

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

296 202

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1996-2387**
(22) Přihlášeno: **15.02.1995**
(30) Právo přednosti: **15.02.1994 GB 1994/9402890**
28.06.1994 GB 1994/9412952
09.11.1994 GB 1994/9422584
(40) Zveřejněno: **13.08.1997**
(Věstník č. 8/1997)
(47) Uděleno: **08.12.2005**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.02.2006**
(Věstník č. 2/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/GB1995/000321**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1995/021618**

(73) Majitel patentu:

Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky,
Praha 4-Krč, CZ

(72) Původce:

Pospíšil Miloslav Prof. Dr. DrSc., Praha 10, CZ
Feizi Ten, London, GB
Bezouška Karel, Praha 6, CZ
Fišerová Anna Dr. ScC, Praha 8, CZ
Vanucci Luca Dr., Praha 8, CZ

(74) Zástupce:

Marta Gabrielová, Heyrovského nám. 2, Praha 6, 16200

(54) Název vynálezu:

**Farmakologický přípravek obsahující
oligosacharid a použití tohoto oligosacharidu**

(57) Anotace:

Řešení se týká farmakologického přípravku obsahujícího jako účinnou látku monosacharidy a oligosacharidy vázící se k NKR-P1 a CD69, exprimovaným na povrchu efektorových buněk imunitního systému, včetně přirozených zabíječských buněk (buněk NK). Současně zahrnuje použití monosacharidů a oligosacharidů pro výrobu farmakologického přípravku pro modulaci efektorové funkce buněk imunitního systému. Jsou-li oligosacharidy volné, inhibují efektorovou funkci, jsou-li sdružené, stimulují efektorovou funkci buněk imunitního systému. Oligosacharidy mohou být sdruženy na liposomech nebo aminokyselinových sekvencích. Oligosacharidy i efektorové buňky lze směřovat k cílovým buňkám použitím členů specifického vazebného páru, například protilátek nebo jejich fragmentů, přičemž cílovými buňkami jsou zejména buňky nádorové.

CZ 296202 B6

Farmakologický přípravek obsahující oligosacharid a použití tohoto oligosacharidu

Oblast techniky

5 Vynález se týká farmakologického přípravku pro modulaci aktivity efektorových buněk imunitního systému, zejména modulaci komponent imunitního systému, a použití monosacharidů a oligosacharidů pro výrobu tohoto farmakologického přípravku.

10 Je založen na identifikaci ligandů, zvláště sacharidových ligandů, pro receptory nalezené na povrchu buněk důležitých v imunitní odpovědi, které zahrnují receptory NKR-P1 a CD69. Mono- a oligosacharidy, jak se ukazuje, jsou schopné inhibovat nebo aktivovat efektorové buňky v závislosti na tom, zdali jsou monomerní (volné) nebo zesíťované (sdružené).

Dosavadní stav techniky

15 Přírozené zabíječské (NK) buňky jsou cytotoxické lymfocyty, které jsou schopné lyzovat různé cílové buňky, včetně nádorových buněk a viry nebo intracelulárními bakteriemi infikovaných buněk (Trinchieri G., Adv. Immunol. 47, 187-376 (1989)). Úloha NK buněk v imunitním systému se neomezuje pouze na buněčné zabíjení. NK buňky mají receptory pro 1. třídu MHC na svém povrchu, a jsou schopny rozpoznávat obojí autologní a allogenní alely 1. třídy (Trinchieri G., J. Exp. Med. 180, 417-421 (1994)), což ukazuje na jejich úlohu v rozpoznávání změn v konformaci antigenů 1. třídy, které mohou být přítomny například během virové infekce. Pomocné T buňky a antigenprezentující buňky restringované MHC II. třídy nejsou NK buňkami vyžadovány - umožňují pravděpodobnou detekci patologických změn v buňkách většiny tkání, včetně hematopoetických a endoteliálních buněk.

25 Aktivace buněk NK probíhá nejen při cytotoxicitě, ale rovněž při sekreci cytokinů, zvláště gama-interferonu (IFN-gama), granulocyto-makrofágového kolonie-stimulujícího faktoru GM-CSF a nádory nekrotizujícího faktoru (Trinchieri G., Adv. Immunol. 47, 187-376 (1989)). IFN-gama a GM-CSF lze zahrnout mezi aktivátory fagocytujících buněk významných v zánětu a aktivaci antigen-prezentujících buněk. NK buňky hrají významnou úlohu v modulaci antigen-specifické odpovědi pomocných a cytotoxických T buněk (Romagnani. Immunology Today, 13, 379 (1992)). Skutečně jak shrnul Trinchieri (Trinchieri G., J. Exp. Med. 180, 417-421 (1994)), časná odpověď NK buněk během infekce má významný účinek na charakteristiku probíhající antigen-specifické adaptivní imunitní odpovědi, a je vyžadována k optimální odpovědi pomocných (TH1) buněk typu 1. Modulace NK buněčné aktivity může tudíž mít výrazný účinek nikoliv jen na přirozenou imunitní odpověď, ale také v antigen-specifických odpovědích.

40 Porozumění biologické úloze různých oligosacharidů glykoproteinů, proteoglykanů a glykolipidů má význam v buněčné biologii. Práce s monoklonálními protilátkami ukázaly, že jsou zásadní změny v obraze oligosacharidů na povrchu buněk během embryonálního vývoje a buněčné diferenciace, a že tyto změny jsou předvídané při malignitě (Feizi T., Nature 314, 53-57 (1985), Hakomori S., Cancer Res. 45, 2405-2414 (1985)). Vznikly úvahy, že takové oligosacharidy (mezi něž patří krevně skupinové antigeny a příbuzné sekvence) mohou mít významné úlohy při buněčné migraci nebo při odpovědi na různé mikropodmínky (Feizi T., Nature 314, 53-57 (1985), Feizi T. et al., Biochem. J. 245, 1-11 (1987), Feizi T., in Carbohydrate Recognition in Cellular Function (Bock G. and Harnett S. eds.), Ciba Foundation Symposium 145, Wiley (1989), str. 62, 79).

50 Nyní narůstá znalost o proteinech, které mají domény s předpokládanou sacharidy vázající aktivitou v závislosti na aminokyselinových sekvencích. Významná mezi těmito proteiny je lektinová rodina C-typu charakterizovaná přítomností jedné nebo více domén, které se podobají sacharidy rozpoznávající doméně (CRD) jaterního receptoru pro asialoglykoproteiny (Drickamer

K., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 393-400 (1993)). Různí členové této proteinové rodiny jsou nyní známi vazbou sacharidů (Feizi T. et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 701-710 (1993)). Mezi ně zvláště patří proteiny umožňující adhezi leukocytů k endotheliu, selektiny (Bevilacqua M. et al., *J. Clin. Invest.* 91, 379-387 (1993), Lasky L. A. et al., *Cell* 56, 1045-1055 (1989), McEver R. P., *J. Cell Biochem.* 45, 156-161 (1991)), které hrají stěžejní úlohy v leukocytárním prostupu krevní stěnou a obnově při zánětu a většinou jistě hrají úlohu v rozsevu nádorových buněk krevní cestou.

Proteiny lektinové rodiny C-typu byly popsány u přirozených zabíječských (NK) buněk (Chambers W. H. et al., *Glycobiology* 3, 9-14 (1993), Yokoyama W. M., *Curr. Opin. Immunol.* 5, 67-73 (1993)). Lektinové proteiny C-typu na NK buňkách jsou dimerního typu, (transmembránové proteiny typu II), obsahující extracelulární motiv společný CRD známých lektinů C-typu. Dále mají oblast stopky a cytoplasmatickou část obsahující tyrosinové a serinové zbytky, které jsou potenciálními fosforylačními místy a tetrapeptidový motiv, který je u T lymfocytárních glykoproteinů CD4 a CD8. Zprostředkuje asociaci s protein-tyrosin kinásou p56^{lck} (Giorda R. et al., *J. Immunol.* 147, 1701-1708 (1991), Rudd C. E. et al., *Biochim Biophys. Acta* 1155, 239-266 (1993)). Do dneška však vazba oligosacharidů k těmto lektinovým proteinům nebyla popsána a protože proteiny byly zařazeny do skupiny V, s chybějícím Ca²⁺ vazebným motivem, majícím zcela odlišné sekvence. Schopnost vazby oligosacharidů byla zpochybněna (Drickamer K., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 393-400 (1993)).

Jeden z prvních těchto proteinů, který byl klonován a sekvenován, je potkaní NKR-P1 protein (Giorda R. et al., *Science* 249, 1298-1300 (1990)) různé izoformy se objevují na potkaních a myších NK buňkách (Ryan J. C. et al., *J. Immunol.* 149, 1631-1635 (1992), Yokoyama W. M., *Annu. Rev. Immunol.* 11, 613-635 (1993)). Podobné proteiny se objevují na lidských NK buňkách (Chambers W. H. et al., *Glycobiology* 3, 9-14 (1993), Yokoyama W. M., *Curr. Opin. Immunol.* 5, 67-73 (1993)). Protilátky vázající se k NKR-P1 na povrchu NK buněk mohou indukovat na protilátkách závislou cytotoxicitu FcR⁺ cílových buněk (Chambers W. H. et al., *J. Exp. Med.* 169, 1373-1389 (1989)) (via Fc částí protilátky - tzv. "opačně směřované zabíjení") a překřížení NKR-P1 protilátkami stimuluje přeměnu fosfoinositolů a mobilizaci intracelulárního kalcia (Ryan J. C. et al., *J. Immunol.* 147, 3244-3250 (1991)). Kaskáda dějů vedoucí k zabíjení zahrnuje tvorbu konjugátů s cílovými buňkami, vznik inositol-bisfosfátu (InsP₂) a vzrůst volného cytoplasmatického kalcia v zabíječské buňce před uvolněním póry tvořícím proteinem a cytotoxickými faktory uvolňovanými z intracelulárních granulí (Trinchieri G., *Adv. Immunol.* 47, 187-376 (1989), Ryan J. C. et al., *J. Immunol.* 147, 3244-3250 (1991), Hudig D. et al., *Curr. Opin. Immunol.* 5, 90-96 (1993)).

CD69 (Schwartz R. et al., *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation*, eds. Knapp W. et al., Oxford University Press. Vol. IV, 428-432 (1989), Testi et al., *Immunology Today* 15, 479-483 (1994), Ziegler S. F. et al., *J. Immunol.* 152, 1228-1236 (1994)) je buněčná povrchová molekula, homodimér s podjednotkami 26-34 kDa, která je *in vivo* konstitutivně exprimována na aktivovaných lymfocytech jako CD3^{bright} thymocytech, T buňkách, podobně na krevních monocytech, epidermálních Langerhansových buňkách, kostně dřevných myeloidních buňkách a destičkách. Jinak exprese CD69 může být indukována po stimulaci většiny buněk hematopoetického původu. Protože existuje široká distribuce CD69 a jeho schopnost podněcovat vznik intracelulárních signálů, lze předpokládat, že protein má obecnou úlohu v biologii hematopoetických buněk včetně buněčné aktivace a diferenciaci. Může působit jako společný buněčný spouštěč (Testi et al., *Immunology Today* 15, 479-483 (1994)). Jak bylo řečeno, definice CD69 ligandů a požadavky na jeho expresi mohou odkrýt molekulární interakce obecné platnosti pro aktivaci a funkci hematopoetických buněk (Testi et al., *Immunology Today* 15, 479-483 (1994)).

Molekulární klonace (Hamann J. et al., *J. Immunol.* 150, 4920-4927 (1993), Lopez-Cabrera et al., *J. Exp. Med.* 178, 537-547 (1993), Ziegler S. F. et al., *J. Immunol.* 145, 1228-1236 (1993)) prokázala, že CD69 je transmembránový protein typu II s molekulární hmotností 22 559 Da a karboxy-terminální oblastí, která se podobá sacharidy-rozpoznávacím doménám Ca²⁺-závis-

ých (C-typu) živočišných lektinů. Dimerní proteiny tohoto typu byly označeny jako lektinová skupina V (Drickamer K., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 393-400 (1993)), která zahrnuje vedle přirozených zabíječů (NK) asociované proteiny. NKR-P1, Ly-49 a NKG2 (Chambers W. H. et al., *Glycobiology* 3, 9-14 (1993), Yokoyama W. M. et al., *Annu. Rev. Immunol.* 11, 613-635 (1993)).

5

CD69 se však odlišuje od těchto proteinů svou krátkostí - chybí mu stopková oblast, která intervenuje mezi trans-membránovou a krční oblastí lektinové domény. Mapování chromozomu ukázalo, že u myši i lidí je gen pro CD69 spojen s oblastí u myši nazvanou NK genový komplex a lektiny C-typu jsou exprimované především na buňkách NK (Yokoyama W. M. et al., *J. Immunol.* 145, 2353-2358 (1990)). A tak u myši CD69 gen patří k distální části chromozomu 6 patřícího k NKR-P1 a Ly-49 genovým rodinám (Yokoyama W. M. et al., *J. Immunol.* 145, 2353-2358 (1990), Ziegler S. F. et al., *Stem Cells* 12, 456-465 (1994)). U lidí je gen řazen k chromozomu 12, který je obdobou distální části myšičího chromozomu 6. Analýza CD69 genu ukázala na jedinou kopii v kontrastu s genovou rodinou, která existuje pro NKR-P1 a Ly-49

15

Ligandy pro CD69 nebyly dříve známy. Antigen CD69 byl zařazen ke skupině V, C-typu lektinů, byly však pochybnosti o jeho schopnosti vázat oligosacharidy (Drickamer K., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 701-710 (1993)).

20

V in vitro experimentech, v kterých byl lymfocytární CD69 překřížen CD69 protilátkou, byly zaznamenány různé účinky (jestliže lymfocyty byly nejprve stimulovány forbol-myristát-acetátem, stimulatorem proteinkinázy C): (a) lidské buňky T, buňky B a thymocyty byly indukovány k proliferaci, (b) u thymocytů došlo k stimulaci proliferace a stimulaci exprese genů kódujících interleukin-2, interferon-gama (Testi et al., *J. Immunol.* 143, 1123-1128 (1989), Nakamura et al., *J. Exp. Med.* 169, 677-689 (1989)), faktor nekrotizující nádory alfa (Santis et al., *Eur. J. Immunol.* 22, 1253-1259 (1992)). Z ostatních pokusů byla získána znalost, že CD69 na aktivovaných buňkách T po kontaktu s monocytami podporuje stimulaci produkce interleukinu-1 beta v monocytech (Isler et al., *Eur. Cytokine Netw.* 4, 15-23 (1993), Manié et al., *Eur. Cytokine Netw.* 4, 7-13 (1993)). Zdá se tedy, že propojení CD69 na T lymfocytech s ligandy může na jedné straně stimulovat proliferaci a produkci cytokinů v těchto buňkách a na druhé straně stimulovat buňky nesoucí ligandy patřící k CD69 jako monocytami k produkci vlastních cytokinů.

25

30

U destiček a cirkulujících monocytů, kde dochází ke konstitutivní expresi CD69, propojení CD69 s protilátkami umožňuje aktivaci cytosolové fosfolipázy A2. Tato cesta vede ke vzniku oxidovaných metabolitů arachidonové kyseliny. Tak vzniká propojení s cestou navozující trombostazi destiček (srážecí mechanismus) a také alergické stavy (aktivace monocytů).

35

Jak bude ještě dále uvedeno, ukázali jsme, že CD69 a NKR-P1 jsou lektiny, které jsou těsně propojeny v přirozených zabíječských procesech, identifikace ligandů pro CD69 a NKR-P1 má tedy široké uplatnění nejen pro modulaci buněčně-zabíjecí aktivity, ale také pro modulaci produkce cytokinů, a tak v protizánětlivém a imunomodulačním lékovém uspořádání.

40

Početné lektinové molekuly této rodiny jsou známy na lidských lymfocytech, např. na B lymfocytech, monocytech a přidružených buňkách (Drickamer K., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 393-400 (1993), Yokoyama W. M., *Curr. Opin. Immunol.* 5, 67-73 (1993)). Sacharidové ligandy, případně syntetické látky napodobující nebo nahrazující tyto ligandy, mají tudíž význam jako terapeutické látky pro stimulaci nebo inhibici přirozeného zabíjení, cytotoxicitu zprostředkovanou buňkami T a ostatní vzájemné buněčné interakce. Mezi ně patří B-T buněčná interakce, nebo T buněčná-B buněčná interakce s akcesorními buňkami, o nichž je známo, že hrají významnou úlohu v imunitní odpovědi.

45

50

Předložený vynález v různých aspektech dokládá, že je založen na získaných výsledcích (jak doloženo dále) včetně následujících signifikantních nálezů:

1. Bylo zjištěno, že NKR-P1 a CD69 jsou přímo zapojeny v přirozených zabíjecích (NK) procesech. Ryan et al. (J. Immunol. 147, 3244-3250 (1991)) dříve ukázali, že protilátkou způsobená agregace NKR-P1 na buněčném povrchu NK buněk vede k stimulaci fosfoinositolového metabolismu s nárůstem intracelulárního kalcia, ale neurčili úlohu proteinu v přirozeném zabíjení. Protilátka neblokuje přirozené zabíjení YAC-1 cílových buněk a fosfoinositolový metabolismus navozený těmito cílovými buňkami. Autoři uzavřeli nález tvrzením, že zabíjení buněk YAC-1 nezahrnuje NKR-P1. Zde je ukázáno, že se tak děje.
- 5
- 10 Také je zde ukázáno, že exprese CD69 antigenu je v přirozeném zabíjení časná, rychlejší než následuje nová syntéza proteinu. Zabíjení NK je neinhovatelné CD69 proteinem.
2. Byly nalezeny ligandy pro NKR-P1 a CD69. Některé z nich mají velmi vysoké afinity, s hodnotami IC_{50} od 10^{-9} do 10^{-12} M. Již dříve byla popsána přítomnost lektinu-podobné domény na NKR-P1 (Giorda R. et al., Science 249, 1298-1300 (1990)). Schopnost vazby monosacharidů N-acetylgalaktózaminového, N-acetylglukózaminového typu a fukózy (IC_{50} hodnoty $0,6 \times 10^{-7}$, 2×10^{-7} , 2×10^{-6} M) je popsána v publikaci uvedené zde (Bezouška K. et al., J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)). Nyní identifikované hexóz oligosacharidy mají afinity, které jsou stokrát až stotisíckrát větší.
- 15
- 20 Předpokládaná sekvence proteinu CD69 je pro lektin podobnou molekulu (Hamann et al., J. Immunol. 150, 4920-4927 (1993), López-Cabrera et al., J. Exp. Med. 178, 537-547 (1993), Ziegler et al., Eur. J. Immunol. 23, 1643-1648 (1993)), ačkoliv sacharidy vázající místa proteinu ještě nebyla popsána. Jinde je ukázáno, že CD69 je lektin se sacharidovou vazebnou specificitou, která se překrývá s NKR-P1. Disacharidy heparin a chondroitin sulfát (viz tabulka 2) jsou vysokoafinitní ligandy pro oba proteiny NKR-P1 a CD69. Disacharid keratan sulfát a ukázané O-glykosidované disacharidy jsou zvláště vyhovující pro CD69.
- 25
- 30 Je uvedeno zjištění, že oligosacharidová struktura chondroitin sulfátového typu a O-glykosidické typy jsou ligandy pro CD69 na NK-vnímavých cílových buňkách.
3. Monomerní (volné) hexóz oligosacharidové ligandy inhibují přirozené zabíjení a inhibují aktivaci buněk NK, což bylo zjištěno poklesem hladiny fosfoinositolů a volného cytoplasmatického kalcia.
- 35
- Zde jsou uvedeny výsledky inhibice zabíjení cílových buněk přirozenými zabíječskými buňkami. Podobné výsledky byly získány při použití ligandů pro NKR-P1 a ligandů pro CD69.
- 40 Určité, zde popsané sacharidy (např. GM2 (Ando I, et al., Ing. J. Cancer 40, 12-17 (1987)) ukazující na interakci s NKR-P1, jsou přítomny na NK-vnímavých cílových buňkách, a bylo ukázáno, že inhibují přirozené zabíjení (např. heparin (von Figura K. et al., Annu. Rev. Biochem. 55, 167193 (1986)), Iuquoid (Roellinger et al., Scand. J. Immunol. 25, 507-515 (1987)) a mannózo-6-fosfát (Chou D.K.H. et al., J. Biol. Chem. 261, 11717-11725 (1986)). Avšak nebylo známo jak jsou tyto sacharidy do procesu zapojeny. Většina inhibičních látek jsou velké molekuly, s výjimkou mannózo-6-fosfátu a ostatních fosforylovaných a sulfatovaných monosacharidů. Výzkum zaměřený na úlohu mannózo-6-fosfátu v přirozeném zabíjení byl v počátku opuštěn z důvodu neznámého mechanismu působení.
- 45
- 50 4. Sdružené mono- a oligosacharidové ligandy aktivují NK buňky, což bylo zjištěno nárůstem hladiny fosfoinositolů a volného cytoplasmatického kalcia. Výsledek aktivace je závislý na hustotě. Podobné výsledky byly získány užitím ligandů pro NKR-P1 a ligandů pro CD69.
- Je zvláště překvapivé, že výhradně negativní nebo pozitivní signály mohou být vyvolány v závislosti na mono- nebo oligomerním stavu oligosacharidů (tj. jsou-li volné nebo sdružené).

5. NK–rezistentní buňky jsou udrženy jako NK–vnímavé opracováním sdruženými sacharidovými ligandy pro NKR–P1 nebo CD69, což je předvedeno užitím liposomů.

- 5 Zabíjení jiných rezistentních buněk je nejvíce zvýšeno, jsou-li liposomy užity k opracování buněk před expozicí NK buňkám.

Podstata vynálezu

- 10 Předmětem předloženého vynálezu je farmakologický přípravek, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje jako účinnou látku oligosacharid vybraný ze skupiny zahrnující oligosacharidy glykosaminoglykanů, sulfatované gangliosidy jiné než sulfatidy, 6–sialylhexózy a 3–O–sulfatované kyseliny uronové.

- 15 Význakem vynálezu je dále, že oligosacharidem je keratan sulfát, chondroitin sulfát nebo heparin sulfát.

Dalším význakem vynálezu je, že oligosacharid je disacharidem nebo tetrasacharidem.

- 20 Význakem předloženého vynálezu je, že oligosacharid je vybrán ze skupiny zahrnující K6, Chon OS, 6S, 2,6S, 2,4,6S, Hep IVA, IIA, IS, HNK–1, 6SN, 6S2, 6SLN, S2 a SN.

- 25 Předmětem předloženého vynálezu je dále farmakologický přípravek obsahující jako účinnou látku oligosacharid, jenž je tvořen glykosylaminoglykanovými oligosacharidy, sulfatidem, sulfatovaným gangliosidem jiným než sulfatidem, 6–sialyl hexózou nebo 3–O–sulfatovanou kyselinou uronovou, fosfátem tetramannózy, fosfátem pentamannózy, sialyl nebo sulfatyl–Le^a nebo Le^x, NK–1, HNK–3–5–kyselinou uronovou.

- 30 Význakem vynálezu je, že oligosacharid je vybrán z keratan sulfátů jako K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfátů, jako je ChonSO3 OS/6S, 2,6S, heparinových oligosacharidů jako je Hep IVA, IIA, IS a 12S.

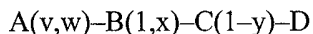
Význakem vynálezu je dále, že oligosacharid je volný.

Podle předmětného vynálezu může být monosacharid nebo oligosacharid sdružený.

- 35 Význakem předmětného vynálezu je, že monosacharid nebo oligosacharid je ligandem pro protein NKR–P1.

Dále je význakem vynálezu, že monosacharid nebo oligosacharid je ligandem proteinu CD69.

- 40 Význakem předmětného vynálezu je farmakologický přípravek podle vynálezu, v němž monosacharid nebo oligosacharid má následující strukturu:



kde:

- 45 A je vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, hexózy, kterou může být galaktóza nebo mannóza a může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, substituované sialové kyseliny, alifatického řetězce s jednou nebo více rozvětvenými skupinami, nasycené nebo nenasycené uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, N–acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými částmi, a N–acetylgalaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami,

- 50 B může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózy, N–acetylglukosaminu, který mů-

že být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózou nebo fukózou, N-acetyl-galaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, substituovaného alifatického řetězce, a oligosacharidového řetězce se 3 nebo 4 mannózovými zbytky,

5 C může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózy, glukózy, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, N-acetylgalaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, a alifatického řetězce, jenž může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami,

10 D může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z jednoho nebo více opakování B a/nebo C, zbývajících strukturních komponent N-glykosidicky vázaných bi- tri- nebo tetra-antenárních oligosacharidů, O-glykosidických oligosacharidů a glykosaminoglykanů a dalších sekvencí, které mohou sloužit k dodatečné vazbě nebo prezentaci ligandu a

15 v závorkách uvedená malá písmena představují pozice uhlíkové vazby u uvedených sacharidů, kde v = 1 nebo 2, w = 2, 3, 4 nebo 6, x = 2, 3 nebo 4, y = 2, 3 4 nebo 6,

příčemž

20 když A je substituovaná sialová kyselina znamená to kyselinu sialovou substituovanou N-acylem nebo O-acylem,

když B nebo C jsou substituované alifatické řetězce znamená to alifatický řetězec substituovaný jedním nebo více substituenty vybranými ze skupiny obsahující hydroxyl, acetyl amin (NH.COCH_3) a nabité skupiny,

25 a nabité skupiny mohou být vybrány ze skupiny sestávající ze sulfátů, fosfátů a karboxylů, jako jsou sialové kyseliny.

30 Významem předloženého vynálezu je dále, že monosacharidy nebo oligosacharidy jsou tvořeny α 2-3 vázanou kyselinou sialovou, 3-O-sulfátem, 3-O-sulfátovanou galaktózou, 3-, 4-, nebo 6-O-sulfátovaným N-acetylhexosaminem, N-sulfátovaným hexosaminem, kyselinou uronovou substituovanou N-acetylhexosaminem nebo hexosaminem, 2- nebo 3-O-sulfátovanou kyselinou uronovou, α 1-3 vázanou fukózou, α 1-4 vázanou fukózou, α 2-6 vázanou kyselinou sialovou, α 2-6 vázanou kyselinou sialovou na galaktóze nebo N-acetylhexóze.

35 Dále je významem vynálezu, že oligosacharid je vybrán ze skupiny zahrnující oligosacharidy glykosaminoglykanů, sulfatidy, sulfátované gangliosidy jiné než sulfatidy, 6-sialylovanou hexózu nebo 3-O-sulfátovanou kyselinu uronovou, fosfát tetramannózy, fosfát pentamannózy, sialylované nebo sulfátované Le^a nebo Le^x , HNK-1, HNK-3-5-uronovou kyselinu, keratan sulfáty jako K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfáty jako ChonSO₃ OS/6S, 2,6 S a 2,4,6 S, a oligosacharidy heparinu jako jsou HepIVA, IIA, IS a IS2.

Významem předloženého vynálezu je dále, že monosacharid nebo oligosacharid je sdružován na liposomech.

45 Dále je významem vynálezu, že monosacharid nebo oligosacharid je sdružován na sekvenci aminokyselin.

50 Významem předmětného vynálezu je, že farmakologický přípravek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný excipient nebo nosič.

Předmětem předloženého vynálezu je rovněž použití oligosacharidu, který je představován oligosacharidem glykosaminoglykanu, sulfátovaným gangliosidem jiným než sulfatidem, 6-sialylovanou hexózou nebo 3-O-sulfatovanou kyselinou uronovou, pro výrobu farmakologického přípravku podle vynálezu pro modulaci aktivity efektorové funkce imunitního systému.

5

Význakem výše uvedeného předmětného vynálezu je použití, při němž je oligosacharidem keratan sulfát, chondroitin sulfát nebo heparin sulfát.

Dále je význakem vynálezu použití, při němž je oligosacharid disacharidem nebo tetrasacharidem.

10

Dále je význakem vynálezu použití, při němž je oligosacharid vybrán ze skupiny zahrnující K6, Chon OS, 6S, 2,6 S, 2,4,6 S, Hep IVA, IIA, IS, HNK-1, 6SN, 6S2, 6SLN, S2 a SN.

15

Význakem vynálezu je rovněž použití, kde oligosacharid je představován glykosaminoglykanovými oligosacharidy, sulfatidem, sulfatovaným gangliosidem jiným než sulfatidem, 6-sialyl hexózou nebo 3-O-sulfatovanou kyselinou uronovou, fosfátem tetramannózy, fosfátem pentamannózy, sialyl- nebo sulfatyl- Le^a nebo Le^x , HNK-1, HNK-3-5-kyselinou uronovou, pro výrobu farmakologického přípravku určeného pro modulaci aktivity efektorové buňky, kterou je přirozená zabíječská buňka.

20

Dále je význakem vynálezu použití, při němž je oligosacharid vybrán z keratan sulfátů, jako je K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfátů jako je ChonSO₃, OS/6S, 2,6 S, 2,4,6 S, oligosacharidů heparinu jako je Hep IVA, IIA, IS, IS2.

Význakem vynálezu je dále použití při němž je oligosacharid volný.

25

Dále je význakem vynálezu použití při němž je oligosacharid sdružený.

Předmětem předloženého vynálezu je použití sdružených monosacharidů nebo oligosacharidů při výrobě farmakologického přípravku podle předmětného vynálezu pro zvýšení aktivity efektorových buněk imunitního systému.

30

Význakem vynálezu je dále použití sdružených monosacharidů nebo oligosacharidů při výrobě farmakologického přípravku podle předmětného vynálezu, při němž je efektorovou buňkou přirozená zabíječská (NK) buňka.

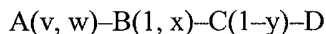
35

Dále je význakem vynálezu použití sdružených monosacharidů nebo oligosacharidů při výrobě farmakologického přípravku podle předmětného vynálezu, při němž je monosacharid nebo oligosacharid ligandem NKR-P1 proteinu.

Význakem vynálezu je dále použití, při němž je monosacharid nebo oligosacharid ligandem CD69.

40

Dále je význakem vynálezu použití sdružených monosacharidů nebo oligosacharidů při výrobě farmakologického přípravku podle předmětného vynálezu, při němž má monosacharid nebo oligosacharid strukturu:



kde:

45

A je vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, hexózy, kterou může být galaktóza nebo mannóza a může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, substituované sialové kyseliny, alifatického řetězce s jednou nebo více rozvětvenými skupinami, nasycené nebo nenasycené uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými částmi, a N-acetylgalaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami,

50

B může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózy, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózou nebo fukózou, N-acetyl-galaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, substituovaného alifatického řetězce, a oligosacharidového řetězce se 3 nebo 4 mannózovými zbytky,

C může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózy, glukózy, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, N-acetylgalaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, a alifatického řetězce, jenž může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami,

D může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z jednoho nebo více opakování B a/nebo C, zbývajících strukturních komponent N-glykosidicky vázaných bi- tri- nebo tetra-antenárních oligosacharidů, O-glykosidických oligosacharidů a glykosaminoglykanů a dalších sekvencí, které mohou sloužit k dodatečné vazbě nebo prezentaci ligandu a

v závorkách uvedená malá písmena představují pozice uhlíkové vazby u uvedených sacharidů, kde $v = 1$ nebo 2 , $w = 2, 3, 4$ nebo 6 , $x = 2, 3$ nebo 4 , $y = 2, 3, 4$ nebo 6 ,

přičemž

když A je substituovaná sialová kyselina znamená to kyselinu sialovou substituovanou N-acetylem nebo O-acetylem,

když B nebo C jsou substituované alifatické řetězce znamená to alifatický řetězec substituovaný jedním nebo více substituenty vybranými ze skupiny obsahující hydroxyl, acetyl amin (NH.COCH_3) a nabitě skupiny,

a nabitě skupiny mohou být vybrány ze skupiny sestávající ze sulfátů, fosfátů a karboxylů, jako jsou sialové kyseliny.

Význakem vynálezu je dále použití sružených monosacharidů nebo oligosacharidů při výrobě farmakologického přípravku podle předmětného vynálezu, při němž je monosacharid nebo oligosacharid tvořen $\alpha 2-3$ vázanou kyselinou sialovou, 3-O-sulfátem, 3-O-sulfatovanou galaktózou, 3-, 4-, nebo 6-O-sulfatovaným N-acetylhexosaminem, N-sulfatovaným hexosaminem, kyselinou uronovou substituovanou N-acetylhexosaminem nebo hexosaminem, 2- nebo 3-O-sulfatovanou kyselinou uronovou, $\alpha 1-3$ vázanou fukózou, $\alpha 1-4$ vázanou fukózou, $\alpha 2-6$ vázanou kyselinou sialovou, $\alpha 2-6$ vázanou kyselinou sialovou na galaktóze nebo N-acetylhexóze.

Dále je význakem vynálezu výše uvedené použití, při němž je oligosacharid vybrán ze skupiny zahrnující oligosacharidy glykosaminoglykanů, sulfatidy, sulfatované gangliosidy jiné než sulfatidy, 6-sialyl hexóza nebo 3-O-sulfatovaná kyselina uronová, fosfát tetramannózy, fosfát pentamannózy, sialylovaný nebo sulfatovaný Le^a nebo Le^x , HNK-1, HNK-3-5-uronovou kyselinou, keratan sulfáty jako K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfáty jako ChonSO₃, OS/6S, 2,6 S a 2,4,6 S, a oligosacharidy heparinu jako jsou HepIVA, IIA, IS a IS2.

Předmětem vynálezu je dále použití podle předmětného vynálezu, při němž je farmakologický přípravek určen pro opracování buněk, jejichž efektorová funkce je směřována na cílové buňky před opracováním cílových buněk efektorovými.

Dále je význakem vynálezu použití, při němž je uvedené působení farmakologického přípravku namířeno na cílové buňky.

Významem vynálezu je dále použití, v němž je uvedené opracování efektorovými buňkami namířeno na buňky cílové.

