14).

З використанням цих праймерів молекулу кДНК, що включає повнорозмірну кодуючу ділянку, ампліфікували на матеріалі кДНК, синтезованої на РНК із РВМС, узятих у тварин ЕК6 і ED3 і простимульованих Кон-А. Ця похідна від РВМС кДНК була отримана раніше і, як було встановлено, включала РНК, що відповідає даному гену. У даної ПЛР (5 хвилин при 95°C - 1 цикл; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 42°C і 45 секунд при 72°C - 30 циклів; 72°C на протязі 7 хвилин) використовували ДНК-полімеразу KlenTaq, що запобігає випадковим помилкам, що звичайно супроводжується при використанні Таq-полімерази, і в результаті одержали 754-нуклеотидний фрагмент, що клонували до складу клонуючого вектора TA і секвенували відповідно до описаного раніше. Як і у випадку з молекулою CD80, кожен нуклеотид підтверджували принаймні за трьома незалежно отриманими послідовностями.

Результати

Вироджені праймери, обрані за параметрами консенсусних ділянок послідовностей кДНК CD28 мишей, людини і кролика, використовували в ПЛР з успішним одержанням продукту, що охоплює практично всю кодуючу послідовність кішки. Завдяки більш високому ступеню консерватизму, властивого молекулі CD28, у результаті вихідної ампліфікації з використанням даних вироджених праймерів одержали віртуально повнорозмірну молекулу. На відміну від молекули CD80 кішки, у якій спочатку був отриманий тільки невеликий центральний фрагмент, у кодуючій рамці, кДНК CD28 не "вистачало" лише 113 "крайніх" 5'-нуклеотидів. Цей вихідний фрагмент послідовності виявляв 86%-вий рівень гомології з аналогічною ділянкою послідовності людини, 86%-вий рівень гомології з кДНК кролика і 79%-вий рівень гомології з кодуючою послідовністю миші.

Старт-кодон ATG і додаткові 110 нуклеотидів, а також деякі 5'-фланкуючі послідовності були виділені з застосуванням методу 5'-RACE (Gibco, Gaithersburg, MA). У реакції "приєднання хвоста" використовували кДНК, отриману на матеріалі РНК клітин РВМС кішки ЕК6, простимульованих Кон-А. На цьому матеріалі в результаті ампліфікації з праймером CD28-786 і якірним праймером dG одержали невеликий розрізняльний матеріал.

Хоча не було виявлено помітних бендів при ампліфікації з комбінацією праймерів dG/CD28-786, розведenu кДНК із цієї реакції ампліфікували з використанням "гніздових" праймерів для CD28 - CD28-182 і CD28-239. Виразний бенд був присутній в області приблизно 600 пар нуклеотидів. Цей продукт виділили з агарозного гелю і секвенували з підтвердженням наявності в ньому 5'-фрагмента, включаючи старт-кодон і фланкуючу

послідовність за його межами.

На основі нуклеотидної послідовності цих продуктів був сформований прямий праймер, що включав старт-кодон. Цей праймер у сполученні з 3'-конструкцією використовували для ампліфікації кДНК з екстрактів РНК клітин РВМС, взятих у тварин ЕК6 і ED3 і простимульованих Кон-А, і одержали 754-нуклеотидний фрагмент.

Принаймні два продукти від кожної тварини секвенували повністю і кожен нуклеотид перевіряли і підтверджували принаймні за трьома незалежним точно ліченими послідовностями. Після цього повнорозмірний продукт секвенували зі складу клонуєчого вектора ТА з метою підтвердження точності і відтворюваності отриманого продукту.

В остаточному 685-нуклеотидному фрагменті, що складає повну відкриту рамку, старт-кодон АТГ знаходиться в положенні 1, стоп-кодон - у положенні 664-666, а ще 19 нуклеотидів складають 3'-UTR. Як і у випадку з молекулою CD80 кішки, положення старт-кодону АТГ підтвердили за параметрами секвенування продуктів реакції 5'-RACE (дані не включені).

Ген CD28 кішки, будучи секвенованим, виявив найбільший рівень сумарної ідентичності з послідовностями кролика і людини. Гомологія з кДНК також була значна, хоча ідентичність з послідовністю курки виражалася в меншому ступені і була порівняна з рівнями подібності інших генів, порівнюваних у курки і ссавців (таблиця 2).

Вид	Відсоток гомології з послідовністю кішки	
	Амінокислотна	Нуклеотидна
Людина	85%	82%
Миша	77%	74%
Кролик	84%	84%
Курка	59%	50%

Амінокислотна послідовність була розшифрована за нуклеотидною послідовністю відповідно до описаного вище. Величини ідентичності розшифрованої амінокислотної послідовності з іншими опублікованими послідовностями виявилися порівнянні з ідентичністю на рівні нуклеотидних послідовностей. Сигнальний сегмент пептиду простирається від старт-залишку метіоніну до 19-ої амінокислоти. Представляється, що, як і в інших клонованих поліпептидах CD28, у молекулі кішки єдиний позаклітинний варіабельний імуноглобуліноподібний домен приходить на залишки 19-153. Гідрофобний трансмембранний домен займає наступні 27 залишки, а ще 41 амінокислота складають цитоплазматичний "хвіст". Як і молекула CD28 людини, поліпептид кішки включає п'ять сайтів потенційного N-глікозилування.

Порівняння розшифрованої амінокислотної послідовності білків CD28 кішки і людини показало наявність ділянок гомології при деяких розходженнях. Більшість змін приходяться на трансмембранний домен, сигнальний сегмент і N-кінцевий домен. Найвищий рівень гомології характерний для центрального IgV-подібного домену і для цитоплазматичного "хвоста".

Порівняння молекули CD28 кішки з розшифрованими амінокислотними послідовностями членів сімейства CD28/CTLA-4 людини і миші показало, що, хоча загальний рівень гомології членів цієї групи білків складає лише 25%, зберігаються специфічні ділянки і амінокислоти. Мотив MYPPPY зберігається в всіх членів цієї групи. В послідовності кішки передбачається наявність додаткових залишків, важливих для забезпечення структурної цілісності, включаючи ряд консервативних залишків цистеїну.

Цитоплазматичний домен у молекулі CD28 характеризується консерватизмом середнього ступеня в порівнянні з іншими опублікованими послідовностями, особливо послідовностями ссавців. Передбачається, що різні внутрішньоклітинні сигнальні механізми опосередковуються перехресним зв'язуванням позаклітинного сегмента даного рецептора (Hutchcroft & Bierer, 1995).

Графіки гідрофільності розшифрованої амінокислотної послідовності CD28 кішки при порівнянні з такими ж графіками поліпептиду людини додатково показують імовірність того, що кожен з цих білків характеризується подібною структурою. Однак, при наявності заміни амінокислот це, очевидно, не приводить до істотних змін гідрофільності даної молекули: це відображає в основному гомологічну природу таких заміни амінокислот. Потрібно відмітити, що дуже високий рівень подібності профілів гідрофільності характеризує трансмембранні домени пептидів кішки і людини, що характеризуються лише 75%-вим рівнем гомології.

Обґрунтування

Усі послідовності клонованих молекул CD28 виявляють середній рівень еволюційного консерватизму. Можна припустити, що участь цієї молекули в активації і опосередкуванні Т-клітинного імунітету має місце в різних вищих хребетних тварин - від курячих птахів "через" гризунів і хижих ссавців до вищих приматів.

Порівняння амінокислотних послідовностей кожної з цих молекул вказує на середній рівень гомології ділянок позаклітинного домену, що приблизно залучений у зв'язування ліганду, а також внутрішньоклітинних ділянок, що приблизно беруть участь у формуванні внутрішньоклітинних сигналів. У цілому, найвищий рівень гомології виявляється в ділянці, що оточує передбачуваний сайт зв'язування ліганду - MYPPPY, - розташований у складі IgV-подібного домену поліпептиду кішки, амінокислоти 118-123.

Передбачуваний сигнальний сегмент відповідає ділянці від початкового метіоніну до 19-го залишку (Aruffo et al., 1987). Мономер CD28 складений єдиним позаклітинним варіабельним імуноглобуліно-подібним доменом, займаючим амінокислоти 19-153 (Aruffo et al., 1987). Гідрофобний трансмембранний домен приходить на

наступні 27 залишки, після якого розташований 41-амінокислотний цитоплазматичний домен (Aruffo et al., 1987). Білок кішки включає 5 сайтів потенційного N-глікозилування в ідентичних положеннях стосовно того, що було знайдено в поліпептиді людини. Цікаво, що сайтом глікозилування, що знаходиться в залишку 105 білка кішки, є мотив NQS, у той час як у послідовності людини він - NQT. Така амінокислотна дивергенція додатково підтверджує те, що, незважаючи на наявність змін у послідовностях, їх загальні структурні характеристики зберігаються.

Як можна було очікувати виходячи з рівнів гомології, що виявляються цими білками, порівняння графіків гідрофільності CD28 кішки і людини показує, що ці молекули характеризуються в принципі подібними конформаційними параметрами. Однак також зрозуміло, що у випадку заміни амінокислоти результуючі зміни виявляються гомологічними. При тому, що трансмембранний домен є областю даної молекули, що характеризується найменшим рівнем консерватизму при простому збереженні ним властивості гідрофобності, цитоплазматичний домен молекули CD28 кішки в порівнянні з іншими опублікованими послідовностями консервативний у середньому ступені. Передбачається існування ряду внутрішньоклітинних сигнальних механізмів, опосередкованих зв'язуванням на даному рецепторі, і, хоча внутрішньоклітинний сегмент поліпептиду CD28 не має власної каталітичної активності, проте зв'язування ним ліганду обумовлює активацію внутрішньоклітинних ефекторних молекул (Aruffo et al., 1987). Існує чотири консервативних залишки тирозину (положення 173, 188, 191 і 200), для яких передбачалося їх фосфорилування (Lu et al., 1992). З іншого боку, мотив MNM, що починається з 193 амінокислоти молекули кішки, розглядається як сайт домену SH2 у білках людини і миші (Prasad et al., 1995). Потенційний сайт фосфорилування за участю протеїнкінази-C залишається в залишку серину-185, у той час як треонін-202 може бути мішенню для атаки пролін-орієнтованої активності серин-треонінових протеїнкіназ Erk1 або Erk2 (Hutchcroft & Bierer, 1996). Як зазначалося вище, сигнальна функція рецептора CD28 є різноманітною, тому зовсім не дивно те, що його цитоплазматичний домен включає трохи потенційних сайтів атаки для сигнальних медіаторів.

Майбутнє використання молекули CD28 кішки повинне включати розробку способів виявлення поверхневої експресії цього рецептора і контролю експресії CD28 після зараження вірусом, таким як FIV. Якщо такий спосіб може бути об'єднаний із вже існуючими способами виявлення мРНК, то може бути отримана цінна інформація про рівень експресії в процесі інфікування. Наступний зв'язок параметрів експресії CD28 у ході хронічної FIV-інфекції дозволить розглядати організм кішки як репрезентативну модель ВІЛ-інфекції людини, що дозволить дати більш точні дані про інфекційні процеси в обох видах організмів.

Приклад 7

Експресія білків CD28/CD80

Введення

При тому, що зв'язки в імунній системі за більшою частиною опосередковані "розчинними" (немембранними) факторами, ініціація первинної Т-клітинної відповіді в приматів і гризунів, як було встановлено, залежить від безпосереднього міжклітинного контакту (Mescher, 1992). Спочатку вважалося, що така взаємодія містить у собі лише взаємодію між TCR на поверхні Т-клітини і молекулою МНС на поверхні антиген-презентуючої клітини, однак потім стало зрозуміло, що зв'язування між допоміжними молекулами також необхідне для повної активації Т-клітини (Schwartz, 1992). Як обговорювалося вище, був отриманий доказ взаємодії між білками CD28 і CD80, як медіаторами такого допоміжного сигналу (Linsley et al., 1991a).

Багато з важливих рецепторів і лігандів у хребетних тварин стосуються суперсімейства імуноглобулінів (Springer, 1990). Ці молекули характеризуються присутністю імуноглобуліно-подібної ділянки - звичайно в позаклітинній частині даної молекули (Buck, 1992). Хоча рівні консерватизму неоднакові, часто він обмежений саме тими залишками, що забезпечують просторове укладання білка за імуноглобуліновим типом (Beaie, 1985). Характеристикою Ig-домену є наявність двох тісно взаємодіючих антипаралельних В-ланцюгів, зв'язаних петлею, що забезпечує консервативну топологію (Williams & Barclay, 1988). Хоча існують загальні ознаки структури членів даного сімейства, існує розмаїття у параметрах зв'язування і сигнальних властивостях у окремих представників даного сімейства (Andersen et al., 1988).

Будучи членами сімейства IgSF, і CD28, і CD80 деякою мірою подібні за структурою своїх позаклітинних доменів. У CD28 існує єдиний V-подібний домен, хоча він і експресований у виді гетеродимеру, зв'язаного дисульфідними "мітками" (Aruffo et al., 1987). Позаклітинна ділянка молекули CD80, однак, включає і V-, і C-подібні імуноглобулінові домени і експресується як мономер (Freedman et al., 1989). Оскільки члени сімейства IgSF характеризуються загальними структурними параметрами, принаймні в обмеженому ступені можна переносити деякі шаблони просторової структури на родинні молекули, що кристалізувати не вдається (Vajorath et al., 1993). Хоча кристалізація ні CD28, ні CD80 не була здійснена, методами рентгенографічної кристалографії були досліджені молекули CD2 (Driscoll et al., 1991) і CD8 (Leathy et al., 1992), що характеризуються аналогічними позаклітинними доменами, що дозволило визначити деякі принципи структури родинних молекул сімейства IgSF (Linsley et al., 1995a).

Як зазначалося вище, CD80 і CD86 виявляють подібні активності за зв'язуванням на рецепторах CD28 і CTLA-4. Однак CD28 є менш афінним рецептором для цих лігандів, у той час як CTLA-4 - більш афінний стосовно обох цих молекул (Linsley et al., 1994a). Хоча ймовірний механізм відомий, поки не зрозуміло, як низькоафінний рецептор, що характеризується високою швидкістю відщеплення ліганду, що характерно для CD28, здатний забезпечувати необхідний коstimulatoryний сигнал у диференціюванні Т-клітин (Linsley et al., 1995a). Передбачається, що зв'язування CD80 на CD28 на поверхні Т-клітин може сприяти олігомеризації даного рецептора, що і забезпечує ефективність зв'язування і вироблення сигналу (Linsley et al., 1995a). Було показано, що CD28 рівномірно розподілений на поверхні активованих Т-клітин: тобто приблизно ці молекули

переміщуються на мембрану після завантаження Т-клітини (Damie et al., 1994). Висока концентрація олігомеризованного CD28 буде сприяти реасоціюванню вільних CD28 в області міжклітинного контакту і тим самим забезпечувати генерування сигналу, незважаючи на швидке відщеплення ліганду (Linsley et al., 1995a).

Такий процес, названий "взаємним кепіруванням", хоча прямо і не встановлений при взаємодії CD28/CD80, був підтверджений для інших рецепторів, для яких необхідний схожий ініціюючий міжклітинний контакт (Singer, 1992). Хоча, як було показано, взаємодія CD28/CD80 є ключовим у розвитку Т-клітинної імунної відповіді, дотепер залишаються питання в з'ясуванні точного механізму даного сигнального механізму (Linsley et al., 1993a). Існування двох рецепторів і двох лігандів у даній взаємодії піднімає питання про роль кожного з них в активації Т-клітин (Linsley et al., 1992b). Хоча рецептор CTLA-4 виявляє більш сильне зв'язування, він експресується набагато пізніше події активації, і хоча сигнальні механізми зв'язувалися з CD28, так і не було визначено, чи генерується сигнал після зв'язування ліганду на рецепторі CTLA-4 (Linsley et al., 1995a).

Матеріали і методи

Одержання вставок

Наступні праймери використовували для ампліфікації повнорозмірної рамки генів, що кодує, CD28 і CD80 кішки для вбудовування його в експресуючі вектори:

Прямий feCD80: CGC GGA TCC GCA CCA TGG GTC ACG CAG CAA AGT GGA AAA C (SEQ ID NO: 11)

feCDSO-960: CCT AGT AGA GAA GAG CTA AAG AGG C (SEQ ID NO: 12)

Прямий feCD28: CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG (SEQ ID NO: 13)

Зворотний feCD28: CGC GGA TCC TCT GGA TAG GGG TCC ATG TCA G (SEQ ID NO: 14).

Прямий праймер для CD80 і обидва праймери для CD28 були сконструйовані з включенням BamHI-сайтів і придатними лінкерами з метою полегшення вбудовування за множинними сайтами клонування. 3'-Розташований BamHI-сайт вносили в послідовність CD80 шляхом розщеплення клонуючого вектора TA. Також прямі праймери включали бокс Козака і старт-кодон ATG обох генів. У кожному випадку отримані праймери використовували для ампліфікації з матриці, що кодує повнорозмірну послідовність кожного гену, що були попередньо внесені до складу клонуючого вектора TA, описаного вище. Приблизно 10нг кожної такої плазміді використовували в ПЛР із Таq-полімеразою (5 хвилин при 95°C - 1 цикл; 30 секунд при 95 °C, 30 секунд при 60°C і 45 секунд при 68°C - 30 циклів; 7 хвилин при 68°C - 1 цикл). Ампліфіковані продукти візуалізували методом електрофорезу в агарозному гелі і потім лігували до складу клонуючого вектора TA (InVitrogen, San Diego, CA) відповідно до описаного вище. Реакцію лігування використовували для трансформації компетентних клітин Inv α F' і позитивні клони скринували і відбирали відповідно до описаного вище.

Клоновані в плазміді рSI

Для клонування до складу вектора рSI, призначеного для трансформації клітин COS-7, цю плазміді розщеплювали рестриктазою EcoRI і потім цей фермент видаляли з використанням центрифужної колонки Micropure EZ (Amicon, Beverly, MA). Після видалення рестриктази плазміді обробляли сумішшю фенолу і хлороформу з метою видалення залишкового білка і осаджували спиртом. Вставки відщепляли від 50мкг очищеної реактивами QIAGEN плазмідної ДНК (Qiagen, Chatsworth, CA) тих клонів, що включають клонуючий вектор TA з правильними вставками, використовуючи EcoRI-сайти, що існують у фланкуючих вставку послідовностях вектора. 100мкл відщепленого матеріалу піддавали електрофорезу в 1,5%-вому агарозному гелі і відщеплений фрагмент вирізали з гелю. Вставку потім очищали з агарози з використанням гель-розпилювача і фільтра Microcon (Amicon, Beverly, MA). Обробку EcoRI-розщепленої плазміді рSI лужною фосфатазою використовували для зниження імовірності лігування даного вектора самого на себе. Шляхом обробки протягом 1 години при 37°C 0,1од./мкг лужної фосфатази кишечника теляти (ЛФКТ) дефосфорилували розщеплені кінці вектора. ЛФКТ видаляли шляхом теплової денатурації при 65°C на протязі 30 хвилин з наступним очищенням на центрифужній колонці Micropure EZ (Amicon, Beverly, MA). Вставки лігували прямо в розрізаний і дефосфорилований вектор рSI протягом ночі при 16 °C з використанням ДНК-лігази фагу T4. Молярне відношення ліганду і вектора складало приблизно 3:1 при співвідношенні 0,05мкг вставки CD28 або CD80 до 0,1мкг рSI. Потім 1мкл реакції лігування використовували для трансформації компетентних клітин Inv α F. Ці клітини висівали смугами на пластини LB, що містять 50мкг/мл ампіциліну. Пластини інкубували протягом ночі при 37°C і наступного дня отримані колонії пересівали в 5мл рідкого середовища LB, що містить 100мкг/мл ампіциліну. Після інкубації протягом ночі при 37 °C з обертанням при 220об./хв. плазмідну ДНК екстрагували методом лужного лізису, ДНК очищали шляхом екстракції фенол-хлороформом і осаджали двома об'ємами 95%-вого етанолу. ДНК обробляли РНКазою і потім розщеплювали обробкою 10од. рестриктази EcoRI. Продукти розщеплення візуалізували в 1%-вому агарозному гелі з метою ідентифікації позитивних клонів. Потім плазмідну ДНК екстрагували з нічної культури позитивного клону об'ємом 5мл з використанням центрифужних колонок QIAprep (Qiagen, Chatsworth, CA). Потім нуклеотидну послідовність очищеної ДНК визначали методом секвенування з кінцевою флуоресцентною міткою з використанням внутрішнього 3'-праймеру, що дозволяє визначити орієнтацію вставки в даній плазміді. Розташування цього праймера таке, що секвенування "перетинає" ділянку стику вектора і вставки, щоб переконатися в правильності її орієнтації. Потім клон кожного гену в плазміді з правильною орієнтацією вирощували в 100-мл культури і плазміді екстрагували на максипрепаративній колонці QIAGEN (Qiagen, Chatsworth, CA).

Клонування в SFV

Для вбудовування до складу вектора SFV вставки і плазміді обробляли таким же чином. 100мкг вектора SFV розщеплювали 120од. рестриктази BamHI протягом 1 години при 37°C. Рестриктазу видаляли від розщепленого продукту центрифугуванням через фільтр Micropure EZ (Amicon, Beverly, MA). Потім плазміді обробляли ЛФКТ,

ЛФКТ інактивували нагріванням і потім плазмідну знову очищали на фільтрі Micropure EZ. Вставки екстрагували з ДНК очищеного клонуючого вектора TA шляхом обробки рестриктазою BamHI. Вставки очищали і лігували до складу вектора відповідно до описаного вище. Після трансформації компетентних клітин Inv α F' плазмідну вставку і її орієнтацію підтверджували методом секвенування з кінцевою флуоресцентною міткою.

