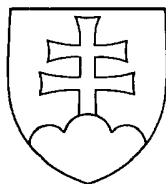


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 27.12.95
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 94203755.7
(32) Dátum priority: 23.12.94
(33) Krajina priority: EP
(40) Dátum zverejnenia: 10.12.97
(86) Číslo PCT: PCT/EP95/05164, 27.12.95

(21) Číslo dokumentu:

806-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 07K 14/74
C 07K 16/28
A 61K 39/395
A 61K 38/17
// A 61K 39/385
C 12N 5/10

(71) Prihlasovateľ: Laboratoires OM S.A., Meyrin, CH;
DEUTSCHE OM ARZNEIMITTEL GMBH, Friedrichsdorf, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Lauener Roger Pascal, Hintereg, CH;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie MHC-II väzbových molekúl**

(57) Anotácia:

MHC-II väzbové a/alebo MHC-II simulujúce molekuly sa používajú pri rušení interakcie medzi aktivačným stimulantom buniek nesúcich MHC-II, ak sú fagocyty, a bunkovo viazanými MHC-II molekulami, interakcie medzi lipopolysacharidom (LPS) alebo LPS v komplexe s inými molekulami, ako CD14 a LBP, a bunkovo viazanými MHC-II molekulami, alebo interakcie medzi produktmi grampozitívnych baktérií alebo komplexmi produktov grampozitívnych baktérií s molekulami, ako je CD14, a bunkovo viazanými MHC-II molekulami. MHC II väzbovou molekulou môže byť ľubovoľná anti-MHC II protilátka alebo jej fragment, alebo ľubovoľná molekula, odvodená od takejto protilátky, ako sú humanizované, bišpecifické alebo iné skonštruované molekuly a podobne. MHC II väzbovú molekulu možno vybrať zo skupiny, ktorá pozostáva z CD14, jeho fragmentov, jeho modifikovaných verzií alebo peptidov, ktoré majú MHC II väzbové vlastnosti.

Použitie MHC-II väzbových molekúl

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia špecifických molekúl na rušenie interakcie medzi toxínmi, ako lipopolysacharidom (LPS) samotným, alebo v komplexe s inými molekulami, ako CD14 a LBP, a ich transportnou molekulou. Vynález sa ďalej týka použitia týchto molekúl v prevencii a liečení zápalových ochorení, ako je septický šok.

Doterajší stav techniky

Lipopolysacharid (LPS) je zložkou bunkovej steny gramnegatívnych baktérií. Infekcia gramnegatívnymi baktériami môže viesť k život ohrozujúcemu ochoreniu, ktoré je spôsobené špecifickou väzbou LPS k fagocytom, ako sú monocyty, makrofágy a granulocyty, ktoré sa tým aktivujú a vylučujú rôzne cytokíny, vrátane tumor nekrotizujúceho faktora α (TNF- α), interleukínu 1 (IL-1), IL-6, IL-8, a iných mediátorov zápalu. Tieto látky buď priamym účinkom alebo aktiváciou sekundárnych mediátorov spúšťajú kaskádu procesov vyúsťujúcu do ochorenia koagulačného systému, vazodilatácie, multiorgánového zlyhania a napokon do septického šoku (4, 5).

Vo všeobecnosti je výrazná aktivácia fagocytujúcich buniek, vyúsťujúca do vylučovania veľkého počtu zápalových mediátorov, ústredným procesom v patogenéze patologického stavu, ktorý sa nazýva syndróm systémovej zápalovej reakcie (SIRS). Popri aktivácii pomocou LPS sa SIRS môže vyvinúť ako výsledok rôznych ďalších klinických stavov, ako je infekcia baktériami alebo vírusmi, trauma, popáleniny, pankreatitída, graft-versus-host a host-versus-graft reakcia, hemofagocytóza a mnoho iných. Toxický šok, spôsobený exotoxínmi, ako je stafylokokový toxín A, z grampozitívnej baktérie je jedným z príkladov zápalového ochorenia. Inými exotoxínmi, tiež známymi ako superantigény, sú stafylokokový toxín B a streptokokové toxíny.

Preukázalo sa, že LPS sa viaže s glykozylfosfatidylinozitolom (GPI)-kotveným monocytovým antigénom CD14. CD14 je prítomný na povrchu monocytov, makrofágov a granulocytov, ale tiež sa nachádza v rozpustnej forme bez kotviaceho GPI v sére zdravých jedincov. Ďalej sa preukázalo, že aktivácia monocytov pomocou LPS sa môže inhibovať anti-CD14 monoklonálnymi protilátkami. Preto sa navrhlo, že CD14 by mohol slúžiť ako receptor pre LPS (1) a sprostredkovať účinky LPS na cytoplazmu. Avšak CD14-negatívne bunky môžu tiež odpovedať na LPS (2, 7, 8).

Ďalej sa stalo známym, že CD14 je glykozylfosfatidylinozitolom (GPI)-kotvenou molekulou, ktorá nemá transmembránovú a cytoplazmovú časť (9). Teda CD14 nemôže prenášať signál do cytoplazmy. Je všeobecne prijímanou hypotézou, že na GPI viazané proteíny vyžadujú prídavné transmembránové molekuly na prenášanie signálu. Teda skutočná transportná molekula pre LPS a prípadne pre iné SIRS stimuly sa doteraz nezistila.

V prípade bunkovej aktivácie pomocou LPS sa u molekúl, iných než CD14, musí vyvolať to, aby prejavili bunkovú aktiváciu pomocou LPS (10). Navrhlo sa, aby LPS vytvoril komplex buď s membránovo viazaným alebo rozpustným CD14 a LPS viažucim proteínom (LBP). Iné sérové molekuly môžu byť tiež súčasťou tohto komplexu. Tento komplex interaguje s doteraz nezistenou molekulou na bunkovom povrchu, čo vedie k aktivácii buniek.

Bolo opísané, že CD14 hrá kľúčovú úlohu pri iniciovaní bunkovej aktivácie produktami bakteriálneho obalu z grampozitívnych, ako aj gramnegatívnych organizmov (13). Opäť sa aj iné membránovo viazané a sérové molekuly môžu zúčastňovať interakcie s molekulou na bunkovom povrchu, ktorá vedie k bunkovej aktivácii.