5 Dále je významem použití, v němž se využívá cílové směřování protilátky nebo jejího fragmentu schopného vázat antigen.

Významem vynálezu je dále použití, při němž je farmakologický přípravek určen pro opracování cílových buněk po opracování cílových buněk s uvedenými efektorovými buňkami.

10 Dále je významem vynálezu použití, při němž je uvedené opracování farmakologickým přípravkem směřováno na cílové buňky.

Významem vynálezu je rovněž použití, při němž je uvedené opracování buňkami imunitního systému směřováno na cílové buňky.

15 Dále je významem vynálezu použití, při němž směřování používá protilátky nebo jejího fragmentu schopného vázat antigen.

20 Významem vynálezu je dále použití podle vynálezu, při němž jsou monosacharidy nebo oligosacharidy sdružovány na liposomech.

Významem vynálezu je rovněž použití podle vynálezu, při němž liposomy tvoří první člen specifického vazebného páru schopného vazby na komplementární druhý článek specifického vazebného páru.

25 Dále je významem použití podle vynálezu, při němž je druhý člen specifického vazebného páru na povrchu cílové buňky.

30 Významem vynálezu je rovněž použití podle vynálezu, při němž je prvním členem specifického vazebného páru protilátka nebo její fragment schopný komplementární vazby druhého člena.

Dále je významem použití podle vynálezu, při němž je monosacharid nebo oligosacharid shlukován na sekvenci aminokyselin.

35 Významem vynálezu je dále výše uvedené použití, při němž je sekvence aminokyselin součástí molekuly tvořící první člen specifického vazebného páru schopný komplementární vazby na druhý člen tohoto vazebného páru.

40 Dále je významem vynálezu použití podle vynálezu, při němž je druhý člen specifického vazebného páru na povrchu cílových buněk.

Významem vynálezu je dále výše uvedené použití podle vynálezu, v němž je první člen specifického vazebného páru protilátkou nebo jejím fragmentem schopným komplementární vazby druhého člena specifického vazebného páru.

45 Významem vynálezu je použití podle vynálezu, při němž je modulovanou aktivitou antiproliferační aktivita, cytotoxicita a/nebo sekrece cytokinů.

50 Dále je významem vynálezu použití podle vynálezu, při němž je cytotoxicita tvořena stimulací apoptózy u cílových buněk.

Významem vynálezu je použití podle vynálezu, při němž je efektorová funkce namířená vůči cílovým buňkám, které jsou buňkami nádorovými.

Farmakologický přípravek podle vynálezu umožňuje modulaci aktivity efektorových buněk imunitního systému, spočívající v kontaktu buněk s monosacharidem nebo oligosacharidem.

5 Oligosacharidy, které mohou být užity v modulaci aktivity přirozených zabijců (NK), zahrnují takové látky, jež obsahují glykosaminyglykanový oligosacharid, sulfatid, sulfatovaný gangliosid jiný než sulfatid, 6-sialyl hexózu nebo 3-O-sulfatovanou uronovou kyselinu, tetramannózový fosfát, pentamannózový fosfát, sialyl nebo sulfatovaný- Le^a nebo Le^x, HNK-1, HNK-3-5-uronovou kyselinu.

10 S výhodou mohou být oligosacharidy vybrány z keratan sulfátů, jako je K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfátů, jako je ChonSO₃ OS/6S, 2,6 S a 2,4,6 S, heparinových oligosacharidů, jako je HepIVA, IIA, IS a IS2.

15 Termíny monosacharid a oligosacharid podle vynálezu zahrnují příslušné neoglykolipidy, vzniklé například otevřením sacharidového kruhu, poté jeho připojením k aminolipidu reduktivní aminací, jak je uvedeno dále.

20 Termín oligosacharid zahrnuje disacharid, tetrasacharid, pentasacharid, hexasacharid, heptasacharid, oktasacharid a oligosacharidy nebo delší, ale s výhodou nepřesahující 50 sacharidových zbytků, výhodnější pod 30 zbytků, ještě výhodnější pod 20 zbytků a nejvýhodnější pod 15 zbytků. Na tomto místě je nutno zdůraznit, že za určitých okolností může aktivita narůstat s narůstajícím počtem sacharidů (například narůstat v délce od disacharidu k tetrasacharidu). S výhodou je oligosacharidem disacharid nebo tetrasacharid.

25 Pro inhibici výkonné funkce, mohou být užity mono- nebo oligosacharidy v monomerní nebo volné formě, například nikoliv část molekuly vykazující nebo nesoucí jiný mono- nebo oligosacharid schopný zvýšit nebo obohatit buněčnou aktivitu.

30 Pro vzrůst, posílení nebo obohacení aktivity, mono- nebo oligosacharidy jsou sdružovány tak, že se dosáhne vícečetnosti mono- nebo oligosacharidových molekul, které jsou prezentovány efektorovým buňkám pomocí vehikula.

35 Tam, kde jsou NK nebo jiné efektorové buňky nadměrně aktivní, může být užita inhibice mono- nebo oligosacharidovým ligandem. Naopak, v jiných situacích může být užito sdružování ligandů za účelem zvýšit funkci NK nebo jiné efektorové buňky, např. zabít nádorových buněk. Sdružování může být na liposomech, při opakujících se a/nebo větvených sekvencích preferenčně glykosylovaných míst uvnitř buněk, nebo užitím jakékoliv jiné vhodné techniky zřejmé těm, kteří jsou odborníky v oboru. Opracování buněk sdruženým ligandem může posílit zabíjení NK buňkami v případě normálních i NK-rezistentních buněk.

40 Preferované mono- a oligosacharidy pro imunomodulaci vazbou k NKR-P1 jsou ukázány v tabulce 1. Preferované mono- a oligosacharidy pro imunomodulaci prostřednictvím vazby k CD69 jsou ukázány v tabulce 2.

45 Ostatní preferované ligandy, funkční znaky a vlastnosti sdílené preferovanými ligandy a tak určující vhodné skupiny k zařazení k preferovaným ligandům, jsou snadno identifikovatelné odborníky na základě tohoto vynálezu. Například, různé znaky, jak je ukázáno, jsou společné více než jednomu ligandu s vysokou afinitou pro NKR-P1 a/nebo CD69. Odborníci snadno určí takové, které jsou obsaženy v informacích zde podaných a použijí je pro označení nebo výběr dalších ligandů, které mohou být užity v souladu s předloženým vynálezem. K výběru může být užita jakákoliv metoda známá odborníkovi v oboru, včetně těch, které jsou zde objasněné a mohou být přímé nebo nepřímé, tj. zahrnovat kompetici mezi testovanými molekulami a známým ligandem pro CD69 a/nebo NKR-P1. NKR-P1 a/nebo CD69, nebo fragment NKR-P1 a /nebo CD69, může být označen.

Ligand vybraný v souladu s význaky předloženého vynálezu může být monosacharid nebo oligosacharid, a monosacharid nebo oligosacharid může být částí glykopeptidu, glykoproteinu, glykolipidu nebo proteoglykanu.

5

Buňky, na něž je efektorová (výkonná) funkce zaměřena (cílové buňky), mohou být opracovány farmakologickým přípravkem obsahujícím monosacharid nebo oligosacharid a poté dále opracovány efektorovými buňkami nebo mohou být nejprve farmakologickým přípravkem obsahujícím monosacharid nebo oligosacharid opracovány efektorové buňky, před opracováním cílových buněk, nebo mohou být cílové buňky opracovány farmakologickým přípravkem obsahujícím monosacharid nebo oligosacharid po opracování efektorovými buňkami. Opracování farmakologickým přípravkem obsahujícím monosacharid nebo oligosacharid nebo opracování efektorovými buňkami může být směřováno k cílovým buňkám například užitím další komponenty, člena specifického vazebného páru, například vazbou specifické protilátky nebo fragmentu protilátky schopné vazby k antigenu, jako je antigen přítomný na povrchu cílových buněk. Opracování může být provedeno in vitro nebo in vivo.

10

Opracování cílových buněk ligandem NKR-P1 a/nebo CD69 se může zvýšit nebo snížit v souladu s význaky předloženého vynálezu, podle vnímavosti nebo rezistence k efektorové funkci, například anti-proliferativnímu účinku, sekreci cytokinů, cytotoxicitě. Takové opracování může nebo nemusí být zacíleno jakýmkoliv způsobem uvažovaným v popisu vynálezu. Obecně ligandy označují cílové buňky jako cíle pro efektorovou funkci efektorových buněk, např. pro narušení.

20

Pro výrobu farmakologického přípravku mohou být použity monosacharidy nebo oligosacharidy sdružované na liposomech nebo na sekvenci aminokyselin, přičemž liposom nebo molekula, jejíž součástí je sekvence aminokyselin, tvoří první člen specifického vazebného páru, schopný vazby na druhý, komplementární člen tohoto vazebného páru, který může být na povrchu cílových buněk. Prvým členem specifického vazebného páru může být například protilátka nebo fragment protilátky schopný komplementární vazby druhého člena specifického vazebného páru.

25

Sdružování může být dosaženo několika cestami. Např. mono- nebo oligosacharidy mohou být sdružovány na povrchu liposomů a liposom může zahrnovat první člen specifického vazebného páru schopný vázat komplementárního druhého člena specifického vazebného páru, např. protilátku, nebo fragment protilátky. Skladba a tvorba nosičových lipidů se může měnit pro optimální zacílení na předpokládané cílové buňky. Poučení v oboru jsou schopni vybrat nejlepší nebo vhodné liposomové složení pro jejich potřeby. Pro in vivo použití může být žádoucí odebrat biopsii cílové tkáně (např. nádoru) pro in vitro analýzu a určení vhodného liposomového složení.

30

Jako alternativa ke sdružování na liposomech může být užit polypeptid, zahrnující aminokyselinovou sekvenci, která je glykosylována hostitelskými buňkami při rekombinantní expresi polypeptidu. Kterákoliv živočišná buňka může být užitá jako hostitelská za předpokladu, že hostitelská buňka poskytne nezbytnou glykosylaci k produkci glykoproteinu. Obecně jsou zvláště vhodné jaterní buněčné linie, např. CHO buňky. Sekvence aminokyselin může být částí molekuly, například protilátky nebo jiného člena specifického vazebného páru.

35

Například užití sdružených lysinů umožňuje konjugaci redukční aminací oligosacharidových ligandů s možností prezentace sdruženého stavu. Aminokyselinová sekvence mucinového typu, například sdružené seriny nebo threoniny, může být použita a modifikována in vitro nebo glykosylována uvnitř buněčných linií exprimujících příslušné enzymy. GalNAc transferázu a sialyltransferázu nebo sulfotransferázu. Alternativně, aminokyselinové sekvence jako souhlasné sekvence Ser-Gly nebo Ser-Ala mohou být použity pro dekoraci s glykosaminoglykany (Kjellen L. et al., Annu. Rev. Biochem. 60, 443-475 (1991), Feizi et al., Glycobiology 4, 106-109 (1994) a Zhang et al., J. Biol. Chem. 269, 19295-19299 (1994)). Jako výchozí jsou buňkami syntetizovány chondroitin sulfátové řetězce. Boční sekvence obsahující hydrofobní domény upřednostňují bio-

40

45

syntézu heparin/heparan sulfátových řetězců (Zhang et al., J. Biol. Chem. 269, 19295-19299 (1994)). Polypeptidy mohou na druhé straně být glykosylovány in vitro užitím glykosyltransferáz.

5 Modulovanou aktivitou podle vynálezu může být anti-proliferační aktivita, cytotoxicita a/nebo sekrece cytokinu, nebo jiná efektorová funkce buněk imunitního systému. Cytotoxicita může s výhodou zahrnovat stimulaci apoptózy u cílových buněk, zvláště váže-li ligand CD69. Modula-
ce zahrnuje stimulaci a inhibici efektorové buněčné aktivity, tj. buněčné zabíjecí aktivity (cyto-
toxicity), jiné efektorové funkce buněk imunitního systému inhibující proliferaci cílových buněk,
10 nebo sekrece cytokinů NK nebo jinými buňkami. Je pravděpodobné, že imunomodulační účinky mono- a oligosacharidů mohou být získány užitím syntetických napodobujících molekul, zvláště malých a negativně nabitých. Takové napodobeniny (v literatuře nazývané mimicks nebo mimetics) jsou zahrnuty v rámeček předloženého vynálezu.

15 S výhodou jsou cílovými buňkami nádorové buňky, stejně jako virově infikované buňky.

Pro některé z mono- a oligosacharidů, které jsou identifikovány na tomto místě jako ligandy pro NKR-P1 a/nebo CD69, nebyl dříve prokázán žádný účinek ve smyslu léčebného využití, včetně keratan a chondroitin sulfátů. Cílem tohoto vynálezu je použití těchto látek pro výrobu přípravku
20 použitelného v procesu léčby lidského nebo živočišného těla. Ostatní, jak bylo dříve ukázáno, mají nebo pravděpodobně mají některé lékařské indikace. Avšak předložený vynález poskytuje mono- a oligosacharidy a navrhuje je k novým účelům, zvláště v přípravě léčiv pro opracování za různých podmínek a modulaci funkce efektorových buněk prostřednictvím NKR-P1 a/nebo CD69.

25 Mono- a oligo-sacharidy mohou být izolovány glykosidázovou digescí přirozených glykosamin-glykanů, například užitím heparináz nebo chondroitináz, nebo chemickým uvolněním z mucinu typu glykoproteinů jako je hovězí submaxilární mucin, nebo mohou být chemicky syntetizovány jako kompletní sekvence nebo jejich části nebo jednoduché analogy mající požadované nabitě skupiny nebo minimální rozpoznávací elementy.

30 Rozpustné formy NKR-P1 a/nebo CD69 mohou být užity v imunomodulaci v souladu s dalšími význaky předloženého vynálezu, včetně užití při opracování lidského nebo živočišného těla, látek pro takové opracování a ve výrobě látek nebo léčiv pro takové opracování, stejně jako in vitro metod, zvláště jak je doloženo na tomto místě pro různá provedení vynálezu používající mono-
35 nebo oligosacharidy. Rozpustný NKR-P1 a/nebo CD69 může redukovat nebo inhibovat efekto-rovou funkci buněk imunitního systému, jako například NK buněk. Vazba rozpustných proteinů k ligandům, jako jsou volné nebo sdružené oligosacharidy, v médiu nebo na povrchu buněk může snížit množství ligandu schopného vázat se k NKR-P1 a/nebo CD69 na povrchu efektorových buněk, a tudíž efektorová funkce může být snížena.

40 Látky a léky zahrnující fragmenty rozpustného NKR-P1 a/nebo CD69, vytvořené nebo užité v souladu s různými význaky a provedeními předloženého vynálezu, mohou být vneseny a/nebo použity v principu jakoukoliv cestou a pro jakékoliv účely zde uvedené: např. v liposomech, směřované užitím členů specifických vazebných párů jako jsou protilátky a fragmenty protilátek, atd.

45 Imunomodulace podle předloženého vynálezu může být užita k opracování nádorů při rakovině, jako jsou solidní tumory a leukémie, například zabít leukemických buněk v autologních kostní dřeňových transplantátech před transplantací. Léčba hematologických (hematopoetických) vad, například leukopenie jako je aplastická anemie, kde NK buňky mohou být příliš aktivní v kostní dřeň,
50 léčbě alergických stavů, zvláště autoimunitních onemocnění jako je revmatická artritida, léčbě parazitárních onemocnění, opracování biologického materiálu, např. tkání nebo krve, obsahující virově-infikované buňky, které mohou být označeny pro NK-zprostředkované zabíjení, a v prevenci nebo zlepšení nemoci štěpu proti hostiteli (GVH), např. opracováním štěpů před transplantací za účelem snížení aktivity NK buněk štěpu. Další způsoby léčby, kde imunomodu-

lace, zvláště aktivace nebo inhibice funkce efektorových buněk, např. cytotoxicity NK buněk, může být přínosná, budou zřejmě pro odborníky v oboru.

Ligandy zde popsané, včetně mono- a oligosacharidů, mohou být užity v léčbě savců a užity při přípravě léků pro použití při léčbě. Aplikace přípravku podle předloženého vynálezu při onemocnění může zahrnovat: (1) užití inhibice přirozeného zabíjení – nemoc štěpu proti hostiteli, onemocnění pojivové tkáně, např. ztráta chrupavky, artritida, onemocnění kůže, hematopoetická onemocnění, (2) užití inhibice apoptotického zabíjení ischemické reperfuze při patologických stavech, např. spojených s koronárním srdečním onemocněním, srdečních operacích, periferní vaskulární poškození po traumatu, trombotická onemocnění, hyperkoagulační stavy například při leukémiích nebo posttraumatech, epiteliální onemocnění, například kožní onemocnění spojené s narušením buněk, pemphigus/pemphigoid, ostatní bulózní kožní léze, (3) užití inhibice vzniku cytokinové kaskády při přirozených buněčných odpovědích - zahrnujících sepsi, revmatoidní artritidu, plicní fibrózu, glomerulonefritidu, (4) užití inhibice cytokinové kaskády, vyúsťující ve specifické odpovědi zahrnující interakce jakýchkoliv monocytů, antigen–prezentujících buněk. B–lymfocytů. T–lymfocytů. NK–buněk, včetně alergických stavů jako je astma a ekzém a ostatní zánětlivé choroby, autoimunitu, odhojení štěpu, hyperreaktivní stavy během léčby parazitárních onemocnění a TB, (5) zahrnutí inhibice cytokinové kaskády zahrnující epiteliální buňky a buňky zánětu, zahrnující zánětlivá onemocnění střeva. Crohnovu chorobu, ulcerativní kolitidu, psoriázu a glomerulonefritidu, (6) užití při NK vnímavosti cílových buněk, včetně prekancerózy, nádoru, solidních tumorů a leukémií, virových infekcí/ nosičových stavů, parazitárních infekcí.

Jak již bylo řečeno, NK buněčná cytotoxicita zahrnuje stimulaci apoptózy cílových buněk. Potenciální přínos užití apoptotické (programované) buněčné smrti v terapii, například nádoru, bylo již zaznamenáno. Viz např. Levitzky. Eur. J. Biochem. 226, 1-13 (1994), který rozpoznal, že mnohé buňky v nádorech jsou klidové a nemnožící se. Takové buňky mohou uniknout chemoterapii zaměřené na proliferaci buněk, a poté se mohou začít dělit v intermisi léčby. Apoptózu indukující podněty mohou skutečně vést k zabítí nedělících se buněk a indukovat jejich smrt. Schopnost zvýšit NK buněčně zprostředkovanou cytotoxicitu za pomoci ligandů vyvolávajících apoptózu jak je zde doloženo, může být zvláště užitečné při terapii nádorů, ačkoliv klinicky je nejlepší využití v kombinaci s protinádorovou terapií.

Na druhé straně, apoptóza byla indikována jako vedlejší efekt reperfuze poškození, speciálně reperfuze k limitaci ischemické nekrose například myokardu, dále mrtvice nebo v játrech. Viz Gottlieb et al., The Journal of Clinical Investigation 94:1621-1628 (1994). Schopnost inhibovat NK zprostředkovanou cytotoxicitu zahrnující apoptózu může tedy být užitečná v zabránění poškození tkáně během reperfuze i za jiných situací.

Ligandy podle předloženého vynálezu mohou být aplikovány jednotlivcům. Přednostně jsou aplikovány v terapeuticky efektivním množství, které je dostačující ke zlepšení stavu pacienta. Množství skutečně aplikované, rychlost a časové schéma aplikace bude záležet na typu a závažnosti léčených případů. Předepsání léčby, tj. rozhodnutí o dávce apod., spadá do odpovědnosti obecného praktika a dalších lékařů.

Ligandy mohou být aplikovány samostatně nebo v kombinaci s jinými látkami, buď současně, nebo postupně v závislosti na léčeném případě.

Farmaceutické přípravky nebo léky podle předloženého vynálezu, a pro užití v souladu s předloženým vynálezem mohou zahrnovat vedle ligandů farmaceuticky přijatelné plnivo, nosič, ústojný roztok, stabilizátor nebo jiný materiál známý dobře odborné veřejnosti. Takové materiály nesmí být toxické a nesmí křížově reagovat s účinkem účinné látky. Přesná povaha nosiče nebo ostatního materiálu bude záviset na cestě podávání, která může být orální nebo injekční, např. kožní, podkožní nebo intravenózní.

Farmaceutické přípravky nebo léky pro orální podání mohou být v tabletách, kapslích, prášku nebo tekuté. Tableta může obsahovat pevný nosič jako je želatina. Tekuté farmaceutické přípravky obecně zahrnují tekutý nosič jako je voda, surový petrolej, živočišné nebo rostlinné oleje, minerální nebo syntetické oleje, zahrnutý mohou být fyziologický roztok, roztoky dextrosy nebo jiných sacharidů nebo glykoly jako je ethylen glykol, propylen glykol nebo polyethylen glykol.

Pro injekce bude aktivní látka ve formě parenterálně přijatelného vodného roztoku, který je apyrogenní a má přijatelné pH, izotonicitu a stabilitu. Ti, kteří jsou odborníky v oboru, jsou schopni připravit vhodné roztoky užitím např. izotonických vehikul jako jsou injekce s chloridem sodným. Ringerovy a Ringerovy laktátové injekce. Ochranné látky, stabilizátory, ústojné roztoky, antioxidanty a/nebo jiná aditiva mohou být včleněny podle požadavků.

Pro směřování efektu např. k nádorovým buňkám jako při leukémii, virově infikovaným buňkám apod. mohou být podány protilátky, fragmenty protilátek nebo jiné vazebné látky před nebo s výhodou simultánně s aplikací ligandu. Podání protilátek je rutinní a může obecně být uplatněno jak je výše uvedeno pro podání ligandu, Intravenózní aplikace je preferována např. v roztoku NaCl.

Jedna z cest směřování zahrnuje užití bispecifické protilátky nebo jiné vazebné substance schopné vazby na cílové buňky a efektorové buňky, například nádorové a NK buňky. A tak, inaktivní buňky NK mohou být dopraveny k nádorovému místu před aktivací podáním mono- nebo oligosacharidu. CD56 (antigen Leu19) je obecný znak NK buněk (Lanier et al., J. Exp. Med. 169, 2233-2238 (1989)). Tento antigen chybí u červených krvinek, granulocytů, monocytů a podtřídy T lymfocytů, B buněk, thymocytů a krevních destiček. Může být přítomen na některých nervových a nádorových tkáních. Anti-CD56 specifická může tudíž být použita k zacílení NK buněk. Bi- nebo vícevazebné protilátky mohou být užity k upřednostnění výhod dvojí specifické anti-CD56 pro buňky NK a některé tumory k zacílení buněk NK k těmto tumorům.

Jiná cesta směřování užívá vazebné látky jako je protilátka (potřebuje být monospecifická) ve spojení s liposomem nebo jiným ligand-nesoucím vehikulem, pro sdružování mono- nebo oligosacharidu. Takový polypeptid může být svázan např. s protilátkou jako fúzní protein, vzniklý rekombinantní expresí po fúzi genu. Jestliže specifická protilátka je namířena proti cílovým buňkám, např. nádorovým buňkám, ligand ve spojení s vehikulem spouští nebo zvyšuje aktivitu kolujících buněk NK v okolí nádoru.

Jedna z cest připojení a vazby substance k ligand-nesoucímu vehikulu používá pár zprostředkující specifickou vazbu molekul, takových, které vazebná substance užívá v cílení a které jsou spojeny s ligand-nesoucím vehikulem nepřímou, když zprostředkující specifické vazebné molekuly se vzájemně váží. Tedy, protilátka, nebo fragment protilátky, může být spojen např. peptidovou vazbou jako výsledek exprese fúzního polypeptidu z chiméricky zakódované sekvence, s první zprostředkující specifickou vazebnou molekulou. K tomu dochází, jakmile ligand-nesoucí vehikulum je spojeno (opět peptidovou vazbou, jestliže vehikulum je peptid nebo polypeptid), s druhou komplementární specifickou vazebnou molekulou, schopnou vázat se k první.

Zprostředkující specifické vazebné páry mohou být vybrány příkladně z párů známých pro užití u volných polypeptidů, včetně: proteinová doména, která tvoří komplex s druhou (makro) molekulou jako je glutathion-S-transferáza (Smith a Johnson. Gene 67, 31-34 (1988)), hovězí pankreatický inhibitor trypsinu, BPTI (Borijn a Nathans. PNAS USA 90, 337-341 (1993)), protein maltózu vázající, MBP (Bedouelle a Duplay. Eur. J. Biochem. 171, 541-549 (1988), Maina a spol., Gene 74, 365-373 (1988)), a polypeptidová sekvence, která může být biothynlována a tak interagovat s avidinem nebo streptavidinem (Schatz. Bio/Technology 11, 1138-1143 (1993)), nebo kalmodulinem a molekulou schopnou vázat kalmodulin, jako je mastoparan, kalmidazolium nebo melatonin (ačkoliv melatonin a kalmodulin mají nízký poločas disociace), nebo Troponin C a molekuly schopné vazby k němu. Některé z těchto, nebo jiné možnosti, mohou být toxické

a/nebo imunogenní in vivo, a tudíž méně výhodné pro podání jednotlivcům, i když mohou být vhodné pro in vitro použití.

5 Kalmodulin a Troponin C jsou na kalcium závislé vazebné proteiny a WO95/12 672 objasňuje fúzi těchto molekul k vazebným látkám jako je protilátka nebo fragment protilátky. Tyto fúze mohou vznikat expresí z chiméricky konstruovaného genu užitím standardních technik známých v odborné obci. Obě molekuly použité k fúzi, na kalcium závislý vazebný protein a specifická vazebná látka jako je protilátka, si zachovávají schopnost vázat se s příslušnými komplementárními členy vazebného páru. Podobně, WO 95/12 672 objasňuje spojení molekuly schopné vazby s protei-
10 nem závislým na kalcium (např. mastoparan schopný vázat kalmodulin) k jiné molekule, např. polypeptidu, jako je protilátka nebo fragment protilátky.

A tak, protilátka s vazebnou specificitou umožňující směrování k vybraným buňkám (např. protilátka schopná vazby na antigen přítomný na povrchu buněk nádoru) může, v souladu s výhodným provedením předloženého vynálezu, být spojena (příkladně jako fúzní protein) např. s kalmodulinem. Peptid schopný za patřičných podmínek vazby kalmodulinu, např. mastoparan, může být připojen k sekvenci aminokyselin (opět např. jako fúzní protein), který nese sdružené ligandy (pro použití v uvedeném patentu), např. pro imunomodulaci buněk NK. Protilátka, která váže cílovou buňku (např. nádor) může být vázána k vehikulu nesoucímu ligand (tj. sekvenci aminokyselin nesoucích sdružené mono- a oligosacharidy) přes zprostředkující vazbu kalmodulinu a peptidu schopného vazby ke kalmodulinu. Jak je uvedeno, tento způsob může být obrácený s protilátkou nebo jinou specifickou vazebnou látkou, užívanou pro směrování, připojenou k peptidu jako je mastoparan a jinou vázající molekulou (jako je kalmodulin) připojenou k ligand-nesoucímu vehikulu, například polypeptidu.

25 Ligand-nesoucí vehikulum v situaci, kde jsou použity zprostředkující vazebné látky, může být liposom, s jednou z látek připojených k liposomu v souladu se známými technikami. Například, liposom nesoucí mono- nebo oligosacharid může inkorporovat kalmodulin-vázající ligand, jako je mastoparan, umožňující mu tak být svázan se specifickou vazebnou látkou jako je protilátka, prostřednictvím kalmodulinu, pro směrování.

Výhodou užití systému dvojího ligandu, zahrnujícího vazebný pár, je možnost rychlé náhrady jedné směrované specifické vazebné substance za jinou. Vehikulum nesoucí ligand, svázaný s jedním členem zprostředkujícího vazebného páru, může být užito s kteroukoliv z extrémně
35 velkého počtu vazebných molekul pro směrování a připojeno k němu vazbou členů zprostředkujícího vazebného páru. Fágová display technologie (viz např. W092/01 047) umožňuje výběr protilátky a protilátkových fragmentů schopných vazby kteréhokoliv zájmového antigenu. Vybrané protilátky nebo fragmenty mohou být klonovány jako fúzní proteiny například s kalmodulinem a pak použity ke spojení s hotovými ligand-nesoucími vehikuly připojenými ke kalmodulin-vázající molekule jako je mastoparan.

Další možnost v těchto souvislostech zahrnuje užití bispecifické protilátky, schopné vazby k cílovým buňkám a k vehikulu pro sdružené mono- a oligosacharidy, například polypeptid buď glykosylovaný, nebo připojený k liposomu nesoucímu mono- nebo oligosacharidy. Jedno rameno
45 bispecifické protilátky, může být schopno vazby antigenu přítomného na povrchu cílových buněk, zatímco druhé může být schopno vazby peptidového přívěsku, který může být propojen k ligand-nesoucímu vehikulu, jako je sekvence aminokyselin, nebo liposom. Škála přívěsků, které mohou být exprimovány s ostatními polypeptidy jako fúzujícími proteiny byla užita pro rekombinantní proteiny včetně: *myc* přívěsek (Munro S. a Pelham H.R.B., Cell 46, 291-300 (1986), Ward E.S., Gussow D., Griffiths A. D., Jones P. T. a Winter G. Nature, 341, 544-546 (1989)), Flag-peptid (Hope T.P. a spol. BioTechnology 6, 12041210 (1988)), KT3 epitop (Martin G. A. a spol., Cell 63, 843-849 (1990), Martin G. A. a spol., Science, 255, 192-194 (1992)), alfa-tubulinový epitop (Skinner R. H. a spol., J. Biol. Chem. 266, 14163-14166 (1991)), T7 gen 10 proteinová
50

peptidová značka (Lutz-Freyermuth C., Querry C. C. a Keene J. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 6393-6397 (1990)).

5 Polypeptidy včetně protilátek mohou být vázány k liposomům užitím hydrofobní transmembránové sekvence (například z MHC-I) nebo (glyko) fosfolipidové kotevní domény z proteinu jako je rozpad-urychlující faktor (mDAF - Decay Accelerating Factor - viz např. WOB9/01 041). Shoda aminokyselinové sekvence pro fosfoinositolovou vazbu k lipidu, např. v liposomu, je možná. Ti, kteří jsou obeznámeni s oborem, znají rovněž tyto techniky.

10 Je zapotřebí zmínit, že jsou-li vhodné ostatní specifické vazebné páry, mohou být použity namísto protilátky/antigenu. Na příklad peptidové ligandy (například malé hormony, neuropeptidy) buněčně povrchových receptorů mohou být použity ke značení buněk nesoucích receptory pro destrukci. Za příklad může sloužit peptidový ligand připojený k liposomu nesoucímu mono- nebo oligosacharidy, nebo připojený, například peptidovým můstkem po expresi jako fúzní protein ke
15 glykosylované sekvenci aminokyselin (například nesoucích sdružený mono- nebo oligosacharid).

Protilátky, které jsou specifické pro zamýšlený cíl, mohou být získány užitím technik, které jsou běžné v oboru. Použity mohou být metody produkce protilátek včetně imunizace savců (tj. myš, potkan, králík, kůň, koza, ovce nebo opice) proteinem nebo jeho fragmentem. Protilátky mohou
20 být z imunizovaných zvířat získány užitím různých technik známých v oboru a testovány především na vazbu zkoumaného antigenu s protilátkou. Například mohou být užity Western blotovací techniky nebo imunoprecipitace (Armitage a spol., Nature 357, 80-82 (1992)).

Produkce monoklonálních protilátek je dobře zavedena v oboru. Monoklonální protilátky mohou
25 být využity s technikami rekombinantní DNA technologie k produkci ostatních protilátek nebo chimerických molekul, které zachovávají specifitu původní protilátky. Taková technika může zahrnovat zavedení DNA kódující imunoglobulinovou variabilní oblast nebo komplementárně určující oblasti (CRDs) protilátky do konstantní oblasti, nebo konstantní oblasti plus základní
30 strukturní oblasti, jiného imunoglobulinu. Viz například EP 0 184 187A, GB 2 188 638A nebo EP 0 239 400A. Jeden z důvodů, proč tak činit, může spočívat v humanizaci nehumánní protilátky ke zvýšení poločasu po aplikaci člověku.

Jako alternativní nebo doplňující k imunizaci savců peptidem, protilátka specifická pro protein
35 může být získána z rekombinantně připravené knihovny exprimovaných imunoglobulinových variabilních domén, např. užitím lambda bakteriofága nebo filamentózního bakteriofága, které vykazují funkční imunoglobulinové vazebné domény na svých površích. Např. viz W092/01 047. Knihovna může být původní, např. konstruovaná ze sekvencí získaných z organismu, který nebyl imunizován žádným z těchto proteinů (nebo fragmentů), nebo může být konstruována užitím sekvencí získaných z organismu, který byl exponován k žádanému antigenu.

40 Žádoucí může být tzv. humanizace nehumánních (tj. myších) protilátek za účelem získání protilátek majících antigen vazebné vlastnosti nehumánní protilátky, za minimalizace imunogenní odpovědi protilátek, např. jsou-li užity k lidské terapii. A tak, humanizované protilátky mohou zahrnovat základní strukturní oblasti získané z lidských imunoglobulinů (příjemcovská protilátka), v nichž zbytky jedné nebo více komplementárních určujících oblastí (CDRs) jsou zaměněny zbytky CRDs nehumánního druhu (donorová protilátka), např. myší, potkaní nebo králičí
45 protilátky mající požadované vlastnosti, např. specifitu, afinitu nebo kapacitu. Některé části základní strukturní oblasti lidské protilátky mohou být zaměněny odpovídajícími částmi nehumánního původu, nebo zbytky, které nejsou přítomny ani v dárcovských ani v příjemcovských protilátkách. Tyto modifikace jsou prováděny k dalšímu čištění a optimalizaci vlastností protilátky.
50

Fágová technologie také umožňuje humanizaci nehumánních protilátek, které mohou být upřednostněny pro použití u lidí. Dvoustupňové řetězové promíchání zamění nehumánní VL a VH domény, které kooperují v tvorbě vazebného místa pro daný antigen (WO93/06 213).