Експресія білка з pSI

Для трансформації еукаріотичних клітин плазмідної рSI клітини COS-7 були отримані з Американської колекції типових культур (ATCC). Заморожений блок ресуспендували в 15мл середовища DMEM, доповненого 10% плідної телячої сироватки (ПТС). Культури потім вирощували моношаром у колбах 1-75. У вечері, напередодні проведення трансфекції клітини видаляли з колб шляхом трипсинізації (0/25% у EDTA) з промиванням ФСБ. Клітини потім висівали при приблизно 20%-вому рівні злиття на 100-мм чашки і залишали рости до рівня злиття приблизно 50% до наступного дня. Для кожної призначеної для трансфекції чашки 5мл DMEM-NuSerum (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) змішували з 0,2мл розчини DEAE-декстрану і хлорохіну. Потім до цієї суміші додавали 10мкг/мл очищеної плазмідної рSI. Культуральне середовище відсмоктували з клітин COS і до цих клітин додавали розчин DMEM-NuSerum, DEAE-декстрану, хлорохіну і ДНК. Культуру інкубували протягом 3,5 годин в інкубаторі при 5% вуглекислоти з наступним видаленням культурального середовища і заміною його на 5мл 10% ДМСО у ФСБ. Через 2 хвилини цей розчин відсмоктували і клітини культивували протягом ночі в 5мл середовища DMEM з 10% ПТС. Наступного дня клітини переливали в 100-мм культуральні чашки. Через 3 дні середовище відсмоктували і трансформовані клітини відбирали з використанням ФСБ із 0,5мкМ EDTA. Суміш ФСБ/EDTA додавали до клітин, що потім інкубували протягом 15 хвилин при 37 °С. Супернатанти відбирали і поєднували з наступними промиваннями у ФСБ. Супернатанти і промивання потім центрифугували. Отриманий у результаті згусток ресуспендували в DMEM/ПТС і підраховували клітини COS.

Експресія білків з SFV

Трансфекцію вектором SFV здійснювали у відношенні ниркових клітин новонароджених хом'ячків (ВНК). 30мкг очищеної плазмідної розщеплювали рестриктазою SpeI протягом 1 години при 37 °С. Потім рестриктазу видаляли на фільтрі Micropure EZ (Amicon, Beverly, MA) і ДНК осаджали 2,5 обсягами 95%-ного етанолу. Потім 1,5мкг плазмідної використовували як матрицю для Sp6-опосередкованої транскрипції *in vitro*. ДНК інкубували протягом 1 години при 37 °С з: транскрипційним буфером, 100мМ дитиотреїтолу, 10мМ G(5')ppp(5')G, сумішшю NTP, водою, RNasin і 60од. РНК-полімерази Sp6. Після транскрипції реакцію розділяли на аліквоти і зразок візуалізували в 1%-вому агарозному гелі. 45мкл транскрипційної реакції використовували для трансфекції клітин ВНК при рівні злиття приблизно 80% у колбах T-75. Культуральне середовище GMEM, доповнене 10% ПТС, відсмоктували від клітин і заміняли на середовище Opti-MEM. Через 2 хвилини інкубації це середовище заміняли на середовище Opti-MEM, 9мкг/мл ліпофектину і транскрибовану РНК. Культури інкубували протягом 2 годин при 37 °С при 5% CO₂ з частим ручним струшуванням. Через 2 години культуральне середовище видаляли і заміняли на GMEM +10% ПТС. Культури інкубували протягом 7-9 годин і клітини потім відокремлювали шляхом обробки трипсином.

Клоновані у вектор pQE

Бактеріальний експресійний вектор pQE також був сконструйований із включенням генів CD80 і CD28 кішки. Розщеплену і оброблену ЛФКТ плазмідну рQE наготовлювали і очищали відповідно описаному вище і лігували з використанням ДНК-лігази T4 у молярному співвідношенні "вставка:плазмідна=4:1" з 50нг очищеного в гелі CD28 або CD80. Реакцію лігування інкубували протягом 16 годин при 16 °С. Потім 2мкл цієї реакції використовували для трансформації компетентних клітин INV α F'. Відбирали позитивні колонії і правильність орієнтації вставки підтверджували шляхом прямого секвенування. Проводили великомасштабне одержання очищеної плазмідної і отримане використовували для трансформації клітин M15 pREP4, що робили компетентними за трансформацією обробкою хлоридом рубідію. Трансформовані клітини культивували на пластинах LB зі вмістом по 50мкг/мл канаміцину і ампіциліну з метою забезпечення того, щоб обидві плазмідні - рQE і плазмідна-помічник pREP4 - зберігалися в цих колоніях. Позитивні колонії потім піддавали скринінгу шляхом мініпрепарування з лужним лізісом і розщепленням рестриктазою BamHI. Колонії з підтвердженими вставками заморожували в матковому розчині 50% гліцерину для подальшого використання.

Тест на зв'язування

Тести на зв'язування у відношенні трансфікованих клітин, експресуючих CD80 кішки і CD28 кішки, проводили в відповідності з протоколом, описаним Linsley et al., 1994a. Через 1 день після трансфекції клітини COS-7, експресуючі CD28, відбирали з колб T-75 шляхом обробки трипсином у EDTA. Ці клітини залишали прикріплюватися до лунок 24-ямкових планшетів при концентрації 10⁵ клітин на 1мл. Через 2 дні клітини COS-7, трансфіковані feCDSO/pSI, відбирали з колб T-75 з використанням ФСБ із 0,5мкМ EDTA. Ці клітини потім мітили флуоресцентно з використанням розчину 5 мкМ Calcein AM (Molecular Probes, Eugene, OR) у стерильному ФСБ із 1% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) протягом 30 хвилин при 37 °С (Akeson & Woods, 1993). Трансфіковані "пустишкою" клітини COS-7 позначали таким же способом. Позначені клітини потім тричі промивали середовищем DMEM, що містить 10% ПТС, з метою видалення мітки, що не приєдналася, підраховували їх і додавали безпосередньо до моношару. Ці дві клітинні популяції піддавали взаємодії одну з одною протягом 1 години при 37 °С. Клітини, що прикріпилися, відбирали шляхом акуратного триразового промивання моношару середовищем DMEM з додаванням 10% ПТС. Після промивання рівень флуоресценції кожної лунки визначали кількісно за допомогою планшетного мікрофлуориметра. Рівень флуоресценції лунок, що містять трансфіковані клітинні популяції, порівнювали з лунками, у яких клітини, експресуючі CD80, були

додані до клітин COS-7, трансфікованих тільки плазмідой рSI.

Тести на конкурентне зв'язування з використанням химерних білків CTLA-4/Ig і CD80/Ig (люб'язно наданих P.Linsley, Bristol-Meyers Squibb) для пригнічення міжклітинних взаємодій вистроювали таким чином, щоб продемонструвати специфічність такої взаємодії. Після мітки кальцеїном, але перед додаванням до моношару клітин, експресуючих CD80, химеру CTLA-4/Ig у середовищі DMEM/ПТС у концентрації 1мкг/мл інкубували з позначеними трансфікованими клітинами протягом 30 хвилин. Клітини двічі промивали в DMEM/ПТС і додавали до моношару. З іншого боку, клітини моношару, експресуючі CD28, інкубували протягом 30 хвилин з химерою CD80/Ig у концентрації 1мкг/мл у середовищі DMEM/ПТС і потім промивали, після чого додавали флуоресцентно позначені клітини, експресуючі CD80. Пригнічення зв'язування химерними білками оцінювали шляхом порівняння рівнів флуоресценції в даних лунках з параметрами зв'язування в лунках, не утримуючих конкурентних факторів.

ПЛР із реверсуванням

Також трансфіковані клітини COS оцінювали за транскрипцією мРНК методом ПЛР із ревертуванням. Через 3 дні РНК екстрагували з клітин, трансфікованих плазмідой, що несе вставку feCD28, feCDSO або позбавлену вставки. РНК обробляли ДНКазою, вільною від РНКаз, з метою видалення можливих забруднюючих ДНК. Потім 0,5мкг РНК піддавали зворотній транскрипції з одержанням кДНК із використанням праймеру оліго-dT і зворотної транскриптази вірусу MuMLV. Кожен зразок кДНК потім ампліфікували з використанням наборів праймерів, специфічних для CD26, CD80 і G3PDH у наступних циклах: 5 хвилин при 95°C - 1 цикл; 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 55°C, 30 секунд при 72°C - 30 циклів; 5 хвилин при 72°C - 1 цикл. Потім по 20мкл кожної реакції візуалізували в 1%-вому агарозному гелі.

Результати

Гени котячих CD28 і CD80 були успішно вбудовані до складу "трьохбілкових" експресуючих векторів (рSI, SFV і рQE). Після лігування у відповідні вектори ці гени використовували для трансформації компетентних клітин INV α F. На Фіг.33-38 показаний кожний з цих векторів з точними вставками кДНК.

Тести на зв'язування проводили для того, щоб показати можливість експресії функціонального білка. Вихідні тести здійснювали з метою визначення відносин між зв'язуванням клітин COS-7, трансфікованих CD28 і CD80, і клітинами COS-7, трансфікованими CD28 і "пустишками". Рівень флуоресценції в лунках, у які були додані флуоресцентно позначені трансфіковані CD80 клітини, виявився вищим у порівнянні з контрольними лунками за двома вихідними розведеннями. Дала взаємодія залежала від дози і після двох вихідних розведень рівні флуоресценції в лунках, у яких клітини, що злилися, експресують поверхневий білок, зберігалися такими ж, як і в контролях, трансфікованих "пустишками".

Для того, щоб показати можливість пригнічення такої взаємодії, лінії трансфікованих клітин перед змішуванням інкубували з розчинними (немембранними) рецепторами. При концентраціях 5×10^5 і 1×10^5 клітин флуоресценція лунок, що містять клітини COS, експресуючі CD28 і CD80, виявляється подібною тому, що спостерігалось в попередньому експерименті. У лунках, в яких клітини, що злилися, перед змішуванням проінкубували з контр-рецептором CD80/Ig, збереження флуоресценції було порівняне з тим, що виявляється в лунках з контрольними (трансфікованими "пустишками") клітинами. Однак, коли клітини COS, трансфіковані рSI з CD80, інкубували з розчинним CTLA-4 перед їхньою взаємодією з клітинами, трансфікованими рSI з CD28, флуоресценція цілком не пригнічувалася. Хоча ці рівні виявилися не настільки істотними, як ті, що виявлялися в неінгібованій групі, проте вони були чітко більшими, ніж і в контролі, і в іншій експериментальній групі.

ПЛР із ревертуванням проводили на матеріалі РНК, похідної від клітин COS-7, трансформованих конструкціями рSI-CD28, рSI-CD80 і "пустишками", з метою виявлення присутності мРНК, специфічної для кожного гену в цій клітинній лінії. На Фіг.32 показані 1% агарозні гелі для кожної клітинної лінії. Ген гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогенази (G3PDH) ампліфікували в кожній групі, щоб показати цілісність РНК і як позитивний контроль у групі "порожньої" трансформації. Клітини COS-7, трансфіковані рSI-CD80, експресували мРНК CD80 і мРНК G3PDH, у той час як клітини COS-7, трансфіковані рSI-CD28, експресували гени CD28 і G3PDH. Клітини, трансфіковані "пустишками", експресували тільки G3PDH.

Обґрунтування

Відсутність придатних антитіл пояснює те, що для виявлення експресії пептиду не може бути проведений прямий тест. Доступні на комерційній основі антитіла, специфічні у відношенні CD28 і CD80 людини, були протестовані на матеріалі ізольованих лімфоцитів з метою встановлення їхньої можливої перехресної реактивності. Аналіз клітин методом FACS із зазначеними антитілами з використанням ПЛР для виявлення експресії мРНК для обох поверхневих білків, виявився безуспішним. Це, у сполученні з даними про те, що ці антитіла не розпізнають поверхневу експресію в клітинах, трансфікованих конструкціями рSI, дозволило зробити висновок, що дані антитіла перехресної (гетерологічної) реактивності не мають. Але перехресна активність антитіл до CD80 і не очікувалася. Обмежена гомологія CD80 людини і кішки повинна обмежувати і потенціал за перехресною активністю моноклональних антитіл, специфічних для них. Однак було дуже дивно, що і антитіла, специфічні у відношенні CD28 людини, також не були перехресно реактивними. Хоча в цьому випадку рівень консерватизму між клонованими молекулами CD28 більш істотний, доступні на комерційній основі антитіла до CD28 людини, які б перехресно реагували з таким же білком миші, знайдені не були. Як і у випадку з антитілом до CD80 людини, тестування моноклональних антитіл до CD28 людини виявилось безрезультатним. Отже, необхідно було розробити тест, який би дозволив продемонструвати не тільки імовірність експресії даних білків, але також і показав їхню функціональність і здатність до взаємодії.

кДНК-CD80 і CD28 кішки були успішно вбудовані в групу експресуючих векторів. У той час як вектор р31 задовольняв усім вимогам, необхідних для здійснення тесту на зв'язування, додаткові вектори, могли полегшити майбутню експресію цих білків.

Після трансфекції експресія мРНК CD28 і CD80 лініями трансформованих клітин COS-7 була підтверджена з застосуванням методу ПЛР із ревертуванням. Обробка РНК ДНКазою перед ПЛР різко знижувала імовірність забруднення геномної або плазмідної ДНК. Крім того, не передбачалося, що клітини COS-7 будуть виключно експресувати кожний з лігандів, що було потім підтверджено за відсутністю мРНК для кожного з цих поверхневих білків у контролі, трансфікованими "порожніми" векторами. Ампліфікація точної мРНК на матеріалі РНК, виділеної з трансфікованих клітин, очевидно, відображає те, що в клітинах роль матриці виконує вектор pSI і мРНК, що кодується цією плазмідною, дійсно транскрибується.

Проведені тести на зв'язування моделювали відповідно до тих тестів, що були здійснені P.Linsley, що продемонстрували подібні параметри активності за зв'язуванням для CD80 і CD28 людини (Linsley et al., 1994a). Модифікований формат тесту використовували для того, щоб показати, що поверхово експресований CD28 кішки зв'язується з поверхово експресованим CD80 кішки і що ця взаємодія може бути подавлена розчинним рецептором. Рівень зв'язування може бути визначений за збереженням флуоресцентно позначених клітин у конкретних лунках. Завдяки використанню автоматичного флуоресцентного планшетного сканера не було необхідності в лізуванні клітин перед виміром рівня флуоресценції.

У початковому тесті установили, що збереження флуоресцентно позначених клітин COS, трансфікованих CD80-pSI, було більш інтенсивним у лунках із клітинами, що злилися, які трансфікували CD28-pSI, у порівнянні з лунками, що містять клітини, що злилися, піддані "порожній" трансформації. Контрольні клітини, тобто клітини COS, трансформовані "пустишкою", тобто вектором pSI, у якому не було вставки, підтвердили, що ні присутність вектора (тобто процес трансфекції per se), ні адгезійні властивості клітин не обумовлюють адгезії (злиття) клітин, опосередкованої взаємодією між поверхово експресованими CD80 і CD28. При вихідному розведенні в 1 млн. клітин рівень флуоресценції в лунках, у яких клітини експресували CD28, був приблизно в 5 разів вищим за порівнянням з лунками, у які до клітин, трансфікованими "пустишками", вносили флуоресцентно позначені клітини, трансфіковані CD80. При концентрації 5×10^5 клітин рівень флуоресценції різко знижувався через зниження числа клітин, однак цей рівень все-таки був вірогідно вищим флуоресценції в контролі. При концентрації 1×10^5 клітин розходження між експериментом і контролем статистично недостовірний, а при 1×10^4 клітин ці рівні практично ідентичні. Даний тест показує, що взаємодія відбувається між клітинами COS, трансфікованими CD80, і клітинами COS, трансфікованими CD28, що приводить до збереження в даній лунці флуоресцентно позначених клітин, трансфікованих CD80. Однак коли клітини, що злилися не експресують поверхнево-клітинні білки, клітини, трансфіковані CD80, віддаляються при ретельному промиванні. Цей ефект може бути титрованим, і при концентрації в 1×10^4 клітин рівень флуоресценції в лунках віртуально однаковий. Для підтвердження того, що взаємодія мала місце, розчинні рецептори були внесені з метою пригнічення взаємодії CD28/CD80.

В другому тесті використовували включення розчинних форм відповідних рецепторів для кожного з пептидів з метою пригнічення взаємодії між адгезійними партнерами. Розчинні рецептори для CD80 - huCTLA-4Ig, і для CD28 - huCD80-Ig, інкубували з відповідними трансфікованими клітинами COS, експресуючими рецептор, що відповідає кожній з даних молекул, з наступним змішуванням клітин двох типів. Хоча розчинні білки походили не від кішки, припустили, що завдяки визначеному рівню консерватизму, що виявляється між передбачуваними сайтами зв'язування в молекулах людини і кішки, цього буде досить для досягнення перехресної реактивності. Більш того, відомо, що ліганди людини зв'язуються з відповідними рецепторами миші (P.Linsley, повід.). Виходячи з кількості клітин, необхідної для проведення даного тесту, виявилось неможливо провести тест із 1×10^6 клітин. Вихідна концентрація склала 5×10^5 клітин, при тому, що самі по собі клітини, трансфіковані CD28/CD80, характеризувалися середнім рівнем флуоресценції, подібним тому рівню, що був визначений у попередньому експерименті. Незрозуміло, чому злилися клітини, проінкубовані з розчинним рецептором CD80, дають флуоресцентний сигнал, близький до такого в контролі з "порожньою" трансфекцією, у той час як незлилися флуоресцентно позначені клітини, трансфіковані CD80, проінкубовані з розчинним CTLA-4, виявляють у 2-3 рази більш високий рівень флуоресценції. Незважаючи на розходження, обумовлене типом розчинного рецептора, малося виразне зниження рівня флуоресценції в лунках, у яких рецептори були відсутні. Дана взаємодія, виявлена в попередньому тесті, може бути подавлена внесенням відповідного розчинного рецептора перед змішуванням клітин.

Хоча моноклональні антитіла, специфічні у відношенні поверхнево-клітинних білків, у принципі є більш переважними для тестів подібного типу, під час відсутності потрібних реагентів описаний тест представляється ефективним підходом, у якому може бути продемонстрована експресія функціонального контррецептора. Дані вихідного тесту на зв'язування в сполученні з даними конкурентного тесту підтверджують, що були виділені κДНК функціональних CD80 і CD28 кішки, а також те, що експресовані у виді мРНК білки ефективно взаємодіють. Хоча застосовність подібного тесту на зв'язування обмежена, він залишається ефективною системою для встановлення імовірності функціональної поверхневої експресії і взаємодії.

Приклад 8
Інфекція
Введення

За визначенням Львова віруси є "строغو внутрішньоклітинними і потенційно патогенними елементами з інфекційною фазою, (1) що проявляють тільки один тип нуклеїнової кислоти, (2) свого генетичного матеріалу, що розмножуються у формі, (3) нездатними рости і проходити стадії розподілу, і (4) позбавленими системи Ліпмана" (Lwoff, 1957). Природні віруси, є безклітинними організмами, геном яких у формі РНК або ДНК контролює синтез наступних вірусних частинок у процесі інфікування клітини-господаря (Luria & Darnell, 1968). Вірусні

захворювання представляють цікаву систему, у якій може бути продемонстроване практичне застосування сигнального комплексу B7/CD28. Зараження, що є ретровірусами ВІЛ у людини і FIV (вірус імунodefіциту котячих) у кішок обумовлює порушення нормального функціонування імунної системи, що приблизно обумовлене елімінацією Т-клітин CD4⁺ (Fauci et al., 1984; Pedersen et al., 1987). Вважається, що сигнальний комплекс CD28/CD80 відіображає важливу роль у даному захворюванні і що шляхом маніпулювання експресією рецепторів можна загострити інфекцію (Harlanetal., 1995).

FIV є дуже актуальною клінічною проблемою для домашніх кішок, тому що обумовлює ряд клінічних і субклінічних симптомів, що дуже подібні ВІЛ-інфекції людини (Pedersen et al., 1987). В міру нагромадження інформації про FIV відповідність викликаного ним захворювання тваринної моделі СНІду людини стає все більш очевидним, тобто вона є не пов'язаною з приматами моделлю, що найбільш точно імітує розвиток даного захворювання в людини (Siebelink, 1990). Молекулярна, біологічна і патологічна подібність також підтверджує те, що велика частина інформації, одержана при дослідженнях ВІЛ, може сприяти кращому розумінню FIV-інфекції в кішок.

Спочатку ВІЛ-інфекція виявляється в непостійній лімфопенії з розвитком мононуклеозоподібного синдрому практично одночасно із сіркоконверсією (dark et al., 1991). Відбувається короткочасне зниження числа Т-клітин CD4⁺ і експансія Т-клітин CD8⁺, що приводить до зниження відношення CD4:CD8, а в наступній безсимптомній фазі захворювання може відбуватися подальше зниження даного співвідношення (Cooper et al., 1984). З появою зв'язаних зі СНІдом симптомів, популяція Т-клітин CD4⁺ різко збіднюється, а в міру розвитку захворювання і переходу його в заключну стадію різко знижується і загальна кількість лімфоцитів (Fauci et al., 1984). При тому, що вихідна лімфопенія, очевидно, обумовлюється порушеннями в популяціях клітин імунної системи, індукованими кортикостероїдами, що спостерігається і при інших вірусних інфекціях, подальша втрата Т-клітин CD4⁺ і експансія Т-клітин CD8⁺, як вважається, зв'язані з розмноженням вірусу і патогенетичними процесами (Fauci & Dale, 1975; Fauci et al., 1984). Формування інформативних модельних систем є ключовим етапом в подальшому розумінні механізмів інфекції і викликаного вірусами захворювання.

FIV, що є Т-лімфотропним ретровірусом, вперше був описаний у популяції домашніх кішок у Каліфорнії, у якій мали місце багаторазові, які часто зустрічаються хронічні інфекції (Pedersen et al., 1987). Хоча дане захворювання саме по собі маніфестує подібним чином з ВІЛ-інфекцією людини і таксономічно віруси відносно близькі, за антигенними властивостями FIV відрізняється від збудника СНІду людини (Siebelink et al., 1990). Передавання патогену відбувається при обміні рідиною організму, як і ВІЛ, але, на відміну від ВІЛ, для якого переважною - є передавання статевим шляхом, передбачається, що FIV у більшості випадків передається через слину при укусах (Yamamoto et al., 1989). Незважаючи на різні шляхи передавання, підсумковий синдром імунodefіциту є однією з кращих моделей родинного захворювання людини (Siebelink et al., 1990).