Podstata vynálezu

Podľa tohto vynálezu sa teraz zistilo, že na aktiváciu buniek pomocou LPS sú potrebné molekuly hlavného histokompa-

tibilného komplexu II (MHC-II), ktoré slúžia buď ako receptor a/alebo ako signál prenášajúci prvok pre molekulové komplexy LPS a molekuly ako CD14 a LBP. U ľudí je MHC známy ako humánný leukocytový antigén (HLA). Ukázalo sa, že schopnosť odpovede na LPS závisí od expresie molekúl MHC triedy II na bunkovom povrchu. Bunková línia, na ktorú tu odkazujeme ako na "THP-1^{MHC+}", je monocytovou bunkovou líniou, ktorá vykazuje expresiu MHC triedy II, a ktorú opísali Tsuchiya a spol. (3) ako THP-1. Druhá bunková línia, na ktorú tu odkazujeme ako na "THP-1.6^{MHC-}", je MHC triedy II-negatívna monocytová bunková línia, odvodená od THP-1^{MHC+} spontánnou mutáciou. THP-1^{MHC+} bunky vylučujú cytokíny v odozve na LPS, zatiaľ čo THP-1.6^{MHC-} bunky nie. CD14-pozitívne, MHC II-negatívne ľudské periférne krvné monojadrové bunky (PBMC) tiež neodpovedajú na LPS. Expresia MHC triedy II a vnímavosť na LPS sa dajú obnoviť transfekciou THP-1.6^{MHC-} buniek pomocou CIITA, cDNA kódujúcou jadrový faktor, podstatný pre expresiu MHC-II molekúl na bunkovom povrchu.

Prenášanie iných SIRS stimulov k bunke môžu tiež sprostredkovať MHC-II molekuly. Už skôr bolo demonštrované, že exotoxíny sa tiež viažu k MHC-II molekulám na bunkovom povrchu. Aktivita iných grampozitívnych produktov sa sprostredkuje prinajmenšom čiastočne pomocou CD14, a preto je pravdepodobné, že komplex týchto produktov s CD14 tiež interaguje s MHC-II molekulami, aby aktivoval bunky.

Prevencia a/alebo liečenie systémového syndrómu zápalovej reakcie sa teda môže uskutočniť rušením interakcie medzi komplexom LPS s inými molekulami, ako sú CD14 a LBP (ďalej označený ako "CD14/LPS/LBP komplex"), a na bunku viazaným MHC-II. Podľa tohto vynálezu sa toto rušenie dá dosiahnuť dvoma rôznymi spôsobmi.

Po prvé môže byť viazanie CD14/LPS/LBP komplexu k MHC-II, viazanému na bunku, blokové MHC-II viažucimi molekulami, ako sú anti-MHC-II protilátky, CD14 alebo od nich odvodené peptidy. Tento typ molekuly konkuruje CD14/LPS/LBP komplexu a teda zabraňuje komplexu naviazať sa, ale samotný neaktivuje MHC-II. Transportná funkcia MHC-II je potom blo-

kovaná.

Po druhé, cirkulujúci LPS alebo CD14/LPS/LBP komplex sa môže zachytiť MHC-II simulujúcimi molekulami. Komplexy, viažuce sa k rozpustnému MHC-II alebo MHC-II podobným molekulám, už nie sú schopné viazať sa k MHC-II, viazanému na bunku. Teda aktivácii bunky sa zabráni.

MHC-II väzbové molekuly zahrnujú ľubovoľnú molekulu, ktorá je schopná blokovať viazanie LPS alebo CD14/LPS/LBP komplexu k MHC-II. V praxi sem budú zahrnuté anti-MHC-II protilátky, aj monoklonálne, aj polyklonálne protilátky, smerujúce k CD14/LPS alebo LPS viažucemu miestu bunky. Fragmenty protilátok sú tiež vhodné ako MHC-II väzbové molekuly.

Predpokladá sa, že MHC-II simulujúce molekuly zahrnujú aj molekuly rozpustného MHC-II samotné, ako aj akúkoľvek inú molekulu, ktorá je schopná blokovať MHC-II väzbové miesto na LPS alebo CD14/LPS komplexe. Molekuly tohto typu môžu zahŕňať kompletne MHC-II molekuly alebo ich fragmenty alebo podjednotky. Ďalej môžu byť užitočné peptidy, schopné viazať sa k LPS alebo k CD14/LPS/LBP komplexu bez aktivovania MHC-II. Takéto peptidy môžu byť prinajmenšom homologické s MHC-II a zahrnujú vhodné D-aminokyseliny, ktoré peptidu dodávajú antagonistické vlastnosti. Tieto molekuly môžu byť v rozpustnej forme alebo viazané na povrch nosiča.

Na základe informácie, podanej v tejto prihláške, bude skúsený odborník schopný určiť vhodné viažuce a/alebo simulujúce molekuly.

Tento typ molekuly môže pochádzať z ľubovoľného vhodného zdroja, buď ľudského alebo iného, a môže sa pripraviť rôznymi spôsobmi, ako je izolácia zo supernatantu bunkovej kultúry MHC-II-pozitívnych buniek alebo z bunkového lyzátu. Zvlášť výhodným spôsobom izolácie je imunochromatografia. Vhodné molekuly tiež možno pripraviť génovou technológiou, proteínovými chemickými metódami alebo akoukoľvek inou vhodnou metódou.

Podľa tohto vynálezu tieto dva typy molekúl možno použiť v prevencii a/alebo liečení zápalových ochorení, ako je septický šok, graft-versus-host reakcie po transplantácii

orgánov, ako sú transplantácie kostnej drene, reakcie odmietnutia štepu, zápalové reakcie, ktoré vznikli v dôsledku popálenín, nehôd, infekcií pankreasu atď..