Nukleová kyselina kódující tyto lidské VL a VH domény může být fúzována k sekvencím kódujícím lidské konstantní domény pro expresi kompletních lidských protilátek.

5 Protilátky mohou být modifikovány několika způsoby. Skutečně termín "protilátka" by měl být vykládán jako zastřešující pro jakékoliv vazebné substance mající vazebnou doménu s požadovanou specificitou. To zahrnuje fragmenty, deriváty, funkční ekvivalenty a homology protilátek, včetně jakéhokoliv polypeptidu zahrnujícího imunoglobulinovou vazebnou doménu, jak přírodní, tak syntetickou. Chimerické molekuly zahrnující imunoglobulinovou vazebnou doménu, nebo ekvivalent, fúzovanou k jinému polypeptidu, jsou tudíž zahrnuty. Klonování a exprese chimerických protilátek jsou popsány v EP 0 120 694 a EP 0 125 023.

15 Bylo ukázáno, že funkce vazebných antigenů může být zachována u fragmentů celých protilátek. Příkladem vazebných fragmentů jsou: (i) Fab fragment obsahující VL, VH, CL a CH1 domény, (ii) Fd fragment obsahující VH a CH1 domény, (iii) Fv fragment obsahující VL a VH domény protilátky, (iv) dAb fragment (Ward E. S. a spol., Nature 341, 544-546 (1989)), který se skládá z VH domény, (v) izolované CDR oblasti, (vi) F(ab)₂ fragmenty a bivalentní fragment zahrnující dva vázané Fab fragmenty (vii) jednotlivý řetězec Fv molekul (scFv), kde VH doména a VL doména jsou spojeny peptidovým spojovacím řetězcem, který umožňuje dvě domény asociovat k tvorbě antigen-vazebného místa, (viii) bispecifický jednoduchý řetězec Fv dimérů (WO93/11 161) a (ix) imitace fúzní protilátky (diabodies), multivalentní nebo multispecifické fragmenty konstruované fúzí genu (WO94/13 804, Holliger P. a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448, (1993)).

25 Imitace fúzní protilátky jsou multimery polypeptidů, každý polypeptid zahrnuje prvou doménu zahrnující vazebnou oblast lehkého řetězce imunoglobulinu a druhou doménu zahrnující vazebnou oblast těžkého řetězce imunoglobulinu, obě domény jsou svázány například peptidovým spojením, ale neschopné asociovat mezi sebou k tvorbě antigen-vazebného místa: antigen-vazebná místa jsou tvořena asociací prvé domény jednoho polypeptidu uvnitř multimeru s druhou doménou jiného polypeptidu uvnitř multimeru (WO94/13 804).

30 Tam, kde jsou užity bispecifické protilátky, tyto mohou být konvenční bispecifické protilátky, které mohou být připraveny mnoha způsoby (Holliger P. a Winter G., Curr. Opin. Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), např. chemicky nebo z hybridních hybridomů, nebo to mohou být jakékoliv fragmenty bispecifických protilátek zmíněných v předcházející části. S výhodou mohou být užity scFv diméry nebo imitace fúzní protilátky spíše než celé protilátky, imitace fúzní protilátky a scFv mohou být konstruovány bez Fc části, použitím pouze variabilních domén, potencionálně redukcí účinků antiidiotypické reakce. Ostatní formy bispecifických protilátek zahrnují jednotlivý řetězec Janusinů, popsány v Traunecker a spol., EMBO Journal 10, 3655-36659, (1991).

40 Bispecifické imitace fúzní protilátky, ve srovnání s bispecifickými celými protilátkami, jsou také zvláště užitečné, protože mohou být lehce konstruovány a exprimovány v E. coli, imitace fúzní protilátky a mnohé ostatní polypeptidy jako fragmenty protilátek odpovídajících vazebných specificit mohou být snadno selektovány užitím fágové display techniky (WO94/13 804) z knihoven. Jestliže jedno rameno imitace fúzní protilátky je získáno jako konstantní, např. se specificitou zaměřenou proti povrchovému antigenu NK buněk, pak může být vytvořena knihovna, kde druhé rameno se mění, a vybrána protilátka požadované specificity.

50 A tak, například při zabíjení nádorů, jedno antigenní vazebné místo může být zaměřeno proti nádorovému znaku, zatímco druhé může být zaměřeno proti přítomnému antigenu na efektorové buňce, např. NK buňce. Inaktivní buňky NK a cílové buňky mohou být spojeny před spuštěním NK buněčné aktivity. Bispecifické protilátky s inkorporovanou specificitou pro T buněčný koreceptor CD3 mohou tlumit růst nádoru (Titus J. A et al., J. Immunol. 138, 4018-4022 (1987)) a léčit lymfóm (Brissinck J. et al., J. Immunol. 174, 4019-4026 (1991)).

Alternativy a variace všech způsobů umožňující různé pohledy uvedeného vynálezu, budou zřejmé osobám vzdělaným v oboru. Techniky jsou navrženy pomocí příkladů a bez omezení mohou být modifikovány, nebo použity alternativy ve vztahu k vědomostem těch, kteří jsou vzděláni v oboru, bez změny cíle předloženého vynálezu.

5

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje vazbu radioaktivním jódem značeného NKR-P1 proteinu k lipid-vázaným oligosacharidům (pro které jsou uvedeny sekvence a zkratky v tabulce 1).

10

Obrázek 1a ukazuje výsledky chromatografie lipid-vázaných oligosacharidů, buď chemicky obarvených orcinolem (negativní zobrazení ukázané v liniích 1 až 5), nebo překrytých ^{125}I -značeným sNKR-P1 s provedením autoradiogramů (linie 1' až 5'). Linie 1 a 1' obsahovaly LNT a H5, linie 2 a 2' LNNT a LX5, linie 3 a 3', laktózu (Lac), DLNN, LNT, LA5 a LB6, linie 4 a 4', SL, linie 5 a 5', 3SL, vzestupná chromatografie.

15

Obrázek 1b ukazuje vazbu ^{125}I -značeného sNKR-P1 proteinu ($\times 10^{-4}$ cpm) k lipid-vázaným oligosacharidům imobilizovaným na plastických mikrojamkách v přítomnosti nosičových lipidů cholesterolu a vaječného lecithinu. Na hlavním panelu ve vzestupujících částech vazebné křivky jsou ukázána sériová ředění lipid-vázaných oligosacharidů použitých v jamkách, a převrstvených ^{125}I -sNKR-P1, 3×10^5 cpm na jamku. V okénku je ukázána saturace vazby, ^{125}I -značený sNKR-P1 byl smíchán s neznačeným proteinem k získání 10^6 cpm/ μg , a byl přidáván ve vzrůstajících množstvích do jamek pokrytých lipid-vázanými oligosacharidy GM2 a DLNN (2 pmol dávány na jamku). Symboly: \square , LNNT, \blacksquare , LNT, \circ , DLNN, \blacktriangledown , GA2, \bullet , GM2, Δ , SUA5, \blacktriangle , IS.

20

Obrázky 1c a 1d ukazují intenzitu vazby na lipid-vázané oligosacharidy, c při použití 64 pmol na jamku a d 8 pmol na jamku.

25

Obrázek 2 ukazuje inhibici vazby ^{125}I -značeného sNKR-P1 k imobilizovanému DLNN volnými oligosacharidy a polysacharidy.

30

Obrázky 2a a 2c ukazují procento inhibice vazby ^{125}I -značeného sNKR-P1 a DLNN v přítomnosti udaných koncentrací sacharidů (M nebo $\mu\text{g/ml}$).

35

Obrázek 2b ukazuje korelaci mezi aktivitami různých oligosacharidů zkoumaných ve vazebných a inhibičních testech.

Obrázek 3 ukazuje srovnání schopnosti oligosacharidů jako inhibitorů vazby radioaktivním jódem označeného sNKR-P1 k různým oligosacharidům a srovnání schopnosti těchto oligosacharidů s neznačenými sNKR-P1 a chondroitin sulfátem A (zkratka CA) jako inhibitorů vazby ^{125}I -značeného sNKR-P1 k nádorovým cílovým buňkám a cytolyza různých cílových buněk NK buňkami.

40

Obrázek 3a ukazuje koncentraci volných oligosacharidů dávajících 50 % inhibici (IC_{50}) vazby DLNN nebo IS s ^{125}I -značeným sNKR-P1.

45

Obrázek 3b ukazuje vazbu (cpm/buňku) ^{125}I -značeného sNKR-P1 na suspenze buněk, proti přidanému sNKR-P1 ($\mu\text{g/ml}$). Symboly: \bullet , YAC-1 buňky, \blacksquare , B16S buňky, \blacklozenge , 1C21 buňky, \blacktriangledown , RNK-16 buňky, ∇ , glutaraldehydem fixované RNK-16 buňky, \diamond , RNK-16 buňky glutaraldehydem fixované v přítomnosti IS disacharidu, \circ , P815 buňky.

50

Obrázek 3c a d ukazují IC_{50} hodnoty inhibice vazby ^{125}I -značeného sNKR-P1 k různým cílovým buňkám.

Obrázek 3e a f ukazují procento specifické lyze různých buněk čerstvými buňkami NK (e) nebo buňkami RNK-16 (f) při různých poměrech efektorových a cílových buněk (E:T). Symboly jsou stejné jako pro obrázek 3b.

5

Obrázky 3 g - j ukazují inhibici zabíjení a k ukazuje korelaci zabíjení s inhibicí vazby: symboly pro inhibitory v panelu g - k jsou: čtverce pro sNKR-P1, kolečka pro chondroitinsulfát A, kosočtverce pro disacharid IS, trojúhelníky pro GM2 tetrasacharid, a obrácené trojúhelníky pro DLNN trisacharid, plné, prázdné a na pravé straně stínované symboly jsou užity pro YAC-1, B16S a 1C21 buňky: pro výsledky získané s čerstvými NK buňkami, malé plné symboly jsou užity k odlišení výsledků získaných s RNK-16 buňkami.

10

Obrázek 4 ukazuje vazbu NKR-P1 proteinu k vysoce afinitnímu sacharidovému ligandu. GM2 glykolipidu, v přítomnosti (obrázek 4a, plná kolečka) a nepřítomnosti (obrázek 4a, prázdná kolečka) vnějšího kalcia a výzkum výskytu NKR-P1 na povrchu čerstvých a aktivovaných NK buněk při na kalcium nezávislé tvorbě konjugátů s cílovými buňkami (obrázek 4b konjugáty tvořící NK buňky jako celkové procento).

15

Obrázky 4c - h ukazují výsledky průtokové imunocytometrické analýzy, které byly provedeny k zjištění exprese NKR-P1, CDB a CD5 antigenů, (plné křivky) na čerstvých NK buňkách (panel c, e a g) a na aktivovaných NK buňkách (panel d, f a h). Tečkované křivky ukazují pouze fluorescenčně značený králičí protimyší imunoglobulin.

20

Obrázek 5 ukazuje hodnoty InsP3 (panely a, d a g), InsP2 (panely b, e a h), a volné cytoplasmatické kalcium (Ca^{2+}); (panely c, f a i) měřené u RNK-16 efektorových buněk po jejich interakci s YAC-1 cílovými buňkami (panely a, b a c), nebo s liposomy obsahujícími oligosacharidové ligandy pro NKR-P1 (panely d, e a f), nebo s monoklonální anti-NKR-P1 protilátkou, nebo chondroitin-sulfátem A nebo volnými disacharidy IS (panely g, h a i).

25

Obrázek 6 ukazuje :

30

Obrázek 6a: vazbu (cpm/buňku) ^{125}I -značeného sNKR-P1 na 5×10^5 YAC-1 buněk nebo P815 buněk, které byly opracovány sialidázou (S'ase) nebo heparinázou I (H'ase) nebo chondroitinázou ABC (C'ase) nebo směsí sialidáz a chondroitináz ABC (SC'ase) nebo směsí sialidáz, chondroitináz ABC a heparinázy I (SCH'ase). Kontrolní buňky byly opracovány směsí teplem inaktivovaných enzymů.

35

Obrázek 6b: cytolýzy (procento specifické lyze) YAC-1 a P815 buněk čerstvými buňkami NK stanoveno po opracování nádorových buněk, jako v panelu a, stejnými glykosylhydrolázami nebo inaktivovanými enzymy.

40

Obrázek 6c: cytolýzy (procento specifické lyze) YAC-1 nebo P815 buněk čerstvými NK buňkami stanoveno po expozici nádorových buněk liposomům exprimujícím neoglykolipid laktózy (LAC), nebo GM2 glykolipid (GM2) nebo neoglykolipid IS disacharidu (IS).

45

Obrázek 6d ukazuje výsledky SDS-polyakrylamidové elektroforézy a elektropřenosu na nitrocelulózu plazmatických membrán buněk YAC-1 a P815, proužky byly obarveny na proteiny (linie 1) a převrstveny ^{125}I -značeným sNKR-P1 proteinem k odhalení vázaných látek (linie 2) autoradiografií (za 3h), u YAC-1 buněčných membrán, přídatné proužky (linie 3, 4 a 5) byly testovány na vazbu po opracování sialidázou, chondroitinázou ABC nebo heparinázou I. Znárodně jsou pozice Mr.

50

Obrázek 6e ukazuje: linie 1, vazba ^{125}I -značeného sNKR-P1 byla vyhodnocena k lipidům extrahovaným z YAC-1 a P815 membrán rozpuštěných TLC. Opakované proužky, linie 2, byly

barveny primulinem. O ukazuje místo aplikace. GM1, GD1A, GD1B, GD1B lakton (GD1BL) a GT1B ukazují posice autentických standardů. GD1(A)L je minoritní glykolipidová komponenta prozatímne označená jako GD1A lakton. Vazba na relativně nízký obsah glykolipidu GT1B a GD1B byla slabé intenzity (šipka) v 3 h autoradiogramu.

5

Obrázek 7 ukazuje radiovazbu a inhibici vazebných experimentů ukazujících vysokou afinitu sCD69 pro sialylované a sulfátované sacharidy. Hlavní panel ukazuje vazbu ^{125}I -značeného sCD69 k lipid-vázaným oligosacharidům (neoglykolipidům) imobilizovaným na plastických mikrojamkách: vázaný protein ($\times 10^{-4}$ cpm/jamku) versus přidáný neoglykolipid (pmol/jamka).

10

Vsuvka ukazuje inhibici vazby sCD69 k IS neoglykolipidu v přítomnosti vybraného sacharidu.

Obrázek 8 ukazuje výsledky radiovazby a cytotoxických experimentů ukazujících, že CD69 je těsně spojen s cytolytickou aktivitou lidských NK buněk.

15

Obrázek 8a ukazuje vazbu ^{125}I -značeného sCD69 k různým leukemickým buněčným liniím: protein vázaný (cpm/buňka) versus protein přidáný ($\mu\text{g/ml}$).

Obrázek 8b ukazuje přirozené zabíjení (procent specifické lyze) leukemických buněčných linií při různém poměru efektorových ku cílovým buňkám (E:T).

20

Obrázek 8c ukazuje korelaci mezi ^{125}I -sCD69 vázaným proteinem (cpm/buňka) k leukemickým buňkám a cytotoxicitami při poměru E:T = 128:1.

25

Obrázek 8d - g ukazují koncentrace v závislosti na aktivitách CD69 (plné symboly) a SN disacharidu (prázdné symboly) jako inhibitory přirozeného zabíjení 4 NK sensitivních buněčných linií D - MOLT-4, E - K-562, F - U937, G - DAUDI.

30

Obrázek 9 ukazuje povrchovou expresi CD69 na lidských NK buňkách fenotypu CD56, k níž prudce dochází po jejich inkubaci s NK-vnímavými cílovými buňkami nebo liposomy obsahujícími vysoce afinitní ligandy pro CD69 protein, a je inhibována v přítomnosti volných oligosacharidových ligandů a je opožděna u buněčných populací, které byly nejdříve zbaveny buněk exprimujících CD69: A- procento $\text{CD56}^+/\text{CD69}^+$ po celou dobu (h), B- procento $\text{CD3}^+/\text{CD69}^+$ buněk po celou dobu (h), C- procento $\text{CD56}^+/\text{CD69}^+$ po celou dobu (h), buňky které byly nejdříve zbaveny CD69^+ buněk inkubací s protilátkou za přítomnosti komplementu (lyzi).

35

Obrázek 10 ukazuje udržení NK-rezistentních leukemických buněčných linií vnímavými k přirozenému zabíjení jejich předinkubací s liposomy nesoucími oligosacharidové ligandy pro CD69. Procento specifické lyze je ukázáno proti koncentraci přidáného neoglykolipidu (nmol/100 μl liposomů): A- MOLT-4 buňky, B- RAJI buňky, C- IM-9 buňky, D- KG-1 buňky.

40

Obrázek 11 ukazuje kinetiku příjmu (inkorporace) neoglykolipidu kultivovanými buněčnými liniemi. Příjem neoglykolipidu do buněk (procento přidáných cpm) je ukázáno proti inkubačnímu času (h) pro MOLT-4, RAJI, THP-1 a IM-9 buňky.

45

Obrázek 12 ukazuje apoptotické zabíjení NK-vnímavých cílových buněk v závislosti na CD69 sacharidových interakcích.

12a až 12c: procento lyze (a) MOLT-4 buněk, (b) U937 buněk a (c) K562 buněk je ukázáno v poměru E:T 2, 8, 32.

50

(d) až (f): Tři typy stanovení byly provedeny v $\text{Mg}^{2+}/\text{EGTA}$ médiu: v (d) výsledky 4h ^{51}Cr uvolnění jsou ukázány při E:T poměru 8:1 užitím PBMC (procento specifické lyze), v (e), výsledky apoptózy zkoumané cytofluorometricky (procento apoptotických buněk), a (f) výsledky

testů apoptotické DNA. Výsledky jsou platné pro NK sensitivní buněčné linie MOLT-4, U937, K-562 a NK rezistentní buněčné linie RAJI označené R, THP-1 označené T, a IM-9 označené I. S MOLT-4 a U937 buňkami jsou ukázány další výsledky s reakční směsí obsahující 10^{-5} M laktózu (označeno L) nebo disacharid SN (S) nebo 10^{-8} M sCD69 (C). Linie označené (O) v panelech (d) a (e) ukazují výsledky v nepřítomnosti inhibitoru.

Příklady provedení vynálezu

Modulace aktivity prostřednictvím NKR-P1

V *Escherichia coli* byla exprimovaná rekombinantní forma NKR-P1 (označeno zde jako sNKR-P1) korespondující s dimerickou extracelulární částí NKR-P1 a ukázali, že jde o kalcium dependentní sacharidy vázající protein s vazebnou kapacitou monosacharidů odlišných od těch, které byly popsány pro ostatní C-typy lektinů, a neobvykle silnou asociaci s kalcie.

Předcházející vazebné a inhibiční studie s imobilizovanými a volnými monosacharidy ukázaly, že protein má vyšší afinitu vazby k beta-N-acetyl-D-galaktosaminu než k beta-N-acetyl-D-glukosaminu a s nižší afinitou k alfa-fukóze s IC_{50} hodnotami (koncentrace udané jako 50 % inhibice vazby) tj. $0,6 \times 10^{-7}$ M, 2×10^{-7} M a 2×10^{-6} M. Nyní jsme identifikovali některé extrémně potentní sacharidové ligandy pro NKR-P1, některé s IC_{50} v hodnotách 10^{-9} - 10^{-12} M. Tyto zahrnují oligosacharidové sekvence krevních skupin, rodiny gangliosidů a glykosaminyglykany.

Vedle toho byly získány důkazy, že existuje interakce NKR-P1 proteinu s oligosacharidy na povrchu cílových buněk nebo podobných proteinů na NK buněčném povrchu, které jsou zastoupeny v mechanismu NK buněčného spouštění vedoucího k cytolýze cílových buněk.

Příklad 1

Exprese NKR-P1 proteinu a rozpustných fragmentů v COS buňkách

COS-7 buňky byly transfekovány s NKR-P1 cDNA v plazmidu pCDm8 použitím DEAE-dextran procedury. 3 dny po přidání plazmidu, buněčné povrchové proteiny netransfekovaných a transfekovaných buněk byly označeny radioaktivním jódem podle glukózoxydáz/laktoperoxidázového protokolu, lyzovány ústojným roztokem Tris-(TBS) obsahujícím 1% Triton X-100 a 1mM fenyl-methyl-sulfonyl-fluorid (PMSF) a lyzáty byly vyčištěny centrifugací při 100 000x g 60min.

Supernatanty (5×10^5 cpm) byly podrobeny imunoprecipitaci monoklonálními protilátkami nebo afinitní chromatografií na 1 ml kolonách s monosacharid-Sepharosou. Kolony byly ustáleny TBS obsahující 10mM $CaCl_2$ a 0,1 % Triton X-100 (TBS+C+T) a radioaktivně značené lyzáty aplikované v 1 ml TBS+C+T. Kolony byly promyty stejným pufovacím roztokem a 1 ml frakce byly sebrány. Vázaný protein ke GlcNAc-Sepharose byl vymyt s 0,5 M GlcNAc v TBS-C + T. Frakce byly proměřeny v gama počítací a stejné díly (10^4 cpm) precipitovány 10 % trichloroctovou kyselinou k analýze na SDS polyakrylamidové gelové elektroforéze za redukcí a neredukujících podmínek.

K přípravě rozpustných fragmentů NKR-071, NKR-081 a NKR-091, NKR-P1 protein byl izolován z Tritonových lyzátů 10^9 transfekovaných buněk afinitní chromatografií na GlcNAc-Sepharose jako výše, dialyzován proti TBS+C+T, a podroben případně následujícím opracováním: (a) limitované proteolýze (0,1 μ g/ml trypsinu nebo trombinu, 10 min, při teplotě místnosti), (b) limitované proteolýze následované deglykosylací N-glykanázou (podle protokolu založeného na enzymatické přípravě), nebo (c) digesci subtilisinem (25 μ g/ml subtilisin, 37 °C, 1 h). Proteinové produkty získané těmito zpracováními byly podrobeny afinitní chromatografií na GlcNAc-Sepharose a dialyzovány proti TBS+C.

Příklad 2

Exprese solubilního NKR-P1 fragmentu v prokaryotických buňkách

5 Celá proteinová kódovací sekvence NKR-P1 proteinu byla subklonována z původního cDNA klonu jako 0,8 kb HindIII-BglIII fragment (HindIII místo bylo zaplněno a konvertováno v EcoRI místo užitím EcoRI spojky) a přeneseno do pGEM-3Z vektoru, štěpeno EcoRI a BamHI k získání pNKR-124.

10 pNKR-141 obsahoval sekvence kódující celou extracelulární část NKR-P1 začínající valinem 65 přeneseným z pNKR-124 jako 145 bp HinfI-Pf1M1 fragment, pNKR-141W měl aminokyselinovou substituci, v které tryptofan 115 byl zaměněn za threonin během ligace Pf1M1 místa, pNKR-161 zahrnoval lektinovou doménu NKR-P1 z tryptofanu 115 a byl konstruován ligací EcoRI spojky (10 mer) k Pf1M1 místu v pNKR-124, zarovnan T4 DNA polymerázou. pNKR-171 a -191 jsou varianty výše uvedených konstruktů, z kterých byl odňat segment
15 kódující 8 nejvíce C-terminálních aminokyselin.

Toho bylo dosaženo otevřením daných plazmidů na jediném místě BsmI, odnětím jednořetězcových prodloužení a ligací vystřihovací spojky (1144, New England BioLabs). Plazmidy byly znovu uzavřeny, amplifikovány in vivo, natráveny BspM1 a opracovány nukleázou z fazolí (Phaseolus aureus) k odnětí jednořetězcových prodloužení. Malý EcoRI-BspM1 fragment byl svázan proti zaplněnému ClaI místu v polylinkeru EcoRI natráveného plazmidu pGEM-7Zf(-) za účelem znovuobnovy stop kodónu. EcoRI/HindIII inserty byly přeneseny do vektorů pNIIIompA2 nebo pMAL-2 (New England BioLabs) k získání expresních plazmidů pNKR-241, -261, -271 a 291, nebo pNKR-341, -341W nebo 391.
25

Proteiny NKR-241 až -291 byly produkovány v Escherichia coli kmeni JA221 před tím popsánými metodami a čištěny afinitní chromatografií na GlcNAc-Sepharosové koloně. Proteiny NKR-341, -341W, nebo -391 byly exprimovány v Escherichia coli kmeni NM522 užitím protokolu přípravy fúzovaných proteinů a čistícího systému.
30

600 ml LB média s 100 µg/ml ampicilinu bylo inokulováno 6 ml kultury obsahující expresní plazmidy a inkubováno v orbitální třepačce při 300 ot. za min po 2 h při 37 °C, případně 30 min. při teplotě místnosti. Buňky byly indukovány izopropyl-beta-D-thiogalaktosidem (0,1 mM) a inkubovány po další 3 až 4 hodiny při teplotě místnosti. Buňky byly sklizeny centrifugací v Beckmanově J-6 centrifuze, resuspendovány v přibližně 20 ml extrakčního pufru (0,02 M Tris. HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM 2-merkaptoetanolu (2-ME), 1 mM NaN₃ a 1 mM PMSF), sonikovány na ledě 4 x 30 s. a centrifugovány při 15 000 x g po 10 min. Fúzované proteiny byly izolovány z pročištěných bakteriálních extraktů na amyulózo-agarózové afinitní koloně podle standardního protokolu (New England BioLabs).
35

40 Spojené fúzovací proteiny (100 mg) byly štěpeny Faktorem Xa při 23 °C a NKR proteiny separovány na maltózu-vázajícím proteinu, chromatografovány na DEAE-Sepharosové koloně (2 x 15 cm), ustáleny v 10 mM Tris pH 8,0, 25 mM NaCl, 10 mM 2-ME a vymyty v lineárním gradientu NaCl 500 mM ve 4 kolonových objemech. Konečná purifikace byla provedena gelovou filtrací na Sephakrylu S-200 SF (0,5 x 120 cm) ustáleném TBS+C, obsahujícím 8 M močoviny a 10 mM 2-ME. NKR fragmenty byly vymyty v druhém vrcholu a určeny SDS polyakrylamidovou gelovou elektroforézou.
45

50 Proteiny byly renaturovány sérií dialyzačních kroků, prvně odstraněním močoviny a poté zbaveny 2-ME a snížením koncentrace denaturačních látek na polovinu v několika dialyzačních krocích. Vzorky pro antigenní analýzu byly sbírány po každé dialýze. Konečně proteiny byly dialyzovány proti TBS + C obsahujícím 1 mM NaN₃ a uchovávány v tomto pufru.

Příklad 3

Vysoce afinitní sacharidové ligandy pro NKR-P1

Jako referenční látka byl použitý na lipid vázaný trisacharid, DLNN (zkratka označující v textu
5 látku uvedenou mezi sacharidy tabulky 1), s terminálním N-acetylglukosaminem vázané
k sNKR-P1. Zvláště byl užit DLNN k výzkumu vlivu NKR-P1 na rozpoznávání dalšího
prodloužení oligosacharidové páteře a periferní substituce krevně skupinových monosacharidů
sialovou kyselinou a sulfátem.

10 V počátečních chromatogram-vazebných experimentech s sNKR-P1 bylo nalezeno, že se váže
k LNT sekvenci, galaktóza je β 1-3 vázána k N-acetylglukosaminu DLNN sekvence, ale nikoliv
k LNNT sekvenci, kde galaktóza je β 1-4 vázána (obrázek 1a, linie 1', 2' a 3'). Avšak v přítom-
nosti α 1-3 vázané fukózy na N-acetylglukosaminu LNNT jako v Le^x antigenní sekvenci LX5,
vazba byla nalezena (linie 2'). Pro LNT páteř bylo zvýšení vazby v přítomnosti α 1-4 vázané
15 fukózy jako v Le^a antigenní sekvenci LA5 (linie 3').

Krevně skupinové H a Le b sekvence obsahující fukózu α 1-2 vázanou ke galaktóze na LNT a
LA5 sekvence jako v H5 (linie 1') a LB6 (linie 3') byly také vázány. Ale, v přítomnosti krevně
skupinového A monosacharidu, α -Nacetyl-D-galaktosamin na H a Le sekvencích jako v A6 a
20 A7, vazba nebyla nalezena (výsledky nejsou ukázány). Krevně skupinový A monosacharid
"maskuje" vazebná místa na Le^a a Le^b sekvencích.

V dalších pokusech (nejsou ukázány) glykolipid globosid s oligosacharidovou sekvencí
GaINAc- β 1-3Gal- α 1-4Gal- β 1-4Glc byl vázán NKR-P1, zatímco Forsmanův glykolipid,
25 který obsahuje GaINAc spojený α 1-3 vazbou ke globosidové sekvenci, nebyl vázán. A tak
afinita NKR-P1 pro N-acetylgalaktosamin se zdá je omezen na β anomer (viz také ganglio série
sacharidů uvedená níže). Afinita pro N-acetylneuraminovou kyselinu, vázanou α 2-3 (ale nikoliv
alfa 2-6), byla objevena pro sNKR-P1, jak ukázáno u 3SL (linie 5') ale nikoliv 6SL (linie 4'),
ani nesubstituované laktosyl páteři (linie 3').

30 Kvantitativní vazebné experimenty ukázaly, že vazba rozpustného NKR-P1 (sNKR-P1)
k lipidu-vázaným oligosacharidům imobilizovaným na plastických mikrojamkách byla nasycena
(panel b, vsuvka). Vazebná data na obr. 1 b a c, nejen že souhlasila s chromatogram-vazebnými
daty, ale navíc ukázala, že (i) α 1-3 vázaná fukóza propůjčuje vazebnou aktivitu k laktosylové
35 kostře jako u LX3, (ii) α 2-3 vázaná N-acetylneuraminová kyselina potencuje vazbu k LNT a
k Le^a a Le^x sekvencím jako u 3SLT, 3SA5 a 3SX5, a (iii) α 2-3 vázaná sialová kyselina na
6SLT není vázána, nicméně vazba je vyloučena k Le^x sekvenci přítomností α 2-6 vázané sialové
kyseliny jako v 6SX5.

40 Síran na galaktóze (3-O vázaný) měl větší potenciační účinek na vazbu NKR-P1 k Le^x a Le^a
sekvencím, než měla 3-vázaná sialová kyselina: srovnej 3SX3 s SUX3 a 3SA5 s SUA5 (obr. 1c).
Bylo také zřejmé, že délka oligosacharidového řetězce má vliv na intenzitu sNKR-P1 vazby:
vazba k SUX4 byla větší než k SUX3, jako byla vazba SUA5 vyšší než SUA4. Přítomnost 3-O
45 sulfátované glukuronové kyseliny připojené vazbou 3- k vnější galaktóze LNNT tvořící HNK-1
antigen také propůjčuje srovnatelnou vazebnou aktivitu.

sNKR-P1 vazebná specificita je nejen vztahena k sérii krevně skupinových oligosacharidů, ale
také zahrnuje ganglio sérii (Obr. 1c). Jak lze předpokládat z vazebných studií monosacharidů
(Bezouška K. et al., J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)), glykolipid GA2 s terminálním
50 beta-N-acetyl-D-galaktosaminem se silně vázal. Taktéž k této sekvenci byla zjištěna vazba,
i když slabší beta 1-3 vázané galaktózy jako u GA1. Bylo zjištěno zvýšení vazebné intenzity,
když tyto dvě kostry byly nahrazeny α 2-3 vázanou sialovou kyselinou: srovnej GM1 s GA1 a

GM2 s GA2. V přítomnosti druhé sialové kyseliny 2–8 vázané dojde k vymizení vazby: srovnaj GD3 s GM3, GD2 a GM2, GD1B s GM1 a GT1B s GD 1A. Jako u série krevních skupin síran (3–O–vázaný) na ganglio sériové kostře má vyšší potenciační efekt na sNKR–P1 než měl k 3– vázané sialové kyselině: srovnaj SM3 s GM3, SM2 s GM2, SM1A s GM1 a SB1A s GD1A. Sulfatid (SULF) byl rovněž vázán. Sulfatovaný glykolipid SB2 s 3–O–síranem jak na N– acetyl– galaktosaminu byl nejvíce vázán na galaktóze v sérii ganglio glykolipidů.

Silnější vazba NKR–P1 byla zjištěna mezi oligosacharidy odvozenými z heparinu a chondroitin sulfátu (Obr. 1d). Nesulfatované disacharidy OS a IVA per se podporují vazbu, ale analogy obsahující různě sulfatované hexosaminy (2–N–sulfatovaný glukosamin, 4–O–sulfatovaný N–acetylgalaktosamin, 6–O–sulfatovaný acetylgalaktosamin nebo N–acetylglukosamin) nebo 2–O–sulfatovaná uronová kyselina (viz tab. 1) vyvolaly zvýšenou vazbu. Z celého testovaného spektra se zdá, že 4–O– a 6–O–sulfatované N–acetylhexosaminy jsou zvláště reaktivní. Mezi disacharidy byl nejvíce vázán trisulfatovaný IS z heparinu. Nejsilnější vazba mezi všemi testovanými oligosacharidy byla k hexasulfatovanému heparin tetrasacharidu IS2. Vazebná aktivita sNKR–P1 zahrnuje fosforylované oligosacharidy, jako 6–fosforylované tetra– a pentasacharidy. M4P a M5P podporující vazbu.

Obrázek 1 ukazuje vazbu jódem značeného NKR–P1 proteinu k lipid–vázaným oligosacharidům. Oligosacharidové sekvence a jejich zkratky jsou uvedeny v tabulce 1.