Клінічний розвиток FIV подібно з ВІЛ-інфекцією: зокрема, захворювання розділяють на п'ять клінічних фаз. Початкова фаза характеризується лихоманкою, нездужанням і лімфаденопатією, потім після зараження настає довга безсимптомна фаза, що переходить у три заключні фази, при яких спостерігаються втрата ваги і виникають множинні вторинні і умовнопатогенні інфекції (English et al., 1994). Хоча не зрозуміло, чи є механізм клітинної інфекції таким же, FIV виявляється трофічним і для CD4-позитивних, і для CD8-позитивних Т-клітин (Brown et al., 1991). В інфікованих цим вірусом тварин спостерігається зниження активності Т-клітин CD4⁺, очевидно, в результаті утворення ними синцитіїв і їх лізису (Siebelink et al., 1990). Настання заключної фази інфекції збігається з істотною втратою Т-клітин CD4⁺ і зниженням відношення CD4:CD8 (Novotney et al., 1990). Хоча захворювання, викликані вірусами FIV і ВІЛ, можуть опосередковуватися різними механізмами зниження числа Т-клітин CD4⁺, підсумковий фенотип і характер ушкоджень імунної системи, очевидно, виявляються дуже подібними.

Хоча зрозуміло, що інфікування Т-клітин CD4⁺ вірусом ВІЛ негативно позначається на розвитку нормальної імунної відповіді, точний механізм, що приводить до імунodefіциту остаточно не визначений. На пізніх фазах інфекції процеси, що приводять до зниження числа Т-клітин CD4⁺ не встановлені (Connor et al., 1993). Хоча при ВІЛ-інфекції було продемонстроване формування синцитіїв, індуція апоптозу і елімінація за участю CTL, як фактора пригнічення популяції Т-клітин (Schattner & Laurence, 1994; Fouchier et al., 1996), також передбачалася наявність механізму, пов'язаного з CD28 (Haffar et al., 1995). Як було показано, у ліній інфікованих Т-клітин під впливом стимуляції алоантигеном знижена експресія CD28 як на трансляційному, так і на транскрипційному рівнях (Haffar et al., 1995). Як зазначалося вище, перехресне зв'язування на рецепторі CD28 є ключовим сигналом для розвитку Т-клітинної відповіді (Linsley et al., 1991a). Якщо ВІЛ-інфекція обумовлює пригнічення поверхневої експресії CD28, то інфіковані Т-клітини, що розпізнають присутній антиген, більш ймовірно вступають в апоптоз, ніж цілком активуються (Schattner & Laurence, 1994). Хоча апоптоз і є нормальним механізмом загибелі ВІЛ-інфікованих клітин, даний механізм може забезпечувати додатковий внесок в елімінацію Т-клітин, що відбувається в цьому випадку, (Brinchmann et al., 1994).

Було зазначено на зв'язок CD8-позитивних CTL з розвитком довгострокової життєздатності при ВІЛ-інфекції, при тому, що високий рівень лімфоцитів CTL асоційований із тривалим пригніченням СНІду в інфікованих осіб (Landay et al., 1994). Навпроти, гуморальний імунітет не тільки виявляється в цілому неефективний у контролі викликаних лентівірусами захворювань, але, як було показано, антитіла можуть у дійсності навіть підсилювати захворювання (Lombard! et al., 1994; Siebelink et al., 1995). Настання заключної клінічної фази ВІЛ-інфекції і супровідного його імунodefіциту в більшості хворих корелює з переключенням клітинної імунної відповіді (1-й тип) на гуморальну відповідь (2-й тип) (Schattner & Laurence, 1994). Це погоджується з спостереженнями, згідно яким перехід зі здорового стану в СНІД зв'язаний зі зниженням противірусної активності, забезпечуваної CTL

CD8 (Lewis et al., 1994). Експресія CD28 на поверхні CTL CD8⁺ також розглядається як пов'язана з їхньою протівірусною активністю, при тому, що могутня CTL-опосередкована протівірусна активність асоційована з експресією CD28 C08-позитивною популяцією лімфоцитів у інфікованого хворого (Landay et al., 1993).

5 Поверхнева експресія CD28, хоча для неї і передбачалася функція медіатора резистентності до ВІЛ, підпадає під негативний вплив у присутності ВІЛ як у інфікованих, так і неінфікованих Т-клітинах (Caruso et al., 1994). Починаючи з безсимптомних фаз ВІЛ-інфекції, відбувається зниження частки Т-клітин CD4⁺ і CD8⁺, що несуть CD28 (Lewis et al., 1994). Передбачається, що це може бути причиною порушень секреції цитокінів, що виявляються в ранніх фазах інфекції (Caruso et al., 1994), рівно як і змінених відповідей за участю 10 CD8-позитивних Т-клітин у пізніх фазах (Zanussi et al., 1996). У ВІЛ-інфікованих хворих зниження проліферації Т-клітин CD8⁺ у ранній фазі захворювання, як передбачається, пов'язане з негативною регуляцією CD28, оскільки тільки експресуючі CD28 Т-клітини CD8⁺ проліферують у відповідь на ІЛ-2 (Brinchmann et al., 1994). На жаль, в інфікованих хворих Т-клітини CD28⁺/CD8⁺ можуть складати до 75% CD8-позитивної популяції, у той час як у здорових індивідуумів вони складають лише 25% цієї популяції (Saukkoen et al., 1993). Таким чином, 15 хоча популяція клітин CD8⁺ може залишатися нормальною в інфікованих осіб, ефективність цієї популяції за її здатністю розвивати діючу протівірусну імунну відповідь може бути порушена навіть на початковій фазі захворювання (Caruso et al., 1994).

Також проведені дослідження показали, що передавання сигналу від CD28 може бути залучене в активність 20 самого вірусу (Asjo et al., 1993; Smithgall et al., 1995). Костимуляція ВІЛ-інфікованих Т-клітин CD4⁺ периферійної крові за участю анти-CD3 і анти-CD28 обумовлює інтенсифікацію розмноження вірусів у порівнянні зі стимуляцією тільки анти-CD3 (Smithgall et al., 1995). Такий ефект може бути переборений шляхом внесення CTLA-4Ig, як розчинної форми рецептора, специфічного для CD80, а в меншому ступені - внесенням анти-ІЛ2 (Smithgall et al., 1995). В іншому дослідженні інфікованих Т-клітин CD4⁺ у 40% хворих було встановлено, що 25 зв'язування тільки CD28 обумовлює позитивну регуляцію розмноження вірусу, при відсутності необхідності в будь-яких додаткових стимулах (Asjo et al., 1993).

Передоброблення популяцій лімфоцитів поверхневим глікопротеїном ВІЛ - gp120 - обумовлює негативну регуляцію CD80 на поверхні антиген-презентуючих клітин (Chimule, 1995). Хоча експресія CD28 на Т-клітинах 30 знижується при ВІЛ-інфекції, на цих же клітинах експресія CD80 інтенсифікується (Haffar et al., 1993). Це є передбачуваним механізмом, за яким інфекція може передаватися неінфікованим Т-клітинам, тому що взаємодія між -CD28- на поверхні неінфікованих Т-клітин з CD80 на інфікованих Т-клітинах може сприяти міжклітинному контакту, що забезпечує перенесення вірусу (Haffar et al., 1993).

У той час як роль CD28 у ВІЛ-інфекції була досліджена, встановити значення цього поверхневого білка для FIV поки не вдалося. Якщо на кішках можуть бути отримані результати, подібні тим, які були виявлені в людини, 35 то це послужить додатковим підтвердженням застосовності кішок як моделі ретровірусної інфекції.

Матеріали і методи Інфікування *in vivo*

Трьох дорослих вільних від конкретного патогену кішок інфікували внутрішньовенно 1×10⁵ TCID₅₀ вірусом FIV штаму Maryland. Дві схожі кішки були контролем, яким ін'єкували сироватку, що не містить вірус. Пробі 40 крові брали безпосередньо перед зараженням і потім щотижня протягом 7 тижнів. У перший тиждень після зараження кішок оглядали двічі на день для того, щоб переконатися у відсутності вихідної реакції на зараження. Після розвитку захворювання тварин контролювали щодня. У ході гострої клінічної фази захворювання щотижня по 5-10мл крові відбирали для CBC (клінічний аналіз крові) і виділення РВМС. CBC включав підрахунок типів клітин на швидких пофарбованих мазках крові (Jorgensen Lab., Loveland, CO).

Клітини РВМС виділяли з крові шляхом її сепарування в градієнті Histopaque (Sigma, St. Louis, MO). Після 45 вихідного промивання розчином Олсивера приблизно 5 ×10⁵ клітин відбирали і розділяли між 5 лунками 48-лучного планшету. Клітини ресуспендували в 500мкл повного середовища RPMI і потім позначали з використанням антитіл, специфічних за відношенням до або CD4, або CD8. Через 1 годину інкубації при кімнатній температурі при акуратному качанні клітини двічі промивали ФСБ. Після промивання додавали друге антитіло - козій антимишачий Іg (H+L), позначений FITC (KP&L, Gaithersburg, MD) - у концентрації 1:500 і 50 інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години при акуратному качанні. Потім клітини тричі промивали ФСБ і фіксували 3,7%-вим формаліном. Флуоресцентно позначені популяції потім піддавали кількісному аналізу на проточному цитофотометрі FACSCalibur.

РВМС, що залишилися промивали додатково 10мл розчину Олсивера. Після центрифугування супернатант 55 видаляли і для проведення екстракції РНК додавали 1мл ULTRASPEC (Biotex, Houston, TX) . РНК очищали і преціпітували відповідно до описаного вище. Потім спектрометрично визначали концентрацію за рівнем поглинання при 260нм. Потім РНК ресуспендували в 50мкл DEPC-обробленої води і заморожували до -70°С для наступного використання.

Напівкількісна ПЛР із реверсуванням

Перед проведенням ПЛР-ампліфікації зразка РНК 60мл крові відбирали в умерщвленій тварини. РВМС 60 виділяли відповідно до описаного вище. Клітини підраховували в гемоцитометрі і розділяли між 4 колбами в концентрації 5×10⁵ клітин на 1мл. Клітини стимулювали конканаваліном-А протягом 0, 8, 16 і 24 годин з наступним центрифугуванням і екстракцією РНК з клітинного згустку з використанням ULTRASPEC відповідно до описаного вище. ПЛР з ревертуванням проводили на матеріалі 1,5мкг РНК, транскрибованої у кДНК з використанням зворотної транскриптази MMLV і зворотного праймер оліго-dT. Суміш РНК, праймера оліго-dT і 65 DEPC-обробленої дистильованої води інкубували протягом 5 хвилин при 70°С з метою руйнування вторинної

структури РНК і забезпечення відпалювання праймера. Потім додавали транскрипційний буфер, MgCl₂, dNTP і DTT і отриману суміш інкубували при 42°C на протязі 2 хвилин. Потім додавали 1мкл зворотної транскриптази і реакцію залишали на півгодини. Потім по 4мкл із 25мкл зворотно-транскриптазної реакції додавали в кожну з 3 пробірок для ампліфікації CD80 і трьох пробірок для ампліфікації CD28. Потім до кДНК додавали суміш ПЛР-буфера 10_x, dNTP і праймери, специфічні для CD28 або CD80. Праймери для CD80 були такими:

прямий праймер В7-S220: CAT GTC TGG CAA AGT ACA AG (SEQ ID NO: 74),
зворотний праймер В7-284: TTA TAC TAG GGA CAG GGA AG (SEQ ID NO: 75),
у той час як праймери для CD28 були такими:

прямий CD28-start: CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG (SEQ ID NO: 13),
зворотний CD28-239: ATT TTG CAG AAG TAA ATA TCC (SEQ ID NO: 73).

Потім по три пробірки для кожного з продуктів інкубували при 95 °С на протязі 5 хвилин і потім у кожну пробірку додавали по 0,25мкл Таq-полімерази в 10мкл води. Реакції включали в такий температурний цикл: 95°C - 30 секунд, 55°C - 30 секунд, 72°C - 30 секунд. По одній пробірці вилучали за завершенням 20, 25 і 30 циклів, відповідно. По 20мкл кожної реакції візуалізували в 1%-вому агарозному гелі. Гелі фотографували і визначали число циклів, при яких з'являвся шуканий продукт. Після цих попередніх експериментів РНК, раніше екстраговану з крові хворих і здорових тварин, ампліфікували в подібному протоколі.

Інфікування *in vitro*

Лінії Т-клітин, інфіковані FIV *in vitro*, стимулювали Кон-А протягом 16 годин або не стимулювали зовсім, після чого експресію CD28 і CD80 оцінювали методом напівкількісної ПЛР із ревертуванням. Клітинна лінія FETJ являла собою змішану популяцію Т-лімфоцитів і росла під час відсутності IL-2 в культуральному середовищі. Незалежні субпопуляції цих клітин були піддані інфікуванню вірусом FIV штамів Maryland і Petaluma. Приблизно по 2×10⁸ нормальних, Petaluma-інфікованих і Maryland-інфікованих клітин FETJ стимулювали протягом 16 годин Кон-А (8мкг/мл) або не стимулювали зовсім. РНК екстрагували з цих клітин після інкубації з реагентом ULTRASPEC (Biotex, Houston, TX) і очищали відповідно до описаного раніше.

MCH-5.4 - лінія Т-клітин, похідних від кішки з колонії, що характеризувалася . множинними FIV-інфекціями, хоча ця лінія і не була хронічно інфікована. Приблизно 2×10⁸ клітин MCH-5.4 пелетували центрифугуванням і ресуспендували в 5мл концентрованому за FIV супернатанті. Клітини при цієї концентрації інкубували протягом півгодини в інкубаторі з 5% CO₂ при 37°C з наступним доведенням концентрації до приблизно 5 ×10⁵ і культивуванням протягом 24 годин. Після цього нормальні і інфіковані клітини MCH-5.4 стимулювали Кон-А (8мкг/мл) протягом 16 годин або не стимулювали зовсім. РНК екстрагували з використанням реагенту ULTRASPEC (Biotex, Houston, TX) і очищали відповідно до описаного вище.

Нозерн-блотинг

Для аналізу методом Нозерн-блотингу концентрацію РНК визначали спектрофотометрично при 260нм. По 15мкг кожного зразка РНК концентрували до 3мкг/мкл і ресуспендували в 3 обсягах завантажувального буфера. Потім зразки нагрівали до 70°C на протязі 15 хвилин з метою денатурації РНК і руйнування її вторинної структури. Зразки в обсязі 20мкл завантажували в 1%-вий денатуруючий агарозний гель і піддавали електрофорезу при напрузі 70В на протязі 2,5 годин до того моменту, як край фарбування бромфеноловим синім досягне оцінки 2см над нижньою крайкою гелю. Потім РНК переносили з гелю на нейлонову мембрану Genescreen (Dupont NEN, Boston, MA) за рахунок капілярного ефекту (блотинг). РНК прикріплювали до мембрани шляхом обробки низькоінтенсивним ультрафіолетом протягом 3 хвилин і потім доріжки візуалізували по чіткості рибосомних бендів методом Уф-екранування.

Зонд, специфічний для CD28 кішки, був сконструйований з використанням мітки кДНК випадковими праймерами. Повнорозмірну молекулу CD28 вирізали з клонууючого вектора ТА за фланкуючими EcoRI-сайтами. Отриманий фрагмент очищали методом гель-електрофорезу і екстрагували з агарози за допомогою гель-розпилювача Amicon (Amicon, Beverly, MA). Потім 25нг очищеного продукту інкубували разом з випадковими декануклеотидами протягом 5 хвилин при 95°C з метою руйнування вторинних структур (Ambion, Austin, TX) . Потім реакцію миттєво заморожували на рідкому азоті і до суміші додавали dNTP (без dATP) і помічений нуклеотид ³²P-αdATP. Після інкубації протягом 1 хвилин при 37 °С додавали 1мкл фрагмента Кльонова і отриману суміш інкубували протягом 30 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 1мкл 0,5М ЕДТА і після цього очищали на зворотній колонці Сефадекс G-50 (Sigma, St. Louis, MO) з метою видалення невиключившогося радіоактивно позначеного нуклеотиду. 1мкл реакції розбавляли в 1мл сцинтиляційної рідини і активність зонду визначали за допомогою лічильника сцинтиляцій. Блоти прегібридували протягом 15 хвилин при 65°C в 5мл реактиву Rapid Hyb (Amersham Life Science, Cleveland, OH). По 5мкл зонду в концентрації 3-5мкл. імп/хв. на 1мкл додавали до кожного блоту і інкубували при обертанні протягом 1,5 годин при 65°C. Потім зонд видалляли і блоти двічі промивали в 1% SSC+0,1% SDS при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Потім блоти сканували за допомогою лічильника Гейгера і при необхідності знову промивали при 65°C. Результати міток оцінювали якісно за допомогою сканера Betagen. Проводили заключне промивання при 65 °С на протязі 15 хвилин і блот вміщували на плівку на 16-24 години при -70°C з використанням інтенсифікуючого екрану. Авторадіограми проявляли і кількісно оцінювали денситометрично. Для підтвердження цілосності РНК і її концентрації використовували специфічний для G3PDH зонд (люб'язно наданий проф. J.Piedrahita, Texas A & M University), який мітили і гібридували аналогічним способом.

Напівкількісна ПЛР з ревертируванням на матеріалі *in vitro* інфікованих клітин

У подальшій для аналізу присутності CD28 приміняли напівкількісну ПЛР. Як було описано вище,

концентрацію екстрагованої РНК оцінювали шляхом спектрофотометричного зчитування при 260нм. По 2мкг (при кінцевому об'ємі 25мкл) транскрибували в кДНК з використанням праймера оліго-dT і зворотної транскриптази MMLV за відповідністю з описаним вище. Потім 3,5мкл зворотно-транскриптазної реакції переносили в 7 пробірок для ПЛР. Три пробірки амплікували з використанням праймерів, специфічних для CD80, три пробірки - з використанням праймерів, специфічних для CD28, а пробірку, яка залишилася - з праймерами, специфічними за відношенням G3PDH:

прямий G3PDH: CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T (SEQ ID NO:76),
зворотний G3PDH: CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC (SEQ ID NO: 77).

Як описувалося вище, пробірки вилучали з реакції через 20, 25 і 30 циклів. По 25мкл кожного зразку візуалізували в 1%-му агрозному гелі. Крім того, схожим чином на матеріалі клітин ліній FETJ і MHC-5.4 тестували присутність деяких інших Т-клітинних цитокінів. Специфічні для них праймери були такими:

прямий IL-2: CAA CCC CAA ACT CTC CAG GAT G (SEQ ID NO: 78),
зворотний IL-2: GGT CAG CGT TGA GAA GAT GCT TTG (SEQ ID NO: 79),
прямий IL-4: TAT TAA TGG GTC TCA CCT ACC (SEQ ID NO: 80),
зворотний IL-4: TTG GCT TCA TTC ACA GAA CAG (SEQ ID NO: 81),
прямий INF γ : GGG TCG CTT TTC GTA GAC ATT TTG (SEQ ID NO: 82),
зворотний INF γ : CAG GCA GGA CAA CCA TTA TTT C (SEQ ID NO:83),

і їх використовували для ампліфікацій кДНК, транскрибованої на матеріалі 1,25мкг РНК. Для кожного цитокіну амплікували за 20% транскрипційною реакцією. кДНК, що залишилася амплікували з використанням праймерів для G3PDH. кДНК амплікували протягом 30 циклів у наступному режимі: 5 хвилин при 95 °С - 1 цикл; 30 секунд при 95°С, 30 секунд при 55°С, 30 секунд при 72°С - 30 циклів; 5 хвилин при 72°С - 1 цикл. Потім 20мкл реакції візуалізували в 1%-ому агарозному гелі.

Визначення інфекції методом ПЛР із реверсуванням

Інфікованість клітин FETJ і MCH-5.4 була підтверджена шляхом ампліфікації в ОТ-ПЛР послідовності вірусного гену gag. РНК у кількості 1,25мкг транскрибували в кДНК відповідно до описаного вище параметрами з використанням зворотної транскриптази MMLV і зворотного праймера, специфічного для gag. 10мкл зворотно-транскриптазної реакції амплікували методом ПЛР із "гарячим стартом" у наступному режимі: 5 хвилин при 95°С; 30 секунд при 95°С, 30 секунд при 55°С, 30 секунд при 72°С - 30 циклів; 5 хвилин при 72°С.

Після ампліфікації 20мкл кожного зразка візуалізували в 1%-ому агарозному гелі.

Результати

Для того, щоб визначити вплив гострої інфекції in vivo на експресію CD28, кішки AUO4, AUU3 і OAC2 були заражені вірусом шляхом внутрішньовенної ін'єкції, у той час як кішкам AWG3 і OAE6 ін'єкували "порожнє" середовище. Аналіз методом FACS показав наявність деякого диференціювання відношення CD4:CD8 в експериментальних і контрольних тварин. У той час як у контролі в цілому дотримувалося постійне відношення на рівні 2:1, в експериментальній групі малися визначені коливання цього відношення, в однієї тварини понизились до 1:1 (таблиця 3).