Vynález je tiež vhodný na prevenciu a/alebo terapiu iných zápalových reakcií, vznikajúcich napr. po chirurgických zákrokoch, ako je syndróm prepúšťania kapilár, alergické ochorenia, autoimúnne ochorenia, ako je Lupus Erythematosus (LE) a jeho subformy, sklerodermia a jej subformy, eozinofilný zápal fascie, Sjögrenov syndróm, polymyozitída, dermatomyozitída, nodózna periarteriitída, Wegenerova granulomatóza, temporálna arteritída, reumatická polymyalgia, atď., reumatoidné ochorenia, ako je reumatoidná artritída, juvenilná chronická artritída, Feltyho syndróm, Caplanov syndróm, ankylozujúca spondylitída, (Marie-Strümpell-Bechtereva choroba), psoriáza, Reiterov syndróm, Behcetov syndróm.

Inými ochoreniami, ktoré sa dajú liečiť podľa tohto vynálezu a prinajmenšom čiastočne vznikajú z autoimúnnych mechanizmov, sú medziiným diabetes mellitus, Crohnova choroba, ulcerózna kolitída, vredy tráviaceho traktu, obličkové infekcie, ako je glomerulonefritída a nefritída, artériosklerotické ochorenia, skleróza multiplex, Alzheimerova choroba, hypertyreóza, hypotyreóza.

Vynález sa tiež môže použiť pri zápalových reakciách v jednom alebo viacerých ľudských orgánoch, spojených s onkologickými ochoreniami, ako je leukémia, krvinkové tumory, karcinóm, fibróm, sarkóm a rôzne typy histiocytózy.

Vynález sa tiež dá použiť na prevenciu a/alebo liečenie vírusových ochorení, ako je AIDS. Je známe, že LPS-stimulácia zvyšuje vnútrobunkovú replikáciu Human Immunodeficiency Virus-u (HIV). Blokovanie stimulácie prostredníctvom LPS pomocou MHC-II väzbových a/alebo simulujúcich molekúl podľa tohto vynálezu teda odstráni tento replikačný stimul. MHC-II väzbové a/alebo simulujúce molekuly podľa tohto vynálezu možno preto použiť na dodanie ochranného účinku HIV-infikovaným bunkám tým, že sa zabráni stimulácii replikácie vírusu stimulmi, ktoré aktivujú bunku.

Na základe údajov, uvedených v príkladoch, si možno

predstaviť nasledujúci model aktivácie buniek prostredníctvom LPS. Na jednej strane sa LPS môže viazať k membránovo viazanému CD14 (mCD14), čo je interakcia, ktorú urýchľuje lipopolysacharid viažuci proteín (LBP). Komplex LPS a GPI-zakotveného mCD14 a prípadne LBP by potom interagoval s transmembránovými molekulami MHC triedy II, čo by vyústilo do prenosu signálu. Táto situácia je znázornená na obr. 3A. Na druhej strane, LPS sa spolu s LBP môže viazať k rozpustnému CD14 (sCD14), prítomnému v sére, a tento komplex sa potom môže viazať k molekulám MHC triedy II na povrchu CD14-negatívnych buniek, čoho výsledkom je aktivácia CD14-negatívnych, ale MHC triedy II-pozitívnych buniek. Táto situácia je znázornená na obr. 3B. Hoci kontakt je znázornený medzi CD14 a MHC-II, na tejto interakcii sa môžu podieľať aj LBP a LPS, ako aj iné, doteraz nezistené molekuly. Aktivačný stimul môže byť tiež zložkou grampozitívnych baktérií, hoci v tomto prípade úloha LBP nebola určená. Tým sa nevylučuje možnosť, že niektoré aktivačné stimuly pôsobia priamo na MHC-II molekuly bez tvorby komplexu s CD14 alebo LBP. Teraz je zistené, že stimulácia je sprostredkovaná MHC-II molekulami. Blokovanie alebo simulovanie týchto molekúl teda zabráni prenosu aktivačného stimulu.

Vynález sa ďalej týka MHC-II väzbových molekúl, MHC-II simulujúcich molekúl a farmaceutických formulácií, obsahujúcich ktorýkoľvek alebo oba typy týchto molekúl. Farmaceutické formulácie, obsahujúce jednu alebo viaceré MHC-II väzbové molekuly a/alebo MHC-II simulujúce molekuly ako účinnú prípravu na rušenie interakcie medzi aktivačným stimulom, ako je LPS, pre bunky, vykazujúce expresiu MHC-II molekúl, ako sú fagocyty, a na bunku viazaných MHC-II molekúl, majú formu práškov, suspenzií, roztokov, sprejov, emulzií, infúzií, inhalačných zmesí, mastí alebo krémov, a možno ich použiť na miestnu aplikáciu, na intranazálne, rektálne, vaginálne a tiež na orálne, parenterálne (intravenózne, intradermálne, intramuskulárne, intratekálne, atď.) alebo transdermálne podanie, podanie pomocou inhalačných prostriedkov, atď.. Farmaceutické formulácie podľa tohto vynálezu možno pripraviť

spojením (t.j. zmiešaním, rozpustením, atď.) účinnej(ých) zlúčeniny(ín) s farmaceuticky prijateľnými vehikulami s neutrálnym charakterom (ako sú vodné alebo nevodné rozpúšťadlá, stabilizátory, emulzifikátory, detergenty, prísady), a ďalej, ak je to potrebné, s farbivami a príchutami. Koncentrácia účinnej prísady vo farmaceutickej formulácii sa môže meniť v rozsahu od 0,001 % do 100 % v závislosti od povahy liečenia a spôsobu podávania. Dávka účinnej prísady, ktorá sa podáva, závisí tiež od špecifickej aplikácie a cesty podávania, ale môže sa meniť napríklad medzi 0,01 µg a 1 mg na kg telesnej hmotnosti, s výhodou medzi 0,1 µg a 100 µg na kg telesnej hmotnosti.

Vynález ilustrujeme s odkazom na nasledujúce príklady, ktoré nemajú obmedziť rozsah vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Úvod

Hypotéza, že MHC-II je prenášačom a/alebo receptorom pre komplex, zahrnujúci LPS, CD14, LBP a prípadne iné molekuly, v aktivácii fagocytizujúcich buniek prostredníctvom LPS sa testovala porovnávaním vylučovania cytokínov MHC triedy II-pozitívnymi (HLA-DR) a MHC triedy II-negatívnymi bunkovými líniami pri stimulácii prostredníctvom LPS. Vylučovanie cytokínov indikuje aktiváciu buniek.