V a, k lipidu vázané oligosacharidy (neoglykolipidy, přibližně 500 pmol každého, byly chromatografovány (Feizi T. et al. Meth. Enzymol. 230, 484519 (1993)) na destičkách silikagelu v rozpouštědlovém systému chloroform/metanol/voda, objemy 55/45/10 (linie 3 a 3') nebo objemy 65/35/8 (ostatní linie), buď byly barveny chemicky orcinolem (negativní vzorky ukázány v liniích 1 až 5), nebo převrstveny ¹²⁵I–značeným sNKR–P1 (rekombinantní rozpustný, dimerická forma NKR–P1 exprimovaná v E. coli (specifická radioaktivita 107 cpm/μg)) (Bezouška K. et al., J. Biol. Chem. 269, 16945–16952 (1994)) po opracování destiček 0,2 % (v/v) poly–metakrylátem, a vazba byla detekována (Feizi T. et al. Meth. Enzymol. 230, 484–519 (1993)) autoradiograficky (linie 1' až 5'). Linie 1 a 1' obsahovaly LNT a H5, linie 2 a 2' LNNT a LX5, linie 3 a 3' laktózu (LAC), DLNN, LNT, LA5 a LB6, linie 4 a 4' SL, linie 5 a 5' 3SL, vzestupná chromatografie.

V b, na lipidu vázané oligosacharidy (glykolipidy nebo neoglykolipidy) byly imobilizovány na plastických destičkách v přítomnosti nosičových lipidů cholesterolu a vaječného lecitinu, a jejich interakce s ¹²⁵I– značeným sNKR–P1 proteinem byla určena (Bezouška K. et al., J. Biol. Chem. 269, 16945–16952 (1994)). Ve vsuvce je ukázka saturace vazby, ¹²⁵I–značeného sNKR–P1 s neznačeným proteinem k dosažení 10⁶ cpm/μg, a nanesen ve vzrůstajícím množství do jamek pokrytých lipidy navázanými oligosacharidy GM2 a DLNN (2 pmol naneseno na jamku). V hlavním panelu vzestupné části vazebné křivky jsou ukázány pro sérii ředění vybraných na lipidu vázaných oligosacharidů použitých pro jamky, a převrstveny ¹²⁵I–značeného sNKR–P1, 3 x 10⁵ cpm pro jamku. Symboly: □, LNNT; ■, LNT; ○, DLNN; ▼, GA2; ●, GM2; △, SUA5; ▲, IS.

V c a d, intenzita vazby sNKR–P1 k lipidu vázaných oligosacharidů byla porovnávána s odečtením vazebné křivky uvedené v panelu b, a ostatních neuvedených, dále jsou uvedeny hodnoty vazby s hodnotami povlečení od 64 pmol/jamku (panel c) a 8 pmol/jamku (panel d), výsledky jsou uvedeny jako duplikáty s odchylkami označenými čarami.

Oligosacharidy, které byly navázány k sNKR–P1 v první fázi vazebných experimentů inhibovaly vazbu proteinu (Obr. 2a). Jestliže DLNN byl užit jako referenční imobilizovaný ligand. N–acetylglukosaminem zakončené a fukózou zakončené oligosacharidy. DLNN a LA5 byly přibližně 10x více potentními inhibitory vazby (IC₅₀ 3 x 10⁻⁸ M a 2 x 10⁻⁷ M) než mono–sacharidy, N–ace–

tylglukosamin a fukóza zkoumaná dříve (Bezouška K. et al., J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)). Navíc, sialylovaný oligosacharid 3SA5 a sulfatovaný oligosacharid SUA5 byly přibližně 10x a 100x více účinné než LA5 s IC_{50} hodnotami $1,3 \times 10^{-8}$ M (neukázáno) a 3×10^{-9} M. Rovněž mannozo-6-fosfát (IC_{50} 6×10^{-8} M) byl téměř 20 tisíckrát aktivnější než nesubstituovaná mannóza (IC_{50} 10^{-3} M (Bezouška K. et al., J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)) a pak byl další desetinásobný vzrůst aktivity (IC_{50} 5×10^{-9}) v přítomnosti větší mannosylové kostry jako v M5P. Nejvyšší inhibiční aktivity byly zjištěny se sulfatovanými oligosacharidy z heparinu a chondroitin sulfátu (Obr. 2a a b), hodnoty IC_{50} pro neaktivnější, kterými jsou IS a IS2, jsou 10^{-11} M a $1,3 \times 10^{-12}$ M.

IC_{50} hodnoty pro daný oligosacharid se liší vzhledem k užitému imobilizovanému oligosacharidovému ligandu (Obr. 3a): vyšší koncentrace volných oligosacharidů byla vyžadována, jestliže kyselé komponenty, GM2 glykolipid nebo IS neoglykolipid byly užity k povlčení spíše než DLNN neoglykolipid, ačkoliv hierarchie inhibičních aktivit porovnávaných čtyř oligosacharidů byla stejná.

Jakmile byly inhibiční studie rozšířeny o polysacharidy (Obr. 2c) bylo zjištěno, že celý heparin glykosaminyglykan (navzdory jeho multivalenci pro NKR-P1 determinanty), byl pouze marginálně aktivnější na váhovou jednotku než cele sulfatovaný tetrasacharid IS2 (IC_{50} 30 pg/ml a 40 pg/ml). To může být způsobeno přítomností méně sulfatovaných sekvencí (Kjellen L. et al., Annu. Rev. Biochem. 60, 443-475 (1991)) v glykosaminyglykanové populaci. Keratan sulfátový přípravek měl srovnatelnou aktivitu s heparinovým, ukazujíc, že 6-O-sulfatovaná galaktóza (Scudder P. et al., Eur. J. Biochem. 157, 365-373 (1986)) je rovněž rozpoznávána NKR-P1. Chondroitinsulfatované přípravky byly výbornými inhibitory s hodnotami IC_{50} 2,5 a 10 pg/ml chondroitinsulfátů C, A a B. Vysoko a nízkomolekulární formy dextran sulfátů a hyaluronové kyseliny byly nejméně aktivní testované polysacharidy s IC_{50} 0,2 ng/ml, 1 ng/ml a 1,8 ng/ml.

V a- a c-, DLNN neoglykolipid byl potažen na mikrodestičkové jamky (64 pmol aplikováno na jamku) a vazba ^{125}I -sNKR-P1 (5×10^4 cpm na jamku) byla měřena v přítomnosti požadovaných koncentrací sacharidů. Regresní křivky byly vyneseny z experimentálních bodů podle vzorce $y=IC_{50} : (x + IC_{50})$, kde $y=1 - (\% \text{ inhibice} : 100)$, x = koncentrace inhibitoru, a IC_{50} je koncentrace inhibitoru dávající 50 % inhibici vazby.

Zkratky pro mono- nebo oligosacharidy jsou uvedeny v tabulce 1, pro polysacharidy platí: CA a CB pro sírany chondroitinu A a B (hovězí), CC síran chondroitinu C (žraločí), H pro heparin (prasečí střevní mukóza), DH a DL jsou pro vysoko a nízkomolekulární sírany dextranu (průměrná molekulová hmotnost 500 kDa a 5 kDa, HY hyaluronová kyselina, všechny Sigma Chemical Company, keratan sulfát (z hovězí rohovky) (Scudder P. et al., Eur. J. Biochem. 157, 365-373 (1986)), tečkovaná křivka v panelu c je pro heparin tetrasacharid IS2 vyjádřená pro srovnání v $\mu\text{g/ml}$.

V b- je uvedena korelace aktivit různých oligosacharidů zkoumaných ve vazebných a inhibičních studiích. Vazebné aktivity byly počítány jako poměry hodnot vazby k specificky imobilizovaným oligosacharidům - těm, které jsou imobilizovány k DLNN (vzato z obr. 1 při 64 nebo 8 pmol/jamku). Inhibiční aktivity volných oligosacharidů relativně k DLNN byly počítány jako poměry IC_{50} pro DLNN k hodnotám určených oligosacharidů, hodnoty IC_{50} byly odečteny z inhibičních křivek uvedených v panelu a, ostatní nejsou uvedeny.

Obrázek 3 ukazuje srovnání schopnosti oligosacharidů jako inhibitorů vazby jódem značeného sNKR-P1 k různým oligosacharidům, a srovnání schopnosti těchto oligosacharidů s neznačeným sNKR-P1 a chondroitin sulfátem A (zkratka CA) jako inhibitorů vazby ^{125}I -sNKR-P1 k nádorovým buňkám a k cytolyze různých cílových buněk buňkami NK.

V a-, mikrojamky byly povlečeny DLNN neoglykolipidem nebo GM2 glykolipidem 64 pmol/jamku, nebo IS neoglykolipidem při 8 pmol/jamku společně s nosičem lipidů (Larkin M. et al., J. Biol. Chem. 267, 13661-13668 (1992), Yuen C. T. et al., J. Biol. Chem. 269, 1595-1598 (1994)) a byla určena inhibice vazby ^{125}I -sNKR-P1 v přítomnosti různých koncentrací volných oligosacharidů IS, GM2, IVA a DLNN. Výsledky byly vyjádřeny jako koncentrace dávající 50 % inhibici vazby (IC_{50}). V oddělených pokusech (není ukázáno) byly užity pro povlékání jamek různé hladiny na lipidu vázaných oligosacharidů (vzato 4-32 pmol/jamku DLNN, 0,5-32 pmol/jamku GM2 nebo 0,5-8 pmol/jamku IS) a bylo zjištěno, že IC_{50} hodnoty jsou ovlivněny zanedbatelně.

V b-, byla měřena vazba ^{125}I -sNKR-P1 k suspenzím 5×10^5 buněk. Symboly: YAC-1 buňky, B16S buňky, 1C21 buňky, RNK-16 buňky, glutaraldehydem fixované RNK-16 buňky, glutaraldehydem fixované RNK-16 buňky v přítomnosti IS disacharidu, P815 buňky. V oddělených experimentech (neukázáno) sNKR-P1 vazba k čerstvým NK buňkám byla podobná jako pro RNK-16 buňky.

V c- a d-, neznačený sNKR-P1, chondroitin sulfát A (průměrná molekulární hmotnost 15 kDA), a oligosacharidy IS, GM2, IVA a DLNN byly testovány (v koncentračním rozsahu) jako inhibitory vazby ^{125}I -sNKR-P1 k cílovým buňkám YAC-1, B16S nebo 1C21: výsledky byly vyjádřeny jako IC_{50} .

V e-, cytotoxicity čerstvých NK buněk k NK-vnímavým YAC-1 a NK-rezistentním P815 buňkám, a v f-cytotoxicity RNK-16 buněk k YAC-1, P815 a také NK-vnímavým B16S a 1C21 buňkám byly studovány v rozdílných poměrech efektorových k cílovým buňkám (E:T). Symboly pro cílové buňky byly stejné jako v panelu b-.

V g-, aktivity látek ukázaných v panelu c- jako inhibitory zabíjení YAC-1 cílových buněk čerstvými buňkami NK, a v h- až j-, tyto samé látky byly hodnoceny jako inhibitory zabíjení YAC-1, B16S a 1C21 buněk buňkami RNK-16 v poměru E:T udaných v metodách.

V panelu k-, schopnosti sNKR-P1, chondroitin sulfátu A a oligosacharidů IS a GM2 jsou porovnávány jako inhibitory sNKR-P1 vazby k YAC-1, B16S a 1C21 buňkám (IC_{50} hodnoty užity z panelu c) a zabíjení YAC-1 buněk čerstvými NK buňkami a YAC-1, B16S, 1C21 buněk RNK-16 buňkami v poměrech E:T udaných v metodách (IC_{50} hodnoty z pokusů zde neukázaných).

Symboly pro inhibitory v panelech g - až k jsou: čtverce pro sNKR-P1, kroužky pro chondroitin sulfát A, diamanty pro disacharid IS, trojúhelníčky pro GM2 tetrasacharid, obrácené trojúhelníčky pro DLNN trisacharid: zavřené, otevřené a vpravo čárkované symboly jsou užity pro YAC-1, B16S a 1C21 buňky, malé uzavřené symboly jsou užity k odlišení výsledků s čerstvými NK buňkami od výsledků získaných RNK-16 buňkami.

Metody:

Čerstvé NK buňky byly izolovány z potkaních slezin samců Fisher F344 adheencí na plastik (Vujanovic N. L. et al., J. Exp. Med. 167, 15-29 (1988)), následovně inkubací ve 200 U/ml rIL-2 (Cetus Inc.) 2 h. RNK-16, NKR-P1+ buněčné linie odvozené z velkých granulárních leukemických lymfocytů potkana rostly in vitro v kompletním RPMI (médiu obsahující 10 % fetálního telecího séra. L-glutamin a antibiotika) s 25 μM 2-merkaptotetanolu (RPMI/ME). NK-senzitivní cílové buněčné linie YAC-1 (T-buněčný lymfom), B16S (melanom), 1C21 (makrofágy) a NK rezistentní buněčná linie P815 (mastocytom) byly získány z americké sbírky tkáňových kultur a kultivovány v kompletním RPMI médiu.

Pro vazebné radiostudie byly buňky promyty 3x RPMI s 10 mM HEPES pH 7,4 (RPMI/HEPES) a suspendovány v koncentraci 5×10^6 buněk/ml. 100 μl buněčné suspenze (v tripletech v 1,5 ml zkumavkách Eppendorf) byly smíchány s ^{125}I -sNKR-P1 ředěným v 10 μl RPMI/HEPES, inkubo-

vány při 23 °C po dobu 1 h: buněčný pelet byl získán při 1000 g po dobu 5 min, buňky 5 x promyty v 1 ml RPMI/Hepes, a radioaktivita měřena na gama počítači.

5 V paralelním experimentu RNK-16 buňky byly předinkubovány s IS disacharidem (10^{-7} M) v 10 mM fosfátovém ústojném roztoku (PBS) nebo PBS samotném, fixovány přidáním glutaraldehydu na finální koncentraci 0,01 % (v/v) a inkubovány 10 min. Buňky byly peletovány a 5 x promyty v PBS, veškerý glutaraldehyd byl odmyt při 37 °C 30 min. kompletním RPMI médiem, buňky byly 3x promyty RPMI/Hepes a použity k měření vazby ^{125}I -sNKR-P1.

10 Pro inhibici buněčné vazby, $0,5 \times 10^6$ buněk bylo smícháno s ^{125}I -sNKR-P1 při koncentracích dávajících poloviční saturaci vazby. Sériová ředění inhibitorů byla zahrnuta (celkový reakční objem 100 μl) a vazebné kalkulace na buňku byly vyjádřeny jak je dříve uvedeno. Spontánní lyze nádorových buněk čerstvými buňkami NK a RNK-16 buněčnou linií byla změřena v tripletech při E:T poměrech od 0,5 do 64:1 standardní ^{51}Cr technikou uvolnění chromu (Brunner K.T. et al.:
15 Immunology 14, 181-196 (1968)) při 37 °C za 4 hodiny v celkovém kultivačním objemu 250 μl , spontánní uvolnění ^{51}Cr bylo změřeno v nepřítomnosti efektorových buněk a nepřesahovalo 5%.

Inhibiční testy cytotoxicity při užití buněk YAC-1, B16S a 1C21 cílových buněk byly provedeny při E:T poměrech = 2:1, 4:1 a 16:1 v přítomnosti sériově ředěných inhibitorů v celkovém objemu
20 kultivačního média 250 μl .

Příklad 4

Sacharidy inhibovatelná vazba sNKR-P1 na buňky

25 Vazba ^{125}I -značeného sNKR-P1 byla prováděna s nádorovými buněčnými liniemi YAC-1, B16S a 1C21, které jsou známými cílovými buňkami pro NK buňky (Karlhofer F.M. et al.: Nature 358, 66-70 (1992)). Zanedbatelná byla vazba k NK-rezistentní buněčné linii P815 buněk (Obr. 3b). Vazba k cílovým buněčným liniím byla inhibovatelná s nenaznačeným s NKR-P1 (Obr. 3c). Vazba byla pravděpodobně zprostředkována sacharidy, protože byla sacharidy inhibovatelná a
30 hierarchie inhibičních aktivit 4 oligosacharidů byla podobná. Sledované inhibiční experimenty byly provedeny s imobilizovanými oligosacharidy (viz Obr. 3a a 3c).

Při použití YAC-1 buněk. IC_{50} hodnoty pro oligosacharidy byly srovnatelné s těmi, kde bylo použito glykosaminyglykanového disacharidu IS k pokrytí jamek (Obr. 3c). Když byly použity
35 B16C buňky, IC_{50} hodnoty dosahovaly IS a GM2 oligosacharidů, nikoliv však IVA a DLNN při nejvyšších koncentracích (10^{-4} M), jestliže byly užity buňky 1C21, byla nalezena inhibice s IS, nikoliv s ostatními oligosacharidy. Analogicky byly zjištěny rozdíly mezi IC_{50} hodnotami při použití imobilizovaných GM2 a IS (Obr. 3a). výsledky naznačují, že mohou existovat rozdíly v repertoáru ligandů kyselých oligosacharidů pro každou ze tří cílových buněčných linií.

40 Nepatrná vazba sNKR-P1 byla zjištěna k buňkám NK linie RNK-16 (Obr. 3b), také k čerstvým buňkám NK (výsledky neukázány) a dodatečná vazebná místa byla objevena, jestliže tyto buňky byly opracovány NKR-P1 inhibičním disacharidem IS, během fixace glutaraldehydem, během vazebných experimentů (fixace glutaraldehydem per se neměla vliv na vazebnou aktivitu, jak je ukázáno na Obr. 3b) a nebyla změna v hladině sNKR-P1 vazbě k PB15 buňkám, jestliže byly podobně opracovány IS a fixovány glutaraldehydem (neukázáno). Jestliže IS byl vymyt z RNK-16
45 buněk před fixací, neproběhlo zvýšení vazby sNKR-P1 (neukázáno).

Tato zjištění napovídají existenci reverzibilní cis-interakce mezi membránově asociovanými
50 sacharidovými ligandy a endogenním NKR-P1 (nebo jinými sacharidy-vázajícími proteiny) na povrchu zabíječů, které maskují některá vazebná místa pro exogenní NKR-P1. S čerstvými buňkami NK a buňkami RNK-16, vyžadovaná koncentrace oligosacharidů pro inhibici sNKR-P1

vazby byla nižší než vyžadovaná pro vazbu na nádorové buňky, spíše však byly srovnatelné s těmi pro pokrytí DLNN (srovnej Obr. 3a a d).

Příklad 5

5 Sacharidy inhibovatelné zabíjení cílových buněk

Protein sNKR-P1 nevyvolává detekovatelnou lýzi, je-li přidán k cílovým buňkám YAC-1, B16S nebo C21 v koncentracích od 0,1 do 100 $\mu\text{g/ml}$ (přibližně 2×10^{-9} do 2×10^{-6} M) za normálních podmínek NK-lytického testu (neukázáno). Avšak je-li zkoumána lýze YAC-1 buněk čerstvými NK buňkami 1 RNK-16 buněčnou linií, stejně jako lýze B16S a 1C21 testována RNK-16 (obr. 3e a f), byla inhibovatelná nikoliv pouze sNKR-P1, ale také sacharidovými ligandy pro tento protein (Obr. od 3g až j).

Inhibiční data pro čerstvé buňky NK a RNK-16 byla velmi podobná (ukázáno pro YAC-1 cílové buňky v obr. 3 g a h). IC_{50} hodnoty pro inhibici zabíjení podobně jako relativní aktivity individuálních inhibitorů se lišily pro 3 cílové buňky testované s RNK-16 buňkami (Obr. 3h, i a j). Hierarchie inhibičních aktivit byla srovnatelná s daty, které byly získány pro inhibici vazby sNKR-P1 k těmto buňkám.

A tak, jak je ukázáno na obr. 3k, byla nalezena silná korelace mezi koncentracemi oligosacharidů nutnými pro inhibici vazby sNKR-P1 k cílovým buňkám (Obr. 3c) a pro inhibici předmětných cílových buněk oběma zabíječi, čerstvými buňkami a buňkami RNK-16 (obr. 3g až j). Společně tyto výsledky naznačují, že protein NKR-P1 (a ostatní proteiny, které mohou být brány v úvahu vazebných specifit a jsou podobné NKR-P1) umožňuje zabíjení nádorových buněk.

K určení, zdali membránově asociované NKR-P1 na zabíječích je zapojeno v konjugaci s cíli, jsme počítali konjugáty tvořené v médiu postrádajícím kalcium a obsahující EGTA k zabránění lytického procesu. Ačkoliv NKR-P1 je na kalcium závislý sacharidy-vázací protein, asociuje s kalcium velmi pevně, zjistili jsme, že je pouze 20 % oslabení v jeho vazbě k DLNN v přítomnosti EGTA (Bezouška K. et al.: J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)).

S ligandy o vyšší afinitě, jako je GM2, nebylo zjištěno oslabení až do doby, než byl protein kompletně dekalifikován za nefyziologických podmínek (obr. 4a). Tak, při studiu konjugátů (v médiu EGTA) bylo zjištěno, že NKR-P1 -zprostředkovaná interakce se sacharidovými ligandy nemůže být závažně ovlivněna.

Jestliže byly užity čerstvé NK buňky za těchto podmínek, vytvořily 11 % konjugátů s YAC-1 buňkami (obr. 4b). Počet konjugátů byl nezměněn v přítomnosti sNKR-P1 nebo disacharidu IS v 10^{-8} a 10^{-7} M koncentraci, (která umožnila kompletní inhibici vazby ^{125}I -značeného sNKR-P1 k nádorovým buňkám) a kompletní inhibici cytotoxicity (obr. 3c a f). Vedle toho, když byly zkoumány aktivované NK buňky, procento konjugátů tvořících buněk bylo vyšší (23 %). Přítomnost sNKR-P1 nebo disacharidu IS v reakční směsi negativně ovlivnila množství konjugátů tvořících buněk jako v případě použití čerstvých buněk (obr. 4b). Jak jsme již poznamenali dříve (Chambers W. H. et al., J. Exp. Med. 169, 1373-1389 (1989)), množství NKR-P1 na buněčném povrchu srovnatelně vzrostlo po NK buněčné aktivaci (obr. 4c a d), zatímco množství CDB antigenu nebylo změněno a CD5 antigen zůstal nedetekovatelným (obr. 4e až h). A tak, mezi aktivovanými buňkami mohou být odlišeny dvě populace konjugátů tvořících buněk: první se podobá čerstvým NK buňkám, přičemž tvorba konjugátů může zahrnovat i jiné buněčné adhezivní molekuly (Zanetti M. et al., EMBO J. 12, 4375-4384 (1993)), a druhá zprostředkovaná NKR-P1 (nebo podobnými proteiny uskutečňujícími tvorbu konjugátů). Tyto mohou přispět k zvýšení tvorby konjugátů (Quillet M. et al., Int. J. Cancer 47, 473-479 (1991)).

Popsané experimenty nevylučují objevení se disociovatelných konjugátů zprostředkovaných NKR-P1 (analogy k disociovatelným elementům DLNN vazby (Bezouška K. et al.: J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)), které nemusí být detekovány v nepřítomnosti kalcia v kulturačním médiu.

5

Obr. 4 poukazuje na vazbu sNKR-P1 proteinu k vysoce afinitním sacharidovým ligandům. GM2 glykolipidu v nepřítomnosti externího kalcia, zapojení NKR-P1 na povrchu čerstvých a aktivovaných buněk NK, a na účast na kalcium nezávislých konjugátů s cílovými buňkami.

10 V plastických mikrojankách potažených GM2 glykolipidem (64 pmol na jamku) vazba ¹²⁵I značeného sNKR-P1 byla měřena jak je uvedeno v popise k obr. 1, po následném opracování radioaktivně značeného proteinu: dialýza (4 dny) proti 10 mM Tris ústojnému roztoku (TBS) s 10 mM CaCl₂, pH 8 (TBS+C) (obr. 4a, plná kolečka), nebo dialýza (4 dny) proti TBS obsahujícímu 10 mM EGTA, pH 8 (TBS+E) (prázdná kolečka), nebo kompletní dekalciфикаční (Bezouška K. et al.: J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)) dialýza proti 0,1 M Tris-HCl, pH 10 po dva dny následovaná dialýzou proti TBS+E po dva dny (prázdné čtverečky), alikvotní duplikáty vzorků byly dialyzovány zpět do TBS +C po dva dny (plné čtverečky).

15

20 V b- byl zkoumán vliv sNKR-P1 a IS disacharidu na tvorbu konjugátů čerstvými a aktivovanými NK buňkami s YAC-1 cílovými buňkami, v kontrolním experimentu v nepřítomnosti inhibitorů, nebo v přítomnosti sNKR-P1 a IS testovaných jako inhibitory. Výsledky jsou uvedeny jako % NK buněk tvořících konjugáty (průměr se stand. odchylkou ze tří určení).

20

25 V c- až h- je ukázka zvýšené exprese NKR-P1 na aktivovaných buňkách (s chyběním exprese CD5 a nezměněné účasti antigenu CD8). Provedena průtoková cytofluorometrie za účelem exprese antigenů NKR-P1, CD8 a CD5 (plné čáry) na čerstvých buňkách NK (panely c-, e- a g-) a na aktivovaných buňkách NK (panely d-, f- a h-). Tečkované linky označují fluorescenci v kontrolních experimentech užitím fluoresceinem značených buněk pouze při použití králičího anti-myšního imunoglobulinu.

25

30

Metody:

Čerstvé buňky NK byly připraveny jak je uvedeno v popisu k obr. 3, k dosažení maxima exprese buněčného NKR-P1 (Chambers W.H. et al., J. Exp. Med. 169, 1373-1389 (1989)), čerstvé buňky NK byly aktivovány kultivací po dobu 120 h v přítomnosti rIL-2, (množství 1000 U/ml).

35

40 Pro měření tvorby konjugátů (Radcliff et al., J. Immunol. Meth. 139, 281292 (1991)), YAC-1 buňky byly značeny hydroethidinem a efektorové buňky kalceinem-AM (obě látky z Molecular Probes), buňky dále promyty, suspendovány v médiu PBS bez kalcia, obsahujícím 10 mM MgCl₂, 10⁵ použitých buněk bylo smícháno v tripletech v nepřítomnosti aditiv nebo v přítomnosti s NKR-P1 (10⁻⁸ M) nebo IS disacharidu (10⁻⁷ M). Buňky byly stočeny při 4 stupních Celsia, ohřáté na 37 °C po dobu 10 minut a % konjugáty-tvořících buněk bylo odečteno za podmínek dvoubarevné průtokové cytometrie (FACSOrt. Becton Dickinson).

40

45 Pro provedení cytofluorometrické analýzy a měření exprese povrchových antigenů NKR-P1, CD5, CDB, čerstvé nebo aktivované NK buňky byly inkubovány v PBS obsahujícím 3 % hovězího sérového albuminu a 0,1 % NaN₃. Následně byly přidány saturující koncentrace monoklonálních protilátek 3.2.3 (proti NKR-P1, Chambers W.H. et al., J. Exp. Med. 169, 1373-1389 (1989)), nebo OX8, nebo OX19 (obě z Serotec) a inkubovány při 23 °C, poté buňky promyty a inkubovány při 23 °C po dobu 1 hodiny v PBS s 0,1 % NaN₃ obsahujícím fluoresceinem značený králičí anti-myší imunoglobulin (Cappel Inc. 1 µg/ml). Buňky byly promyty v PBS médiu bez Ca²⁺/Mg²⁺, s 0,02 % EDTA a analyzovány průtokovou cytometrií.

50

Příklad 6

Oligosacharidy-zprostředkovaná aktivace zabíječských buněk

V souladu s dřívějšími zjištěními (Ryan J. C. et al., J. Immunol. 147, 3244-3250 (1991)), InsP3 a
 5 InsP2 hladiny se zvyšují po expozici RNK16 buněk s YAC-1 buňkami (obr. 5a, b) nebo propoje-
 ním membránově asociovaných molekul NKR-P1 s protilátkami (panely g- a h-). Odpovídavost
 k YAC-1 buňkám byla potlačena v přítomnosti sNKR-P1 a heparindisulfidu IS (panely a- a b-)
 při koncentracích které inhibovaly ^{125}I -sNKR-P1 vazbu k cílovým buňkám (10^{-8} M, 10^{-7} M).
 10 Obsah cytoplasmatického kalcia po expozici buňkám YAC-1 (panel 5c) byl také utlumen v pří-
 tomnosti sNKR-P1 dokazujíc, že interakce membránově asociovaného NKR-P1 (nebo proteinů
 majících podobné vazebné specifity) s ligandy na povrchu nádorových buněk jsou těsně zapo-
 jeny ve spuštění aktivačních procesů.

Liposomy obsahující na lipidy vázané oligosacharidové ligandy pro NKR-P1, neoglykolipid
 15 disacharidu IS a glykolipidu GM2, jsou-li přidány k buňkám RNK16, vyvolají zvýšenou hladinu
 InsP3 a InsP2, která je srovnatelná s hodnotami zjištěnými po propojení membránově asociova-
 něho NKR-P1 s protilátkami (srovnej panely d- a e- s panely g- a h-). Odpovědi vzniklé shluklý-
 mi oligosacharidy byly inhibovatelné, jakmile byly dodány do reakční směsi volné oligosacha-
 20 ridy (panely d- a e-).

Navíc, na dávce závislé uvolnění cytoplasmatického kalcia bylo zjištěno v RNK-16 buňkách po
 jejich expozici liposomům s GM2 (panel f-). Účinek je závislý na hustotě glykolipidů zabudova-
 ných do liposomů - byly pozorovány tři hladiny zabudování GM2 : při 0,2 nmol/ 100 μl liposo-
 mů byla pozorována malá změna volného cytoplasmatického kalcia. Při 2 nmol (ekvivalent
 25 k hladině fosfoinositidového experimentu v panelu d- a e-), bylo zvýšení více patrné než u
 20 nmol. Na hustotě závislé spuštění uvolňování kalcia bylo také inhibovatelné u GM2, jestliže
 GM2 oligosacharid nebo sNKR-P1 byly včleněny v reakční směsi (panel f-).

V experimentu, v kterém RNK-16 buňky byly exponovány přítomnosti chondroitinsulfátu A
 30 (10^{-7} M), indukované hladiny InsP3 a InsP2 (panely g- a h-) byly téhož řádu jako byly zjištěny
 při expozici YAC-1 buněk popsanych v panelech a- a b- (vezmi na vědomí odlišné stupnice
 v panelech a-, b-, a g- a h-), nelze pochybovat o zvýšení cytoplasmatického kalcia (panel i-).

Na rozdíl od význačných účinků zjištěných u sdružených oligosacharidových ligandů prezento-
 35 vaných liposomy, kde RNK-16 buňky byly exponovány s volným disacharidem IS, žádné změny
 nebyly nalezeny v hladině inositolfosfátů (panely g- a h-), ačkoliv malé (ale reprodukovatelné)
 zvýšení bylo nalezeno v cytoplasmatickém kalcii (panel i-).

Obrázek 5 ukazuje zapojení protein-sacharidové interakce v aktivaci buněk NK. Hladiny InsP3
 40 (panely a-, d- a g-), InsP2 (panely b-, e- a h-), a cytoplasmatického kalcia (Ca^{2+})_i (panely c-, f- a
 i-) byly změřeny u efektorových buněk RNK-16 po jejich interakci s YAC-1 cílovými buňkami
 (panely a-, b-, a c-), nebo s liposomy obsahujícími oligosacharidové ligandy pro NKR-P1 (panely
 d-, e- a f-) nebo s monoklonálními NKR-P1 protilátkami, nebo chondroitin sulfátem A nebo
 volným disacharidem IS (panely g-, h- a i-).

V a- a b- bylo zjišťováno množství vzniklých inositolfosfátů (Ryan J.C. et al., J. Immunol 147,
 3244-3250 (1991)) jestliže myo- (^3H)-inositol-značené buňky RNK-16 (5×10^6 v 0,25 ml
 RPMI/ME média) byly smíchány se stejným množstvím YAC-1 buněk (0,25 ml) v nepřítomnosti
 45 inhibitorů (plné kroužky) a v přítomnosti IS disacharidu (10^{-7}) nebo sNKR-P1 proteinu (10^{-8})
 50 (prázdné kroužky a prázdné čtverečky).

V d- a e- byly zkoumány inositolfosfáty jestliže NKR-16 buňky (5×10^6 v 0,45 ml RPMI/ME) byly inkubovány s 50 μ l liposomů (Feizi T. et al., J. Exp. Med. 149, 975-980 (1979)) skládajících se z 25 nmol (obě hodnoty) cholesterolu a vaječného lecithinu se zabudovaným neoglykolipidem IS (2,5 nmol, plné trojúhelníčky) nebo GM2 glykolipidy (1 nmol uzavřené, obrácené trojúhelníčky). V paralelních pokusech (odpovídající symboly prázdné) inkubační směs obsahovala rovněž volné oligosacharidy IS a GM2 (10^{-7} a 10^{-6} M).

V g- a h- inositolfosfáty byly zkoumány za následujících podmínek: myo- (^3H)-inositolem značené RNK-16 buňky (5×10^6 v 0,5 ml RPMI/ME) byly inkubovány s 0,5 μ g fragmentů $\text{F(ab}')_2$ (Ryan J.C. et al., J. Immunol. 147, 3244-3250 (1991)) purifikované monoklonální protilátky 3.2.3 a potom propojeny (Chambers W.H. et al., J. Exp. Med. 169, 1373-1389 (1989)) přidáním 1 μ g/ml $\text{F(ab}')_2$ kozího anti-myšního imunoglobulinu (Capell Inc.) (plné čtverečky), nebo chondroitin sulfátu A, 10^{-7} M (plné diamanty) nebo disacharidu IS (10^{-7} , plné trojúhelníčky).

V c-, f- a i- byly zkoumány základní hladiny volného cytoplasmatického kalcia (Chused et al., Cytometry 8, 396-404 (1987)) 5 minut než byly RNK-16 buňky opracovány Indo-1 AM a bez aditiv. Reaktanty v c- se skládají z 10^6 RNK-16 buněk a ze stejného počtu YAC-1 buněk v 1 ml RPMI/ME v nepřítomnosti inhibitoru (uzavřené kroužky) nebo v přítomnosti 10^{-8} M sNKR-P1 buněk přidanych před cílovými buňkami (otevřená kolečka).