CD4:CD8	тиж-1	тиж-2	тиж-3	тиж-4	тиж-5	тиж-6	тиж-8
Інфіковані							
AUO4	4,5	н/о	1,9	1,2	1,0	1,5	1,6
AUU3	н/о	2,3	2,9	1,3	1,2	1,1	2,1
OAC2	2,8	1,48	2,3	1,9	1,1	1,14	1,1
Неінфіковані							
AWG3	2,6	1,5	1,9	2,0	1,8	1,9	2,2
OAE6	2,1	1,5	1/9	1,2	1,8	2,0	2,0

Аналіз експресії РНК CD80 і CD28 у часі проводили для того, щоб показати, що мРНК кожного білка присутня і може бути ампліфкована методом ПЛР через 0, 8, 16 і 24 годин після стимуляції Кон-А. Дана процедура напівкількісної ПЛР була розрахована на виявлення візуалізованого бенда при мінімальному числі циклів ампліфікації, що можна було б використовувати як відносний показник кількості даної мРНК. Виразний бенд, специфічний для CD80, був відсутній після 20 і 25 циклів через будь-який час після інфікування, але після 30 циклів бенд мРНК CD80 виявлявся в гелі в кожній з експериментальних груп (Фіг.42). Також мРНК CD28 візуалізовалася на кожному тимчасовому етапі після 30 циклів ампліфікації, хоча на відрізу в 16 годин він також візуалізовався (слабо) після 25 циклів.

Подібний підхід був використаний у відношенні до РНК, екстрагованої з РВМС FIV-інфікованих і неінфікованих кішок. Ампліфікацію методом ОТ-ПЛР специфічної для CD28 і CD80 РНК використовували для визначення відносної кількості транскрибованої мРНК кожного з цих білків. Як це було здійснено вище в експерименті за тимчасовою динамікою, зразки вилучали після закінчення 20, 25 і 30 циклів. Після 20 циклів мРНК не виявлялася, хоча обидва продукти мРНК CD28 і CD80 візуалізувались після 25 циклів (таблиця 4). Були відсутні будь-які відмінності за експресією кожної з цих мРНК між експериментальною і контрольною групами. В обох випадках малися коливання ознаки числа циклів, при якому відбувалася візуалізація продукту.

Таблиця 4

Напівкількісне визначення продуктів ОТ-ПЛР для CD80 і CD28, ампліфікованих на матеріалі РНК інфікованих і неінфікованих РВМС в інтервалах гострої фази FIV-інфекції						
Число циклів з візуалізацією	до-інф	тиж-1	тиж-3	тиж-4	тиж-6	тиж-8
Інфікування						
1	2	3	4	5	6	7
AUO4	30/30	30/30	30/30	-/25	30/25	25/25
1	2	3	4	5	6	7
AUU3	30/30	30/30	25/25	-/25	30/25	-/30
OAC2	30/30	30/30	30/30	-/30	25/30	25/25
Неінфіковані						
AWG3	25/30	30/30	30/25	-/30	30/25	25/25
OAE6	30/30	-/30	-/30	-/25	30/30	25/25

ПЛР-ампліфікація мРНК з клітин ліній FETJ і MCH-5.4 з використанням FIV/gag-специфічних праймерів показала, що клітинна лінія MCH-5.4 інфікована і зберігає активний інфекційний агент, у той час як клітинні лінії FETJ не дозволяють ампліфікувати gag-специфічну РНК. FIV-специфічний продукт легко ампліфікується з РНК, екстрагованої з зразків клітин MCH-5.4, але не з РНК, екстрагованої з неінфікованого контролю. Подібні реакції, проведені на матеріалі клітинних ліній FETJ, оброблених вірусом FIV штамів Petaluma і Maryland, не дозволили одержати візуалізований продукт за тих самих умов (дані не включені).

Нозерн-блотинг і напівкількісну ПЛР проводили з метою виявлення мРНК CD28 у нормальних клітинних лініях FETJ і MCH-5.4. Лінія клітин MCH-5.4 була представлена інфікованою (експериментальною) групою і неінфікованим контролем, у той час як клітинну лінію FETJ використовували як непермісивні контрольні Т-клітини.

Результати напівкількісної ПЛР показали, що кожна клітинна лінія здатна виробляти мРНК CD28. При ампліфікації неінфікованих FETJ були виявлені параметри експресії, подібні тим, які були виявлені в описаному вище експерименті за тимчасовою динамікою експресії. Якщо в 0 годин після стимуляції (по суті без неї) бенд був відсутній аж до проведення 30 циклів, то до 16-ї години після стимуляції бенд виявлявся після 25 циклів. Подібні параметри виявили в неінфікованій лінії клітин MCH-5.4 при тому, що бенд був відсутній до 30-го циклу в 0-у годину і візуалізувався після 25 циклів через 16 годин інкубації. Цікаво, що в інфікованих клітинах MCH-5.4 ці параметри відрізнялися від таких у контрольних клітинах. В експериментальній групі мРНК не візуалізувалися аж до 30 циклів ні в 0-й, ні в 16-й годині. Для підтвердження цілісності екстрагованої РНК і її концентрації проводили ампліфікацію мРНК G3PDH. Таким чином, інфікування впливає на експресію РНК CD28.

Аналіз методом Нозерн-блотингу використовували для підтвердження даних, що були отримані з застосуванням напівкількісної ОТ-ПЛР. Найбільш сильну гібридизацію з зондом установили для РНК з неінфікованих клітин MCH-5.4, простимульованих Кон-А протягом 16 годин. Непростимульований зразок неінфікованих клітин характеризувався більш інтенсивною гібридизацією в порівнянні з будь-якими інфікованими (стимульованими або ні) клітинами MCH-5.4.

На додаток до авторадіографічної оцінки вимірювали рівень радіоактивності за допомогою лічильника BetaGen. Попередні підрахунки за гібридизацією CD28 стандартизували за підрахунками, отриманими для того ж блоту з зондом для G3PDH (таблиця 5).

Нормалізоване обрахування Нозерн-блотів за CD28 за допомогою BetaGen			
	G3PDH	CD28	CD28, норм.
MCH-5.4, без стимуляції	14995	14921	14807
MCH-5.4, стимуляція Кон-А	13336	13270	15430
MCH-5.4, інфіковані	16700	10854	9867
MCH-5.4, інф.+стимуляція Кон-А	15112	11077	10967

Ампліфікація методом ПЛР із ревертуванням РНК цитокінів з клітинних ліній MCH-5.4 показала ампліфікованість мРНК тільки для IL-2, ні IL-4, ні IL-6, ні Г-інтерферон не вдалося ампліфікувати в 30 циклах, хоча мРНК IL-2 виявлялася досить легко.

Обґрунтування мРНК CD28 аналізували при інфекціях in vivo і in vitro з метою визначення того, чи може бути оцінена експресія CD28 і чи змінює ретровірусна інфекція експресію мРНК. Коли може бути виділена достатня кількість РНК, мРНК CD28 вимірювали методом Нозерн-блотингу, а при обмеженості такого виділення застосовували напівкількісну ПЛР із ревертуванням.

За результатами експериментів in vivo за інфікуванням трьох тварин вірусом FIV штаму Maryland відповідно до зазначеного вище, мРНК, специфічні для CD28 і CD80, ампліфікували з пулу РНК, екстрагованого з РВМС, виділених із проб крові цих інфікованих тварин і неінфікованого контролю. Хоча аналіз методом Нозерн-блотингу є переважним, напівкількісну ПЛР із ревертуванням використовували через обмеженість числа клітин і доступної кількості РНК із них. У кішок брали кров щотижня, тому для кожного експерименту могло бути взято максимум 10мл крові.

Аналіз методом FACS відношення CD4:CD8 у РВМС інфікованих тварин показав його зниження протягом 8

тижнів у інфікованих тварин у порівнянні з неінфікованими тваринами, у яких це відношення залишалося відносно постійним. Існують розходження між двома експериментальними групами. Хоча відношення CD4:CD8 розрізняється в інфікованих і неінфікованих тварин, не було виявлено розходжень за параметрами CBC або експресії CD80 і CD28 (дані не включені).

Для оптимального виявлення експресії CD28 необхідні очищені пули Т-клітин. У виділених фракціях PBMC насправді приблизно 40% є Т-клітинами. Серед цих клітин на різних етапах експерименту до половини клітин були CD8-позитивними Т-клітинами, що не експресували CD28 у тій же концентрації, що і Т-клітини CD4⁺. Це узгоджується з тим фактом, що, як і в інших видах, Т-клітини, що знаходяться в стані спокою (які в кровотоку становлять більшість Т-клітин) CD28 на високому рівні не експресується, і це пояснює необхідність застосування ПЛР замість Нозерн-блотингу. Попередні експерименти, спрямовані на виявлення мРНК CD28 на матеріалі 20мкг РНК, екстрагованої з PBMC, виявилися безуспішними. У напівкількісній ПЛР із ревертуванням була встановлена присутність РНК, що кодує CD28. Цей метод також був застосований для ампліфікації мРНК CD80.

На матеріалі клітинних ліній *in vitro* одержали пули РНК, у яких мРНК CD28 виявляли методом Нозерн-блотингу. Клітини лінії MCH-5.4 вибрали тому, що, будучи лінією Т-клітин, вони були потенційним експресантом мРНК CD28, а також вони походили від лінії, що попередньо набули хронічної вірусної інфекції. Нарешті, як позитивна якість цієї лінії клітин була доступність значної кількості РНК у порівнянні з лімфоцитами крові, взятими від єдиної тварини.

Також намагалися виявити мРНК методом Нозерн-блотингу. У той час як на В-клітинах, що знаходилися в стані спокою і моноцитах CD80 є присутнім у низькій концентрації, у стимульованих моноцитах і макрофагах відзначені найвищі рівні його експресії. Лінія антиген-презентуючих клітин кішки виявилася недоступною, а Т-клітини в нормі експресують цей білок тільки на низькому рівні. Експерименти з виявлення мРНК CD80 у пулах РНК, екстрагованих із PBMC, виявилися безуспішними, очевидно, за тими ж причинами, які зазначалися вище під час обґрунтування CD28. З іншого боку, при використанні напівкількісної ПЛР із ревертуванням у відношенні клітин, отриманих від інфікованих тварин, були виявлені мРНК CD80 і CD28. Хоча даний метод і не дає точної кількісної оцінки мРНК, проте він вказує на присутність мРНК і на відносну його кількість.

Успішним виявився аналіз методом Нозерн-блотингу мРНК CD28 Т-клітинної лінії кішки. При порівнянні параметрів мРНК CD28 для інфікованих і неінфікованих клітин встановили розходження в параметрах експресії. Найбільш численною мР-НК CD28 була в неінфікованих клітинах, простимульованих конканаваліном-А протягом 16 годин. Також мРНК виявили в нестимульованих і неінфікованих клітинах. При тому, що дана мРНК виявляється в стимульованих і нестимульованих FIV-інфікованих клітинах, ці рівні виявляються істотно меншими в порівнянні з неінфікованими клітинами. Ці дані добре узгоджуються з подібними даними, отриманими в методі ПЛР із ревертуванням.

Виявлення мРНК CD28 не утруднене тими ж обмеженнями, що мали місце у випадку з молекулою CD80. Однак, якщо може бути виділена велика популяція клітин, експресуючих CD80, то можна було б легко виявити мРНК із застосуванням Нозерн-блотингу. Коли будуть сформовані специфічні моноклональні антитіла для даних поверхнево-клітинних білків, буде цікаво зіставити рівні мРНК із рівнем поверхневої експресії кожного з цих білків.

кДНК цитокінів ампліфікували для того, щоб підтвердити відсутність розходжень між інфікованими і неінфікованими лініями. Незалежно від статусу інфікованості в кожній групі ампліфікували IL-2. мРНК будь-яких інших цитокінів ампліфікувати не вдалося.

Дані Нозерн-блотингу показують, що *in vitro* експресія CD28 на рівні мРНК негативно регулюється вірусом FIV. Хоча така закономірність ще повинна бути підтверджена шляхом вимірювання рівнів поверхневої експресії, зрозуміло, що FIV-інфекція *in vitro* може впливати на експресію CD28, що було раніше продемонстровано для Т-клітин людини у випадку ВІЛ-інфекції (Brinckmann et al., 1994).

Висновок

Клонування і секвенування кДНК, кодуєчої сигнальний комплекс молекул CD28 і CD80 кішки, привело до одержання продуктів, аналогічних молекулам, що виділялися в інших видах. Хоча розшифрована амінокислотна послідовність білка кішки виявила відносно низький рівень ідентичності стосовно поліпептидів людини і миші, дані порівняння з раніше клонованими молекулами, збереження характерних амінокислотних залишків і той факт, що даний поверхневий ліганд, очевидно, позбавлений прямих сигнальних функцій, дозволили зробити висновок про те, що виділений продукт дійсно є котячим аналогом CD80. Навпроти, молекула CD28 кішки характеризується середнім рівнем ідентичності і на рівні нуклеотидних, і на рівні амінокислотних послідовностей, тобто є аналогом молекул, клонованих в інших видах.

Природу цих молекул далі досліджували, шляхом виявлення їхньої взаємодії в тестах на зв'язування. Моноклональні антитіла, специфічні за відношенням до аналогічних білків інших видів, не можуть реагувати з білками кішки, що експресується. Враховуючи це був розроблений ряд тестів на зв'язування, націлених на виявлення взаємодії, а також того, що така взаємодія пригнічується розчинним рецептором. У цих тестах зв'язування визначали за збереженням флуоресцентно позначених клітин, що можуть бути подавлені внесенням відповідних розчинних рецепторів. Дані тести показали не тільки те, що білки CD80 і CD28 кішки-можуть бути експресовані, але також і те, що ці поверхнево-експресовані молекули можуть взаємодіяти.

Також експресія цих молекул була охарактеризована в ході активної інфекції. Експресію CD28 і CD80 досліджували в моделях *in vivo* і *in vitro*, що піддавалися зараженню вірусом FIV. Експресія CD28, що змінюється у ВІЛ-інфікованих клітинах людини (Asjo et al., 1993), також зазнавала негативних змін слідом за FIV-інфекцією Т-клітин кішки.

Наступна інформація, що стосується експресії кожної з цих молекул при розвитку захворювання, повинна додатково підтверджувати те, що організм кішки є важливою моделлю ретровірусної інфекції.

Способи довгострокового застосування зазначених молекул потенційно можуть бути широкими. Вивчення структури імунних систем, еволюційно відособлених від імунної системи людини, може обумовити лише ще більше розуміння того, як імунна система працює в організмі людини. Більш того, важливість домашньої кішки як модельного організму ретровірусної інфекції, переконливо підтверджена (Siebelink et al., 1990). Передбачається, що білок CD80, входячи до складу протиретровірусних вакцин, є потенційним ад'ювантом при індукції CTL пам'яті. Кішка може бути винятково інформативною моделлю з погляду перевірки ефективності даної закономірності.

Бібліографія

- Azuma, M., et al., *J. Immunology* 149, 1115-1123 (1992).
- Azuma, M., et al., *Nature* 366, 76-79 (1993).
- Chambers, et al., *Current Opinion in Immunology* 9, 396-404. (1997)
- Chen, et al., *J. Immunology* 148,2617-2621 (1992). Chen, et al., *Cell* 71, 1093-1102 (1992).
- Donnelly JJ, et al., *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 617-648
- Freeman, et al., *J. Immunology* 143 2714-2722 (1989).
- Freeman, et al., *J. Exp. Med.* 174, 625-631 (1991).
- Gimmi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6575-6579 (1991).
- Hathcock, et al., *J. of Exp. Med.* 180, 631-640 (1994)
- Hassett and Whitton, *Trends Microbiol.* 1996; 4: 307-312.
- Linsley, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5031-5035 (1990).
- Jenkins, et al., *J. Immunology* 147, 2461-2466 (1991).
- Riley, et al., *J. Immunology* 158, 5545-5553 (1997).
- Tsuji, et al., *Eur J. Immunology* 27 (3), 782-787 (1997).
- PCT International Application WO 92/00092, Bristol Myers Squibb.
- PCT International Application WO 92/15671, Cytomed, Inc. 17 September 1992.
- PCT International Application WO 93/00431, Bristol Myers Squibb, 7 January 1993.
- Akeson, A.L. and Woods, C.W. (1993). A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *J. Immunol. Meth.* 163, 181-185.
- Allison, J.P., and Lanier L. (1987). The structure, serology, and function of the T-cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 5, 503-540.
- Allison, J.P. (1994). CD28-B7 interaction in T-cell activation. *Current Opinion Immunol.* 6, 414-419.
- Anderson, P., Morimoto, C, Breitmeyer, J.B., Schlossman, S.F. (1988). Regulatory interactions between members of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Today* 9,199-203.
- Antonia, S.J., Munoz-Antonia, T., Soldevila, G., Miller, J., Flavell, R.A. (1995). B7-1 expression by a non-antigen presenting cell-derived tumor. *Can. Res.* 55, 2253-2256.
- Arima, T., Rehman, A., Hickey, W., Flye, M. (1996). Inhibition by CTLA-4Ig of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 156, 4917-4924.
- Arruffo, A. and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a COS cell expression system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84, 8573-8577.
- Asjo, B., Cefai, D., Debre, P., Dudoit, Y., Autran, B. (1993). A novel mode of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activation: ligation of CD28 alone induces HIV-1 replication in naturally infected lymphocytes. *J. Virol.* 67,4395-4398.
- Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, M., Phillips, J.H., Lanier, L.X. (1992). Involvement of CD28 in MHC unrestricted cytotoxicity mediated by a human killer leukaemic cell line. *J. Immunol.* 149, 1115-1123.
- Azuma, M, Yssel, H., Phillips, J.H., Spits, H., Lanier, L.L., (1993b) Functional expression of B7/BB1 on activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 177, 845-850.
- Azuma, M., Cayabyab, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1993c). Requirements for CD28-dependant T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 150, 2091-2101.
- Bajorath, J., Stenkamp, R., Arruffo, A. (1993). Knowledge based protein modeling: concepts and examples. *Proc. Sci.* 2, 1798-1810.
- Bajorath, J., Peach, R., Linsley, P.S. (1994). Immunoglobulin fold characteristics of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86). *Prot. Sci.* 3, 2148-2150.
- Balazano, C, Buonavista, N., Rouvier, E., Golstein, P. (1992) CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *Int. J. Can. Suppl.* 7, 28-32.
- Barcy, S., Wettendorf, M., Leo, C, Urbain, J., Kruger, M., Ceuppens, J.L., de Boers, M. (1995). FcR crosslinking on monocytes results in impaired T cell stimulatory capacity. *Int. Immunol.* 1, 179-189.
- Beale, D. (1985). A comparison of the amino acid sequences of the extracellular domains of the immunoglobulin superfamily. Possible correlations between conservancy and conformation. *Comp Biochem Physiol.* 80, 181-194.
- Bellone, M., Iezzi, G., Manfredi, A.A., Protti, M.P., Dellabona, P., Casorati, G., Rugari, C (1994). In vitro priming of cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic epitopes by engineered antigen presenting cells. *Eur. J. Immun.* 24, 2691-2698.
- Berke, G. (1993). The functions and mechanisms of action of cytolytic lymphocytes. In "Fundamental Immunology," (W. Paul), pp. 965-1014. New York: Raven Publ. 3rd ed.

Berke, G. (1994). The binding and lysis of target T-cells by cytotoxic lymphocytes. *Annu. Rev. of Immunol.* 12, 735-773.

Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M., Lindstein, T., Thompson, C.B. (1993). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-89.

Brinchmann, J.E., Doblung, J.H., Heger, B.H., Haaheim, L.L., Sannes, M., Egeland, T. (1994). Expression of costimulatory molecule CD28 on T-cells in human immunodeficiency virus type 1 infection: functional and clinical correlations. *J. Inf Dis.* 169, 730-738.

Brown, W.C., Bissey, L., Logan, K.S., Pedersen, N.C., Elders, J.H., Collisson, E.W. (1991). Feline immunodeficiency virus infects both CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. - *J. of Virol.* 62, 3359- 3364.

Buck, C A. (1992). Immunoglobulin Superfamily: structure function and relationship to other receptor molecules. *Semin. Cell Biol.* 3. 179-188.

Buelens, C, Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, IP., Velu, T., Goldman, M. (1995). Interleukin 10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 2668-2675.

Caruso, A., Cantalamessa, A., Licenziati, S., Peroni, L., Prati, E., Martinelli, F., Canaris, A.D., Folghera, S.,Goria, R., Balsari, A. (1994). Expression of CD28 on CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes during HIV infection. *Scan. J. Immunol.* 40, 485-490.

Cerdan, C, Martin, Y., Brailly, H., Courcoul, M., Flavetta, S., Costello, R., Mawas, C, Birg, F., Olive, D. (1991). IL-1 is produced by T lymphocytes activated via the CD2 plus CD28 pathways. *J. Immunol.* 146, 560-564.

Chen, L., Linsley, P.S., Hellstrom, K.E. (1993). Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol. Today* 14, 483-486.

Chesnut, R.W and Grey, H.M. (1986). Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. *Adv. Immunol.* 39, 51-59.

Clark, S.J., Saag M.S., Decker, W.D, Campbell, H.S., Roberson, J.L., Veldkamp, P.J. (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptoms of primary HIV-1 infection. *N. Eng. J. Med.* 324, 954-960.

Clayberger, C, Lyu, S.C., DeKruyff, R., Parham, P., Krensky, A.M. (1994). Peptides corresponding to the CD8 and CD4 binding domains of HLA molecules block T-lymphocyte immune responses in vitro. *J. Immunol.* 153, 946-951.

Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., Terhorst, C (1988). The T-cell receptor-CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 629-662.

Connor, R.I., Mohri, H., Cao, Y., Ho, D.D. (1993). Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4⁺T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 67, 1772-1777.

Cooper, D.A., Tindall, B., Wilson, E.J., Imreie, A.A., Penny, R. (1988). Characterization of T-lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J. Int. Dis.* 157, 889-896.

Damle, N.K., Doyle, L.V., Grossmaire, L.S., Ledbetter, J.A. (1988). Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 molecule during the activation of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 140, 1753-1761.

Damle, N.K., Klussman, K., Leytze, G., Myrdal, S., Arruffo, A., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S. (1994). Costimulation of lymphocytes with integrin ligands ICAM-1 or VCAM-1 induces functional expression of CTLA-4 a second receptor for B7. *J. Immunol.* 152, 2686-2697.

Davis, M.M. and Bjorkman, P.K. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.

de Boer, M., Kasran, A., Kwekkeboom, J., Walter, H., Vandenbergh, P., Cfiuppeas, J.L. (1993). Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T-cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 3120-3125.

de Waal Malefyt, R., Yssel, H., de Vries, J.E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 150, 4754-4765.

Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting upregulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151, 1224-1234.

Driscoll, P.C., Cyster, J., Campbell, I., Williams, A. (1991). Structure of domain 1 of rat T-lymphocyte CD2 antigen. *Nature* 353, 762-765.

Ellis, J.H., Burden, M., Vinogradov, D., Linge, C, Crowe, J. (1996). Interactions of CD80 and CD86 with CD28 and CTLA-4. *J. Immunol.* 155, 2700-2709.

Engelhard, V.H. (1994). Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Op. Immunol.* 6, 13-21.

English, R.V., Nelson, P., Johnson, CM., Nasisse, M., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B. (1994). Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Inf. Dis.* 170, 543-552.

Fauci, A.S. and Dale, D.C. (1975). The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* 46, 235-243.

Fauci, A., Macher, A., Longo, D., Lane, H., Rook, A., Masur, H., Gelmann, E. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiological, clinical, immunological and therapeutic considerations. *Am. Int. Med.* 100, 92-106.

Fong, T.A. and Mosmann, T.R. (1990). Alloreactive murine CD8⁺ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J. Immunol.* 144, 1744-1752.

Fouchier, R.A., Meyaard, L., Brouwer, M., Hovenkamp, E., Schuitemaker, H. (1996). Broader tropism and higher cytopathicity for CD4⁺ T-cells of asyncytium-inducing compared to a non-syncytium-inducing HIV-1 isolate

as a mechanism for accelerated CD4⁺ T cell decline in vivo. *Virology* 219, 87-95.

Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., Daley, J., Nadler, L.M. (1987). A B-cell restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J. Immunol.* 139, 3260-3267.

Freeman G.J., Borrillo, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Hathcock, K.S., Laszlo, G., McKnight, A.J., Kirn, J., Du, L., Lombard, D.B., Gray, G.S., Nadler, L.M., Sharpe, A.H. (1993). Uncovering a functional alternative CTLA-4 counter receptor in B7-1 deficient mice. *Science* 262, 907-909.

Gajewski, T.E., Schell, S.R., Nau, G., Fitch, F.W. (1989). Regulation of T-cell activation: Differences among T-cell subsets. *Immunol Rev.* 113, 79-110.

Germain, R.N. (1993). The Biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 403-450.

Haffar, O.K., Smithgall, M.D., Bradshaw, J., Brady, W., Damie, N.K., Linsley, P.S. (1993). Costimulation of T-cell activation and virus production by B7 antigen on activated CD4⁺ T-cells from human immunodeficiency virus type 1-infected donors. *Immunology* 90, 11094-1098.

Harlan, D.M., Abe, R., Lee, K.P., June, C.H. (1995). Potential roles of the B7 and CD28 receptor families in autoimmunity and immune evasion. *Clin. Immunol. Immunopath.* 75, 99-111.

Hodge, J.W., Abrami, S., Schlom, J., Kantor, J.A. (1994). Induction of antitumor immunity by recombinant vaccinia viruses expressing B7-1 or B7-2 costimulatory molecules. *Can. Res.* 54, 5552-5555.

Hutchcroft, J.E. and Bierer, B.E. (1996). Signaling through CD28/CTLA-4 family receptors. *J. Immunol.* 155, 4071-4074.

Jenkins, M.K., Pardoll, D.M., Mizuguchi, J., Quill, H., Schwartz, R.H. (1987). T cell responsiveness in vivo and in vitro: Fine specificity of induction and molecular characterisation of the unresponsive state. *Immunol. Rev.* 95, 113-135.

June, C.H., Ledbetter, J.H., Linsley, P.S., Thompson, C.B. (1990). Role of the CD28 molecule in T-cell activation. *Immunol. Today* 11, 211-216.

June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M., Thompson, C.B. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* 12, 321-333.

Kozber, D., Moretta, A., Messner, H.A., Moretta, L., Croce, CM. (1987). Tp44 molecules involved in antigen-independent T cell activation are expressed on human plasma cells. *J. Immunol.* 138, 4128-4132.

Kupfer, A. and Singer, S.J. (1989). Cell biology of cytotoxic and helper T-cell functions. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 309-337.

Landay, A.L., Mackewicz, C.E., Levy, J.A. (1993). An activated CD8⁺ T cell phenotype coorelates with an anti-HIV activity and as symptomatic clinical status. *Clin Immun. Immunopath.* 69, 106-116.

Lane, P., Burdet, C., Hubele, S., Scheidegger, D., Muller, U., McConnell, F., Kosco-Vilbois, M. (1994). γ cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4⁺T-cells. *J. Exp Med.* 179, 819-830.

Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J.H., Linsley, P.S., Okumura, K., Ito, D., Azuma, M. (1995). CD80 (B7) and CD86 (B7.2) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154, 97-105.

Larsen, CP., Ritchie, S.C, Pearson, T.C., Linsley, P.S., Lowry, R.P. (1992). Functional expression of the costimulatory molecule B7/BB1 in murine dendritic cell populations. *J. Exp. Med.* 176, 1215-1220.

Leahy, D., Axel, R., Hendrickson, W. (1992). Crystal structure of a soluble form of human T cell counter receptor CDS at 2.8 resolution. *Cell* 68, 1145-1162.

Lechler, R.I., Lombardi, G., Batchelor J.R., Reinsmoen N., Bach, F.H. (1990), The molecular basis of alloreactivity. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 83-88.

Lenschow, D.J., Su, G.H-T., Zuckermann, L.A., Nabavi, N., Jellis, C.L., Gray, G.S., Miller, J., Bluestone, J.A. (1993). Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90, 11054-11058.

Lenschow, D.J., Walunas, T.L., Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 233-258.

Leung, H.T. and Linsley, P.S. (1994). The CD28 costimulatory pathway. *Therap. Immunol*, 1, 217-228.

Lewis, D.E., Ng Tang, D.S., Adu-Oppong, A., Schober, W., Rodgers, J. (1994). Anergy and apoptosis in CD8⁺T-cells from HIV infected persons. *J. Immunol.* 153, 412-420.

Li, Y., McGowan, P., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Chen, L. (1994). Costimulation of tumor reactive CD4 and CD8 T-lymphocytes by B7 a natural ligand for CD28 can be used to treat established mouse melanoma. *J. Immunol.* 153, 421-428.

Lindsten, T., Lee, K.P., Harris, E.S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P.J., Lombard, D.B., Freeman, G.J., Nadler, L.M., Gray, G.S. (1993). Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T-cells. *J. Immunol.* 151, 3489-3499.

Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., Ledbetter, J.A. (1991a). Binding of the B-cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T-cell proliferation and Interleukin-2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173, 721-730.

Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N.K., Ledbetter, J. A. (1991b). CTLA-4 is a second receptor for the B-cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174, 561-569.

Linsley, P.S., Wallace, P.M., Johnson, J., Gibson, M.G., Greene, J.L., Ledbetter, J.A., Singh, C, Tepper, M.A. (1992a). Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science*,

257, 792-795.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C, Damle, N.K. (1992b). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176, 1595-1604.

Linsley, P. S. and Ledbetter, J. A. (1993a). The role of CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Ann. Rev. Immunol.* 11, 191-212.

Linsley, P.S., Bradshaw, J., Urnes, M., Grosmaire, L., Thompson, C.B. (1993b). CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J. Immunol.* 150, 3161-3169.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., Peach, R. (1994a). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.

Linsley, P.S., Peach, R., Gladstone, P., Bajorath, J. (1994b). Extending the B7(CD8D) gene family. *Prot. Sci.* 3, 1341-1343.

Linsley, P.S., Ledbetter, J., Peach, R., Bajorath, J. (1995a). CD28/CTLA-4 receptor structure, binding stoichiometry and aggregation during T cell activation. *Res. Immunol.* 146, 130-140.

Linsley, P.S., Nadler, S.G., Bajorath, J., Peach, R., Leung, H.T., Rogers, J., Bradshaw, J., Stebbins, M., Leytze, G., Brady, W., Malacko, A.R., Marquardt, H., Shaw, S. (1995b). Binding stoichiometry of the cytotoxic T-lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). *J. Biol. Chem.* 270, 15417-15424.

Littman, D.R. (1987). The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu. Rev. Immunol.* 5, 561-584.

Liu, C.C., Welsh, C.M., Young, J. D-E. (1995). Perform: Structure and function. *Immunol. Today* 16, 194-201.

Liu, Y., Jones, B., Brady, W., Janeway, C A., Linsley, P. (1992). Murine CD4 T cell growth: B7 and heat stable antigen both participate in co-stimulation. *Eur. J. Immunol.* 115, 1905-1912.

Lombardi, S., Garzelli, C, Pistello, M., Massi, C, Matteucci, D., Baldinotti, F., Cammarota, G., Da Prato, L., Bandecchi, P., Tozzini, F., Bendinelli, M. (1994). A neutralizing antibody- inducing peptide of the V3 domain of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein does not induce protective immunity. *J. Virol.* 68, 8374-8379.

Lu, Y., Granelli-Piperno, A., Bjoradahl, J.M., Phillips, C.A.,

Trevillyan J.M. (1992). CD28-induced T cell activation. Evidence for a protein-tyrosine kinase signal transduction pathway. *J. Immunol.* 149, 24-29.

Luria, S.E. and Darneli, J.E (1968) "General Virology". New York: John Wiley and Sons, Inc.

Lwoff, A. (1957). The concept of virus. *J. Gen. Microbiol.* 17, 239-253.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." New York: Cold Spring Harbor Press.

Martin, P.J., Ledbetter, J.A., Morishita, Y., June, C.H., Beatty, P.J., Hansen, J.A. (1986). A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.*, 136, 3282-3287.

Matsumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A., Wilson, LA. (1992). Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257, 927-934.

Mescher, M.F. (1992). Surface contact requirements for activation of cytotoxic T-lymphocytes. *J. Immunol.* 49, 2402-2405.

Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C, Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B., Minty, C, Casellas, P., Loison, G., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P., Caput, D., (1993). Interleukin 13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 362, 248-250.

Moffett, C.W. and Paden, CM. (1994) . Microglia in the rat neurohypophysis increase expression of class I major histocompatibility antigens following central nervous system injury. *J. Neuroimmunol.* 50, 139-51.

Mosmann, T. and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.

Nabavi, N., Freeman, G.J., Gault, D., Godfrey, G.N., Nadler, L.M., Glimcher, L.M. (1992). Signaling through the MHC CII cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 360, 266-268.

Nagata, S. and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1465.

Nickoloff, B.J., Mitra, R.S., Lee, K., Turka, L.A., Greem, J., Thompson, C, Shimizu, Y. (1993). Discordant expression of CD28 ligands BB-1 and B7 on keratinocytes in vitro and psoriatic cells in vivo. *Am J. Path.* 142, 1029-1040.

Novotney, C, English, R., Housman, J., Davidson, M., Nasisse, M, Jeng, C.R. (1990). Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS*, 4, 1213-1218.

O'Doherty, U., Steinman, P.M., Peng, M., Cameron, P.U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W.J., Pope, M., Bhardwaj, N. (1993). Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned media. *J. Exp. Med.* 178, 1067-1076.

Ozawa, H., Aiba, S., Nakagawa, S., Tagami, H. (1995). Interferon gamma and interleukin 10 inhibit antigen presentation by Langerhan's cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur. J. Immunol.* 26, 648-652.

Page, C, Thompson, C, Yacoub, M., Rose, M. (1994). Human endothelial stimulation of allogenic T-cells via

a CTLA-4 independant pathway. *Trans. Immunol.* 2, 342-347.

Peach, R., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J., Linsley, P.S. (1994). CDR1 and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J. Exp. Med.* 180, 2049-2058.

5 Peach, R., Bajorath, J., Naemura, J., Leytze, G., Greene, J., Aruffo, A., Linsley, P.S. (1995). Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T-cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J. Biol. Chem.* 270, 21181-21187.

Pedersen, N.C., Ho, E., Brown, M.L., Yamamoto, J.K. (1987). Isolation of a T lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency like syndrome. *Science* 235, 790-793.

10 Prasad, K.V., Cai Y.C., Raab, M., Duckworth, B., Cantley, L., Shoelson, S.E., Rudd, C.E. (1994). T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-Kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc Nati Acad Sci USA.* 91, 2834-2838.

Radvanyi, L.G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G.B., Miller, R.G. (1996). CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J. Immunol.* 158, 1788-1798.

15 Ranheim, E.A. and Kipps, T.J. (1995). Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) on human B cells by activated T-cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L. *Cell. Immunol.* 161, 226-235.

Razi-Wolf, Z., Freeman, G., Galvin, F., Benacerraf, B., Nadler, L., Reiser, H. (1992). Expression and function of the murine B7 antigen and the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89, 4210-4214.

20 Ronchese, F., Hausmann, B., Hubele, S., Lane, P. (1994). Mice transgenic for a soluble form of murine CTLA-4 show enhanced expansion of antigen-specific CD4⁺ T-cells and defective antibody production in vivo. *J. Exp Med.* 179, 809-817.

Rotzschke, O. and Falk, K. (1994). Origin structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr. Op Immunol.* 6, 45-51.

25 Russel, J.H. (1983). Internal disintegration model of cytotoxic lymphocyte induced target damage. *Immunol. Rev.* 72, 97-118.

Saukkonen, J.J., Kornfield, H., Berman, J.S. (1993). Expansion of a CD8⁺CD28⁺ cell population in the blood and lung of HIV-positive patients. *JAIDS* 11, 1194-1199.

Schattner, E. and Laurence, J. (1994). HIV induced T-lymphocyte depletion. *Clin. Lab. Med.* 14, 221-227.

30 Schmittel, A., Scheibenbogen, C., Keilholz, U. (1995). Lipopolysaccharide effectively up-regulates B7-1 (CD80) expression and costimulatory function of human monocytes. *Scan. J. Immunol.* 42, 701-704.

Schwartz, R.H. (1992). Costimulation of T-lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068.

35 Seder, R.A., Germain, R.N., Linsley, P.S., Paul, W.E. (1994). CD28 mediated co-stimulation of IL-2 production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and IFN γ production, *J. Exp Med.* 179, 299-304.

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., Mak, T.B. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28 deficient mice. *Science* 261, 609-612.

40 Sher, A., Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Clerici, M., Kullberg, M., Pearce, E.J., Berzofsky, J.A., Mosmarm, T.R., James, S.L., Morse, H.C. (1992). Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev.* 127, 183-204.

Siebelink, K.H., Chu, T.H., Rimmelzwaan, G.F., Weijer, K., van Herwijnen, H.R., Knell, P. (1990). Feline Immunodeficiency virus (FIV) infection in the cat as a model for HIV infection in man: FIV induced impairment of immune function. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6, 1373-1378.

45 Siebelink, K.H., Tijhaar, E., Huisman, R.C., Huisman, W., deRonde, A., Darby, I.H., Francis, M.J., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D. (1995). Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. *J Virol.* 69, 3704-3711.

Singer, S.J. (1992). Intracellular communication and cell:cell adhesion. *Science* 255, 1671-1674.

50 Smithgall, M.D., Wong, J.G., Linsley, P.S., Haffar, O.K. (1995). Costimulation of CD4⁺ T-cells via CD28 modulates human immunodeficiency type 1 infection and replication in vitro. *AIDS Res. Hu. Retro.* 11, 885-892.

Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K., Marlin, S.D. (1987). The lymphocyte function associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 5, 223-252.

Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.

55 Stack, R.M., Lenschow, D.J., Gray, G.S., Bluestone, J.A., Fitch, F.W. (1994). IL-4 treatment of small splenic B cells induces co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J. Immunol.* 152, 5723-5733.

Symington, F.W., Brady, W., Linsley, P.S. (1993). Expression and function of B7 on human epidermal Langerhan's cells. *J. Immunol.* 150, 1286-1295.

Taylor, M.K. and Cohen, J.J. (1992). Cell mediated cytotoxicity. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 338-343.

60 Thomas, R., Davi, L.S., Lipsky, P.E. (1994). Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen presenting dendritic cells. *J. Immunol.* 152, 2613-2623.

Townsend, S.E., and Allison, J.P. (1993). Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T-cells by B7 transfected melanoma cells. *Science* 259, 368-370.

Turka L.A., Ledbetter, J.A., Lee, K., June, C.H., Thompson, C.B. (1990). CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3⁺ mature thymocytes. *J. Immunol.* 144, 1646-1653.

65 Turka, L.A., Linsley, P.S., Paine, R., Schieven, G.L., Thompson, C.B., Ledbetter, J.A. (1991). Signal

transduction via CD4, CD8 and CD28 in mature and immature thymocytes. *J. Immunol.* 146, 1428-1436.

Unanue, E.R. (1984). Antigen presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 395-428.

van Kooten, C, Rensink, I., Pascual-Salcedo, D., van Oers, R., Aarden, L. (1991). Monokine production by human T-cells: IL-1 alpha production is limited to memory T-cells. *J. Immunol.* 146, 2654-2658.

van Seventer, G.A., Shimizu, Y., Shaw, S. (1991). Roles of multiple accessory molecules in T cell activation. *Curr. Opin Immunol.* 3, 294-303.

Wang, R., Murphy, K.M., Loh, D.Y., Weaver, C, Russell, J.H. (1993). Differential activation of antigen-stimulated suicide and cytokine production pathways in CD4+ T-cells is regulated by the antigen-presenting cell. *J. Immunol.* 150, 3832-42.

Weiss, A. and Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.

Williams, A. and Barclay, A. (1988) . The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 381-405.

Windhagen, A., Newcombe, J., Dangond, F., Strand, C, Woodroffe, M.N., Cuzner, M.L., Hafler, D.A. (1995). Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) and interleukin 12 in multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* 182, 1985-1996.

Yamamoto, J.K., Hansen, H., Ho, W.E., Morishita, T.Y., Okuda, T., Sawa, T.R. (1989). Epidemiological and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J.A.V.M.A.* 194, 213-220.

Yasukawa, M., Inatsuki, A., Kobayashi/ Y. (1989). Differential in vitro activation of CD4+CD8- and CD8+CD4-herpes simplex virus-specific human cytotoxic T-cells. *J. Immunol.* 143, 2051-2057.

Yssel, H., Schneider, P.V., Lanier, L.L. (1993). Interleukin 7 specifically induces B7/BB1 antigen on human cord blood and peripheral blood T-cells and T cell clones. *Int. Immunol.* 5, 753-759.

Zanussi, S., Simonelli, C, D'Andrea, M., Caffau, C, Clerici, M., Tirelli, U., DePaoli, P. (1996). CD8+ lymphocyte phenotype and cytokine production in long-term non-progressor and in progressor patients with HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 105, 220-224.

Zhou, T., Weaver, C, Linsley, P.S., Mountz, J.D. (1994). T-cells of staphylococcal enterotoxin B-tolerized autoimmune MRL-lpr/lpr mice require costimulation through the B7-CD28/CTLA-4 pathway for activation and can be reenergized in vivo by stimulation of the T cell receptor in the absence of costimulatory signal. *Eur. J. Immunol.* 24, 1019-1025.

Формула винаходу

1. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує ліганд CD86 кішки, розчинний ліганд CD86 кішки або їх фрагменти, які мають імунорегуляторну активність, причому ліганд CD86 кішки кодується кодуючою послідовністю SEQ ID NO: 5.

2. Нуклеїнова кислота за п. 1, де ліганд CD86 кішки містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

3. Нуклеїнова кислота за п. 1 або 2, де нуклеїнова кислота є РНК.

4. Нуклеїнова кислота за п. 1 або 2, де нуклеїнова кислота є ДНК.

5. Нуклеїнова кислота за п. 4, де ДНК є κДНК.

6. Нуклеїнова кислота за п. 4, де ДНК є геномною ДНК.

7. Діагностичний олігонуклеотид, що складається щонайменше з 12 нуклеотидів, який характеризується послідовністю, яка комплементарна послідовності, що унікально присутня в нуклеїновій кислоті за п.1 або 2, яка має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 5.

8. Діагностичний олігонуклеотид за п. 7, що складається щонайменше з 15 або 16 нуклеотидів.

9. Діагностичний олігонуклеотид за п. 7 або 8, де олігонуклеотид позначений міткою, що виявляється.

10. Діагностичний олігонуклеотид за п. 9, де мітка, що виявляється, містить радіоактивний ізотоп, флуорофор або біотин.

11. Діагностичний олігонуклеотид за п. 7 або 8, де олігонуклеотид вибірково метильований.

12. Клонуючий вектор, що містить нуклеїнову кислоту за п. 1 або 2.

13. Вектор за п. 12, позначений як B7-2# 19-2/011298 та депонований в АТСС під № 209821.

14. Вектор за п. 12 або 13, що містить промотор, функціонально приєднаний до нуклеїнової кислоти.

15. Вакцина для модулювання імунної відповіді у кішки, що містить ефективну кількість поліпептиду, кодованого нуклеїновою кислотою за п. 1 або 2, і придатний носій.

16. Вакцина за п. 15, де поліпептид являє собою ліганд CD86, розчинний ліганд CD86 кішки або їх фрагмент.

17. Вакцина за п. 15 або 16, де ефективною кількістю є кількість від приблизно 0,01 мг до приблизно 100 мг на одну дозу.

18. Вакцина за п. 15 або 16, де ефективною кількістю є кількість від приблизно 0,25 мг/кг маси тіла кішки на добу до приблизно 25 мг/кг маси тіла кішки на добу.

19. Вакцина за будь-яким з пп. 15-18, що додатково містить імуноген, похідний від патогена.

20. Вакцина за п. 19, де патоген є патогеном кішки, вірусом сказу, хламідією, *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, патогеном блохи або бактеріальним патогеном.

21. Вакцина за п. 20, де патогеном кішки є вірус імунодефіциту котячих (FIV), вірус лейкозу котячих (FeLV), вірус інфекційного перитоніту котячих (FIP), вірус панлейкопенії котячих, каліцивірус котячих, реовірус 3-го типу котячих, ротавірус котячих, коронавірус котячих, респіраторно-синцитіальний вірус котячих,

вірус саркоми котячих, герпесвірус котячих, вірус хвороби Борна кішок або паразит кішок.