Materiály a metódy

THP-1^{MHC+} je CD14-negatívna, MHC triedy II-pozitívna monocytová bunková línia ľudského pôvodu (3). THP-1.6^{MHC-} je spontánne odvodený, MHC triedy II-negatívny mutant THP-1^{MHC+}, klonovaný opakovanými obmedzujúcimi zriedeniami.

HLA-DR expresia sa obnovila transfekciou THP-1.6^{MHC-} buniek pomocou CIITA (transaktivátor triedy II; jadrový proteín, podstatný pre expresiu MHC triedy II-proteínov (12)), aby vznikol THP-1.6^{MHC-}CIITA.

Expresia HLA-DR a CD18 na povrchu THP-1^{MHC+} buniek (divokého typu), THP-1.6^{MHC-} buniek (bunková línia mutantu) a THP-1.6^{MHC-}CIITA (THP-1.6^{MHC-} bunky, transfektované pomocou CIITA) sa stanovila prietokovou cytometriou.

Rôzne bunkové línie sa kultivovali s 10⁶ bunkami/ml v médiu, doplnenom 10 % FCS, a stimulovali sa LPS v dávkach 0, 1, 10, 100 ng/ml a 1 µg/ml. Po 24 hodinách sa supernatanty odobrali a pomocou ELISA sa v nich stanovil obsah TNF-α a IL-8.

Výsledky a diskusia

Životaschopnosť buniek sa pôsobením LPS nezhoršovala. Viac než 95 % buniek bolo životaschopných, ako ukázalo farbenie trypanovou modrou.

Zatiaľ čo expresia CD18 bola v uvedených troch bunkových líniách podobná, pri THP-1.6^{MHC-} bunkách sa prejavila expresia významne nižších hladín HLA-DR než pri THP-1^{MHC+} bunkách.

Pri stimulácii THP-1^{MHC+} buniek prostredníctvom LPS bunky odpovedali vylučovaním TNF-α a IL-8 (obr.1). Na rozdiel od toho sa v HLA-DR-negatívnej bunkovej línii THP-1.6^{MHC-} nepodarilo vzbudiť vylučovanie TNF-α ani IL-8 stimuláciou pomocou LPS, dokonca ani pri použití vysokých dávok LPS. Avšak HLA-DR-expresia a schopnosť odpovedať na LPS sa obnovili transfekciou s CIITA. Prijal sa záver, že na aktiváciu monocytových buniek pomocou LPS bola potrebná expresia HLA-DR molekúl.

Príklad 2

Úvod

Na potvrdenie zistení z príkladu 1 sa výsledky, získané s uvedeným systémom bunkovej línie verifikovali s použitím buniek pacienta s nedostatkom MHC triedy II, zriedkavou vrodenou chorobou, ktorá sa prejavuje ako ťažká kombinovaná imunodeficiencia v rannom detstve. U týchto pacientov nie je ovplyvnená CD14- expresia. PBMC od pacienta s nedostatkom

MHC triedy II a od kontrolného jedinca sa kultivovali v prítomnosti zvyšujúcich sa dávok LPS, a hladiny TNF- α a IL-1 sa merali v supernatantoch z týchto kultúr.

Materiály a metódy

Periférne krvné monojadrové bunky (PBMC) sa odobrali pacientovi s nedostatkom MHC-II a zdravej kontrole.

Expresia HLA-DR na povrchu oboch PBMC od pacienta (šrafovaný histogram, ľavá strana na obr. 2) a od zdravej kontroly (sivý histogram) sa stanovila priamym imunofluorescenčným farbením a prietokovou cytometriou.

PBMC od pacienta (hrubá čiara) a od kontroly (tenká čiara) sa kultivovali s 10^6 bunkami/ml v médiu, doplnenom 10 % normálneho ľudského AB-pozitívneho séra a stimulovali sa 0, 1, 10 a 100 ng/ml LPS. Po 24 hodinách sa supernatanty odobrali a pomocou ELISA sa v nich stanovil obsah TNF- α .

Výsledky a diskusia

PBMC od zdravého jedinca vylučovali TNF- α a IL-1 v odozve na LPS, ako sa očakávalo. Avšak MHC triedy II-deficitné PBMC od pacienta nevylučovali významné úrovne cytokínov v odozve na LPS (obr. 2). Ukázalo sa teda, že požiadavka expresie MHC triedy II molekúl sa neobmedzovala na THP-1^{MHC+} skupinu bunkových línií.

Údaje ukazujú, že membránovo viazaný CD14 nie je na aktiváciu buniek pomocou LPS (THP-1^{MHC+} bunky nevykazujú expresiu CD14) ani potrebný ani postačujúci (PBMC od MHC triedy II-deficitných pacientov vykazujú expresiu normálnych hladín CD14).

Avšak vyššie opísané pokusy neurčujú úlohu rozpustného CD14. Vo všetkých týchto pokusoch sa použili médiá, doplnené sérom, ktoré obsahovalo rozpustný CD14. Pokusy sa preto zopakovali, kultivujúc THP-1^{MHC+}, THP-1.6^{MHC-} a THP-1.6^{MHC-}-CIITA bunky v médiu bez séra. Pôsobenie zvýšenými dávkami LPS nevedlo k vylučovaniu významných hladín TNF- α .

Výsledky naznačujú, že MHC triedy II molekuly rozhadu-

júco ovplyvňujú schopnosť odpovedať na LPS. HLA-DR-negatívne bunky neboli schopné vylučovať cytokíny pri stimulácii pomocou LPS. Tiež by sa mohlo argumentovať, že chýbanie odpovede na LPS je spôsobené faktorom, ktorý úzko súvisí s MHC triedy II a je regulovaný CIITA, skôr než to, že chýbanie MHC triedy II-expressie samo osebe spôsobuje zníženú schopnosť odpovedať na LPS. Avšak tento defekt v odpovedi na LPS sa neobmedzuje na vylučovanie samotného cytokínu, pretože sa potlačilo vylučovanie TNF- α , ako aj IL-1 a IL-8. Naviac sa dodnes napriek intenzívnemu výskumu nezistila okrem MHC triedy II žiadna molekula, regulovaná CIITA. Napokon, príčinou choroby pacienta nie je defekt, ktorý súvisí s CIITA. Transfekcia Epstein Barrovým vírusom (EBV) transformovaných B-buniek od tohto pacienta neobnovila expresiu MHC triedy II molekúl.