V f-, reakční směs se skládala z 10^6 RNK-16 buněk v 0,9 ml RPMI/ME a 100 μ l liposomů (50 nmol cholesterolu a 50 μ l vaječného lecithinu) GM2 glykolipidu, 0,2 nmol (prázdné trojúhelníčky), nebo 2 nmol (plné trojúhelníčky), nebo 20 nmol (plné obrácené trojúhelníčky), nebo 2 nmol tetrasacharidu (10^{-6} M nebo sNKR-P1 proteinu (10^{-8} M)). Výsledky s GM2 tetrasacharidem jsou ukázány, s sNKR-P1 byly podobné.

V i-, reakční směs obsahovala 10^6 buněk v 1 ml RPMI/ME a 10^{-7} M chondroitinsulfátu A (plné diamanty) nebo disacharidu IS (plné trojúhelníčky). Po 15 minutách inkubační směs byla podrobena účinku 1 μ M ionomycinu za účelem maximální stimulace uvolnění kalcia z intracelulárních rezerv.

Příklad 7

NKR-P1 vazba a cytolýza ligandy sialylovaného a glykosaminglykanového typu na cílových buňkách

Nádorové linie byly opracovány sialidázou, heparináзой I, chondroitináзой ABC jednotlivě nebo ve směsi. Výsledky získané NK- vnímavými buňkami YAC-1, B16S a 1C21 byly podobné. Výsledky pro YAC-1 a NK-rezistentní P815 buňky jsou ukázány na obr. 6.

Vazba sNKR-P1 a cytolýza NK-vnímavých nádorových buněk byla odstraněna opracováním sialidázou a chondroitináзой, směs obou enzymů měla nejvyšší účinek se snížením sNKR-P1 vazby přibližně na 60 % a snížením specifické cytolýzy přibližně na 50 % kontrolních hodnot, zatímco heparináza měla malý účinek (panely a- a b-). V příbuzných pokusech (výsledky neukázány) užití heparinázy III nemělo vliv na vazbu sNKR-P1 nebo cytolýzu 4 nádorových buněčných linií.

Předběžná pozorování, která zahrnovala vazebné experimenty sNKR-P1 k membránovým preparacím nádorových buněk a elektroforézu na polyakrylamidovém gelu s elektropřenosy na nitrocelulózu a chromatogram vazebné experimenty užitím glykolipidových extraktů nádorových buněk ukázaly, že sialylované ligandy na NK-vnímavých buňkách jsou převážně gangliosidy, na YAC-1 buňkách tyto mají chromatografické vlastnosti a fragmentační profily při použití techniky hmotnostní spektroskopie kapalných sekundárních iontů shodné s těmi pro GD1A, GN1,

GM2, GT1A (se snižující se převahou). Chondroitináza-vnímavé ligandy jsou polydisperzní proteoglykany větší než 200 kDa - 60 kDa (jejich popis bude uveden jinde).

Úlohy pro ligandy gangliosidového a glykosaminového typu na cílových buňkách lze spatřovat v úloze mediátorů přirozeného zabíjení. To může být jasně ukázáno provedením cytolytického testu (E:T poměry 16:1) po expozici NK-rezistentních buněk PB15 k liposomům obsahujícím GM2 glykolipid nebo heparin disacharid IS nebo neoglykolipid laktózy (Obr. 6, panel c-). Jestliže v nepřítomnosti liposomů, nebo v přítomnosti liposomů obsahujících neoglykolipid laktózy je specifická lyze těchto buněk pouze 10 %, preinkubací P815 buněk s GM2 nebo IS liposomy dosáhneme vzrůstu na 60 % a 80 % specifické lyze. Předložením NKR-P1 ligandů na liposomech tyto NK rezistentní buňky se stávají vždy vnímavými k cytolyze jako cílové buňky YAC-1 v E:T poměru 16:1 (srv. obr. 3d-). Preinkubace YAC-1 buněk s GM2 nebo IS liposomy vede k zvýšené cytolyze těchto buněk rovněž v poměru E:T= 4:1 (Obr. 6, panel c-). Jestliže po preinkubačním kroku slabě asociované liposomy byly odmyty z nádorových buněk, cytolyza nádorových buněk vzrostla, ale v menším rozsahu (panel c-). Jestliže byla preinkubace s liposomy vynechána, byla pozorováno pouze slabé zvýšení lyze P815 buněk (přibližně 25 % hodnoty s GM2 liposomy a 30 % hodnoty s IS liposomy).

Obrázek 6 ukazuje úlohy membránově-asociovaných komponent sialylovaného a glykosaminoglykanového typu jako ligandů NKR-P1 na nádorových buňkách. Podobně úlohu těchto komponent pro vnímavost k cytolyze a indukci NK vnímavosti k rezistentním nádorovým buňkám za pomoci inkubace s liposomy exprimujícími oligosacharidové ligandy.

V a-, vazba ^{125}I -sNKR-P1 byla měřena na 5×10^5 YAC-1 nebo P815 buňkách. Buňky byly opracovány sialidázou (S'ase) nebo heparinázou I (H'ase) nebo chondroitinázou ABC (C'ase) nebo směsí sialidázy, chondroitinázy ABC a heparinázy I (SCH'ase), a výsledky byly porovnány s výsledky vazby buněk opracovaných směsí teplem opracovaných enzymů (kontrola).

V b-, cytolyza buněk YAC-1 a P815 čerstvými NK buňkami byla sledována po opracování nádorových buněk, jako v panelu a-, glykosylhydrolázami nebo inaktivovanými enzymy.

V c-, cytolyza YAC-1 nebo P815 buněk čerstvými NK buňkami byla sledována po expozici nádorových buněk k liposomům exprimujícím neoglykolipid laktózy (LAC), glykolipid GM2 (GM2) nebo neoglykolipid disacharidu IS (IS). Podmínky pro liposomovou expozici byly následující: preinkubace s liposomy byla následována promytím nádorových buněk (P+W+), nebo preinkubace s liposomy nebyla následována promytím nádorových buněk (P+W-), nebo nebyla provedena preinkubace a promytí nádorových buněk (P-W-). Výsledky jsou srovnávány s cytolyzou nádorových buněk v nepřítomnosti liposomů (kontrola).

V d-, plazmatické membrány buněk YAC-1 a P815 byly podrobeny SDS-elektroforéze na polyakrylamidovém gelu, a přeneseny na nitrocelulózu. Proužky byly barveny na obsah proteinů (linie 1) nebo převrstveny ^{125}I -sNKR-P1 k autoradiografii (za 3h), vazbě komponent (linie 2) s YAC-1 buněčnými membránami, další proužky (linie 3, 4 a 5) byly testovány na vazbu po opracování sialidázou, chondroitinázou ABC nebo heparinázou I. Jsou vyznačeny pozice molekulových hmotností (kDa).

V e-, linie 1 ukazuje vazbu ^{125}I -sNKR-P1 sledovanou k lipidům extrahovaným z YAC-1 a P815 buněčných membrán rozpuštěných TLC. Opakované proužky, linie 2, byly barveny primulinem. O označuje pozici aplikace, GM1, GD1A, GD1B, GD1B laktonu (GD1BL) a GT1B ukazuje posice autentických standardů. GD1 (A)L je minoritní glykolipidová komponenta označena jako GD1A lakton. Vazba k relativně nízkému bohatému glykolipidu GTB1 a GD1B byla slabé intenzity (šipka) v 3 h autoradiogramech.

Metody:

Pro glykosylhydrolázové opracování kultivovaných nádorových buněk bylo provedeno promytí 3x PBS: 10^7 buněk bylo resuspendováno v 0,9 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 6,5 obsahujícího 0,14 M NaCl. Enzymy (0,1 U Arthrobacter sialidázy, nebo 2 U chondroitinázy ABC získané od Boehringer Mannheim, nebo 100 U heparinázy I nebo 100 U heparinázy III získané od Sigma nebo směs enzymů) byly přidány k buněčným suspenzím v 0,1 ml téhož pufru a inkubovány 30 min při 37 °C. Jako kontroly byly použity buňky inkubované v přítomnosti individuálních enzymů nebo směsi enzymů, které byly inaktivovány inkubací při 100 °C po dobu 5 minut. Po těchto opracováních byly nádorové buňky 3x promyty v RPMI a užity pro vazebné studie s ^{125}I -sNKR-P1, nebo pro cytotoxické studie s čerstvými NK buňkami jak bylo popsáno v popisu k obr. 3.

^{125}I -sNKR-P1 vazba k buňkám nebo cytolýza buněk opracovaných heparináзой III nebo čtyřmi teplem inaktivovanými enzymy (stejný postup jako s buňkami, pouze v pufru). Výsledky jsou ukázány jako kontroly v panelech aa ba jsou vyjádřeny jako průměry hodnot získaných po opracování směsí inaktivovaných enzymů - sialidázy, heparinázy I a chondroitinázy ABC.

V experimentech s expozicí liposomům, YAC-1 nebo P815 buňky (10^5 buněk v 0,9 ml kompletního RPMI) byly smíchány s 0,1 ml liposomů připravených jak bylo popsáno v popisu k obr. 4, a obsahujících 2 nmol GM2 glykolipidu nebo neoglykolipidu IS nebo laktózy. Směs byla inkubována 1 h při 37 °C, a liposomy opracované nádorové buňky byly užity v cytolytických testech po 3x promytí kompletním RPMI nebo bez promytí. Alternativně nádorové buňky byly inkubovány 1 hodinu v nepřítomnosti liposomů a liposomy byly přidány k buněčné suspenzi bezprostředně před přidáním efektorových buněk. Jako kontroly sloužily nádorové buňky inkubované pouze v médiu.

Čerstvé NK buňky byly použity k sledování specifické lýze nádorových buněk jak bylo uvedeno v popisu k obr. 3 v poměru E:T= 4:1 s YAC-1 buňkami a 16:1 s buňkami P815. Tyto poměry byly vybrány ve vztahu k cytolytické křivce u obr. 3d- za účelem maximalizace zviditelnění zvýšeného zabíjení obojích NK-senzitivních YAC-1 a rezistentních P815 buněk.

Výsledky v a- jsou průměry duplikátů s odchylkami vyjádřenými úsečkami a výsledky v b- a c- průměry triplikátů se standardními odchylkami. V a- a b- spontánní uvolnění ^{51}Cr nádorovými buňkami exponovanými glykosylhydrolázám a v c-, exponovanými liposomům - bylo nižší než 5 % v nepřítomnosti efektorových buněk.

Pro identifikaci komponent nádorových buněk, které se váží k ^{125}I -sNKR-P1, byly alikvoty membránových preparací (Robinson P. J., Immunological Methods. Vol. III (eds. Lefkovitz 1., Pernis B.) 125-132 (1979)) považeny ve vzorkovém pufru (Laemmli. Nature 227, 680-685 (1970)), rozpuštěny v opakujících se liniích 3 až 7 % gradientu SDS-polyakrylamidového gelu (30 g membránových proteinů na linii) a elektropřeneseny z gelů na nitrocelulóзовé membrány (0,45 m, BioRad Laboratories, Hercules, CA), nastříhány na proužky. Jeden proužek byl obarven na proteiny (AuroDye, Amersham, UK). Ostatní proužky byly blokovány v 10 mM CaCl_2 , 5 % BSA a 0,1 % Tween 20 a inkubovány při 20 °C 1 h pouze s blokovacím činidlem, nebo sialidázou 10 U/ml nebo heparináзой 1100 U/ml nebo chondroitinázou ABC 1 U/ml v 0,01 M fosfátovém pufru pH 6, 5, promyty a vazba ^{125}I -sNKR-P1 byla určena za podmínek uvedených u obr. 2a.

Po lipidové extrakci (Ebel F. et al., Biochemistry 31, 12190-12197 (1992)) plasmatických membrán, byly extrakty odsoleny na Sep-Pak Vac C18 patronách (Millipore, Bedford, MA) a rozpuštěny v tenké vrstvě chromatograficky v chloroform/metanol/ 0,5 % chlorid vápenatý, 55/10 (v/v) užitím 4 g extraktu pro linii. Lipidy byly vizualizovány barvením primulinem (Stoll M. S. et al., Biochem. J. 256, 661-664 (1988)) a vazba ^{125}I -sNKR-P1 určena autoradiograficky podle popisu obr. 1a. Vázané komponenty byly analyzovány přímo na chromatogramech pomocí hmotové spektrometrie kapalných sekundárních iontů (Feizi T. et al., Meth. Enzymol. 230, 484-

519 (1993)). GD1B lakton byl chemicky syntetizován (nepublikováno), syntetický GD1A lakton nebyl vhodný.

Diskuse k práci s NKR-P1:

- 5 Výsledky ukazují za prvé, že membránově asociovaný NKR-P1 na buňkách NK je klíčový efektor, jehož interakce se sacharidovými ligandy na nádorových buňkách vede k aktivaci zabíječské buňky, což vede k zabíjení cílové buňky a za druhé, že sialylové a glykosaminoglykanové typy sekvencí tvoří přirozené ligandy NK-vnímavých nádorových buněk.
- 10 Úloha NKR-P1 v zabíjecí kaskádě nemusí být prokázána ostatními, jsou-li podniknuty pokusy (Ryan J.C. et al., *Natural Immunity and Cell Growth Regulation* 11, 279 (1992)) blokovat zabíjení užitím monoklonální protilátky 3.2.3 specifické pro NKR-P1.

15 Z našich výsledků lze vyvodit závislosti na typu cílové buňky, odlišných tříd oligosacharidů: rodiny krevně skupinových, rodiny ganglio a glykosaminglykanů, které na cílových buňkách mohou představovat ligandy pro NKR-P1.

Mnohotvárná specifita oligosacharidů, znak sdílený ostatními endogenními lektiny (Feizi T. et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 701-710 (1993)) (často se překrývající ve vazebných specifitách) je mimořádně vyjádřen v případě NKR-P1. Extenzivní křížové reakce zjištěné u NKR-P1 mohou být výsledkem vysoce afinitních CRD tohoto proteinu pro kalcium a sacharidy jak bylo již dříve ukázáno (Bezouška K. et al., *J. Biol. Chem.* 269, 16945-16952 (1994)). Výsledky ukazují, že nejvyšší afinity jsou namířeny proti kyselým oligosacharidům chondroitin sulfátu, heparinů a keratan sulfátů (mezi sacharidy doposud sledovanými).

25 Mnohé z látek zde identifikovaných jako NKR-P1 ligandy, například GM2 a heparin, inhibují přirozené zabíjení jak bylo již dříve ukázáno (Ando I. et al., *Ing. J. Cancer* 40, 12-17 (1987), Grayson G. et al., *Cell. Immunol.* 139, 18-29 (1992), Yamamoto H. et al., *Cell. Immunol.* 96, 409-417 (1985)). Vnímavost lidské leukémie, buněk lymfomů, k NK lými může být korelována s expresí GM2 (Young W. M. et al., *J. Immunol.* 126, 1-6 (1981)). V souladu se zjištěními zde v potkaním NK systému při použití strukturně definovaných oligosacharidů, jiné výsledky (Yamamoto H. et al., *Cell. Immunol.* 96, 409-417 (1985)) ukazují v myším systému na inhibiční aktivitu heparinu v korelaci s jeho negativním nábojem (tj. stupněm sulfatace). Žádného inhibičního účinku nebylo dosaženo s chondroitin sulfáty A, B, a C (glykosaminglykanový zdroj a cílové buňky nespecifikovány).

Výsledky nabízejí vysvětlení pro zjištění (Forbes J. T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5797-5801 (1981), Chambers W. H. et al., *J. Immunol.* 137, 1469-1474 (1986)), že přirozené zabíjení je inhibovatelné v přítomnosti mannosu-6-fosfátu (a hexosu-6-fosfátů) - fenomén, pro který v pozdějším výzkumu (Haubeck H. D. et al., *J. Immunol.* 134, 65-69 (1985), von Figura K. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 55, 167-193 (1986)) bylo prokázáno, že se netýká mannosu-6-fosfátového receptoru. Z pohledu, že byla nalezena afinita NKR-P1 pro mannosu-6-fosforylované oligosacharidy, bylo by zajímavé zkoumat, zdali tento protein má úlohu ve spouštění mannosu-6-fosforylovaných lysozomálních enzymů přítomných uvnitř granulí NK buněk (von Figura K. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 55, 167-193 (1986)), a odeslání hydrolytických enzymů k cílovým buňkám v zabíjecích procesech.

Mnohé NKR-P1 ligandy identifikované v tomto vynálezu byly detekovány imunochemicky na povrchu NK buněk. Ty zahrnují asialo GM1 (GA1) u myší (Young W. W. et al., *J. Immunol.* 124, 199-201 (1980)), a HNK-1 (Chou D.K.H. et al., *J. Biol. Chem.* 261, 11717-11725 (1986)) a sialyl-Le^x (Ohmori K. et al., *Blood* 74, 255-261 (1989)) u lidí. Tyto antigeny nepatří mezi ty s nejvyšší aktivitou ligandů pro NKR-P1 (Obr. 1c). Vedle toho existuje důkaz, že část ligandů na povrchu NK buněk zůstává v kryptickém stavu během sacharidy inhibovatelných interakcí

s endogenně membránově asociovanými komponentami. Tyto skutečnosti mohou sloužit k ochraně NK buněk před autolýzou.

Různé účinky exogenně použitých monomerních (volných) a sdružených oligosacharidových ligandů na aktivaci NK buněk mohou mít zvláštní význam v řídicích mechanismech cytolytické kaskády a naznačit nové imunomodulační léky. Monomerní oligosacharidové ligandy nejen že soutěží o vazbu s NKR-P1, ale také inhibují NK buněčnou aktivaci, která je vyvolávána cílovými buňkami a sdruženými oligosacharidovými ligandy. Naproti tomu, sdružené, na lipid vázané oligosacharidové ligandy na liposomech mohou sloužit jako "návnada", která napodobuje cílové buňky a má schopnost hustotně závislé aktivace NK buněk: zvyšující se hladina cytoplasmatického Ca^{2+} je zjištěna se vzrůstající hustotou až ke kritické hustotní hladině, na které Ca^{2+} hladina je nižší.

Z pohledu výzkumu léčiv je patrné, že silný negativní nebo pozitivní dopad na cytolytický proces může být jednoduše uskutečněn volnými nebo na lipid vázanými formami heparin-disacharidu který postrádá (Kjellen L. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 60, 443-475 (1991)) antikoagulační aktivitu. Ukázka, že NK-rezistentní nádorové buňky mohou být udržovány vnímavé po předlčení sdruženými NKR-P1 ligandy na liposomech, nabízí velmi silnou terapeutickou možnost k napadení vybraných buněk.

20 Modulace buněčné aktivity CD69

K zahájení ligand-identifikační studie byla připravena rozpustná dimerická forma CD69 proteinu (zde označena jako sCD69). Byla získána expresí jeho extracelulární části v *Escherichia coli*. Počáteční studie ukazují, že protein je neobyčejně svázán s kalcium, znakem společným s NKR-P1 a že sacharidová vazebná afinita proteinu je spojena s N-acetyl-D-glukosaminem a N-acetyl-D-galaktosaminem jako silnými monosacharidovými inhibitory.

Příklad 8

30 Produkce rozpustné formy CD69 v *E. coli*

Byly připraveny tři proteiny obsahující extracelulární části CD69 antigenu: CDA-401 zahrnující extracelulární část minus dvě aminokyseliny začínající glycinem 64, CD-411 je zkrácen a cystein 68 je nahrazen argininem, CD-421 skládající se z lektinové domény.

Korespondující DNA fragmenty byly přeneseny do pMALc2 expresního vektoru po směru od EcoRI místa. EcoRI spoj byl použit z důvodu korekce čtecího rámce, a expresní plazmidy byly sekvenovány z dvouřetězcových templatů užitím pMAL primeru a TaqTrack sekvenačního protokolu (Promega, Madison, USA).

Rozpustné CD69 proteiny byly exprimovány jako fúzní proteiny s bakteriálním maltózu-vázajícím proteinem v *E. coli* kmene NM a štěpeny faktorem Xa. Po štěpení a purifikaci za denaturačních podmínek, rozpustné CD69 proteiny byly renaturovány podle CD69 epitopů rozpoznávaných dvěma monoklonálními protilátkami. 10 cyklů Edmanovy degradace bylo připraveno s naštěpenými proteiny k určení přítomnosti aminokyselin (4 až 5 aminokyselin z expresního vektoru bylo přítomno).

Rekombinantní rozpustný CD69 byl užit v pokusech zde popsanych jako CDA-401 a byl čištěn gelovou filtrací na Sephacryl S-200 SF koloně, koncentrován na 10 mg/ml a skladován při 4 °C v Tris-ústojném roztoku (TBS) obsahujícím 10 mM $CaCl_2$ a 1 mM NaN_3 .

Příklad 9

Ligandy CD69

5 Pilotní vazebné pokusy byly prováděny s rozpustnou molekulou sCD69 značenou radioiodinací a několika na lipid vázanými oligosacharidy (neoglykolipidy), které též obsahovaly monosacharidy N-acetylglukosamin a N-acetylgalaktosamin, o nichž bylo ukázáno, že tvoří strukturu rozpoznávanou tímto proteinem.

10 Trisacharid DLNN obsahující terminální N-acetylglukosamin (sekvence oligosacharidů jsou uvedeny v tabulce 2) byl vázán s hodnotou signálu jasně nad úroveň pozadí v množství 300 pmol na jamku (Obr. 7). Vazba na tuto sekvenci byla porušena v přítomnosti terminálně navázané beta 1-3 galaktózy, jak je patrné u LNT. Ani disacharid laktóza nebyl vázán (výsledek není ukázán), avšak silná vazba byla pozorována u 6'-sialyl analogu 6SL, nikoliv však u 3'-sialyl analogu, 3SL, což ukazuje na specifickou vazbu kyseliny N-acetylneuraminové s vazbou alfa 2-6.

15 Tento závěr byl až překvapivě potvrzen vazebnými pokusy s disacharidem SN, který obsahuje N-acetylneuraminovou kyselinu vázanou právě vazbou alfa 2-6 na N-acetylgalaktosamin. Vazebný signál pro SN v množství 1 pmol na jamku byl ekvivalentní signálu 300 pmol DLNN, která obsahuje nesubstituovaný terminální N-acetylgalaktosamin. Přídavná vazba 6-O-substituovaného sulfátu molekulou CD69 byla prokázána ve vazebných studiích s použitím disacharidu z chondroitin sulfátu 6S, který obsahuje 6-O sulfatovaný glukosamin, a dva další sulfáty 2-O-substituující uronovou kyselinu a N-substituující glukosamin.

25 Pro získání představy o relativních aktivitách oligosacharidů s rozličným způsobem sialylace a sulfatace, série volných oligosacharidů byla zkoumána jako inhibitory vazby s CD69.

30 Počáteční pokusy ukázaly, že inhibiční aktivita (vyjádřená například jako koncentrace inhibitoru nezbytná pro dosažení 50 % inhibice, IC_{50}) závisí na síle vazby imobilizovaným ligandem: přibližně desetkrát vyšší koncentrace sacharidových inhibitorů jsou nezbytné, jestliže se jako imobilizovaný ligand použije neoglykolipid odvozený od disacharidu heparinu IS ve srovnání s neutrálním neoglykoproteinem $GIcNAc_{23}$ -BSA, který sloužil jako imobilizovaný ligand v počátcích našich studií. V případě, že se buď tento neoglykoprotein nebo IS neoglykolipid (tabulka 2) použijí jako imobilizované ligandy, hodnoty IC_{50} pro N-acetylgalaktosamin jsou 8×10^{-5} M resp. 2×10^{-4} M a pro N-acetylglukosamin 4×10^{-5} M resp. 1×10^{-4} M.

35 V předkládané studii byly inhibiční pokusy prováděny s disacharidem IS odvozeným od glykosaminoglykanů jako s imobilizovaným ligandem. Výsledky získané s rozsáhlým panelem strukturně definovaných oligosacharidů budou popsány na jiném místě. Výsledky s vybranými sloučeninami jak jsou uvedeny v malém panelu obrázku 7 a v tabulce 2 ukazují jasně na existenci určitých ligandů s extrémně vysokou afinitou ve formě sekvencí O-glykosidového, N-glykosidového a glykosaminoglykanového typu.

40 Inhibiční data se souborem oligosacharidů 1 (tabulka 2) opět ukazují maskující vliv galaktózy vázané vazbou beta 1-3 po jejím přidání k sekvenci DLNN, jako je tomu u LNT, což vyústí v desetinásobné snížení inhibiční aktivity, z IC_{50} 2×10^{-5} M na 3×10^{-4} M. 6-O-substituce terminálního N-acetylglukosaminu sulfátem, jak je tomu u disacharidu odvozeného z keratan sulfátu K6 ovšem vyústila až ve stotisícinásobný vzrůst inhibiční aktivity (IC_{50} 8×10^{-11} M) ve srovnání s DLNN.

50 Výsledky dosažené se souborem oligosacharidů 2 zdůrazňují přednostní rozpoznání kyseliny N-acetylneuraminové vázané vazbou alfa 2-6 na galaktózu oproti 2-3 analogu.

V tomto případě je 6SL více než desetisíckrát účinnější inhibitor vazby sCD69 oproti 3SL (IC_{50} 7×10^{-9} M, resp. 3×10^{-4} M).

5 Soubor oligosacharidů 3 ilustruje možnosti N-glykosidicky vázaných oligosacharidů odvozených od glykoproteinů jako ligandů pro CD69 protein. Biantennární oligosacharid N2 obsahující dva terminální N-acetylglukosaminové zbytky (IC_{50} 10^{-9} M) je téměř desetisíckrát účinnějším inhibitorem než monomerní DLNN. Také zde vyúští přítomnost terminálních galaktóz na vnějších ramenech oligosacharidu (látka G2, IC_{50} 5×10^{-4} M) v dramatickou, více než tisícínásobnou, ztrátu inhibiční aktivity, zatímco přítomnost kyseliny N-acetylneuraminové vázané vazbou alfa 2-6, jako je tomu u látky SN (IC_{50} 2×10^{-11} M) zvyšuje inhibiční aktivitu téměř desetmilionkrát oproti sloučenině G2.

15 Soubor oligosacharidů 4 ilustruje rozpoznání oligosacharidů O-glykosidického typu proteinem CD69. V tomto případě, na rozdíl od souborů 1 a 2, je zřejmé, že substituce N-acetylgalaktosaminového jádra pomocí beta 1-3 vázané galaktózy jako v disacharidu T zvyšuje inhibiční aktivitu asi stonásobně ve srovnání s nesubstituovaným N-acetylgalaktosaminem. IC_{50} 3×10^{-6} M, resp. 2×10^{-4} M. Potencující vliv kyseliny sialové vázané vazbou alfa 2-6 na monosacharid jádra je zřetelnější v nepřítomnosti galaktózy, jelikož disacharid SN (IC_{50} 6×10^{-12} M) je téměř stonásobně aktivnější inhibitor než trisacharid ST (IC_{50} 3×10^{-10} M). Jestliže tedy srovnáme 20 inhibiční účinnost disacharidu SN s nesubstituovaným monosacharidem, dospíváme k neobyčejnému, asi stomilionnásobnému zvýšení biologické aktivity.

Soubor 5, který se skládá ze sacharidů chondroitin sulfátového a heparinového typu ukazuje, že 25 substituce N-acetylhexosaminů kyselinou uronovou v nepřítomnosti sulfatace, jako u látek OS a IVA, má za následek téměř tisícínásobné zvýšení inhibiční aktivity ve srovnání s nesubstituovanými monosacharidy (IC_{50} 2×10^{-7} M, resp. 5×10^{-7} M). Je také zřejmé, že 6-O-sulfatovaná forma monosacharidu N-acetylglukosaminu NS (IC_{50} 4×10^{-8} M), ačkoliv je téměř tisíckrát aktivnější než nesubstituovaná forma, je stále ještě téměř desetisíckrát méně účinná než 6'-sialyl analog SN (viz. Soubor 4). Výsledky ukázané v tabulce 2 a další výsledky, které budou 30 popsány na jiném místě, ukazují, že 2-sulfatace kyselin uronových, 4-O-sulfatace N-acetylgalaktosaminu nebo N-sulfatace glukosaminu má za následek relativně malé zvýšení inhibičních aktivit vůči sCD69.

35 Bovinní submaxilární mucin, který je bohatý na shluky O-glykosidicky vázaných disacharidů NeuAc-alfa2-6-GalNAc (SN), je účinným inhibitorem vazby sCD69, IC_{50} 10 pg/ml. Komerčně dostupné glykosaminoglykany, heparin, chondroitin sulfáty A, B a C, které se skládají z lineárních oligosacharidových řetězců s průměrnou molekulovou hmotností v rozsahu 1-2 kDa jsou méně aktivní při vztažení na jednotku hmotnosti. IC_{50} 1, 7, 2 a 20 ng/ml, zatímco preparát peptidoglykanu keratan sulfátu byl ještě méně aktivní, při koncentraci 100 ng/ml bylo dosaženo pouze 40 20 % inhibice. Z těchto výsledků a dalších pozorování, které budou uvedeny na jiném místě, vyvozujeme, že rozpoznávací elementy, které jsou sdružené nebo lokalizované v terminálních polohách, spíše než takové, které jsou lokalizovány interně uvnitř lineárních oligosacharidových řetězců, jsou vázány proteinem CD69.

45 Obrázek 7 ukazuje radiovazebné a inhibiční experimenty ukazující vysokou afinitu sCD69 proteinu pro sialylované a sulfatované oligosacharidy.

Hlavní panel ukazuje vazbu 125 I-sCD69 na lipidově vázané oligosacharidy (neoglykolipidy) 50 imobilizované v plastických jamkách. Neoglykolipidy byly sériově ředěny v methanolu obsahujícím nosičové lipidy cholesterol a vaječný lecithin (4 μ g obou látek na 1 ml), aplikovány do jamek, a vysušené při 37 °C. Jamky byly promyty, blokovány v přítomnosti 5 % bovinního sérového albuminu, a inkubovány 2 hodiny při 20 °C s 125 I-sCD69. Poté byly jamky promyty a

proměřeny. Ukázané výsledky jsou průměrem duplikátních specifických impulsů (po odečtení pozadí v jamkách bez obsahu neoglykolipidů).

5 Vložený panel ukazuje inhibici vazby sCD69 na neoglykolipid IS (aplikováno 60 pmol na jamku) v přítomnosti vybraných sacharidů. Výsledky jsou průměry duplikátních stanovení s vyznačenou směrodatnou odchylkou.

Příklad 10

Přirozené zabíjení zahrnuje interakci CD69 se sacharidem

10

Z důvodu strukturní příbuznosti molekuly CD69 s několika dalšími proteiny asociovanými s buňkami NK, a též pro blízkou genovou příbuznost genu pro CD69 s geny pro několik jiných proteinů buněk NK (Testi et al., *Immunology Today* 15, 479-783 (1994), Ziegler et al., *J. Immunol.* 152, 1228-1236 (1994)), jsme zkoumali, zda může být CD69 důležitý pro přirozené zabíjení.

15

Byla pozorována vazba ^{125}I -sCD69 na buněčné linie MOLT4, K562, U937 a Daudi, o nichž je známo, že jsou citlivé na zabíjení buňkami NK, velice malá vazba proteinu byla pozorována na NK-rezistentní buněčné linie KG1, IM9, RAJI a THP-1 (Obr. 8a). Byla pozorována pozoruhodná korelace mezi pořadím vazebných aktivit, a stupněm citlivosti těchto buněčných linií vůči NK zabíjení (Obr. 8b, c).

20

Kromě toho bylo zabíjení inhibovatelné nejen neznačeným sCD69 (IC_{50} činily $1,5 \times 10^{-9}$, $2,5 \times 10^{-10}$, $1,3 \times 10^{-9}$ a 1×10^{-10} M u buněk MOLT-4, K562, U937 a Daudi), ale též disacharidovým ligandem, SN (IC_{50} bylo pro výše uvedené linie $1,5 \times 10^{-6}$, $1,2 \times 10^{-7}$, $1,2 \times 10^{-8}$ a 1×10^{-6} M). Zabíjení buněk K562 bylo zcela inhibováno, zatímco u buněk MOLT-4, U937 a Daudi byla maximální dosažitelná inhibice kolem 80 %.

25

Tyto výsledky jasně ukazují na důležitost proteinu CD69 pro přirozené zabíjení, a navrhují, že interakce receptoru CD69 s cílovými buňkami může být sacharidově závislá.

30

Obrázek 8 ukazuje radiovazebné a cytotoxické pokusy poukazující na intimní zapojení proteinu CD69 do cytolytické aktivity lidských buněk NK.

Vazba ^{125}I -sCD69 je ukázána na suspenzi kultivovaných leukemických buněčných linií jak je popsáno v "Experimentální části". Ukázané výsledky představují průměry duplikátních stanovení s ukázanou směrodatnou odchylkou.

35

Přirozené zabíjení kultivovaných buněčných linií. Cytotoxicity leukemických buněčných linií po působení PMBC byly stanoveny měřením uvolněného radioaktivního chromu ^{51}Cr s použitím různého poměru efektorových a cílových (E:T) buněk, jak je popsáno v "Experimentální části". Výsledky jsou vyjádřené jako průměry % specifické cytotoxicity vypočteného z triplikátních stanovení s ukázanou směrodatnou odchylkou.

40

Je ukázána korelace mezi vazbou ^{125}I -sCD69 na kultivované leukemické linie (údaje z panelu a) a cytotoxicitami těchto buněk dosaženými při E:T = 128:1 (údaje z panelu b).

45

(d) až (g) Koncentrační závislost aktivit sCD69 (plné trojúhelníky) a SN (prázdné trojúhelníky) jako inhibitorů přirozeného zabíjení čtyř buněčných linií citlivých na NK zabíjení podle metody popsané v "Experimentální části". Ukázané výsledky jsou průměry triplikátních stanovení s vyznačenou standardní odchylkou.

50

Příklad 11

Indukce exprese CD69 antigenu na CD56+ buňkách závislá na cílových buňkách a sacharidech

5 CD69 je exprimován na buněčném povrchu pouze u minoritní frakce nestimulovaných buněk NK (Lanier et al., J. Exp. Med. 169, 2233-2238 (1989)), proto byla monitorována exprese CD69 na těchto buňkách (s použitím CD56 antigenu jako markeru buněk NK) v průběhu čtyř hodin. Toto je časové období, během něhož jsou efektorové buňky inkubovány s cílovými buňkami v průběhu standardního krátkodobého testu NK zabíjení.