22. Спосіб індукції імунітету у кішки, що передбачає введення кішці вакцини за будь-яким з пп. 15-21.

23. Спосіб посилення імунної відповіді у кішки, що передбачає введення кішці вакцини за будь-яким з пп. 15-21.

24. Спосіб за п. 22 або 23, де вакцину вводять підшкірно, внутрішньом'язово, системно, місцево або перорально.

25. Спосіб пригнічення імунної відповіді у кішки, що передбачає введення кішці ефективно пригнічуючої імунну відповідь кількості розчинного поліпептиду, що кодується нуклеїновою кислотою за п. 1 або 2.

26. Спосіб за п. 25, де вказана кількість складає від приблизно 0,25 мг/кг маси тіла на добу до приблизно 25 мг/кг маси тіла на добу.

27. Спосіб за п. 25, де кішка страждає на аутоімунне захворювання або є реципієнтом при пересадженні тканини або органа.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2

UNITED STATES OF AMERICA
DEPARTMENT OF JUSTICE
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION

MEMORANDUM FOR THE DIRECTOR, FBI (100-442600) FROM SAC, NEW YORK (100-100000) DATE: 10/15/54

SUBJECT: [REDACTED]

RE: [REDACTED]

DATE: [REDACTED]

BY: [REDACTED]

CLASSIFICATION: [REDACTED]

REASON: [REDACTED]

APPROVED: [REDACTED]

DATE: [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

U A 7 7 3 8 2 C 2

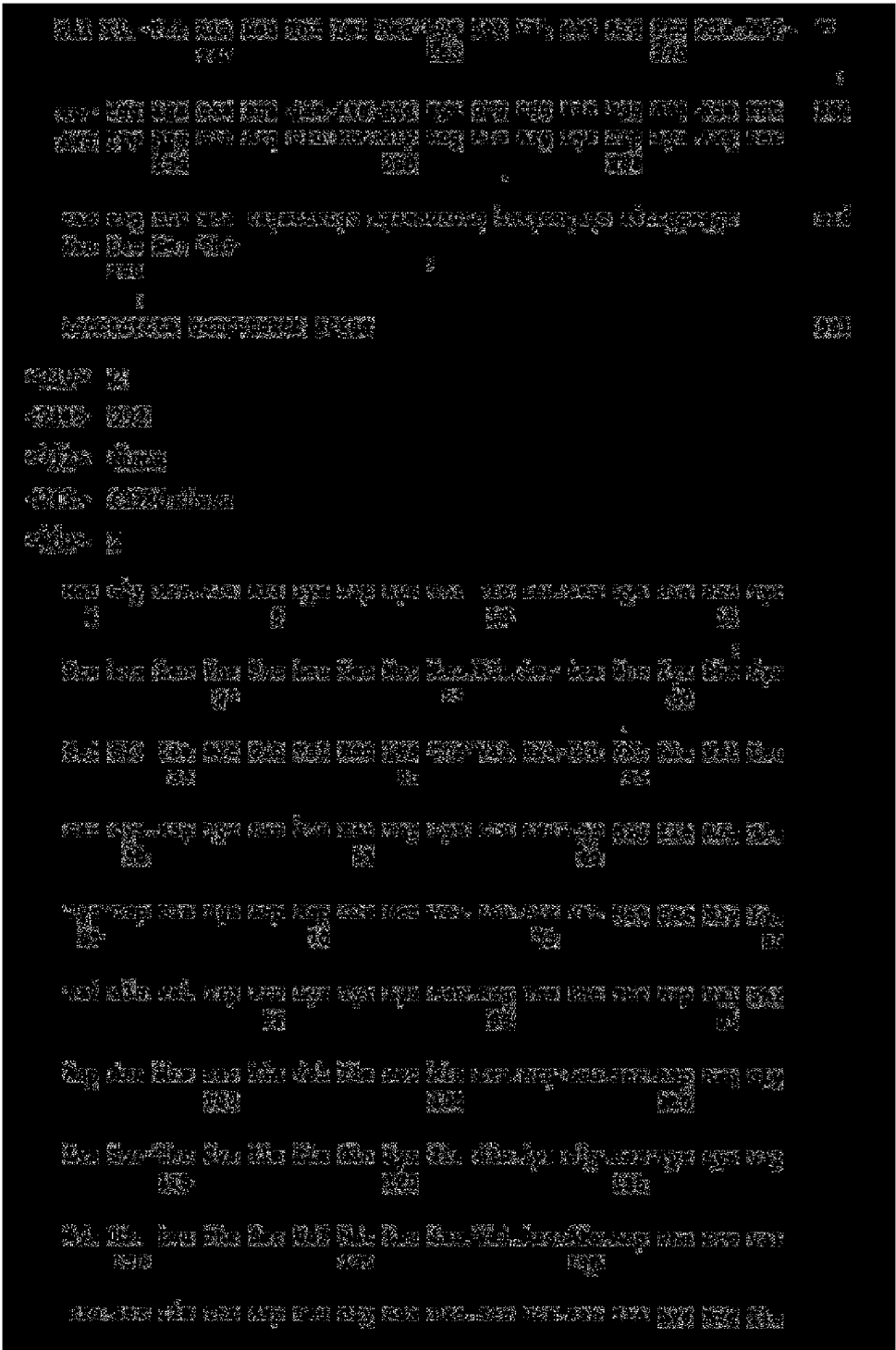
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



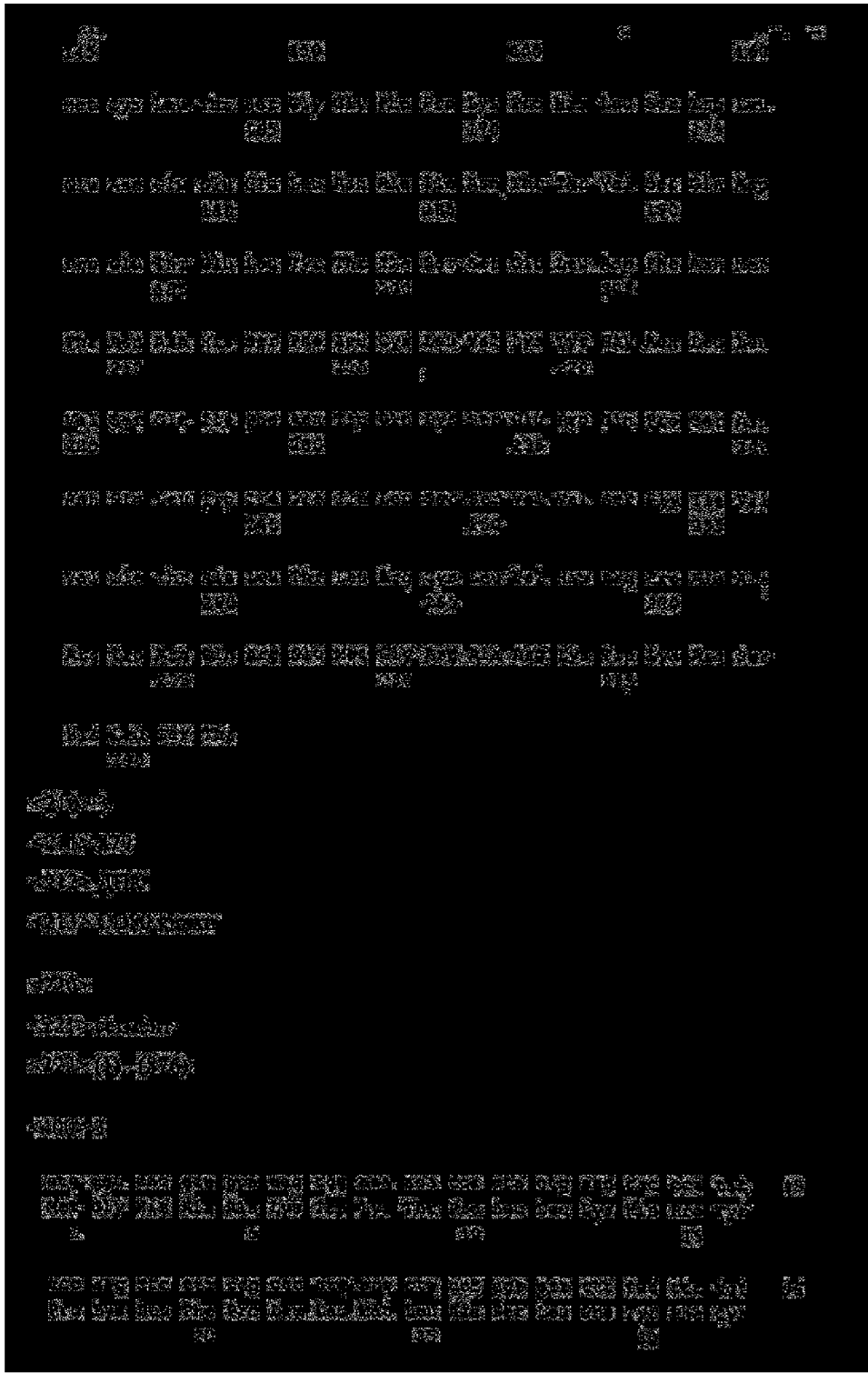
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



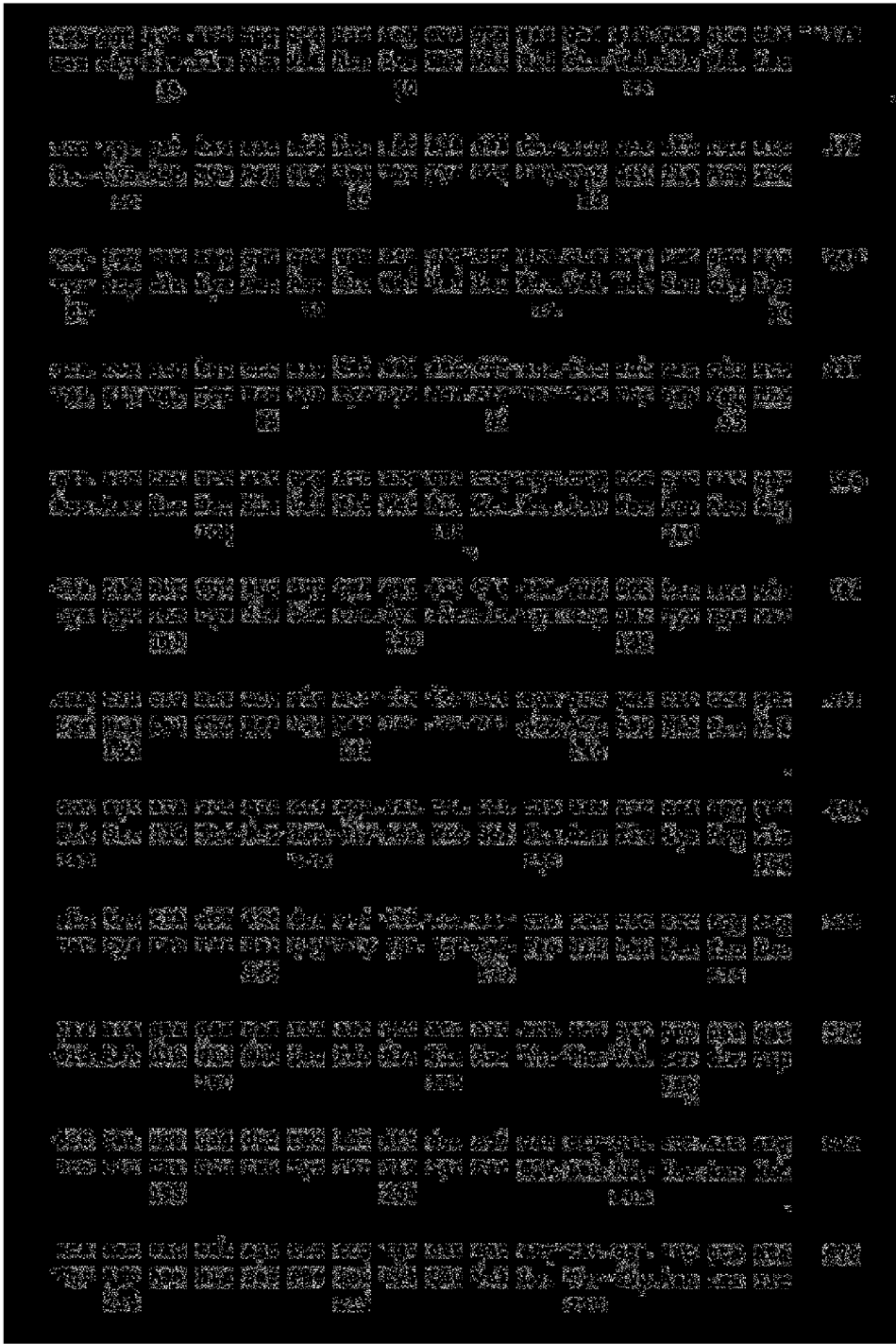
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



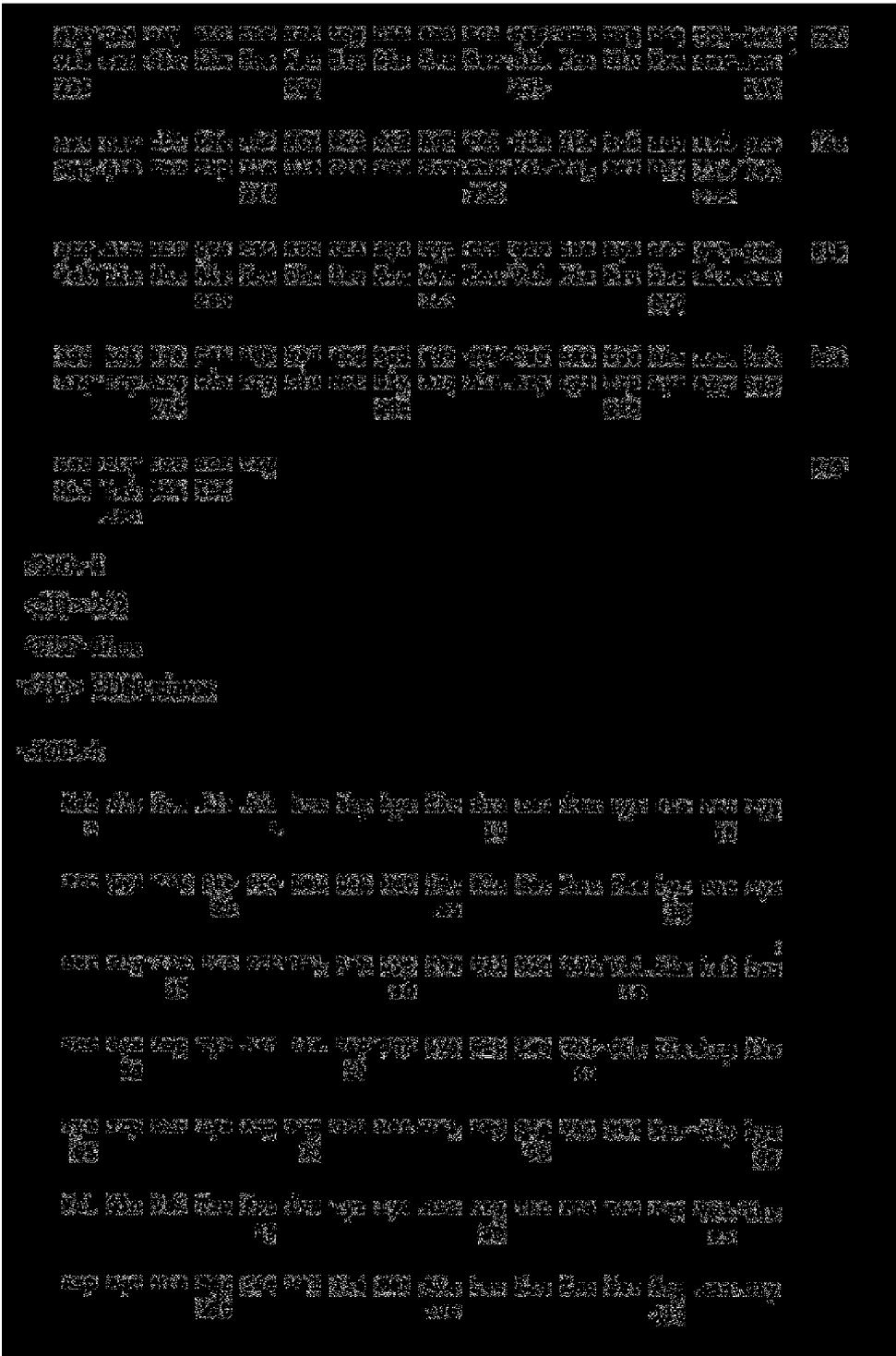
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



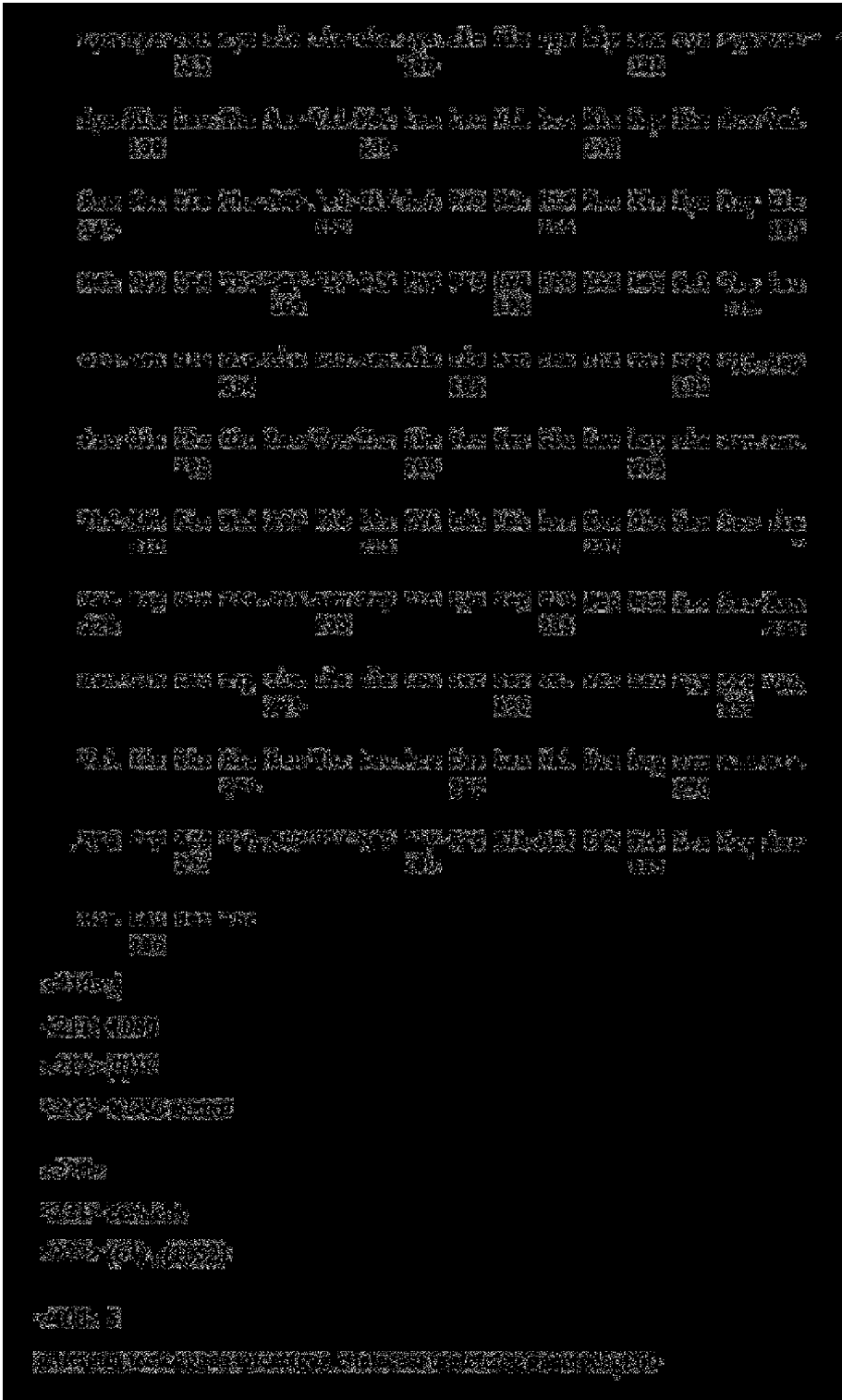
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