Príklad 3

Úvod

Fyzická interakcia medzi MHC triedy II molekulami a CD14 sa demonštrovala tromi rôznymi spôsobmi.

Po prvé, lyzáty MHC-II-pozitívnych a MHC-II-negatívnych bunkových línií sa inkubovali MHC II špecifickými alebo kontrolnými protilátkami a rádioaktívnym CD14 (CD14^{*}) alebo rádioaktívnou kontrolnou molekulou. Komplexy medzi MHC-II a CD14^{*} môžu precipitovať len interakciou proteín A-agarózy a MHC-II špecifických protilátok. V zrazenine by sa nemala zistiť žiadna rádioaktivita, keď sa použije kontrolná molekula alebo kontrolná protilátka. Ak nie je prítomný žiadny MHC-II, nemožno v zrazenine nájsť žiadnu rádioaktivitu.

Po druhé, MHC-II sa inkuboval rádioaktívnym CD14. Predpokladá sa, že sa vytvoria komplexy MHC-II/CD14^{*}. Teoreticky tieto komplexy možno zrážať pomocou protilátok, ktoré sú špecifické pre ktoréhokoľvek z oboch partnerov v komplexe a proteín A-agarózu.

Po tretie, testovalo sa, či by anti-CD14 protilátky mohli blokovať interakciu MHC-II a CD14^{*}.

Princíp týchto pokusov je ďalej ilustrovaný na obr. 4.

Metódy

1. Príprava rádioaktívneho CD14

Rekombinantný CD14 sa pripravil pomocou *in vitro* transkripcie/translácie z CD14 cDNA plnej dĺžky, ktorá bola pripravená pomocou PCR metód a ktorej nukleotidová sekvencia sa overila s použitím TNT T7 viazaného retikulocytového lyzátového systému podľa protokolu výrobcu (Promega, Švajčiarsko) v prítomnosti ^{35}S -metionínu. Ako kontrola sa pripravila rádioaktívne značkováná luciferáza pomocou *in vitro* transkripcie/translácie s použitím toho istého systému.

2. Príprava bunkových lyzátov

Takzvané 293 bunky sa pripravujú z ľudských embryonálnych obličiek, transformovaných ľudským adenovírusom typu 5 DNA (ATCC označenie CRL 1573); 293 bunky divokého typu nevykazujú expresiu MHC triedy II molekúl, ako sa zistilo FACS analýzou. Tieto sa vzali ako MHC II-negatívne bunky. 293 bunky, transfektované s cDNA z α -, β - a invariálnych (i) reťazcov ľudského MHC triedy II, sa získali od Dr. Jacquesa Neefsjesa, Netherlands Cancer Institute, Amsterdam. Tieto vykazujú expresiu MHC II, a preto sa použili ako MHC II-pozitívne bunky. Lyzáty z MHC triedy II-pozitívnych a MHC triedy II-negatívnych bunkových línií sa pripravili nasledovne.

5×10^6 buniek sa lýzovalo v Petriho miske v 1 ml lýzového pufru (Boehringer Mannheim, súprava na značenie a imunoprecipitáciu buniek). Po 30 minútach sa lýzované bunky pozberali a podrobili sa sonifikácii (3 x 15 sekúnd), po ktorej nasledovalo 30 minút inkubácie na ľade a následná centrifugácia. Supernatanty sa podrobili imunoprecipitácii, ako je opísané ďalej.

3. Imunoprecipitácia v pokuse 1

Imunoprecipitácia sa uskutočnila s použitím reagentov a podľa návodu zo "Súpravy na značenie a imunoprecipitáciu buniek" Boehringer Mannheim (Švajčiarsko). Stručne, vzorky

sa predčistili s použitím 50 μ l proteín A-agarózy. Po odstránení tejto proteín A-agarózy centrifugáciou sa supernatanty inkubovali s nasledujúcimi protilátkami: L243 (anti-HLA-DR, ATCC označenie HB 55); 1B5 (anti-MHC triedy II, získaná od Dr. Jacquesa Neefsjesa, Netherlands Cancer Institute, Amsterdam); a anti-CD3 (Pharmingen, San Diego, USA/AMS Biotechnology, Švajčiarsko). Po 1 hodine sa pridalo 50 μ l proteín A-agarózy a vzorky sa inkubovali 3 hodiny s následnými 6 premytiami.

Potom sa pelety opätovne suspendovali v 30 μ l pufra (50 mM Tris, pH 7,5, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF), a pridalo sa 5 μ l roztoku, získaného v *in vitro* reakcii transkripcie/translácie, ktorý obsahoval rádioaktívne značkovaný CD14, a táto zmes sa inkubovala 30 minút pri teplote miestnosti. Po centrifugácii sa pelety premyli 2x premývacím pufrom #2 s následnými 2 premytiami premývacím pufrom #3 (pufre #2 a #3 pochádzajú zo súpravy na značenie a imunoprecipitáciu buniek, Boehringer Mannheim, Švajčiarsko). Pelety sa potom rozpustili a varili v štandardnom SDS-PAGE plniacom pufri a podrobili sa gélovej elektroforéze na 10 % SDS polyakrylamidovom géli, po ktorej nasledovala autorádiografia.