10 V nulovém čase méně než 20 % CD56+ buněk vykazovalo měřitelnou povrchovou expresi CD69 (obr. 9a). Avšak během 30 minut inkubace s NK-vnímavými buňkami K562 byla povrchová exprese CD69 zvýšena na 40 %, a během jedné až dvou hodin inkubace přes 50 % buněk s NK fenotypem (CD56+ buňky) vykazovalo pozitivní expresi CD69 antigenu. Poté následoval jistý pokles povrchové exprese na asi 40 % po 4 hodinách, ačkoliv ještě nová vlna povrchové exprese
15 následovala při dlouhodobé stimulaci.

Rychlá indukce povrchové exprese antigenu CD69 závisela prokazatelně na cílových buňkách stejně jako na povrchových sacharidech, jelikož nebyla pozorována při použití NK-rezistentní buněčné linie RAJI, a indukce byla zcela inhibována při přidání ligandu molekuly CD69, oligo-
20 sacharidu SN, do inkubační směsi (Obr. 9a). Kromě toho liposomy obsahující na lipidy navázaný oligosacharid SN, se chovaly jako mimikry NK-vnímavých cílových buněk v tom, že také vyvolávaly povrchovou expresi CD69 se shodnou kinetikou (Obr. 9a). Také zde byla povrchová exprese odstraněna v přítomnosti volného sacharidového ligandu, a žádná indukce nebyla pozorována s liposomy obsahujícími irelevantní oligosacharid, laktózu. U CD3+ buněk nebyla zaznamenána žádná indukce povrchové exprese za podmínek NK stanovení (obr. 9b).
25

V dalším pokusu (Obr. 9c) v němž byly CD69⁺ buňky odstraněny na začátku pokusu, se projevil pouze nepatrný vzrůst povrchové exprese antigenu CD69 nad kontrolní hodnoty během prvních čtyř hodin inkubace. Teprve po 16 hodinách bylo více než 80 % CD56+ buněk pozitivních na
30 CD69. Ani tato zpožděná indukce CD69 neprobíhala v přítomnosti volného oligosacharidu SN. Tyto výsledky ukazují, že k počáteční rychlé indukci povrchové exprese antigenu CD69 dochází přednostně u těch buněk, které už exprimují alespoň minimální množství tohoto antigenu, ale po prodloužené inkubaci pravděpodobně nastává exprese nově syntetizovaného CD69 antigenu.

35 Obrázek 9 ukazuje, že povrchová exprese CD69 na lidských buňkách s fenotypem NK (CD56+ buňky) je rychle indukována při jejich inkubaci s NK-vnímavými cílovými buňkami nebo liposomy obsahujícími vysokoafinitní ligandy pro CD69 protein, a tyto procesy jsou inhibovány v přítomnosti volných oligosacharidových ligandů.

40 Lidské PBMC byly obohaceny o buňky NK na Percollově gradientu a inkubovány s NK-vnímavými buňkami K562 v přítomnosti nebo nepřítomnosti 10^{-5} M volného disacharidu SN, nebo spolu s SN liposomy v nepřítomnosti nebo v přítomnosti 10^{-5} M volného oligosacharidu, nebo s NK-rezistentními buňkami RAJI. Jako negativní kontrola byly buňky K562 inkubovány v samotném médiu. Povrchová exprese antigenu CD69 na CD56+ buňkách byla monitorována dvoubarevnou
45 průtokovou cytometrií jak je popsáno v experimentální části. Výsledky ukazují % ze všech PBMC, které byly dvakrát pozitivní (CD56⁺/CD69⁺).

Experiment podobný jako v bodu (a) byl uskutečněn s cílem sledovat % PBMC, které by byly CD3⁺/CD69⁺. V těchto pokusech byly použity buňky K562 v přítomnosti nebo nepřítomnosti
50 10^{-5} M disacharidu SN, nebo buňky RAJI. Nebyla pozorována žádná indukce exprese CD69 (jsou ukázány pouze výsledky s buňkami K562). Tyto výsledky jsou vyjádřeny jako % dvojitě pozitivních CD3⁺/CD69⁺ buněk. Jsou ukázány průměrné hodnoty triplikátních stanovení spolu se standardní odchylkou.

Byl proveden experiment podobný jako v případě (a), ale v tomto pokuse byly PBMC izolované na Ficoll-Isohpaque dále zbavovány CD69+ buněk pomocí protilátek a komplementu před inkubací s buňkami K562 v přítomnosti nebo nepřítomnosti 10^{-5} M disacharidu SN, nebo s buňkami RAJI, a byla analyzována exprese CD69 antigenu na CD56+ buňkách. Byla pozorována pouze velmi malá indukce CD69. Jsou ukázány výsledky s buňkami K562 v přítomnosti a nepřítomnosti disacharidu SN, výsledky s buňkami RAJI (nejsou ukázány) byly podobné jako s buňkami K562 v přítomnosti inhibujícího sacharidu. Výsledky jsou vyjádřeny jako % CD56+/CD69+ dvojitě pozitivních buněk z celkových PBMC (nepřerušovaná linie). Ukázány jsou průměrné hodnoty triplikátních analýz s vyznačenou standardní odchylkou.

Příklad 12

Udělení citlivosti na přirozené zabíjení pomocí na lipidy vázaných ligandů antigenu CD69

NK-rezistentní buněčné linie RAJI, IM9 a KG1 byly vystaveny po dobu jedné hodiny působení liposomů obsahujících různé koncentrace na lipidy navázaných ligandů proteinu CD69 SN a 6S, neoglykolipid laktózy byl použit jako negativní kontrola (Obr. 10b – d). Účinnost inkorporace neoglykolipidů asociovaných s liposomy byla asi 40 až 70 % u těchto různých buněčných linií (Obr. 10d, vložený panel).

V cytotoxických stanoveních byla úroveň specifické lýze dosažené při E:T = 16:1 zhruba 40 až 65 % při hustotě ligandu 20 nmol na 100 μ l liposomů, což snese srovnání s hodnotami dosaženými při E:T = 16:1 pro NK-vnímavé buněčné linie U937, K562 a MOLT-4, 45 až 75 % (srovnej obr. 8b). V přítomnosti liposomů obsahujících kontrolní neoglykolipid s laktózou nebyla cytolyza NK-rezistentních buněk ovlivněna. Liposomy s ligandy SN a 6S, ne však laktózové liposomy, též způsobily značné zvýšení cytotoxicity u NK-vnímavé buněčné linie MOLT-4: u těchto buněk byla při E:T = 1:1 zvýšena specifická cytotoxicita ze zhruba 30 na více než 70 %. U všech pěti zkoumaných buněčných linií byly liposomy obsahující disacharid SN vždy účinnější než 6S liposomy, což odpovídá aktivitě těchto látek jako ligandů CD69 (tabulka 2).

Obrázek 10 ukazuje možnost, jak učinit NK-rezistentní buněčné linie vnímavými vůči přirozenému zabíjení preinkubací s liposomy nesoucími oligosacharidové ligandy pro CD69.

NK-vnímavá buněčná linie MOLT 4 a (v panelech b až d) NK rezistentní buněčné linie RAJI, IM-9 a KG-1 byly značeny chrómem ^{51}Cr , a 10^4 buněk v 90 μ l média RPMI bylo smícháno s 10 μ l preparátu liposomů (obsahujících na lipidy vázané oligosacharidy v koncentraci 0,2 nebo 2 nebo 20 nmol na 100 μ l liposomů. Po 1 h inkubace při 37 °C byly přidány PBMC ve 150 μ l média RPMI při E:T = 1:1 (buňky MOLT-4) nebo 16:1 (jiné typy buněk), a cytotoxicita stanovená po 4 hodinách jak je uvedeno v experimentální části. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty triplikátních stanovení s uvedením standardní odchylky.

Obrázek 11 ukazuje kinetiku příjmu neoglykolipidů kultivovanými buněčnými liniemi.

Suspenze (5×10^4 buněk v 90 μ l média RPMI) NK-vnímavé buněčné linie MOLT-4 nebo NK-rezistentních linií RAJI, THP-1 a IM9 byly inkubovány s 10 μ l preparátu liposomů typu I (plné symboly) nebo typu II (prázdné symboly) obsahujícími ^3H -značený neoglykolipid laktózy (2×10^4 cpm) po uvedené dobu, a pohlčení na lipid vázaných oligosacharidů buňkami (vyjádřené jako % přidaných cpm) bylo stanoveno jak je uvedeno v experimentální sekci. Uvedené výsledky jsou průměrem duplikátních stanovení s uvedením rozptylu.

Ve zvláštním pokusu (který není ukázán) bylo pozorováno, že NK-vnímavost linie MOLT-4 a NK-rezistentních buněčných linií je ovlivněna pouze málo při použití liposomů typu II. Na roz-

díl od těchto linií inkorporují erytrocyty a normální lymfocyty cca. 40 %, resp. 25 % značeného, na lipid vázaného oligosacharidu při použití tohoto preparátu liposomů, avšak inkorporace je nepatrná u preparátu liposomů 1. Ve stanoveních přirozeného zabíjení s použitím ^{51}Cr značených červených krvinek a lymfocyt vykazovaly tyto specifickou lyzi při opracování liposomy typu II (ne však liposomy typu 1), která dosahovala 40 % a 50 % při E: T = 16:1.

Z těchto pokusů lze uzavřít, že pro různé cílové buňky může být nezbytné vyzkoušet liposomy s rozličným složením lipidů, aby bylo dosaženo optimalizace přenosu na lipid vázaného oligosacharidu. Podle výše uvedených výsledků by liposomy typu II neměly činit normální červené krvinky nebo lymfocyty více zranitelné pro přirozené zabíjení, a mohou tedy být užitečné za podmínek in vivo, kdy je žádoucí eliminovat abnormální buňky, například nádorové, leukemické nebo virově infikované.

Příklad 13

15 Stimulace apoptózy s použitím ligandů pro CD69

Aby se zjistilo, zda vazba CD69 antigenu na zabíječských buňkách na sacharidy cílových buněk způsobuje jejich apoptotické zabíjení, testy přirozeného zabíjení byly prováděny v nepřítomnosti Ca^{2+} a v přítomnosti $\text{Mg}^{2+}/\text{EGTA}$, čímž byla inhibována neapoptotická dráha přirozeného zabíjení závislá na kalcium za podmínek, o nichž je známo, že u lymfocytů umožňují apoptotické zabíjení.

Při poměru E:T = 32:1 byla přibližně polovina specifické cytotoxicity buněk MOLT-4 a U937 závislá na kalcium (Obr. 12a, b). Tato cytotoxicita byla pouze nepatrně ovlivněna opracováním těchto cílových buněk O-glykoproteinázou (výsledek není ukázán) nebo sialidázou NDV, ale byla snížena asi na polovinu po opracování sialidázou AU nebo N-glykanázou. Na kalcium nezávislá cytotoxicita není vůbec pozorována u NK-vnímavých buněk K562.

Pro další zkoumání apoptózy byly provedeny další pokusy s cytotoxicitou v $\text{Mg}^{2+}/\text{EGTA}$ (Obr. 12D) a další dva typy stanovení apoptózy s použitím průtokové cytometrie a elektroforózy DNA (panely E a F) v přítomnosti sCD69 nebo disacharidového ligandu pro CD69 (SN), nebo irelevantního oligosacharidu (laktózy).

Bylo pozorováno, že specifická cytotoxicita v $\text{Mg}^{2+}/\text{EGTA}$ u PBMC nebyla ovlivněna v přítomnosti laktózy, byla však snížena zhruba na polovinu v přítomnosti oligosacharidového ligandu SN nebo rozpustné molekuly CD69 (panel d).

Výsledky cytofluorometrických stanovení apoptotických buněk včetně inhibičního obrazu s oligosacharidovými ligandy, sCD69 a fragmentem protilátky souhlasily velice dobře s výsledky cytotoxických stanovení (panel e).

Tyto analýzy a analýzy fragmentace DNA (tvorba žebříčků) ustanovily existenci apoptotického zabíjení u NK-vnímavých buněčných linií, MOLT-4 a U937.

Obrázek 12 ukazuje, že apoptotické zabíjení NK-citlivých cílových linií závisí na interakcích CD69 se sacharidy.

(a) až (a) Přirozené zabíjení PBMC bylo stanoveno ve standardním médiu obsahujícím kalcium (tečkované linie) nebo v bezkalciovém médiu s obsahem $\text{Mg}^{2+}/\text{EGTA}$ umožňujícím apoptózu (nepřerušovaná linie) s použitím NK-vnímavých linií MOLT-4, U937 a K562. U buněk MOLT-4 a U937 byla provedena dodatečná stanovení v bezkalciovém médiu po opracování těchto buněk po dobu 30 minut při 37 °C sialidázou NDV nebo AU, N-glykanázou, popřípadě O-glykoproteinázou. Ve srovnávacím pokusu byly buňky inkubovány 30 minut při 37 °C v přítomnosti pufru bez

enzymu. Výsledky s buňkami opracovanými O-glykoproteinázou byly shodné s výsledky u neo-
pracovaných buněk. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty triplikátních stanovení
s vyznačenou směrodatnou odchylkou.

5 (d) až (f) Tři typy stanovení byly prováděny v médiu s $Mg^{2+}/EGTA$: v (d) jsou ukázány výsledky
čtyřhodinového stanovení uvolnění ^{51}Cr při E:T = 8:1 s použitím PBMC. V (e) jsou uvedeny
výsledky apoptotických stanovení cytofluorometrií, a v (f) apoptotické fragmentace DNA, při
nichž byly PBMC, které byly předtím obohaceny o buňky s NK fenotypem mnohastupňovou
10 metodou, sledovány při E:T = 1:1, jak je popsáno v experimentální části. Výsledky jsou ukázány
pro NK-vnímavé buněčné linie MOLT-4, U937 a K562, a pro NK rezistentní buněčné linie RAJI
(označená R), THP-1 (označená T) a IM-9 (označená I). Pro buňky MOLT-4 a U937 jsou
ukázány další výsledky pokusů, v nichž reakční směs obsahovala 10^{-5} M laktózu (označeno L)
nebo disacharid SN (S) nebo 10^{-8} M sCD69 (C). Linie označené (O) v panelech (d) a (e) ukazují
výsledky v nepřítomnosti inhibitorů.

15 V oddělených pokusech, jejichž výsledky nejsou zde ukázány, v nichž nebyly přidány efektorové
buňky, bylo procento nalezených apoptotických buněk menší než 5 % a tvorba žebříčků DNA
nebyla pozorována, výsledky s použitím směsi oligosacharidu SN a s CD69 byly podobné jako
v pokusech, v nichž byly tyto látky vyšetřovány odděleně. Výsledky v (d) až (e) jsou vyjádřené
20 jako průměry triplikátních stanovení s vyznačenou směrodatnou odchylkou.

Diskuse výsledků s CD69

Bylo zjištěno, že molekula CD69 na povrchu buněk NK je těsně zahrnuta v procesech spuštění
cytotoxických mechanismů, které závisí na vazbě oligosacharidových ligandů na povrchu cílo-
25 vých buněk touto molekulou. U dvou NK citlivých buněčných linií je značná část přirozeného
zabíjení apoptotická. Dalším novým principem zjištěným v našich pokusech je na sacharidech
závislá indukce exprese CD69 u buněk NK: jde o rychlou indukci s kinetikou charakteristickou
pro translokaci molekuly na buněčný povrch z intracelulárních zásob, následovaná druhou fází
indukce s kinetikou odpovídající nové proteinové syntéze.

30 Pozoruhodné zesílení vazby CD69 bylo pozorováno v případě, kdy byly monosacharidy
N-acetylgalaktosamin nebo N-acetylglukosamin substituovány alfa-2-6 vázanou kyselinou
N-acetylneuraminovou nebo 6-O-sulfátem, k dalšímu zesílení vazby docházelo v případě, kdy
byly 6'-sialyl nebo 6'-sulfo monosacharidy součástí oligosacharidů. Hodnota IC_{50} dosahovala až
35 6×10^{-12} M u disacharidu SN, který je O-glykosidicky vázán na protein, 2×10^{-11} M pro disacha-
rid odvozený od chondroitin sulfátu, a 8×10^{-11} M pro disacharid K6 nacházející se v keratan
sulfátovém proteoglykanu.

40 Stojí za povšimnutí, že 6-O-sulfatovaný analog N-acetylglaktosaminu se sekvencí K6 (o němž
předpokládáme, že by mohl být vysoko-afinitním ligandem pro CD69) byl pozorován v termi-
nální sekvenci vnějších řetězců N-glykosidicky vázaných oligosacharidů pituitárních hormonů a
dalších glykoproteinů.

45 Z výsledků uvedených v tabulce 2 (soubor oligosacharidů 2 a 3) a dalších výsledků, které budou
popsány na jiném místě, je zřejmé, že CD69 rozpoznává 6'-sialyl motiv sám o sobě, aniž musí
tento být nezbytně připojený na N-acetylhexosamin. Tento motiv se vyskytuje ve vnějších řetěz-
cích N-glykosidicky vázaných oligosacharidů připojených na galaktózu, u biantennárního řetězce
S2 byla zaznamenána hodnota IC_{50} 2×10^{-11} M. Přednostní rozpoznání 6'-sialyl oproti 3'-sialyl
50 motivu je v případě CD69 v příkrém kontrastu s pozorováními u NKR-P1 proteinu potkana, který
rozpoznává pouze 3'-sialyl motiv.

Způsob prezentace rozpoznávaných elementů na makromolekulárním nosiči může mít zásadní
vliv na jeho rozpoznání CD69. BSM, u něhož jsou krátké O-glykosidické sekvence SN uspořá-

dány ve formě shluků, je velmi silným inhibitorem vazby sCD69, IC_{50} 0,01 ng/ml. Na druhé straně jsou glykosaminoglykany heparan sulfát a chondroitin sulfát A, B a C o dva až tři řády horšími inhibitory i přesto, že disacharidické jednotky, z nichž jsou složeny, jsou ve formě volného oligosacharidu dobrým inhibitorem, a silná vazba se pozoruje v případě, kdy jsou tyto disacharidy sdružené. Extrémním příkladem je peptidoglykan keratan sulfát, který je bohatý na lineárně se opakující disacharidovou sekvenci K6. Hodnota IC_{50} pro volný disacharid je 8×10^{-11} M, a přesto je tato sekvence špatně rozpoznávána s CD69 v případě, kdy je součástí dlouhého oligosacharidu tohoto peptidoglykanu.

10 Experimentální přístupy používané při výzkumu CD69

Sacharidy, neoglykolipidy a jiné glykokonjugáty

Struktura a označení zkoumaných sacharidů je uvedena v tabulce 2.

15 Monosacharidy N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin a jejich 6-O-sulfatované formy byly od firmy Sigma, stejně jako disacharid laktóza (LAC), 3'-sialyllaktóza (3SL), 6'-sialyllaktóza (6SL), a disacharidy odvozené od chondroitin sulfátu OS, 6S a disacharidy odvozené od heparinu IVA, IIA a IS. Lakto-N-tetraóza (LNT) byla od firmy Dextra. Trisacharid DLNN byl připraven štěpením lakto-N-tetraózy beta-galaktosidázou (Bezouška K. et al., J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)). Disacharid K6 byl izolován z bovinního keratan sulfátu po působení endo-beta-galaktosidázou (Scudder P. et al., Eur. J. Biochem. 157, 365-373 (1986)), a O-glykosidové disacharidy SN a T byly připraveny z bovinního submaxilárního mucinu, popřípadě z glykoproteinu ovariálních cyst po nereduktivní beta-eliminaci (Yuen C. T. et al., J. Biol. Chem. 269, 1595-1598 (1994)). O-glykosidicky vázaný trisacharid 6ST je dar od Prof. Andre Lubineau. Biantennární N-glykosidické oligosacharidy N2 a G2 byly získány darem. S2 byl zakoupen u firmy Biocarb. Bovinní submaxilární mucin, heparin z prasečí intestinální mukózy, a chondroitin sulfát A a B (bovinní) a chondroitin sulfát C (žraloka) byly od firmy Sigma. Peptidoglykan keratan sulfát byl izolován z bovinní rohovky (Scudder P. et al., Eur. J. Biochem. 157, 365-373 (1986)).

30 Neoglykolipidy (oligosacharidy konjugované na aminofosfolipid L1-2-dihexadecyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin) byly připraveny z laktózy. DLNN, LNT, 3SL, 6SL, 6S a IS, a přečištěny jak bylo předešle popsáno, s použitím bezvodých podmínek pro derivatizaci laktózy, DLNN a LNT, a 5 % v/v vody pro další oligosacharidy.

35 Neoglykolipidy označené 3H byly připraveny substitucí 3H označeného kyanoborohydridu sodného (specifická aktivita $2,9 \times 10^{13}$ Bq/mol) za neaktivní ekvivalent. Po standardní době ohřevu byla víčka reakčních zkumavek (s výjimkou neutrálních oligosacharidů) odstraněna, aby bylo umožněno odpaření na ohřívací plotně po dobu několika hodin pro zvýšení výtěžku neoglykolipidu. 3H -značené neoglykolipidy laktózy a SN byly izolovány s použitím sloupce s fenylborovou kyselinou, neoglykolipidy obsahující 6S a IS s použitím C18 kolony.

40 V některých pokusech byly neoglykolipidy inkorporovány do liposomů připravených z (a) cholesterolu a vaječného lecitinu, 50 nmol obou látek (Feizi et al., Biochem. J. 173, 245-254 (1978)), dále zde uváděné jako liposomy typu I, nebo (b) fosfatidylserinu a fosfatidylethanolaminu, 50 nmol obou (Correa-Freire et al., J. Immunol. 132, 69-75 (1984)), liposomy typu II, ve 45 100 μ l RPMI média. Oba typy liposomů byly připraveny sonikací v ultrazvukové vodní lázni (Feizi et al., Biochem. J. 173, 245-254 (1978)).

Glykosidázy

50 Sialidáza z *Arthrobacter ureofaciens* (AU), sialidáza z Newcastle virus disease (NVD), a endo-beta-galaktosidáza z *Bacteroides fragilis* byly od firmy Boehringer Mannheim. Heparináza I a chondroitináza ABC pocházely od firmy Sigma. O-glykoproteináza (Abdoullah K.M. et al., Infect. Immun. 60, 5662 (1992)) byla získána darem.

Protilátky

Protilátka proti alfa fetoproteinu (AFP-02) byla poskytnuta Dr. I. Hilgertem, ÚMG AV ČR Praha, a použita jako ascites (výpotek z dutiny břišní) po ředění 1:1000.

5

Protilátka proti CD69 označená FITC (Leu-23), protilátka proti CD56 označená PE (Leu-19), a protilátka proti CD3 (Leu-4) byly od firmy BectonDickinson, použity v ředění doporučeném výrobcem.

10 Buňky

Lidské mononukleární buňky periferní krve (PBMC) byly izolovány na gradientu Ficoll-Isopaque centrifugací heparinizované krve, červené krvinky byly odebrány ze sedimentu. V uvedených případech byly připraveny frakce obohacené o NK buňky a lymfocytární frakce centrifugací na diskontinuálním Percollově gradientu (Timonen T. et al., *J. Exp. Med.* 153, 569-582 (1981)) nebo po mnohastupňové proceduře v níž jsou nejprve monocyty odstraněny adhezí na plastické povrchy, poté jsou odstraněny B lymfocyty po průchodu suspenze nylonovou vatou, a CD3⁺ buňky jsou odstraněny imunomagnetickými částicemi (Borrego F. et al., *Eur. J. Immunol.* 23, 1039-1043 (1993)). Lidské leukemické linie MOLT-4, K562, U937, Daudi, RAJI, THP-1, IM9 a KG-1 byly získány z Evropské sbírky tkáňových kultur (ETCC) (UK) a kultivovány za standardních podmínek v kompletním médiu RPMI s výjimkou buněk KG-1, které byly kultivovány v Iscove DMEM s 20 % (v/v) fetálním sérem.

15

20

Před opracováním glykosidázami bylo 10⁶ kultivovaných buněk promyto a resuspendováno v 50 μl 10 mM fosfátového pufru pH 6,5 s 0,15 M NaCl, a smícháno s 50 μl tohoto pufru obsahujícího 50 mU AU sialidázy, nebo 100 U N-glykanázy, nebo množství O-glykoproteinázy schopné rozštěpit 80 μg glykoforinu A za 1 h (Abdollah K. M. et al., *Infect. Immun.* 60, 56-62 (1992)), nebo 50 mU chondroitinázy ABC. V kontrolních vzorcích byl přidán enzym po povaření 5 min při 100 °C. Po 30 min inkubace při 37 °C, buňky byly promyty třikrát kompletním médiem RPMI.

25

Pro opracování liposomy (Bezouška et al., *Nature* 372, 150-157 (1994)), kultivované buňky byly značeny ⁵¹Cr, a 10⁴ buněk v 90 μl kompletního RPMI bylo smícháno s 10 μl preparátu liposomů s uvedenou koncentrací neoglykolipidu, a inkubovány 1 hodinu při 37 °C.

30

Pro stanovení kinetiky inkorporace neoglykolipidů buňkami, 5 x 10⁴ buněk v 90 μl kompletního RPMI bylo smícháno s 10 μl preparátu liposomů obsahujícího ³H-značené neoglykolipidy, 0,2 nmol (2 x 10⁴ cpm) a inkubováno po uvedený časový úsek při 37 °C. Reakce byla ukončena ochlazením buněčné suspenze na ledu, buňky byly promyty ledovým médiem RPMI, a aktivita buněčného sedimentu získaného centrifugací při 500 g měřena kapalínovou scintilací. Radioaktivita v kontrolních zkumavkách (neobsahujících buňky) byla vždy méně než 0,1 % přidané radioaktivity.

35

40

Radiovazebná stanovení

Vazba sCD69 na neoglykolipidy, neoglykolipidy byly imobilizovány v 96 jamkových destičkách s plochým dnem (Immulon 1, Dynatech Inc.) v přítomnosti nosičových lipidů cholesterolu a vaječného lecithinu (Larkin M. et al., *J. Biol. Chem.* 267, 13661-13668 (1992), Yuen C.T. et al., *J. Biol. Chem.* 269, 1595-1598 (1994)), a vazba ¹²⁵I-sCD69 (10 x 10⁶ cpm/μg, 10⁵ cpm/jamku) byla stanovena jak bylo předešle popsáno (Bezouška et al., *J. Biol. Chem.* 269, 16945-16952 (1994)). Pro inhibiční experimenty, jamky byly pokryty aplikací 32 pmol/jamku neoglykolipidu IS, a vazba ¹²⁵I-sCD69 (10⁵ cpm/jamku) byla měřena v přítomnosti uvedené koncentrace oligosacharidu.

45

Vazba sCD69 na buňky, kultivované buňky byly promyty v médiu RPMI s 10 mM HEPES pH 7,4, resuspendovány v koncentraci 5 x 10⁶ buněk/ml, a vazba ¹²⁵I-sCD69 na 100 μl buněčné alikvoty byla měřena v 1,5 ml mikrozkuvkách jak bylo popsáno (Bezouška et al., *Nature* 372, 150-157

50

(1994)). Nespecifická vazba, stanovená v přítomnosti tisícinásobného nadbytku neznačeného proteinu, která vždy činila méně než jedno procento experimentální vazby, byla odečtena.

Stanovení cytotoxicity

5 Standardní čtyřhodinové stanovení cytotoxicity (Brunner K. et al., Immunology 14, 181-196 (1968)) bylo prováděno v destičkách s 96 jamkami se dnem ve tvaru V (Falcon) v kompletním médiu RPMI s použitím PBMC jako efektorových buněk, a ^{51}Cr -značených leukemických buněčných linií jako cílových buněk, celkový reakční objem byl 250 μl .

10 Čtyřhodinové stanovení cytotoxicity v nepřítomnosti extracelulárního kalcia (Kojima H. et al., Immunity 1, 357-364 (1994)) bylo prováděno v bezkalciovém médiu připraveném smícháním Ca^{2+} -deficientního Hankova pufráčního roztoku, který obsahoval 1 mM Mg^{2+} s dialyzovaným fetálním telecím sérem (10 %) a 0,1 mM EGTA (Mg^{2+} /EGTA médium).

15 Analýza změn v expresi CD69

PBMC obohacené o NK buňky centrifugací na Percoll gradientu, 10^5 buněk v 0,5 ml kompletního RPMI média, bylo smícháno s 10^5 cílových buněk nebo 100 μl suspenze liposomů v 0,5 ml média, s obsahem nebo bez obsahu oligosacharidových inhibitorů, a inkubovány při 37 °C.

20 Na konci zvolené inkubační periody byly buňky centrifugovány, a dále udržovány na ledové lázni v 10 mM PBS pH 7,4 s 5 % (v/v) BSA a 0,1 % NaN_3 (barvicí pufr). Buňky byly inkubovány s 1 mg/ml irelevantní monoklonální protilátky (proti alfa-fetoproteinu) v barvicím pufru 30 minut, následovala 30 minutová inkubace s FITC-anti-CD69 a PE-anti-CD56 protilátkami, nebo s FITC-anti CD69 a PE-anti-CD3 protilátkami, poté byly buňky promyty třikrát v barvicím pufru, a exprese povrchových antigenů byla určena průtokovou cytometrií (FACScan, Becton-Dickinson) vybavenou třibarevnou fluorescencí. Bylo proměřeno nejméně deset tisíc pozitivních buněk, a mrtvé buňky byly vyloučeny s použitím propidium jodidového barvení.

30 Výsledky byly vyjádřeny jako % buněk pozitivních na CD56 a CD3, nebo jako relativní fluorescence anti CD69 protilátky, nebo jako % dvojité pozitivních buněk.

35 V některých pokusech byly z efektorové buněčné populace nejprve odstraněny buňky s povrchovou expresí CD69 inkubací se saturující koncentrací monoklonální protilátky BL-FB/81 a komplementem po dobu 1 hodiny (Correa-Freire M. C. et al., J. Immunol. 132, 69-75 (1984)), mrtvé buňky byly odstraněny po centrifugaci na Ficoll-Isopaque gradientu, a zbývající buňky promyty třikrát v kompletním RPMI.

Stanovení apoptózy průtokovou cytometrií

40 Neznačené cílové buňky v přítomnosti nebo v nepřítomnosti různých inhibitorů byly smíchány za podmínek identických s podmínkami na kalcium nezávislého cytotoxického stanovení. PBMC byly obohaceny mnohastupňovou metodou, celkový reakční objem byl 250 μl . Na konci čtyřhodinové inkubační periody byly buňky centrifugovány, a fragmentace DNA byla vizualizována (Sgonc R. et al., Trends. Genet. 10, 41-42 (1994)) pomocí terminální deoxynukleotidyl transferázy značící místa fragmentace DNA v jádře, a FACS analýzou.

45 Pět tisíc pozitivních buněk bylo proměřeno v jednom pokusu, všechny buňky s relativní fluorescencí FITC-dUTP větší než 10^2 byly vyhodnoceny jako apoptotické, a výsledek vyjadřován jako procento apoptotických buněk.

50 Analýza fragmentace DNA

Pro detekci apoptotické fragmentace DNA (tvorba žebříčků), 5×10^5 cílových buněk v 0,4 ml Mg^{2+} /EGTA média bylo smícháno se stejným objemem PBMC, které byly izolovány mnohastupňovou metodou pro obohacení o buňky NK (0,4 ml), a 200 μ l média obsahujícího různé inhibitory, nebo média bez inhibitorů, a inkubováno při 37 °C po dobu 4 hodin. Na konci tohoto inkubačního období byly buňky centrifugovány, resuspendovány v lyzačním pufru obsahujícím 10 mM Tris-HCl pH 7,0 s 10 mM EDTA, 0,2 % Tritonem X-100 a 0,1 μ g/ml proteinázy K. Byly připraveny vzorky buněčné DNA (Eischen C. M. et al., J. Immunol. 153, 1947-1954 (1994)), analyzovány elektroforézou v 1,2 % agarosovém gelu (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, eds. J. Sambrook. E. F. Fritsch and T. Maniatis. Col Spring Harbour Laboratory Press (1989)).

10

Monosacharidy a oligosacharidy zkoumané při sledování interakcí NKR-P1 (viz tabulka 1)

Ukázané sacharidy byly zkoumány jako neoglykolipidy, tj. oligosacharidy konjugované (Stoll M. S. et al., Biochem. J. 256, 661-664 (1988)) na aminolipid L-1, 2-dihexadecyl-*sn*-glycero-3-fosfoetanolamin, s výjimkou těch uvedených pod hlavičkou gangliosidy a sulfatované gangliosidy, které byly přirozenými glykolipidy, a látek 3SX5 a 6SX5 uvedených pod hlavičkou sialylované oligosacharidy 2. typu, které byly chemicky syntetizovanými glykosfingolipidy. Část těchto sacharidů (uvedená v obrázcích 2a a 2b) a mannos-6-fosfát byly též zkoumány jako volné sacharidy. Přesný popis sacharidů uvedených pod hlavičkami Neutrální, Sialylované, a Sulfatované (typu 1 a 2, z rodiny sacharidů krevních skupin) jsou uvedeny v citacích Bezouška K. et al., J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994), Gooi H.C. et al., J. Biol. Chem. 260, 13218-13222 (1985), Larkin M. et al., J. Biol. Chem. 267, 13661-13668 (1992), Yuen C.T. et al., J. Biol. Chem. 269, 1595-1598 (1994), s výjimkou látek 3SL a 6SL, které byly zakoupeny u firmy Sigma. Sacharidy uvedené pod hlavičkou Gangliosidy, Sulfatované gangliosidy, a Fosforylované sacharidy jsou uvedeny v citaci Loveless R. W. et al., EMBO J. 11, 813-819 (1992), s výjimkou volných oligosacharidů GM1 a GM2 (viz. Schwarzmann G. et al., Meth. Enzymol. 138, 319-341 (1987)). Tetrasacharid IS2 byl izolován z heparinu prasečího střeva (Sigma) po štěpení heparinázou I (EC 4.2.2.7., Sigma) po izolaci pomocí HPLC používající silný ionex. Disacharidy chondroitin sulfátu a heparinu byly zakoupeny od Dextra Laboratories.