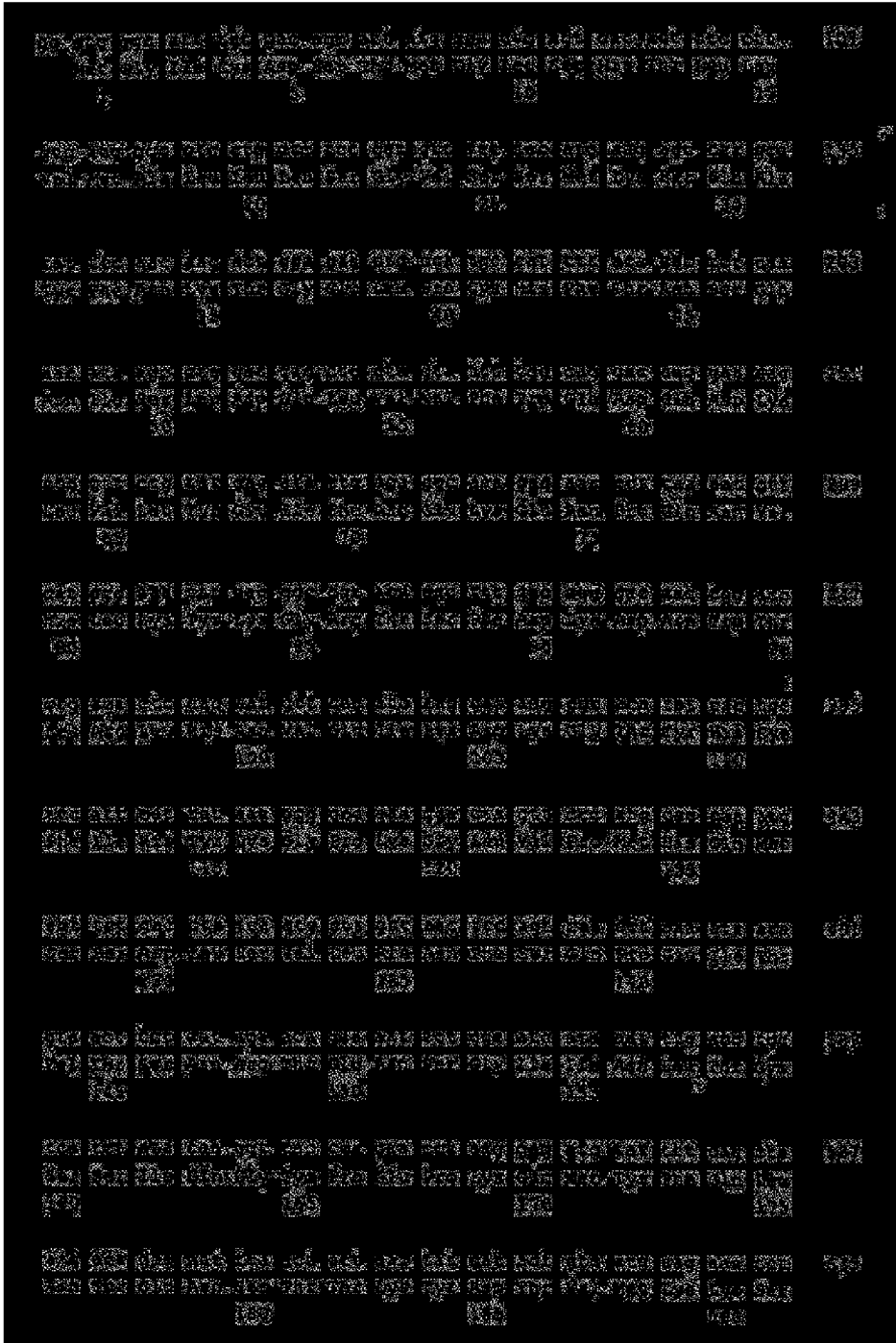
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



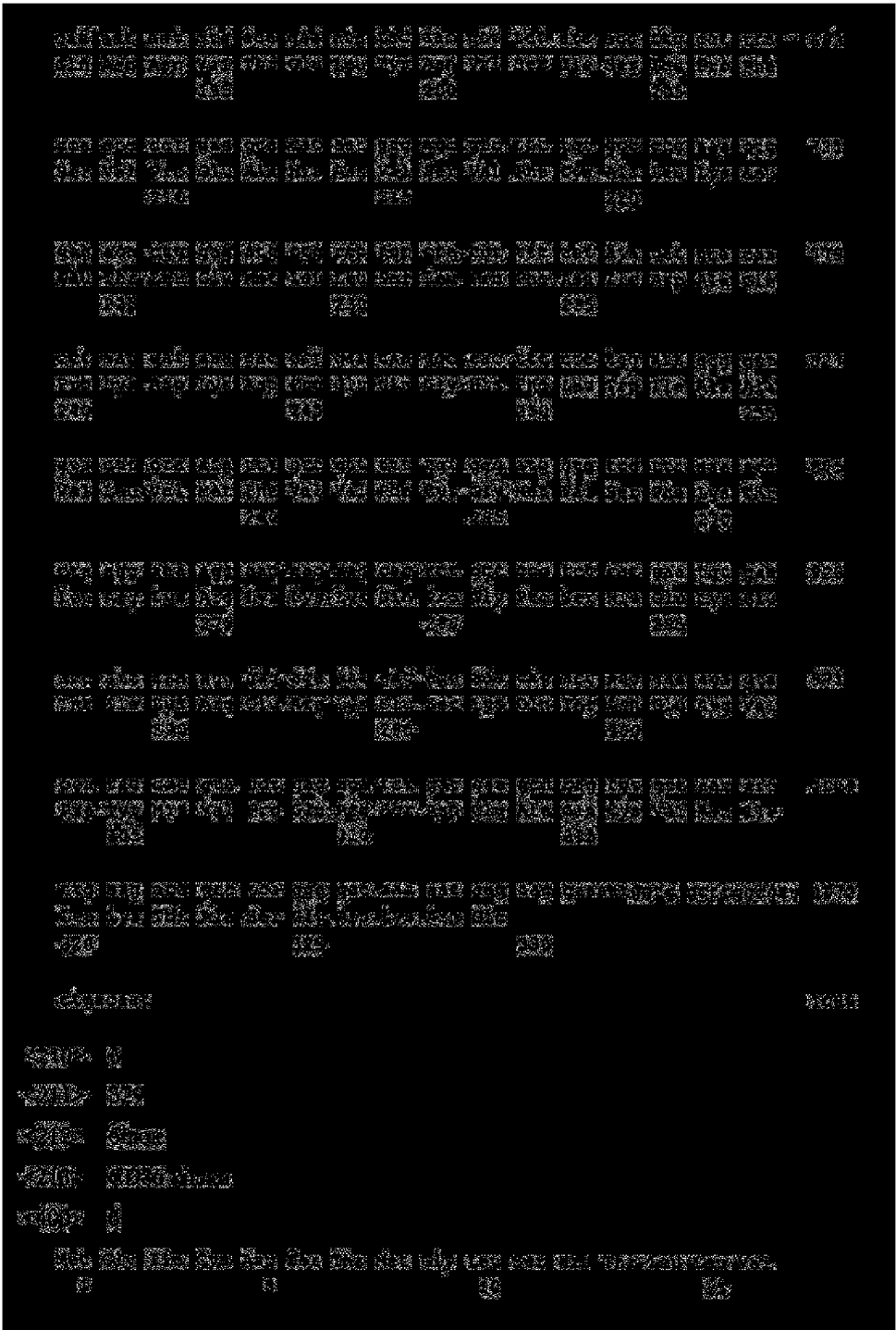
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



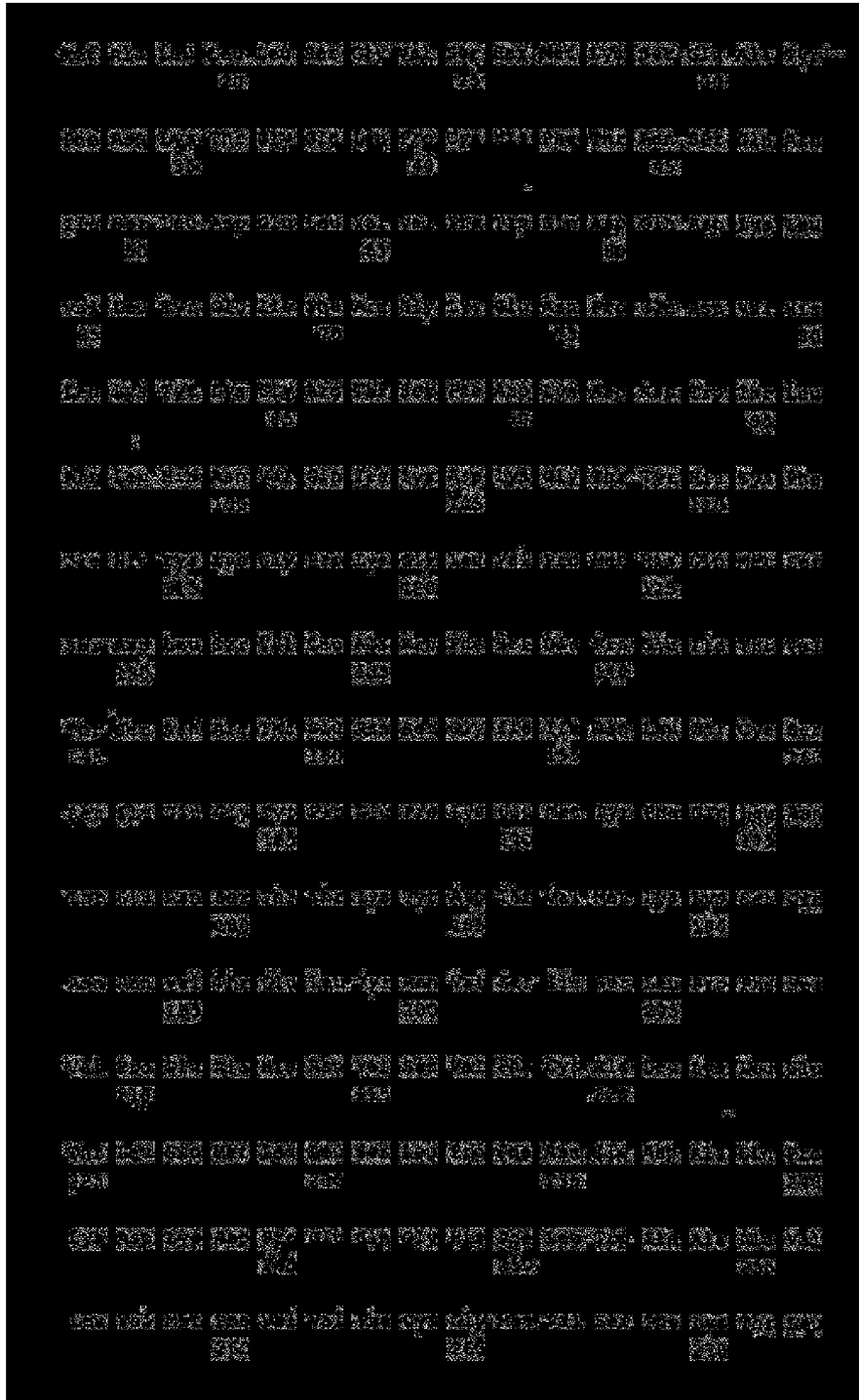
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



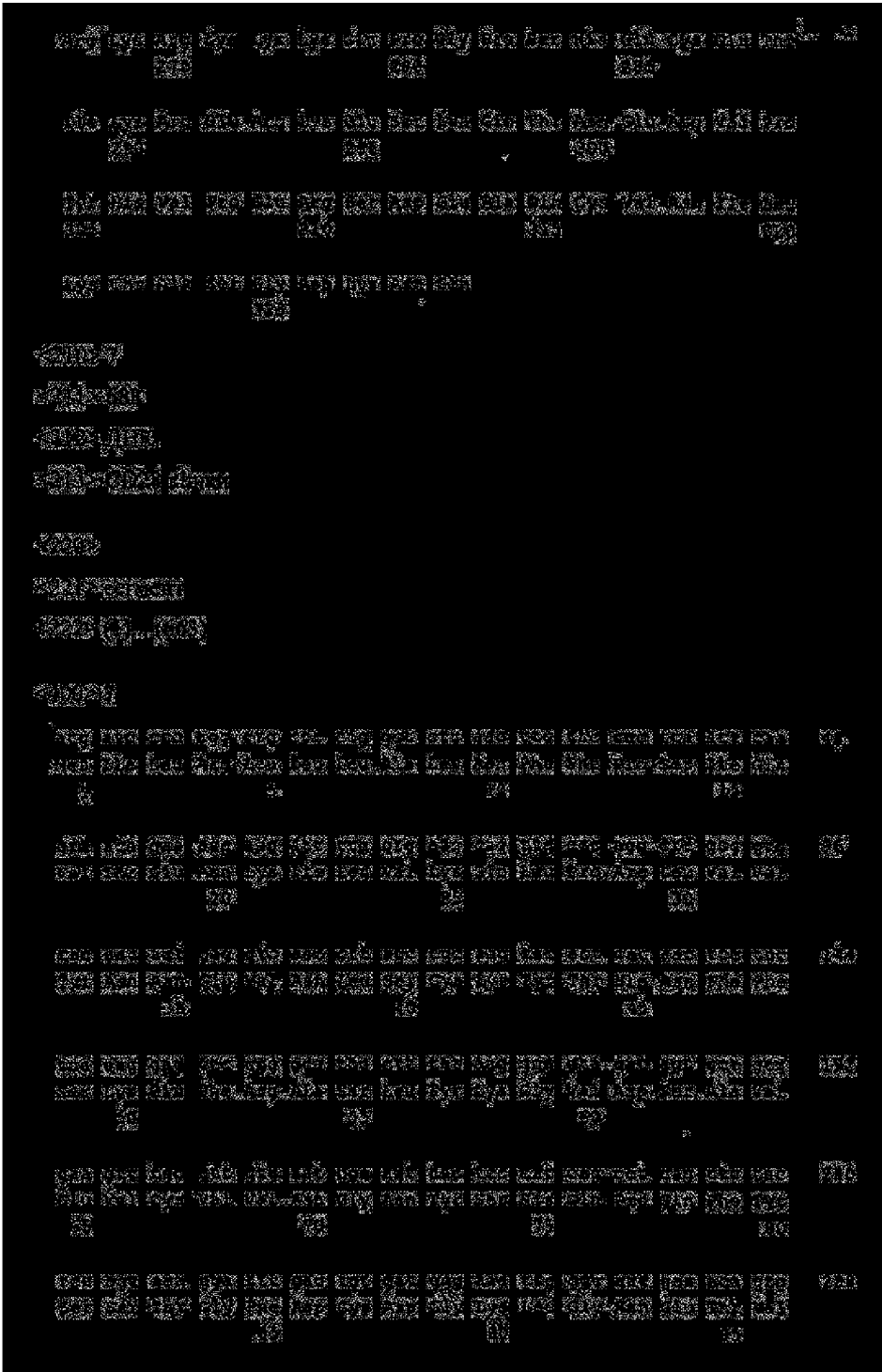
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



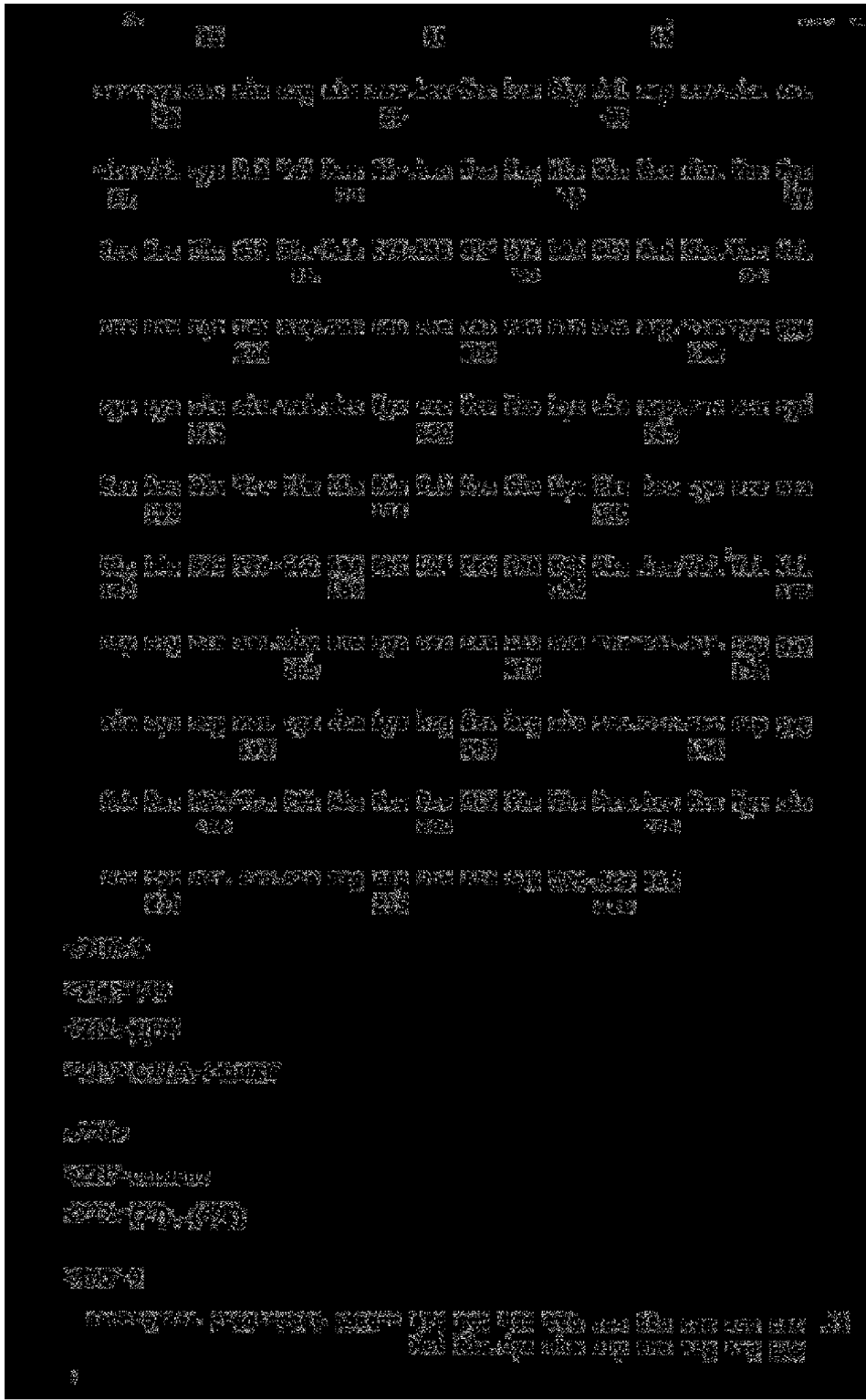
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



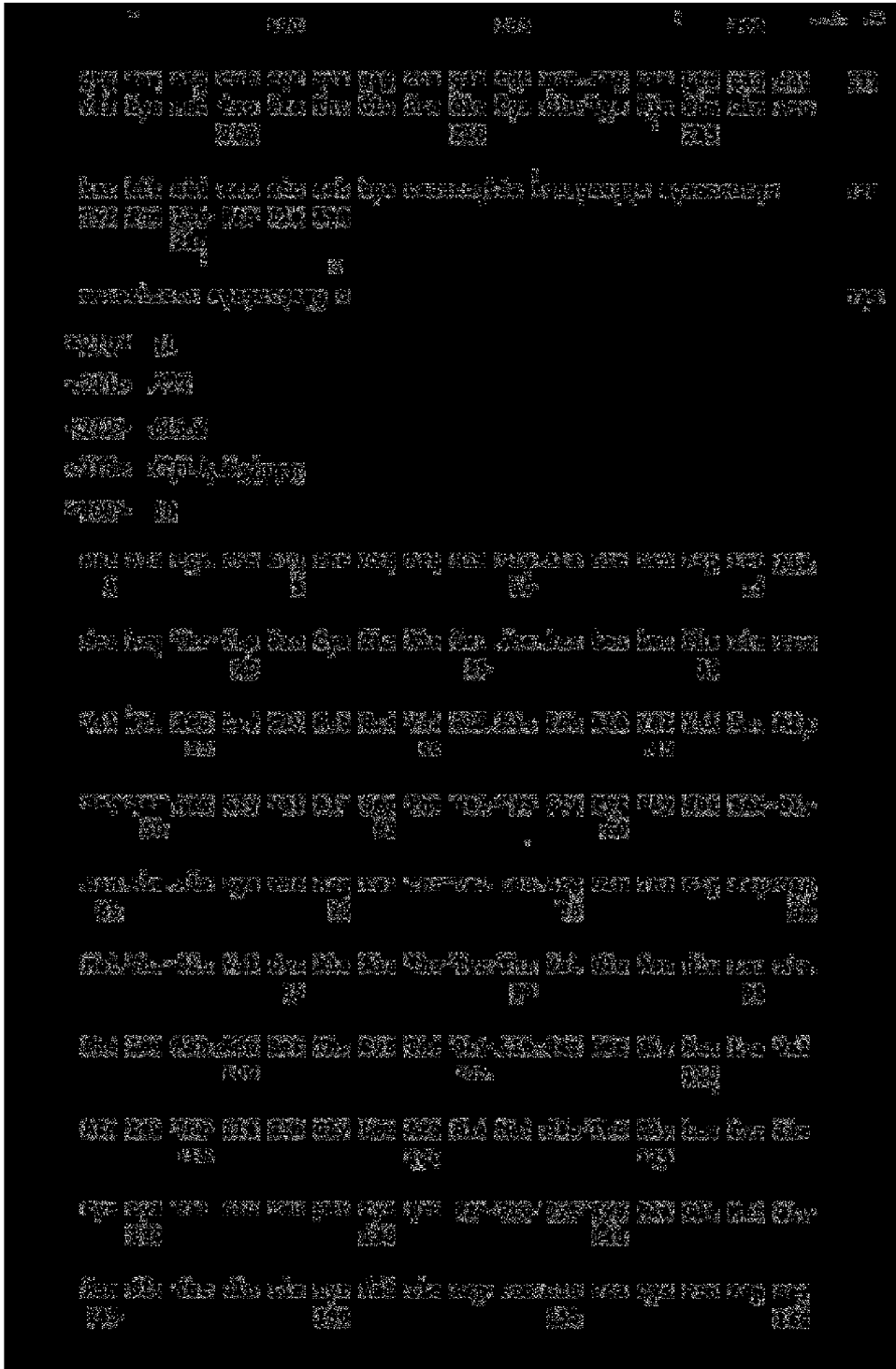
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