4. Čistenie MHC triedy II molekúl

MHC triedy II molekuly sa extrahovali a prečistili od THP-1 buniek spôsobom, ako opísali Gorga a spol. (15), s malými modifikáciami. L243 (anti-HLA-DR, ATCC označenie HB 55) sa imobilizovala na stĺpci proteín A-Sepharose B priechovou väzbou s dimetylpimelimidátom. THP-1 bunky sa lýzovali na ľade v Tris-HCl, pH 8,0, obsahujúcej 0,1 mM PMSF. Všetky následné kroky sa uskutočnili pri 4 °C. Lyzát sa centrifúgoval pri 3000xg a peleta sa premývala, kým supernatant nebol číry. Spojené supernatanty sa centrifúgovali pri 160000xg 40 min. a peleta sa opätovne rozpustila pridaním Nonidet P40 do 4 %-nej konečnej koncentrácie. Po centrifúgovaní pri 160000xg po dobu 2 hodín sa supernatant naniesol na rad stĺpcov v nasledujúcom poradí: Sepharose 4B (10 ml), normálne králičie sérum - Affigel 10 (10 ml), proteín A-Sepharose

4B (2 ml) L243-Sepharose 4B (12 ml). Stĺpce sa premyli 10 mM Tris-HCl/0,1 % Nonidet P40, pH 8,0 (5 objemov); 10 mM MOPS/140 mM NaCl/0,1 % deoxycholát, pH 8,0 (2 objemy); 10 mM Tris-HCl/0,1 % deoxycholát, pH 8,0 (4 objemy). L243 stĺpec sa potom odpojil od ostatných stĺpcov a rýchlo sa eluoval 50 mM glycínu/0,1 % deoxycholátu, pH 11,5. 10 ml frakcie sa odobrali a nastavili na pH 7,0 až 8,0, akonáhle boli eluované 2M glycínom, pH 2,0. Eluované HLA-DR molekuly sa skoncentrovali ultrafiltráciou s 30 kDalton uzatváracími membránami. Po trojnásobnom premytí v Tris-HCl/0,1 % deoxycholáte, pH 8,0, sa proteín opätovne zriedil v tom istom pufri.

5. Imunoprecipitácia v pokuse 2

5 μ l roztoku, obsahujúceho rádioaktívne značkovaný CD14, získaného v in vitro reakcii transkripcie/translácie, sa zmiešalo s 1 μ l roztoku, obsahujúceho približne 10 ng MHC triedy II molekúl, a inkubovalo sa 30 minút pri teplote miestnosti. Potom sa pridali protilátky a vzorky sa inkubovali 1 hodinu pri 4 °C. Po pridaní 50 μ l proteín A-agarózy sa vzorky inkubovali ďalšie 3 hodiny pri 4 °C. Po centrifugácii sa pelety 2x premyli premývacím pufrom #2, po čom nasledovali 2 premytia premývacím pufrom #3 (súprava na značenie a imunoprecipitáciu buniek, Boehringer Mannheim, Švajčiarsko). Pelety sa potom rozpustili a varili v štandardnom SDS-PAGE plniacom pufri a podrobili sa gélovej elektroforéze na 10 % SDS polyakrylamidovom géli, po ktorej nasledovala autorádiografia.

6. Imunoprecipitácia v pokuse 3

Pred pridaním rádioaktívne značkovaného CD14 k imunoprecipitačným vzorkám, ako bolo opísané pre iné imunoprecipitačné pokusy, sa roztok, obsahujúci CD14, inkuboval so zmesou anti-CD14 protilátok 10 minút pri teplote miestnosti. Zmes pozostávala z 10 μ g každej z nasledujúcich anti-CD14 protilátok: RMO52 (Immunotech, Švajčiarsko); LeuM3 (Beckton & Dickinson, Švajčiarsko); MY4 (Coulter, Švajčiarsko); Tük 4 (Dako, Švajčiarsko); a 100 μ l supernatantu z nasledujúcich

anti-CD14 hybridómov: 3C10, 63D3 (oba získané od ATCC). Ako kontrola sa pridal PBS s tým istým objemom, ako bol objem zmesi protilátok, k 5 μ l roztoku, ktorý obsahoval rádioaktívne značkovaný CD14.

Protílátkami, použitými na imunoprecipitáciu, boli: MY4 (anti-CD14) a L243 (anti-MHC II).

Výsledky:

Pokus 1

Demonštrácia koprecipitáciou MHC triedy II molekúl a CD14 s použitím lyzátov z MHC triedy II-positívnych a MHC triedy II-negatívnych buniek

Výsledky tohto pokusu sú znázornené na obr. 5. Na ľavej strane sú znázornené výsledky pokusov, uskutočnených s použitím lyzátu z 293-buniek, transfektovaných MHC triedy II (t.j. kotransfektovaných s α , β a i-reťazcom MHC triedy II), na pravej strane vidieť výsledky s použitím MHC triedy II-negatívnych buniek 293 divokého typu.

V líniiach 1 a 2 nešpecificky precipitovali kontrolnou protílátkou anti-CD3 len slabé pásy, pravdepodobne zodpovedajúce rádioaktívnemu CD14 (línia 1), resp. luciferáze (línia 2). Pásy, zodpovedajúce rádioaktívne značkovanému CD14 (CD14*), sú jasne viditeľné v líniiach 3 a 5; dve rozdielne protílátky, rozoznávajúce MHC triedy II-molekuly (línia 3: L243; línia 5: 1B5) (ko)precipitovali CD14*. Koprecipitačný účinok týchto anti-MHC triedy II protilátok je špecifický pre CD14, pretože tieto protílátky nekoprecipitujú (línie 4 a 6) žiadne významné množstvo rádioaktívne značkovaného kontrolného proteínu (luciferázy). Koprecipitácia CD14 anti-MHC triedy II protílátkami závisí od prítomnosti MHC triedy II molekúl, pretože v neprítomnosti MHC triedy II molekúl (s použitím lyzátu z MHC triedy II-negatívnych 293 buniek, línie 7 až 9) nedochádza k žiadnej precipitácii CD14 anti-MHC triedy II protílátkami.

Pokus 2

Demonštrácia koprecipitáciou MHC triedy II molekúl a CD14 s použitím MHC triedy II molekúl, vyčistených imunoafinitným stĺpcom

Výsledky tohto pokusu sú znázornené na obr. 6. Na ľavej strane sú znázornené výsledky imunoprecipitačných pokusov, uskutočnených v prítomnosti vyčistených MHC triedy II molekúl, na pravej strane vidieť výsledky pokusov, uskutočnených v neprítomnosti vyčistených MHC triedy II molekúl, t.j. s použitím pufru ako negatívnej kontroly.