Zkratky pro monosacharidy: Fuc, fukóza, Gal, galaktóza, GalNAc, N-acetylglaktosamin, Glc, glukóza, GlcN, glukosamin, GlcNAc, N-acetylglukosamin, GlcA, kyselina glukuronová, Man, mannóza, NeuAc, kyselina N-cetylneuraminová, UA, uronová kyselina (glukuronová nebo iduronová bez bližší specifikace), delta UA, 4,5-nesaturovaná kyselina uronová.

Monosacharidy a oligosacharidy zkoumané jako inhibitory vazby CD69 proteinu na IS neoglykolipid (viz tabulka 2)

Detailní popis mnoha těchto oligosacharidů lze nalézt v tabulce 1 (DLNN, LAC, 3SL, 6SL, disacharidy chondroitinsulfátu Chon O-S, 6-S (dva posledně jmenované vystupují pod zkratkou OS a 6S) disacharidy heparinu HEP IV-A, II-A a I-S (jsou zde zkráceny jako IVA, IIA a IS), monosacharidy N-acetylglukosamin, N-acetylglaktosamin (N) a jejich 6-O sulfatované formy (SC a NS) byly zakoupeny od firmy Sigma, stejně jako Chon 2, 6S a 2, 4, 6S. Lakto-N-tetraóza (LNT) byla od firmy Dextra. Trisacharid DLNN byl připraven z lakto-N-tetraosy štěpením beta-galaktosidázou (Bezouška et al., J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)). Disacharid K6 byl izolován z bovinního keratan sulfátu po působení endo-beta-galaktosidázou (Scudder P. et al., Eur. J. Biochem. 157, 365-373 (1986)), a O-glykosidické disacharidy SN a T byly izolovány z bovinního submaxilárního mucinu a z glykoproteinu ovariálních cyst nereductivní beta-eliminací (Yuen C.T. et al., J. Biol. Chem. 269, 1595-1598 (1994)). O-glykosidický trisacharid 6ST byl získán jako dar od Prof. Andre Lubineau. Biantennární oligosacharid N2 a G2 byly získány darem, S2 byl zakoupen u firmy Biocarb. Bovinní submaxilární mucin, heparin z prasečí intestinální mukózy, a chondroitin sulfáty A a B (bovinní) a C (ze žraloka) byly zakoupeny u firmy Sigma. Peptidoglykan keratan sulfátu byl izolován z hovězí rohovky (Scudder P. et al., Eur. J. Biochem. 157, 365-373 (1986)).

Tabulka 1: Sekvence monosacharidů a oligosacharadů studovaných ve volné formě nebo ve formě vázané na lipidy.

Název	Zkratka	Struktura
Neutrální typ 1		
Lakto-N-tetra	LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
H penta	H5	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 1,2 Fuca
Le ^a penta	LA5	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 1,4 Fuca
Le ^b hexa	LB6	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 1,2 1,4 Fuca Fuca
A hexa	A6	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 1,2 Fuca
A hepta	A7	GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 1,2 1,4 Fuca Fuca
Sialylovaný typ 1		
3'-sialyllakto-N-tetra	3SLT	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
6'-sialyllakto-N-tetra	6SLT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 2,6 NeuAc α
3'-sialyl Le ^a penta	3SA5	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 1,4 Fuca
Sulfatovaný typ 1		
3'-sulfatovaný Le ^a tri	SUA3	Gal β 1-3GlcNAc 3 1,4 HSO ₃ Fuca
3'-sulfatovaný Le ^a tetra (penta)	SUA4 (SUA5)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal(β 1-4Glc) 3 1,4 HSO ₃ Fuca
Neutrální typ 2		
Laktóza	LAC	Gal β 1-4Glc
Degalaktosylovaný lakto-N-neo-tetra	DLNN	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Lakto-N-neo-tetra	LNNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Le ^x tri (glukosyl)	LX3	Gal β 1-4Glc 1,3 Fuca

Le ^x penta	LX5	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 1,3 Fuca
Sialylovaný typ 2		
3'-sialyllaktóza	3SL	NeuAcα2-3Galβ1-4Glc
6'-sialyllaktóza	6SL	NeuAcα2-6Galβ1-4Glc
Sialyl Le ^x tri (glukosyl)	3SX3	NeuAcα2-3Galβ1-4Glc 1,3 Fuca
3'-sialyl Le ^x penta	3SX5	NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 1,3 Fuca
6'-sialyl Le ^x penta	6SX5	NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 1,3 Fuca
Sulfatovaný typ 2		
HNK-1	HNK1	GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 3 HSO ₃
3'-sulfatovaný Le ^x tri	SUX3	Galβ1-4GlcNAc 3 HSO ₃
3'-sulfatovaný Le ^x tetra	SUX4	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal 3 HSO ₃
Gangliosidy		
GM ₃	GM3	NeuAcα2-3Galβ1-4Glc
AsialoGM ₂	GA2	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc
GM ₂	GM2	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 2,3 NeuAcα
AsialoGM ₁	GA1	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc
GM ₁	GM1	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 2,3 NeuAcα
GD ₃	GD3	NeuAcα2-8NeuAcα2-3Galβ1-4Glc
GD ₂	GD2	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 2,3 NeuAcα2-8NeuAcα
GD _{1a}	GD1A	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 2,3 NeuAcα
GD _{1b}	GD1B	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 2,3 NeuAcα2-8NeuAcα

GT _{1a}	GT1A	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc 2,8 NeuAc α	 2,3 NeuAc α
GT _{1b}	GT1B	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc 2,3 NeuAc α 2-8NeuAc α	

Sulfatované glykolipidy

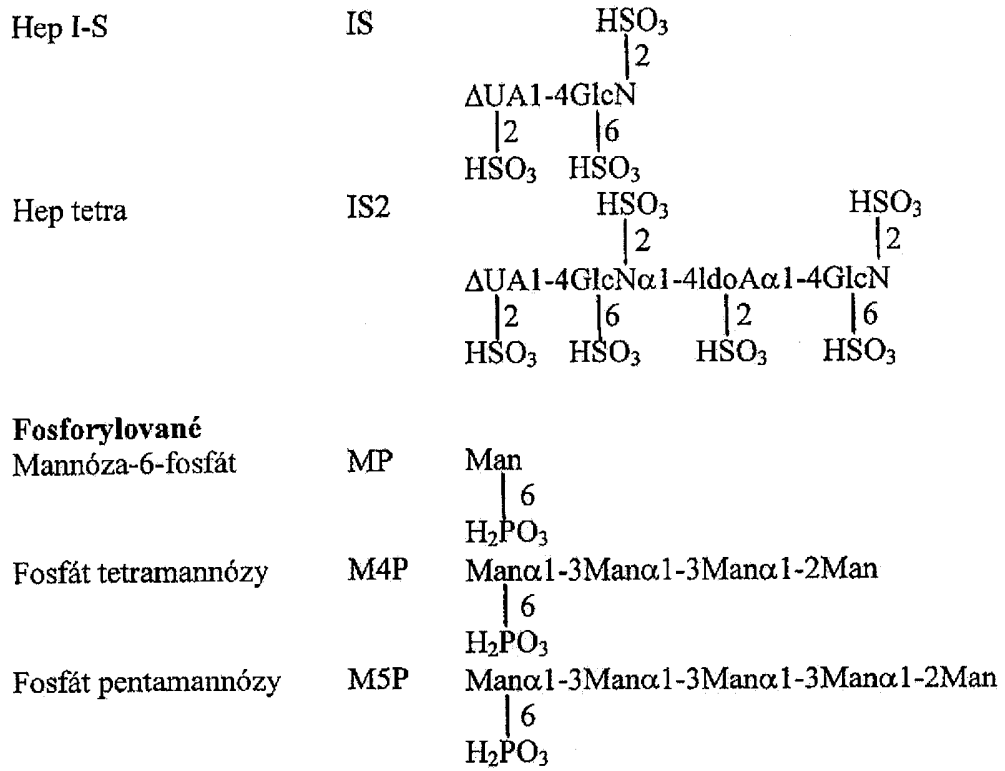
Sulfatid	SULF	Gal 3 HSO ₃	
SM3	SM3	Gal β 1-4Glc 3 HSO ₃	
SM2	SM2	GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc 3 HSO ₃	
SM1a	SM1A	Gal β 1-3GalNA β 1-4 Gal β 1-4Glc 3 HSO ₃	
SB2	SB2	GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc 3 HSO ₃	 3 HSO ₃
SB1a	SB1A	Gal β 1-3GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc 3 HSO ₃	 3 HSO ₃

Chondroitin sulfát

Chon O-S	OS	Δ UA1-3GalNAc
Chon 4-S	4S	Δ UA1-3GalNAc 4 HSO ₃
Chon 6-S	6S	Δ UA1-3GalNAc 6 HSO ₃

Heparin

Hep IV-A	IVA	Δ UA1-4GlcNAc
Hep III-A	IIIA	Δ UA1-4GlcNAc 2 HSO ₃
Hep II-A	IIA	Δ UA1-4GlcNAc 6 HSO ₃
Hep III-S	IIIS	HSO ₃ 2 Δ UA1-4GlcN 2 HSO ₃



Tabulka 2: Aktivita sacharidů jako inhibitorů vazby sCD69 k IS neoglykolipidu

Zkratka	Sekvence	IC ₅₀ (M)	
Soubor 1	C	GlcNAc	2×10^{-4}
	DLN	GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	2×10^{-5}
	LNT	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	3×10^{-4}
	SC	GlcNAc 6 HSO ₃	3×10^{-8}
	K6	GlcNAcβ1-3Gal 6 HSO ₃	8×10^{-11}
Soubor 2	LAC	Galβ1-4Glc	$> 10^{-3}$
	3SL	Galβ1-4Glc 2,3 NeuAcα	3×10^{-4}
	6SL	Galβ1-4Glc 2,6 NeuAcα	7×10^{-9}
	6SLN	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	2×10^{-9}
	Soubor 3	N2	GlcNAcβ1-2Manβ1-6 Manβ1-4 GlcNAcβ1-4GlcNAc
G2		GlcNAcβ1-2Manβ1-3 Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manβ1-6 Manβ1-4 GlcNAcβ1-4GlcNAc	5×10^{-4}
S2		Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manβ1-3 NeuAcα 2,6 Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manβ1-6 Manβ1-4 GlcNAcβ1-4GlcNAc	2×10^{-11}
S2		Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manβ1-3 2,3 NeuAcα	
Soubor 4	N	GalNAc	2×10^{-4}
	T	Galβ1-3GalNAc	3×10^{-6}
	SN	GalNAc 2,6 NeuAcα	6×10^{-12}
	6ST	Galβ1-3GalNAc 2,6 NeuAcα	3×10^{-10}
Soubor 5	NS	GalNAc 6 HSO ₃	4×10^{-8}
	OS	ΔUA1-3GalNAc	2×10^{-7}
	6S	ΔUA1-3GalNAc 6 HSO ₃	2×10^{-11}
	2,6S	ΔUA1-3GalNAc 2 6 HSO ₃ HSO ₃	1×10^{-11}

2,4,6S	$\begin{array}{c} \text{HSO}_3 \\ \\ \Delta\text{UA1-3GalNAc} \\ \quad \\ 2 \quad 6 \\ \text{HSO}_3 \quad \text{HSO}_3 \end{array}$	7×10^{-12}
IVA	$\begin{array}{c} \Delta\text{UA1-4GlcNAc} \\ \\ \Delta\text{UA1-4GlcNAc} \\ \\ 6 \\ \text{HSO}_3 \end{array}$	5×10^{-7}
IIA	$\begin{array}{c} \text{HSO}_3 \\ \\ \text{HSO}_3 \\ \\ 2 \\ \Delta\text{UA1-4GlcN} \\ \quad \\ 2 \quad 6 \\ \text{HSO}_3 \quad \text{HSO}_3 \end{array}$	7×10^{-12}
IS	$\begin{array}{c} \Delta\text{UA1-4GlcN} \\ \quad \\ 2 \quad 6 \\ \text{HSO}_3 \quad \text{HSO}_3 \end{array}$	2×10^{-10}

	IC_{50} (ng/ml)
Bovinní submaxilární mucin	0,01
Heparin	1
Chondroitin sulfát A	7
Chondroitin sulfát B	2
Chondroitin sulfát C	20
Keratan sulfát	> 100

5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmakologický přípravek, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako účinnou látku oligosacharid vybraný ze skupiny zahrnující oligosacharidy glykosaminoglykanů, sulfatované gangliosidy jiné než sulfatidy, 6-sialyl hexózy a 3-O-sulfatované kyseliny uronové.
2. Farmakologický přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že oligosacharidem je keratan sulfát, chondroitin sulfát nebo heparin sulfát.
3. Farmakologický přípravek podle nároků 1, **vyznačující se tím**, že oligosacharid je disacharidem nebo tetrasacharidem.
4. Farmakologický přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že oligosacharid je vybrán ze skupiny zahrnující K6, Chon OS, 6S, 2,6S, 2,4,6S, Hep IVA, IIA, IS, HNK-1, 6SN, 6S2, 6SLN, S2 a SN.
5. Farmakologický přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako účinnou látku oligosacharid, jenž je tvořen glykosylaminoglykanovými oligosacharidy, sulfatidem, sulfatovaným gangliosidem jiným než sulfatidem, 6-sialylhexózou nebo 3-O-sulfatovanou kyselinou uronovou, fosfátem tetramannózy, fosfátem pentamannózy, sialyl nebo sulfatyl- Le^a nebo Le^x, HNK-1, HNK-3-5-kyselinou uronovou.
6. Farmakologický přípravek podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že oligosacharid je vybrán z keratan sulfátů jako K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfátů, jako je ChonSO3 OS/6S, 2,6S, heparinových oligosacharidů jako je Hep IVA, IIA, IS a 12S.

7. Farmakologický přípravek podle nároků 1 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že oligosacharid je volný.

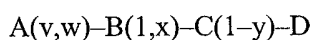
5 8. Farmakologický přípravek podle nároků 1 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monosacharid nebo oligosacharid je sdružený.

9. Farmakologický přípravek podle nároku 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monosacharid nebo oligosacharid je ligandem pro protein NKR-P1.

10

10. Farmakologický přípravek podle nároků 8 a 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monosacharid nebo oligosacharid je ligandem proteinu CD69.

15 11. Farmakologický přípravek podle nároku 9 nebo 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monosacharid nebo oligosacharid má následující strukturu:



kde:

20 A je vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, hexózy, kterou může být galaktóza nebo mannóza a může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, substituované sialové kyseliny, alifatického řetězce s jednou nebo více rozvětvenými skupinami, nasycené nebo nenasycené uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami. N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými částmi, a N-acetylgalaktózaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami,

25

30 B může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózy, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózou nebo fukózou, N-acetylgalaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, substituovaného alifatického řetězce, a oligosacharidového řetězce se 3 nebo 4 mannózovými zbytky,

35

C může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózy, glukózy, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, N-acetylgalaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, a alifatického řetězce, jenž může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami,

40

D může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z jednoho nebo více opakování B a/nebo C, zbývajících strukturních komponent N-glykosidicky vázaných bi- tri- nebo tetra-antenárních oligosacharidů, O-glykosidických oligosacharidů a glykosaminoglykanů a dalších sekvencí, které mohou sloužit k dodatečné vazbě nebo prezentaci ligandu a

v závorkách uvedená malá písmena představují pozice uhlíkové vazby u uvedených sacharidů, kde v = 1 nebo 2, w = 2, 3, 4 nebo 6, x = 2, 3 nebo 4, y = 2, 3, 4 nebo 6,

45

příčemž

když A je substituovaná sialová kyselina znamená to kyselinu sialovou substituovanou N-acetylem nebo O-acetylem,

50

když B nebo C jsou substituované alifatické řetězce znamená to alifatický řetězec substituovaný jedním nebo více substituenty vybranými ze skupiny obsahující hydroxyl, acetyl amin (NH.COCH_3) a nabitě skupiny,

a nabité skupiny mohou být vybrány ze skupiny sestávající ze sulfátů, fosfátů a karboxylů, jako jsou sialové kyseliny.

5 12. Farmakologický přípravek podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že monosacharidy nebo oligosacharidy jsou tvořeny α 2–3 vázanou kyselinou sialovou, 3–O–sulfátem, 3–O–sulfátovanou galaktózou, 3–, 4–, nebo 6–O–sulfátovaným N–acetylhexosaminem, N–sulfátovaným hexosaminem, kyselinou uronovou substituovanou N–acetylhexosaminem nebo hexosaminem, 2– nebo 3–O–sulfátovanou kyselinou uronovou, α 1–3 vázanou fukózou, α 1–4 vázanou fukózou, α 2–6 vázanou kyselinou sialovou, α 2–6 vázanou kyselinou sialovou na galaktóze nebo
10 N–acetylhexóze.

13. Farmakologický přípravek podle nároku 9 nebo 10, **vyznačující se tím**, že oligosacharid je vybrán ze skupiny zahrnující oligosacharidy glykosaminoglykanů, sulfatidy, sulfátované gangliosidy jiné než sulfatidy, 6–sialylovanou hexózu nebo 3–O–sulfátovanou kyselinu uronovou, fosfát tetramannózy, fosfát pentamannózy, sialylované nebo sulfátované Le^a nebo Le^x, HNK–1, HNK–3–5–uronovou kyselinu, keratan sulfáty jako K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfáty jako ChonSO₃ OS/6S, 2,6 S a 2,4,6 S, a oligosacharidy heparinu jako jsou HepIVA, IIA, IS a IS2.

20 14. Farmakologický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 7 až 10, **vyznačující se tím**, že monosacharid nebo oligosacharid je sdružován na liposomech.

15 15. Farmakologický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 8 až 13, **vyznačující se tím**, že monosacharid nebo oligosacharid je sdružován na sekvenci aminokyselin.

25 16. Farmakologický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje farmaceuticky přijatelný excipient nebo nosič.

30 17. Použití oligosacharidu, který je představován oligosacharidem glykosaminoglykanu, sulfátovaným gangliosidem jiným než sulfatidem, 6sialylovanou hexózu nebo 3–O–sulfátovanou kyselinou uronovou, pro výrobu farmakologického přípravku podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16 pro modulaci aktivity efektorové funkce imunitního systému.

35 18. Použití podle nároku 17, při němž je oligosacharidem keratan sulfát, chondroitin sulfát nebo heparin sulfát.

19. Použití podle nároků 17 a 18, při němž je oligosacharid disacharidem nebo tetrasacharidem.

40 20. Použití podle nároku 17, při němž je oligosacharid vybrán ze skupiny zahrnující K6, Chon OS, 6S, 2,6S, 2,4,6S, Hep IVA, IIA, IS, HNK–1, 6SN, 6S2, 6SLN, S2 a SN.

45 21. Použití podle nároku 17, kde oligosacharid je představován glykosaminoglykanovými oligosacharidy, sulfatidem, sulfátovaným gangliosidem jiným než sulfatidem, 6–sialyl hexózu nebo 3–O–sulfátovanou kyselinou uronovou, fosfátem tetramannózy, fosfátem pentamannózy, sialyl nebo sulfatyl– Le^a nebo Le^x, HNK–1, HNK–3–5–kyselinou uronovou, pro výrobu farmakologického přípravku určeného pro modulaci aktivity efektorové buňky, kterou je přirozená zabíječská buňka.

50 22. Použití podle nároku 21, při němž je oligosacharid vybrán z keratan sulfátů, jako je K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfátů jako je ChonSO₃ OS/6S, 2,6S, 2,4,6 S, oligosacharidů heparinu jako je Hep IVA, IIA, IS, IS2.

23. Použití podle nároku 22, při němž je oligosacharid volný.

24. Použití podle nároku 23, při němž je oligosacharid sdružený.

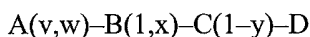
25. Použití sdružených monosacharidů nebo oligosacharidů při výrobě farmakologického přípravku podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16 pro zvýšení aktivity efektorových buněk imunitního systému.

26. Použití podle nároku 25, při němž je efektorovou buňkou přirozená zabíječská (NK) buňka.

27. Použití podle nároku 26, při němž je monosacharid nebo oligosacharid ligandem NKR-P1 proteinu.

28. Použití podle nároku 26 a nároku 27, při němž je monosacharid nebo oligosacharid ligandem CD69.

29. Použití podle nároku 27 nebo nároku 28, při němž má monosacharid nebo oligosacharid strukturu:



kde:

A je vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, hexózy, kterou může být galaktóza nebo mannóza a může, být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, substituované sialové kyseliny, alifatického řetězce s jednou nebo více rozvětvenými skupinami, nasycené nebo nenasycené uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými částmi, a N-acetylgalaktózaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami,

B může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózy, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózou nebo fukózou, N-acetyl-galaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, substituovaného alifatického řetězce, a oligosacharidového řetězce se 3 nebo 4 mannózovými zbytky,

C může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z uronové kyseliny, která může být substituována jednou nebo více nabitými skupinami, galaktózy, glukózy, N-acetylglukosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, N-acetylgalaktosaminu, který může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami, a alifatického řetězce, jenž může být substituován jednou nebo více nabitými skupinami,

D může chybět nebo být vybráno ze skupiny sestávající z jednoho nebo více opakování B a/nebo C, zbývajících strukturních komponent N-glykosidicky vázaných bi- tri- nebo tetra-antennárních oligosacharidů, O-glykosidických oligosacharidů a glykosaminoglykanů a dalších sekvencí, které mohou sloužit k dodatečné vazbě nebo prezentaci ligandu a

v závorkách uvedená malá písmena představují pozice uhlíkové vazby u uvedených sacharidů, kde $v = 1$ nebo 2 , $w = 2, 3, 4$ nebo 6 , $x = 2, 3$ nebo 4 , $y = 2, 3, 4$ nebo 6 ,

přičemž

když A je substituovaná sialová kyselina znamená to kyselinu sialovou substituovanou N-acetylem nebo O-acetylem,

když B nebo C jsou substituované alifatické řetězce znamená to alifatický řetězec substituovaný jedním nebo více substituenty vybranými ze skupiny obsahující hydroxyl, acetyl amin (NH.COCH_3) a nabitě skupiny,

a nabité skupiny mohou být vybrány ze skupiny sestávající ze sulfátů, fosfátů a karboxylů, jako jsou sialové kyseliny.

5 **30.** Použití podle nároku 29, při němž je monosacharid nebo oligosacharid tvořen α 2-3 vázanou kyselinou sialovou, 3-O-sulfátem, 3-O-sulfatovanou galaktózou, 3-, 4-, nebo 6-O-sulfatovaným N-acetylhexosaminem, N-sulfatovaným hexosaminem, kyselinou uronovou substituovanou N-acetylhexosaminem nebo hexosaminem, 2- nebo 3-O-sulfatovanou kyselinou uronovou, α 1-3 vázanou fukózou, α 1-4 vázanou fukózou, α 2-6 vázanou kyselinou sialovou, α 2-6 vázanou kyselinou sialovou na galaktóze nebo N-acetylhexóze.

15 **31.** Použití podle nároku 29 nebo nároku 30, při němž je oligosacharid vybrán ze skupiny zahrnující oligosacharidy glykosaminoglykanů, sulfatidy, sulfatované gangliosidy jiné než sulfatidy, 6-sialyl hexóza nebo 3-O-sulfatovaná kyselina uronová, fosfát tetramannózy, fosfát pentamannózy, sialylovaný nebo sulfatovaný Le^a nebo Le^x, HNK-1, HNK-3-5-uronovou kyselinou, keratan sulfáty jako K6, S2, SN, 6ST, chondroitin sulfáty jako ChonSO₃ OS/6S, 2,6 S a 2,4,6 S, a oligosacharidy heparinu jako jsou HepIVA, IIA, IS a IS2.

20 **32.** Použití podle kteréhokoliv z nároků 17 až 31, při němž je farmakologický přípravek určen pro opracování buněk, jejichž efektorová funkce je směřována na cílové buňky před opracováním cílových buněk efektorovými.

25 **33.** Použití podle nároku 32, při němž je uvedené působení farmakologického přípravku namířeno na cílové buňky.

34. Použití podle nároku 32, v němž je uvedené opracování efektorovými buňkami namířeno na buňky cílové.

30 **35.** Použití podle nároku 33 nebo nároku 34, v němž se využívá cílové směřování protilátky nebo jejího fragmentu schopného vázat antigen.

36. Použití podle kteréhokoliv z nároků 17 až 35, při němž je farmakologický přípravek určen pro opracování cílových buněk po opracování cílových buněk s uvedenými efektorovými buňkami.

35 **37.** Použití podle nároku 36, při němž je uvedené opracování farmakologickým přípravkem směřováno na cílové buňky.

38. Použití podle nároku 36, při němž je uvedené opracování buňkami imunitního systému směřováno na cílové buňky.

40 **39.** Použití podle nároku 37 nebo nároku 38, při němž směřování používá protilátky nebo jejího fragmentu schopného vázat antigen.

45 **40.** Použití podle kteréhokoliv z nároků 24 až 31, při němž jsou monosacharidy nebo oligosacharidy sdružovány na liposomech.

41. Použití podle nároku 40, při němž liposomy tvoří první člen specifického vazebného páru schopného vazby na komplementární druhý článek specifického vazebného páru.

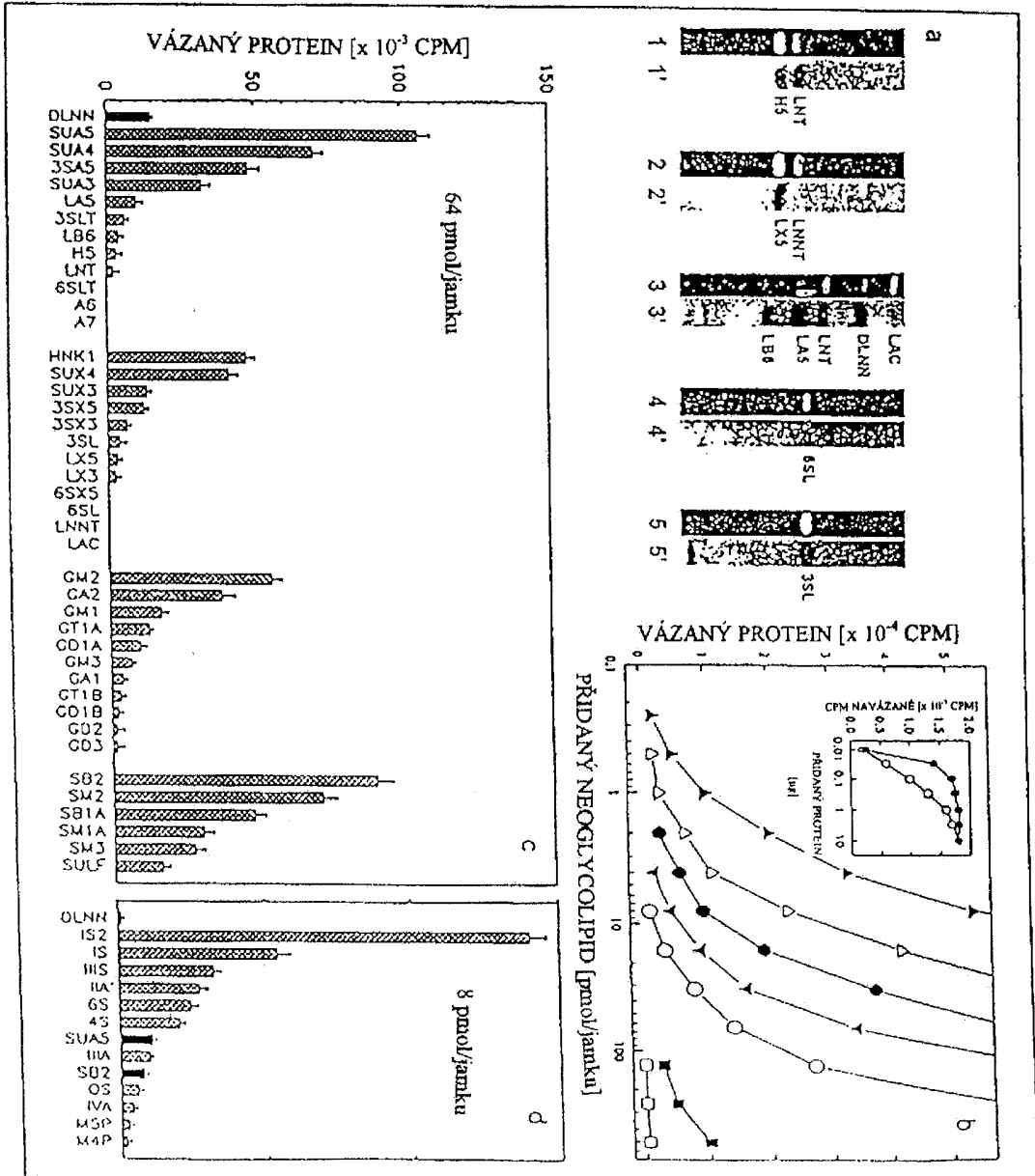
50 **42.** Použití podle nároku 41, při němž je druhý člen specifického vazebného páru na povrchu cílové buňky.

43. Použití podle nároku 41 a nároku 42, při němž je prvním členem specifického vazebného páru protilátka nebo její fragment schopný komplementární vazby druhého člena.
- 5 44. Použití podle kteréhokoliv z nároků 24 až 31, při němž je monosacharid nebo oligosacharid sdružován na sekvenci aminokyselin.
- 10 45. Použití podle nároku 44, při němž je sekvence aminokyselin součástí molekuly tvořící první člen specifického vazebného páru schopný komplementární vazby na druhý člen tohoto vazebného páru.
- 15 46. Použití podle nároku 45, při němž je druhý člen specifického vazebného páru na povrchu cílových buněk, vůči nimž je směřovaná efektorová funkce.
- 20 47. Použití podle nároku 45 nebo nároku 46, při němž je první člen specifického vazebného páru protilátkou nebo jejím fragmentem schopným komplementární vazby druhého člena specifického vazebného páru.
- 25 48. Použití podle kteréhokoliv z nároků 17 až 47, při němž je modulovanou aktivitou anti-proliferační aktivita, cytotoxicita a/nebo sekrece cytokinů.
- 30 49. Použití podle nároku 48, při němž je cytotoxicita tvořena stimulací apoptózy u cílových buněk.
- 35 50. Použití podle kteréhokoliv z nároků 17 až 49, při němž je efektorová funkce namířená vůči cílovým buňkám, které jsou buňkami nádorovými.