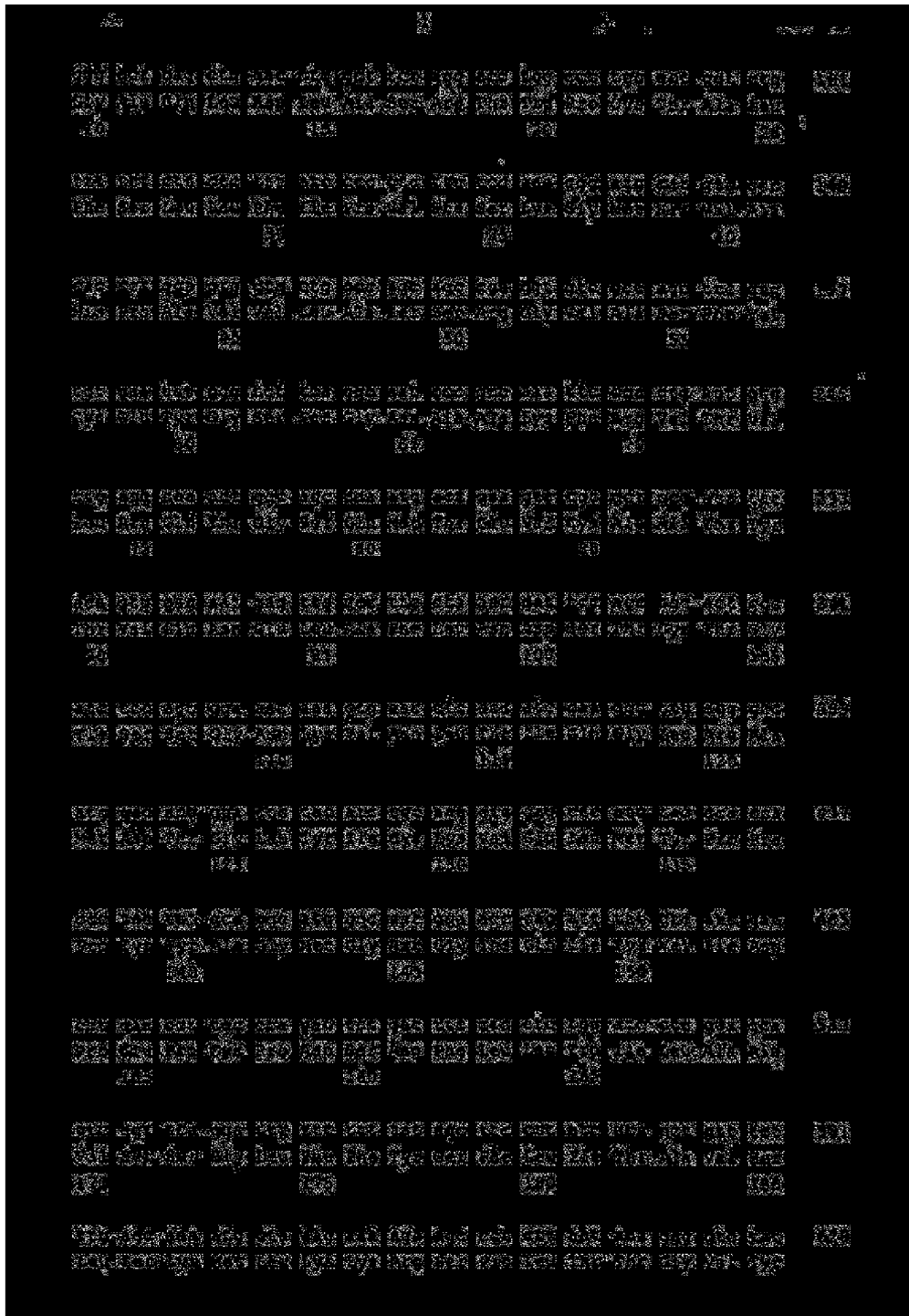
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2

2017-01		
2017-02		
2017-03		
2017-04		
2017-05		
2017-06		
2017-07		
2017-08		
2017-09		
2017-10		
2017-11		
2017-12		
2018-01		
2018-02		
2018-03		
2018-04		
2018-05		
2018-06		
2018-07		
2018-08		
2018-09		
2018-10		
2018-11		
2018-12		
2019-01		
2019-02		
2019-03		
2019-04		
2019-05		
2019-06		
2019-07		
2019-08		
2019-09		
2019-10		
2019-11		
2019-12		
2020-01		
2020-02		
2020-03		
2020-04		
2020-05		
2020-06		
2020-07		
2020-08		
2020-09		
2020-10		
2020-11		
2020-12		
2021-01		
2021-02		
2021-03		
2021-04		
2021-05		
2021-06		
2021-07		
2021-08		
2021-09		
2021-10		
2021-11		
2021-12		
2022-01		
2022-02		
2022-03		
2022-04		
2022-05		
2022-06		
2022-07		
2022-08		
2022-09		
2022-10		
2022-11		
2022-12		
2023-01		
2023-02		
2023-03		
2023-04		
2023-05		
2023-06		
2023-07		
2023-08		
2023-09		
2023-10		
2023-11		
2023-12		
2024-01		
2024-02		
2024-03		
2024-04		
2024-05		
2024-06		
2024-07		
2024-08		
2024-09		
2024-10		
2024-11		
2024-12		
2025-01		
2025-02		
2025-03		
2025-04		
2025-05		
2025-06		
2025-07		
2025-08		
2025-09		
2025-10		
2025-11		
2025-12		
2026-01		
2026-02		
2026-03		
2026-04		
2026-05		
2026-06		
2026-07		
2026-08		
2026-09		
2026-10		
2026-11		
2026-12		
2027-01		
2027-02		
2027-03		
2027-04		
2027-05		
2027-06		
2027-07		
2027-08		
2027-09		
2027-10		
2027-11		
2027-12		
2028-01		
2028-02		
2028-03		
2028-04		
2028-05		
2028-06		
2028-07		
2028-08		
2028-09		
2028-10		
2028-11		
2028-12		
2029-01		
2029-02		
2029-03		
2029-04		
2029-05		
2029-06		
2029-07		
2029-08		
2029-09		
2029-10		
2029-11		
2029-12		
2030-01		
2030-02		
2030-03		
2030-04		
2030-05		
2030-06		
2030-07		
2030-08		
2030-09		
2030-10		
2030-11		
2030-12		
2031-01		
2031-02		
2031-03		
2031-04		
2031-05		
2031-06		
2031-07		
2031-08		
2031-09		
2031-10		
2031-11		
2031-12		
2032-01		
2032-02		
2032-03		
2032-04		
2032-05		
2032-06		
2032-07		
2032-08		
2032-09		
2032-10		
2032-11		
2032-12		
2033-01		
2033-02		
2033-03		
2033-04		
2033-05		
2033-06		
2033-07		
2033-08		
2033-09		
2033-10		
2033-11		
2033-12		
2034-01		
2034-02		
2034-03		
2034-04		
2034-05		
2034-06		
2034-07		
2034-08		
2034-09		
2034-10		
2034-11		
2034-12		
2035-01		
2035-02		
2035-03		
2035-04		
2035-05		
2035-06		
2035-07		
2035-08		
2035-09		
2035-10		
2035-11		
2035-12		
2036-01		
2036-02		
2036-03		
2036-04		
2036-05		
2036-06		
2036-07		
2036-08		
2036-09		
2036-10		
2036-11		
2036-12		
2037-01		
2037-02		
2037-03		
2037-04		
2037-05		
2037-06		
2037-07		
2037-08		
2037-09		
2037-10		
2037-11		
2037-12		
2038-01		
2038-02		
2038-03		
2038-04		
2038-05		
2038-06		
2038-07		
2038-08		
2038-09		
2038-10		
2038-11		
2038-12		
2039-01		
2039-02		
2039-03		
2039-04		
2039-05		
2039-06		
2039-07		
2039-08		
2039-09		
2039-10		
2039-11		
2039-12		
2040-01		
2040-02		
2040-03		
2040-04		
2040-05		
2040-06		
2040-07		
2040-08		
2040-09		
2040-10		
2040-11		
2040-12		
2041-01		
2041-02		
2041-03		
2041-04		
2041-05		
2041-06		
2041-07		
2041-08		
2041-09		
2041-10		
2041-11		
2041-12		
2042-01		
2042-02		
2042-03		
2042-04		
2042-05		
2042-06		
2042-07		
2042-08		
2042-09		
2042-10		
2042-11		
2042-12		
2043-01		
2043-02		
2043-03		
2043-04		
2043-05		
2043-06		
2043-07		
2043-08		
2043-09		
2043-10		
2043-11		
2043-12		
2044-01		
2044-02		
2044-03		
2044-04		
2044-05		
2044-06		
2044-07		
2044-08		
2044-09		
2044-10		
2044-11		
2044-12		
2045-01		
2045-02		
2045-03		
2045-04		
2045-05		
2045-06		
2045-07		
2045-08		
2045-09		
2045-10		
2045-11		
2045-12		
2046-01		
2046-02		
2046-03		
2046-04		
2046-05		
2046-06		
2046-07		
2046-08		
2046-09		
2046-10		
2046-11		
2046-12		
2047-01		
2047-02		
2047-03		
2047-04		
2047-05		
2047-06		
2047-07		
2047-08		
2047-09		
2047-10		
2047-11		
2047-12		
2048-01		
2048-02		
2048-03		
2048-04		
2048-05		
2048-06		
2048-07		
2048-08		
2048-09		
2048-10		
2048-11		
2048-12		
2049-01		
2049-02		
2049-03		
2049-04		
2049-05		
2049-06		
2049-07		
2049-08		
2049-09		
2049-10		
2049-11		
2049-12		
2050-01		
2050-02		
2050-03		
2050-04		
2050-05		
2050-06		
2050-07		
2050-08		
2050-09		
2050-10		
2050-11		
2050-12		

U A 7 7 3 8 2 C 2

FeB71.TAMU

ATGGGTCACGCAGCAAAGTGGAAAACACCCACTACTGAAGCACCCATATCCCAAGCTCTTT 60
Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr Pro Lys Leu Phe

CCGCTCTTGATGCTAGCTAGTCTTTTTTACTTCTGTTCCAGGTATCATCCAGGTGAACAAG 120
Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys

ACAGTGGAAAGTAGCAGTACTATCCTGTGATTACAACATTTCCACCAAAGAAGTACAGC 180
Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr

GAAATTCGAATCTATTGGCAAAGGATGATGAAATGGTGTGGCTGTCATGCTGGCAAA 240
Glu Ile Arg Ile Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys

GTACAAGTGTGGCCCAAGTACAAGAACCACACATTCACTGACGTCACCGATAACCACTCC 300
Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr Asp Asn His Ser

ATTGTGATCATGGCTCTGCGCCTGTGAGACAATGGCAAATACACTTGTATTATTCAAAAG 360
Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys

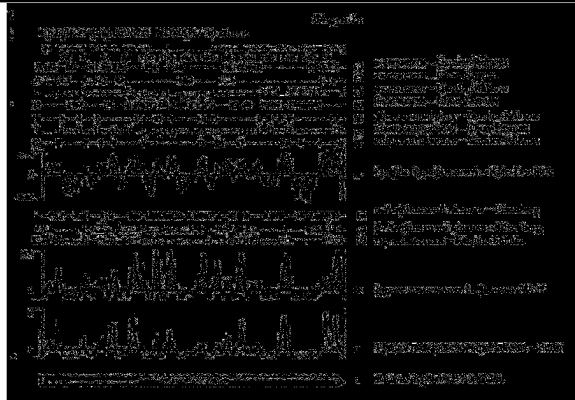
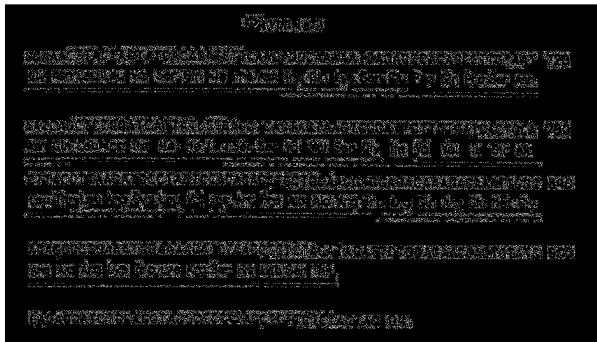
ATTGAAAAAGGGTCTTACAAAGTGAACACCTGACTTCGGTGATGTTATTGGTCAGAGCT 420
Ile Glu Lys Gly Ser Tyr Lys Val Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala

GACTTCCTGTCCCTAGTATAACTGATCTTGGAAATCCATCTCATAACATCAAAGGATA 480
Asp Phe Pro Val Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile

ATGTGCTTAACTTCTGGAGGTTTTCCAAAGCCTCACCTCTCCTGGCTGGAATGAAGAA 540
Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Glu

GAATTAATGCCATCAACACAACAGTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTACACTATT 600
Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile

AGCAGTGAACGGATTTC AATATGACAACAACCATAGCTTCCTGTGCTTTGTCAAGTAT 660
Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr



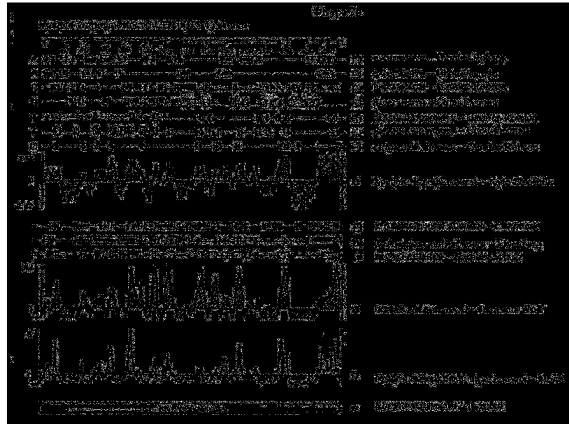
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2

Page 1
[Redacted text block]

Page 2
[Redacted text block]



U A 7 7 3 8 2 C 2

Phiypa 3a-1

FeB72
 GTTCTCTGTTCCTCGGGAATGTCACAGCTTATACATCTGGTCTCTGGGAGCTGCAGT 60
 GGATGGGCATTGTGACAGCAGCTATGGGACTGAGTCACACTCTCTCTGTGATGGCCCTCC
 Met Gly Ile Cys Asp Ser Thr Met Gly Leu Ser His Thr Leu Leu Val Met Ala Leu 120

TGCTCTCTGGTGTTCCTCCATGAAGAGTCAAGCATATTTCAACAAGACTGGGAACTGC 180
 Leu Leu Ser Gly Val Ser Ser Met Lys Ser Gln Ala Tyr Phe Asn Lys Thr Gly Glu Leu

CATGCCATTTTACAAACTCTCAAACATAAGCCTGGATGAGCTGCTAGTATTTTGGCAGG 240
 Pro Cys His Phe Thr Asn Ser Gln Asn Ile Ser Leu Aso Glu Leu Val Val Phe Trp Sin

ACCAGGATAAGCTGGTTCGTATGAGATATTCAGAGCCAAAGAGAACCCTCAAAATGTTT 300
 Asp Gln Asp Lys Leu Val Leu Tyr Glu Ile Phe Arg Gly Lys Glu Asn Pro Gln Asn Val

ATCTCAAATATAAGGCCCCTACAAGCTTTGACAAGGACAACCTGGACCCTGAGACTCCACA 360
 His Leu Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser Phe Asp Lys Asp Asn Trp Thr Leu Arg Leu His

ATGTCAGATCAAGGACAAGGSCACATACACTGTTTTCATTATAAAGGGCCCAAG 420
 Asn Val Gln Ile Lys Asp Lys Gly Thr Tyr His Cys Phe Ile His Tyr Lys Gly Pro Lys

GACTAGTTCCTCCATGCCAAATGAGTTCGACCTATCAGTCTTGGCTAACTTCAGTCAAC 480
 Gly Leu Val Pro Met His Gln Met Ser Ser Asp Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln

CTGAAATAACAGTAACTTCTAATAGAACAGAAAATTCGGCATCAAAATTTGACCTGCT 540
 Pro Glu Ile Thr Val Thr Ser Asn Arg Thr Glu Asn Ser Gly Ile Ile Asn Leu Thr Cys

CATCTATACAAGGTTACCCAGAACCTAAGSAGATGTATTTTCAGCTAAACACTGAGAATT 600
 Ser Ser Ile Gln Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Glu Met Tyr Phe Gln Leu Asn Thr Glu Asn

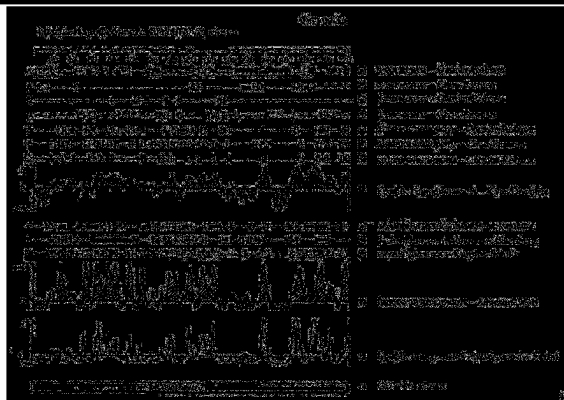
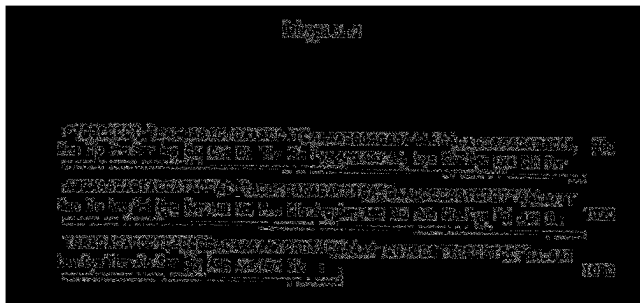
CAACTACTAAGTATGATACGTGTCATGAAGAAATCTCAAATAATGTGACAGAACTGTACA 660
 Ser Thr Thr Lys Tyr Asp Thr Val Met Lys Lys Ser Gln Asn Asn Val Thr Glu Leu Tyr

ACGTTTCTATCAGCTTGCCTTTTTCAGTCCCTGAAGCACACAATGTGAGCCTCTTTTGTG 720
 Asn Val Ser Ile Ser Leu Pro Phe Ser Val Pro Glu Ala His Asn Val Ser Val Phe Cys

CCCTGAAACTGGAGACTGGAGATGCTGCTCCCTACCTTTEAATATAGATGCCAAC 780
 Ala Leu Lys Leu Glu Thr Leu Glu Met Leu Leu Ser Leu Pro Phe Asn Ile Asp Ala Gln

CTAAGGATAAAGACCCTGAACAAGGCCACTTCCTCTGGATTGGGGCTTACTTGTAAATGT 840
 Pro Lys Asp Lys Asp Pro Glu Gln Gly His Phe Leu Trp Ile Ala Ala Val Leu Val Met

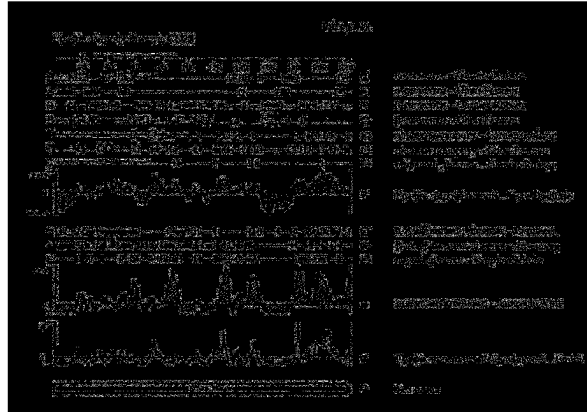
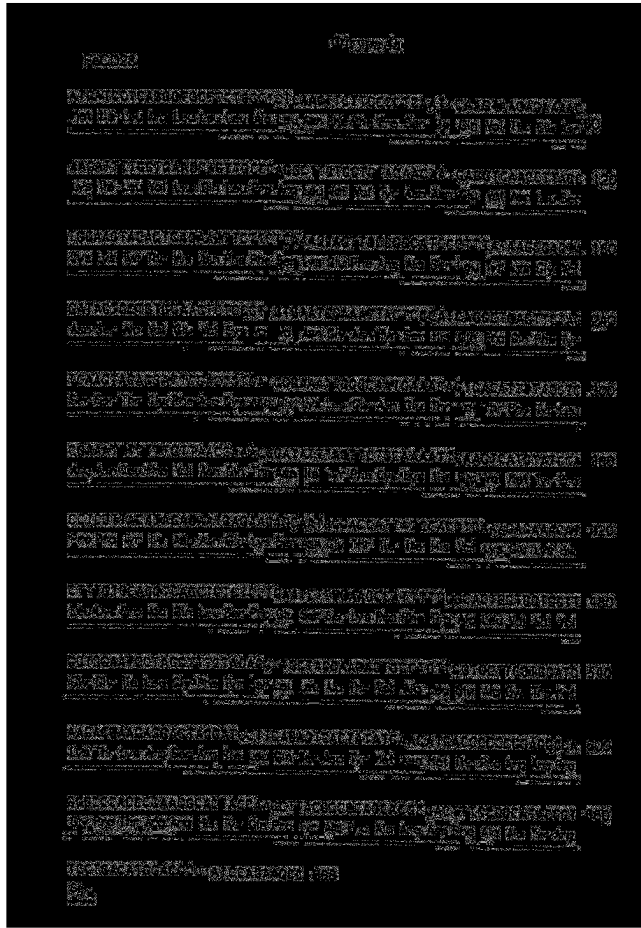
TTGTTGTTTTTTTGGGATGGTCTCCTTTAAAACACTAAGGAAAAGGAAGAAGCAGC 900
 Phe Val Val Phe Cys Gly Met Val Ser Phe Lys Thr Leu Arg Lys Arg Lys Lys Lys Gln



U A 7 7 3 8 2 C 2

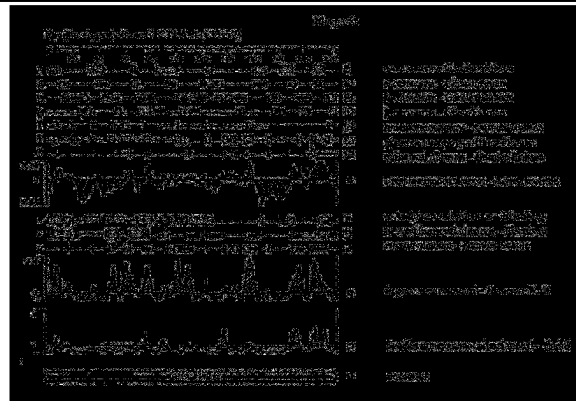
U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



U A 7 7 3 8 2 C 2

U A 7 7 3 8 2 C 2



Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2006, N 12, 15.12.2006. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

U A 7 7 3 8 2 C 2