V líniiach 1 a 4 vidieť slabé pásy, zodpovedajúce CD14, nešpecificky precipitovanému kontrolnou protilátkou (anti-CD3). V línii 3 sa po precipitácii anti-CD14 protilátkou objavuje pás, zodpovedajúci CD14. V línii 2 má pás, zodpovedajúci CD14, vyššiu intenzitu než v línii 3, hoci v tomto pokuse sa precipitácia uskutočnila anti-MHC triedy II molekulami. V neprítomnosti vyčistených MHC triedy II molekúl CD14 silne precipituje anti-CD14 protilátkami (línia 6), zatiaľ čo koprecipitácia CD14 anti-MHC triedy II protilátkami nepresahuje úroveň pozadia (línia 5).

Pokus 3

Fyzikálnu interakciu medzi CD14 a MHC triedy II molekulami možno inhibovať anti-CD14 protilátkami

Výsledky sú znázornené na obr. 7. Línii 1 a 5 ukazujú, že anti-CD14 protilátka MY4 precipituje rádioaktívne značkovaný CD14, vytvorený *in vitro* transkripciou/transláciou, nezávisle od prítomnosti (línia 1) alebo neprítomnosti (línia 5) MHC triedy II molekúl (kontrola). CD14 je silne precipitovaný L243, anti-MHC triedy II protilátkou, za predpokladu, že sú prítomné MHC triedy II molekuly (línia 2), ale v neprítomnosti MHC triedy II molekúl len v množstvách na úrovni pozadia (línia 6). Ak sa na CD14 pôsobí najprv zmesou

anti-CD14 protilátok predtým, než sa zmieša s bunkovým lyzá-
tom, obsahujúcim MHC-II molekuly, CD14 nemožno precipitovať
anti-MHC triedy II protilátkami. Línia 4 ukazuje, že pufer
(kontrola) nemá žiadny účinok na koprecipitáciu CD14
anti-MHC triedy II protilátkami. Línie 7 a 8 ukazujú výsled-
ky tých istých pokusov ako v líniiach 3 a 4, ale uskutočne-
ných v neprítomnosti MHC triedy II molekúl.

Príklad 4

Úvod

Na demonštrovanie úlohy MHC II v aktivácii buniek *in vivo* sa použili MHC triedy II uspané myši. Ak sa MHC II po-
dieľa na aktivačnom mechanizme pomocou LPS, myši bez MHC II
by nemali vykazovať bežné fyziologické účinky LPS stimulá-
cie. Podobný pokus sa uskutočnil *in vitro* s použitím krvi
tých istých myší.

Metódy

Pre *in vivo* pokus sa 100 µg LPS (E.coli 0111:B4, zrie-
dené v sterilnom 0,9 % NaCl) vstreklo intravenózne divokému
typu C57BL/6 a B6-Aa⁰/Aa⁰ MHC triedy II naočkovaným myšiam
(Hoffmann-La Roche; odkaz 16). Po 2 hodinách sa myši utrati-
li a sterilne sa im odobrala krv. Krv sa nechala koagulovať
pri teplote miestnosti a centrifúgovala sa 5 minút pri
13000 ot./min.. Potom sa odstránilo sérum. Obsah TNF-α, znak
aktivácie fagocytov, sa stanovil v sére pomocou ELISA (Bio-
source). Obr. 8 ukazuje výsledky.

Pre *in vitro* pokus sa heparizovaná celá krv z divoké-
ho typu MHC II-pozitívnych C57BL/6 myší (čierne krúžky na
obr. 9) a B6-Aa⁰/Aa⁰ myší (otvorené krúžky), u ktorých chýba
MHC triedy II expresia po cielenom prerušení MHC triedy II
génu Aa¹, inkubovala v prítomnosti 0, 0,1, 1, 10 a 100
ng/ml LPS. Po 4 hodinách inkubácie sa stanovila hladina
TNF-α v plazme pomocou ELISA (Biosource). Výsledky sú zná-
zornené na obr. 9.

TNF-α vylučovanie je jasne vyššie u myší alebo buniek,

ktoré vykazujú expresiu MHC triedy II molekúl.

Príklad 5

Úvod

In vivo účinok MHC II-väzbových a MHC II-simulujúcich molekúl sa stanovil nasledovne.

Metódy

Myši C57B1/6 divokého typu sa jednotlivovo odvážili a vstrekla sa im LD₅₀, určená v predbežných pokusoch. Pred vstreknutím LPS sa na myši pôsobilo:

Skupina 1: rozpustnými MHC triedy II molekulami v dávkovom rozsahu od 1 µg do 1 mg/kg telesnej hmotnosti;

Skupina 2: anti-MHC triedy II protilátkami v tom istom dávkovom rozsahu; a

Skupina 3: len fyziologickým roztokom (kontrolná skupina).

Ako kontrola tri ďalšie skupiny dostali rozpustný MHC triedy II, anti-MHC II alebo fyziologický roztok bez nasledujúcej provokačnej injekcie LPS.

Prežitie sa sledovalo 7 dní. Myši sa pozorovali v pravidelných intervaloch počas prvých 48 hodín, aby sa zistili symptómy. Jedna podskupina myší sa utratila a odobrala sa im krv predtým, než nastala LPS vyvolaná smrť, a v sére z týchto zvierat sa stanovili hladiny TNF-α pomocou ELISA.

Výsledky

Úmrtnosť, ako aj TNF-α hladiny v sére sa významne znížili v skupinách myší, na ktoré sa pôsobilo rozpustnými MHC triedy II molekulami alebo anti-MHC II protilátkami (výsledky neznázornené) pri porovnaní. Kontrolná skupina, na ktorú sa pôsobilo MHC triedy II molekulami alebo anti-MHC II protilátkami, ale bez LPS provokačnej injekcie, nevykázala významné rozdiely od myší, na ktoré sa pôsobilo fyziologickým roztokom bez provokačnej injekcie LPS.