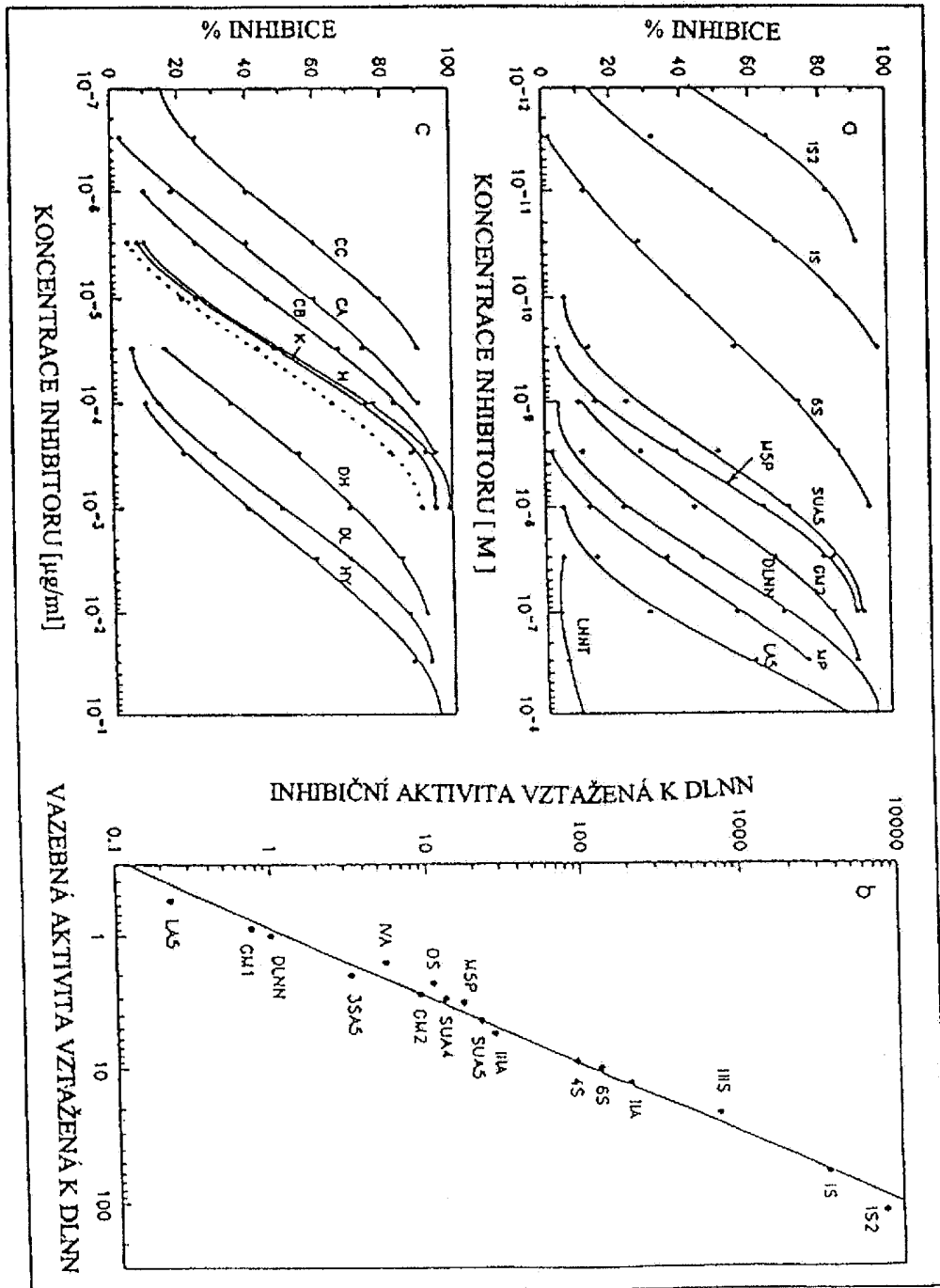
12 výkresů

30

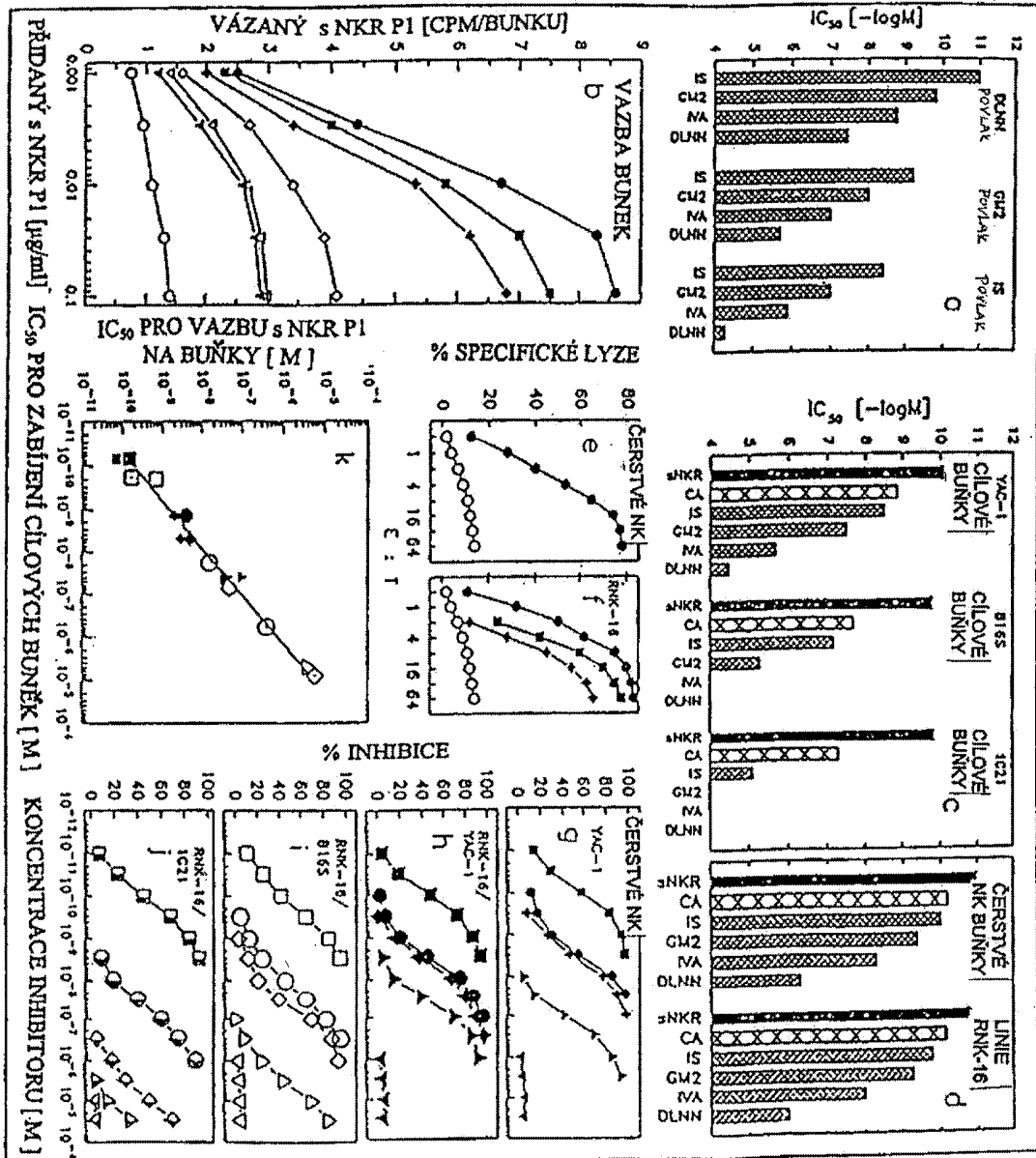
Obr. 1



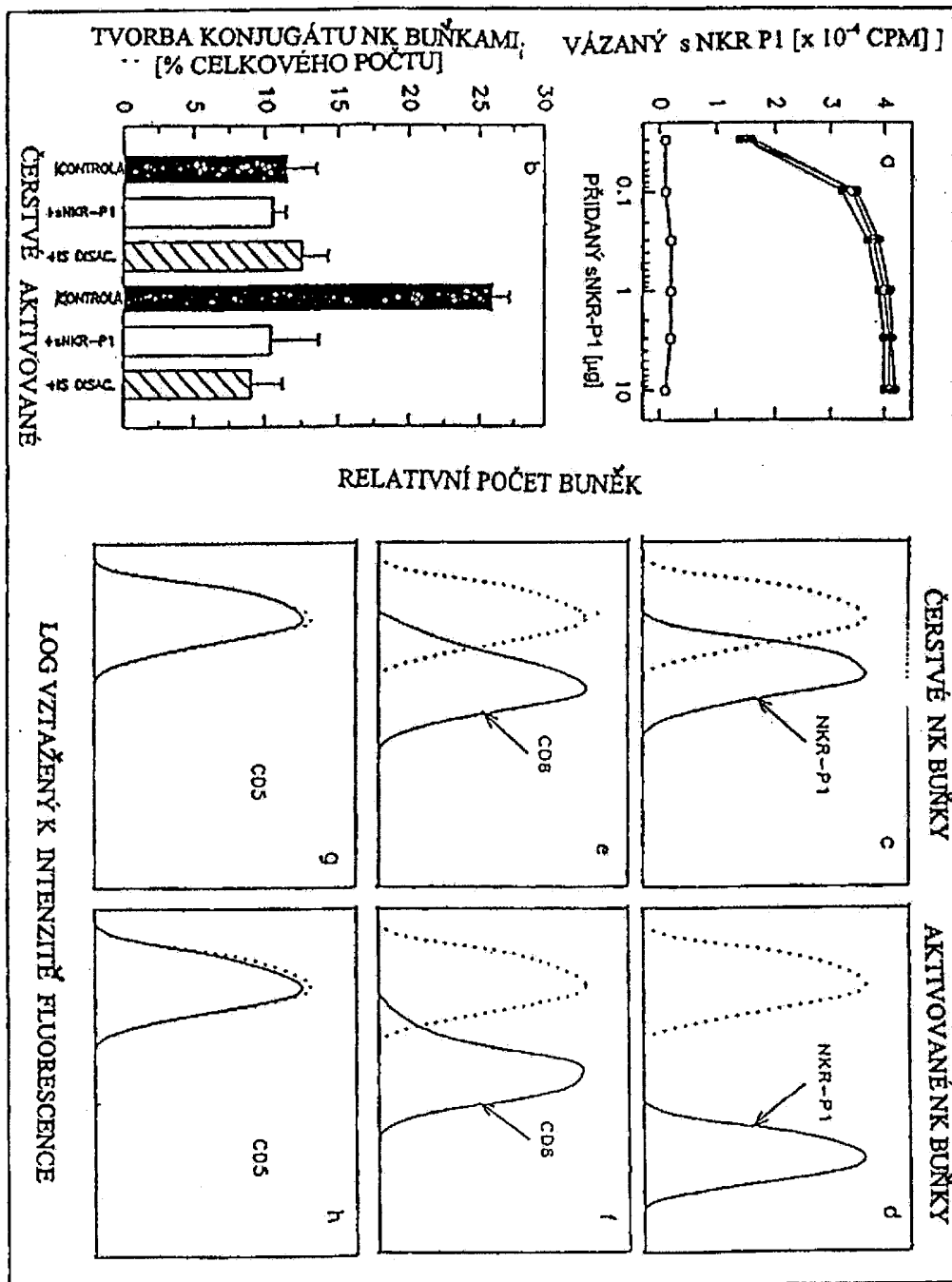
Obr. 2



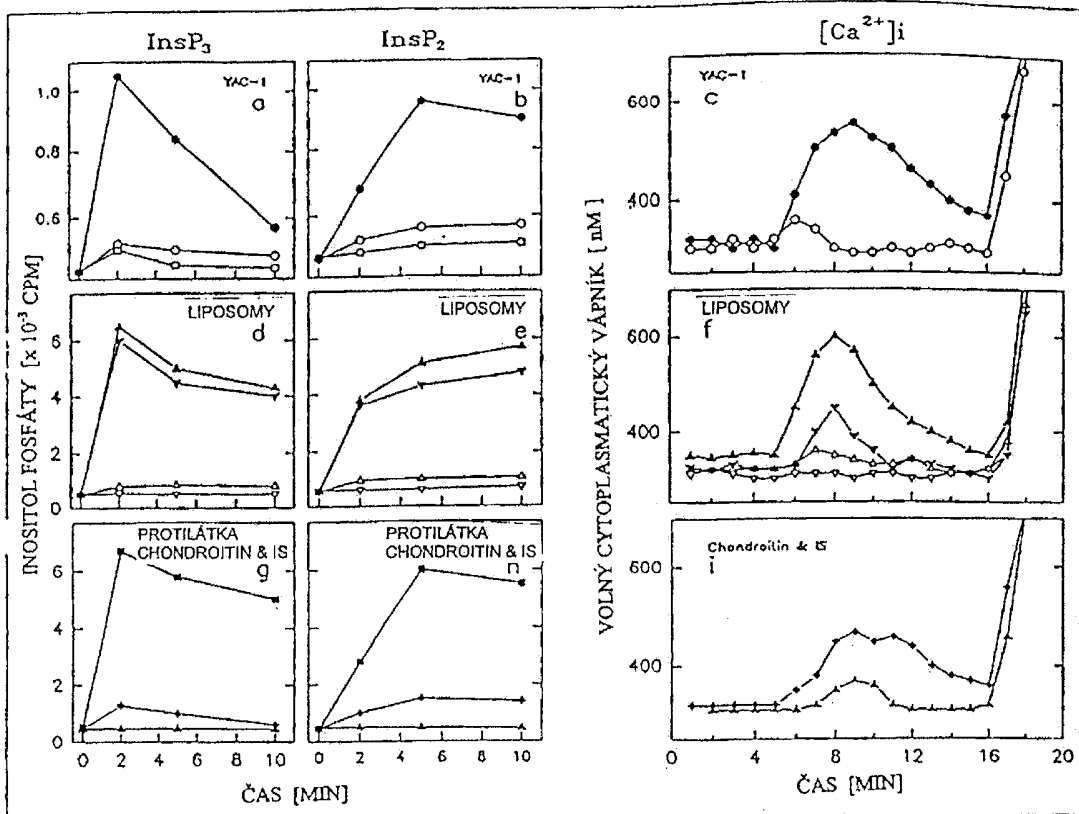
Obr. 3



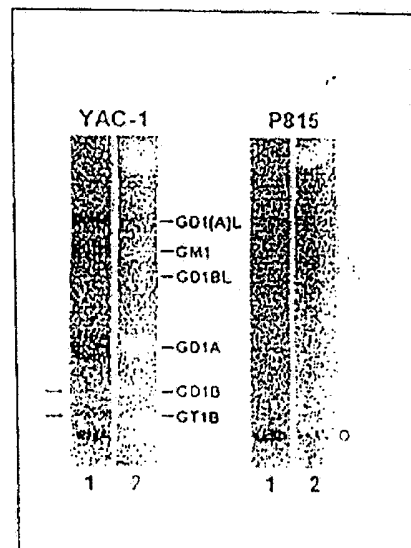
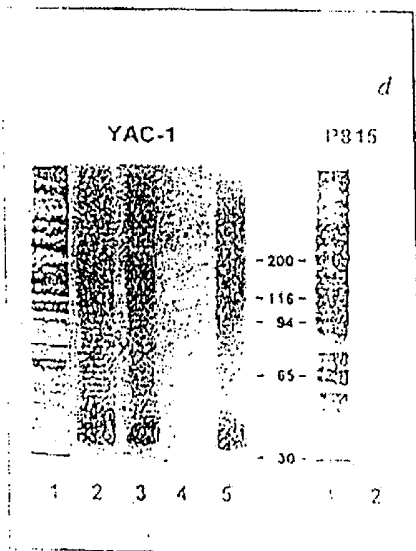
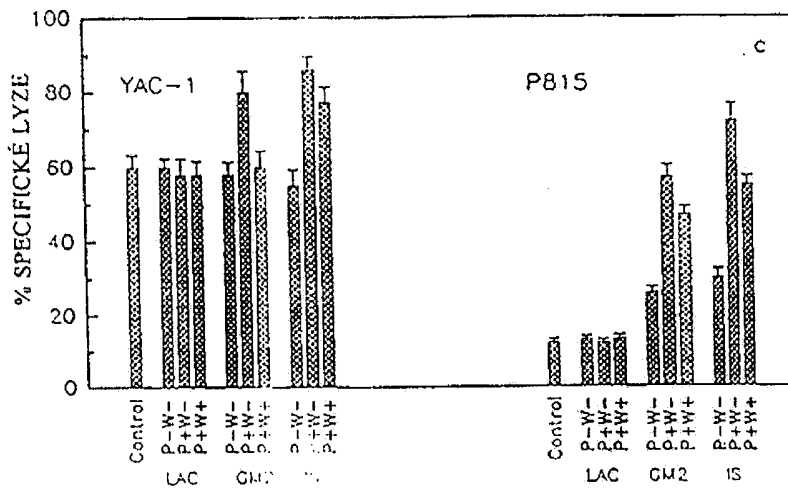
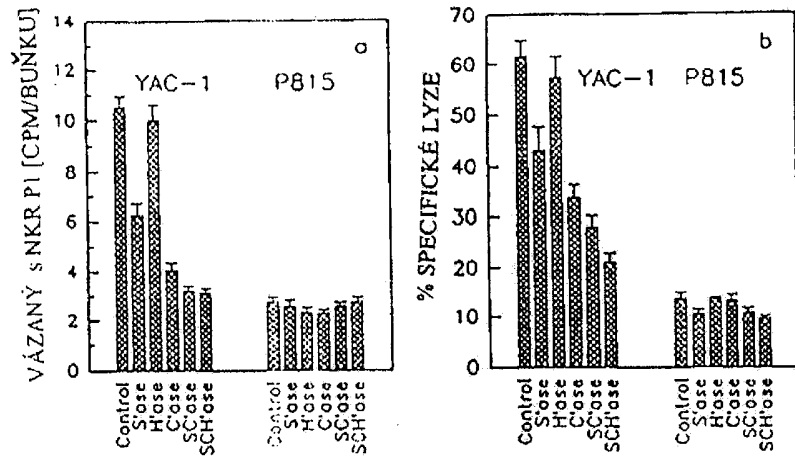
Obr. 4



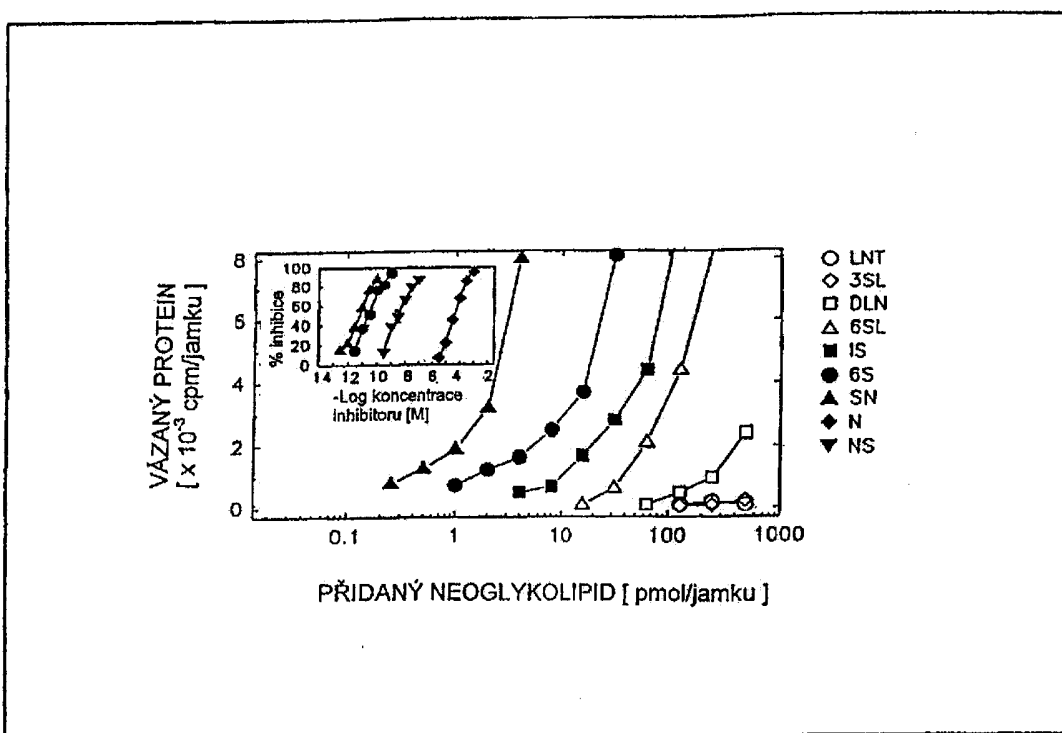
Obr. 5



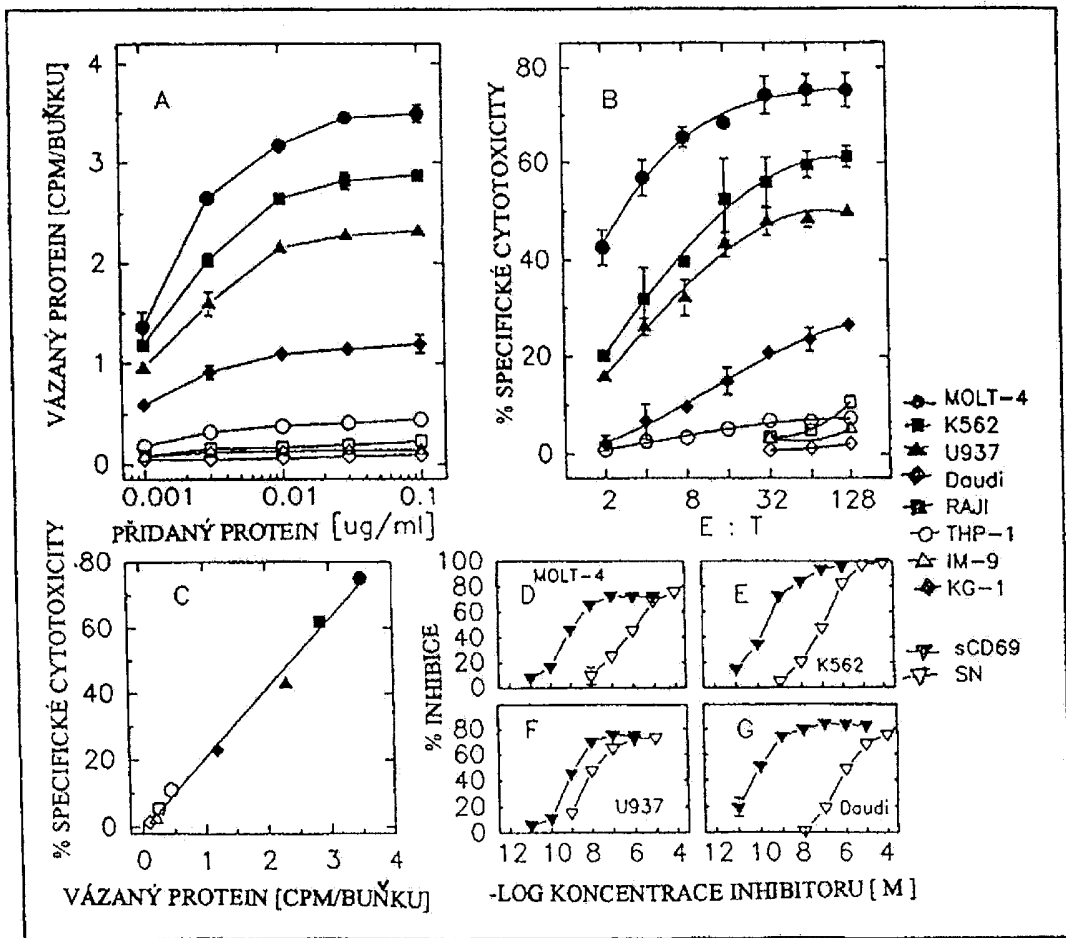
Obr. 6



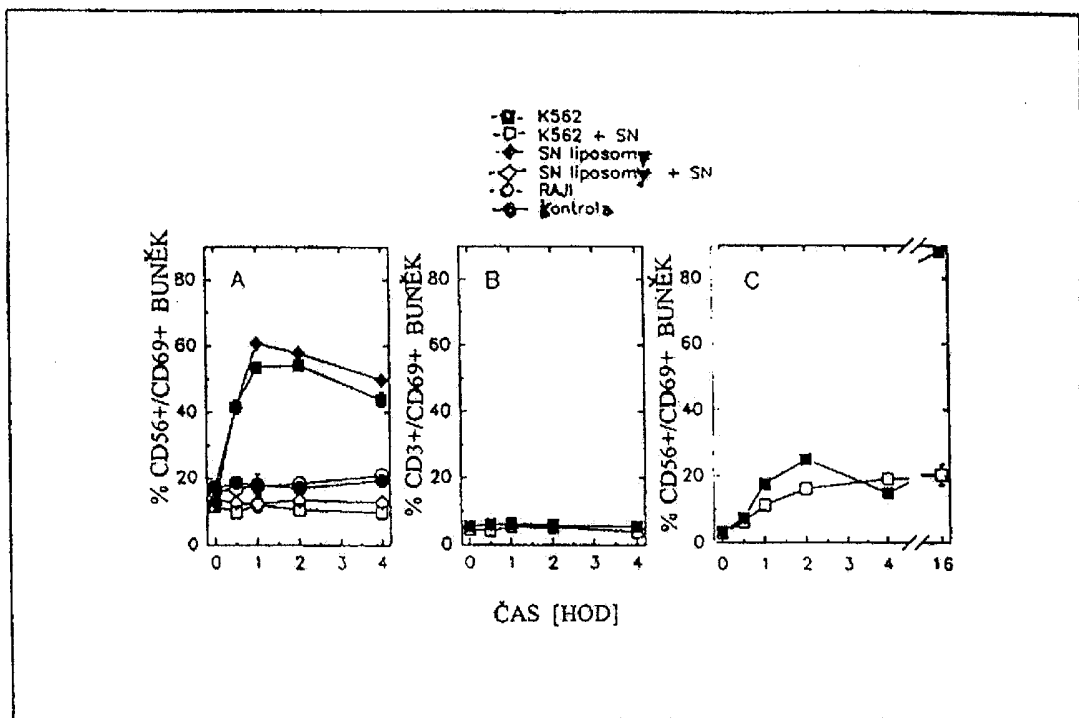
Obr. 7



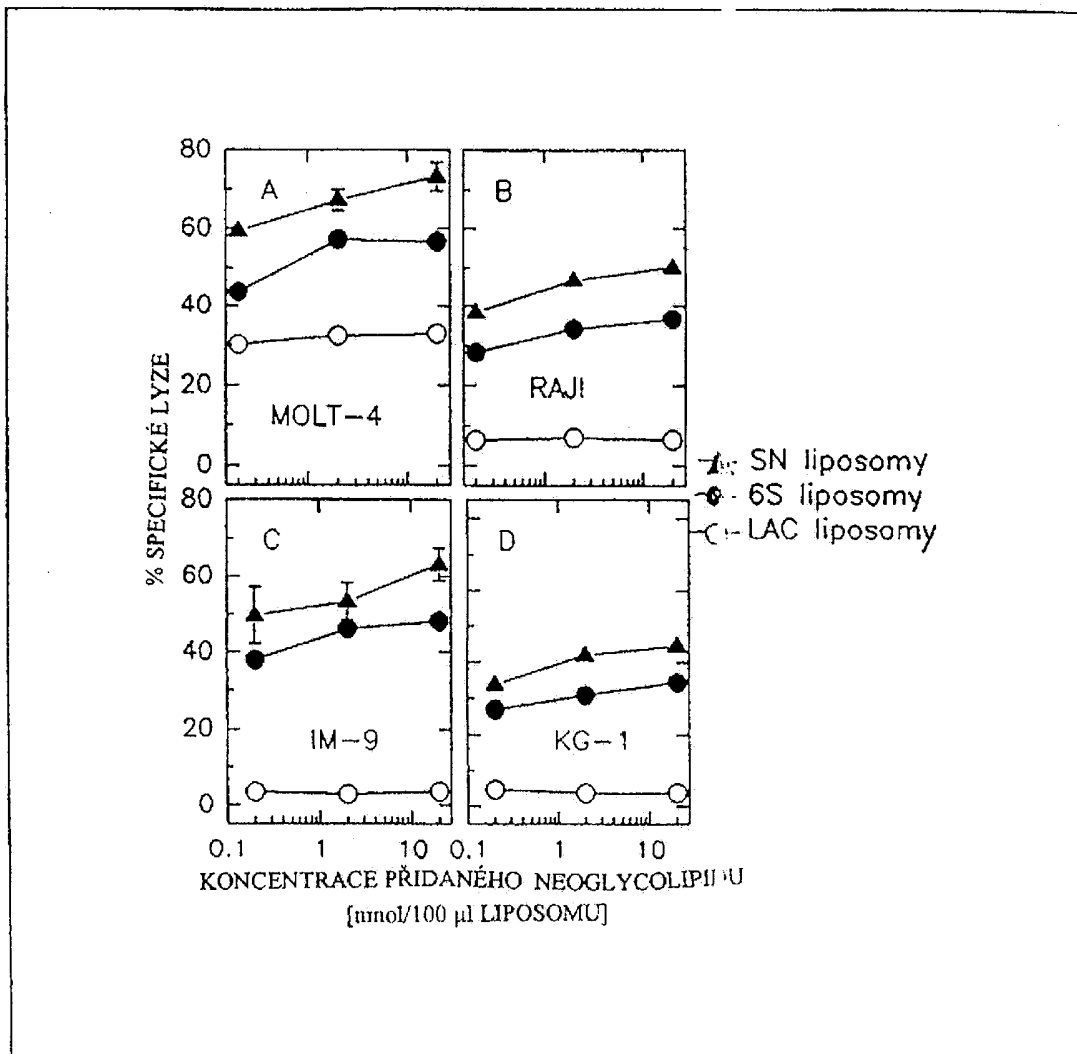
Obr. 8



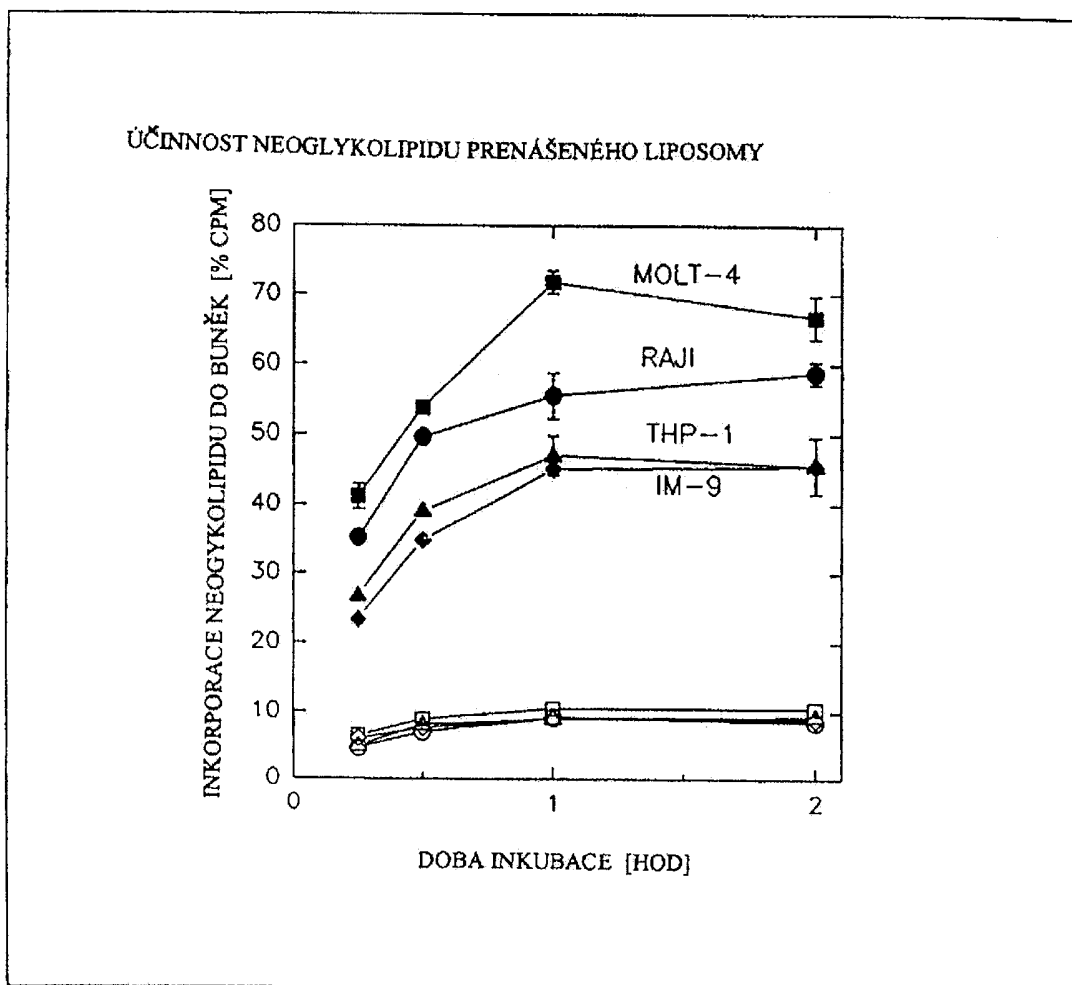
Obr. 9



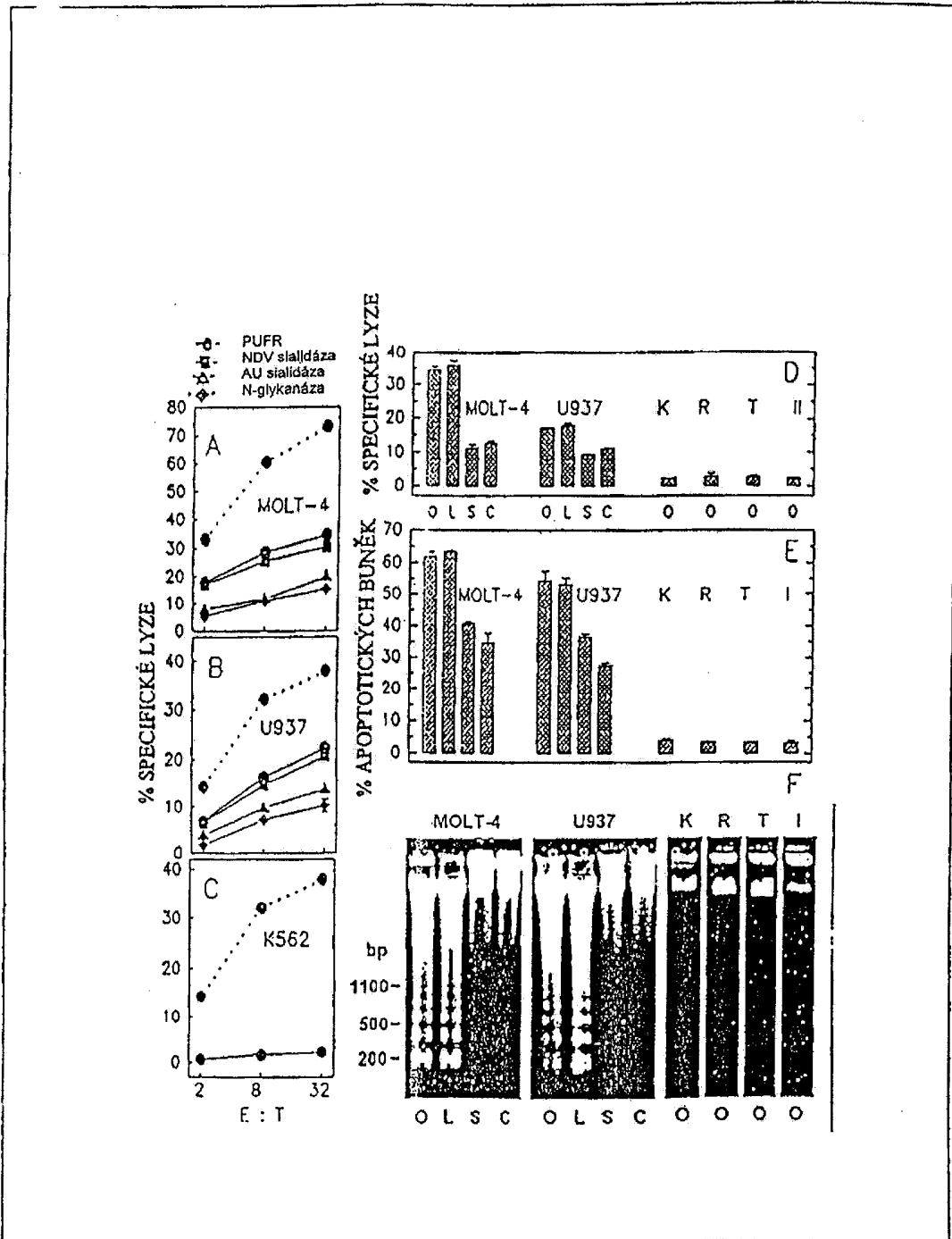
Obr. 10



Obr. 11



Obr. 12



Konec dokumentu