Literatúra

1. Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. & Mathison, J.C., *Science* 249, 1431-1433 (1990)
2. Couturier, C., Jahns, G., Kazatchkine, M.D. & Haeffner Cavailon, N., *Eur. J. Immunol.* 22, 1461-1466 (1992).
3. Tsuchiya, M., et al., *Int. J. Cancer* 26, 171-176 (1980)
4. Bone, R., *Chest* 101, 802-808 (1991)
5. Glauser, M., Zanetti, G., Baumgartner, J. & Cohen, J., *Lancet* 338, 732-736 (1991)
6. Schumann, R.R., et al. *Science* 249, 1429-1431 (1990)
7. Frey, E.A., et al. *J. Exp. Med.* 176, 1665-1671 (1992)
8. Haziot, A., Rong, G.W., Silver, J. & Goyert, S.M., *J. Immunol.* 151, 1500-1507 (1993)
9. Haziot, a., et al., *J. Immunol.* 141, 547-552 (1988)
10. Tobias, P.S. & Ulevitch, R.J., *Immunobiology* 187, 227-232 (1993).
11. Marrack, P. & Kappler, J., *Science* 248, 705-711 (1990)
12. Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M. & Mach, B., *Cell* 75, 135-146 (1993)
13. Pugin, J., et al., *Immunity* 1, 509 (1994)
14. Hailmann, E., et al., *J. Exp. Med.* 179, 269-277 (1994)
15. Gorga, J.C. et al., *J. Biol. Chem.* 262, 16087-16094 (1987)
16. Köntgen. et al., *International Immunology* 5, 957-964 (1993)

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie MHC-II väzbových molekúl na prípravu farmaceutickej formulácie na prerušenie interakcie medzi aktivačným stimulantom pre fagocyty a bunkovo viazanými MHC-II molekulami na ovplyvnenie prenosu signálu vo fagocytoch.

2. Použitie MHC-II väzbových molekúl na prípravu farmaceutickej formulácie na prerušenie interakcie medzi lipopolysacharidom (LPS) alebo LPS v komplexe s inými molekulami, ako je CD14 a LBP, a bunkovo viazanými MHC-II molekulami na ovplyvnenie prenosu signálu vo fagocytoch.

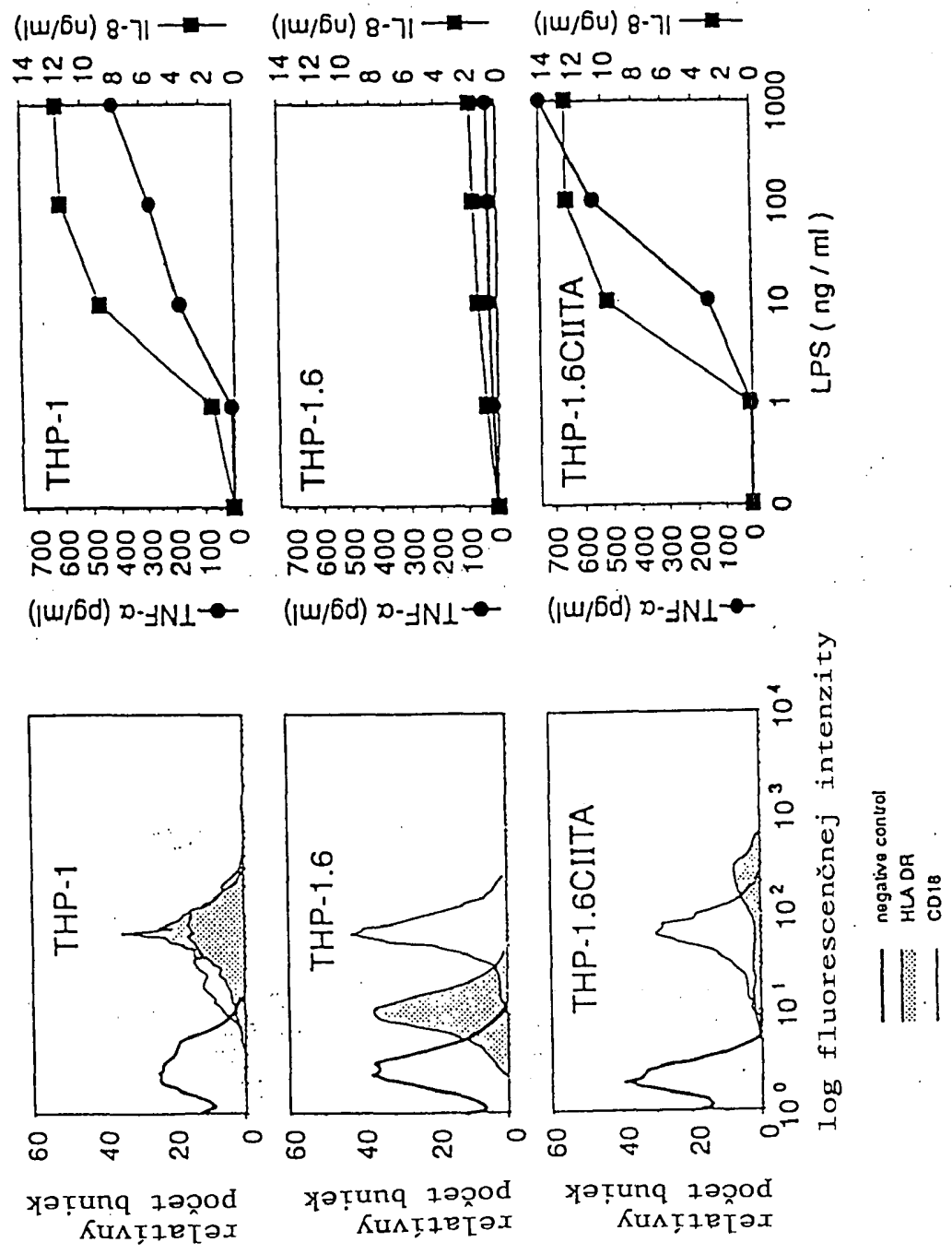
3. Použitie MHC-II väzbových molekúl na prípravu farmaceutickej formulácie na rušenie interakcie medzi produktami grampozitívnych baktérií alebo komplexami produktov grampozitívnych baktérií s molekulami, ako je CD14, a bunkovo viazanými MHC-II molekulami na ovplyvnenie prenosu signálu vo fagocytoch.

4. Použitie MHC-II väzbových molekúl podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že MHC-II väzbovou molekulou je anti-MHC II protilátka alebo jej fragment, alebo akákoľvek molekula, odvodená od takejto protilátky, ako sú humanizované, bišpecifické alebo iné skonštruované molekuly a podobne.

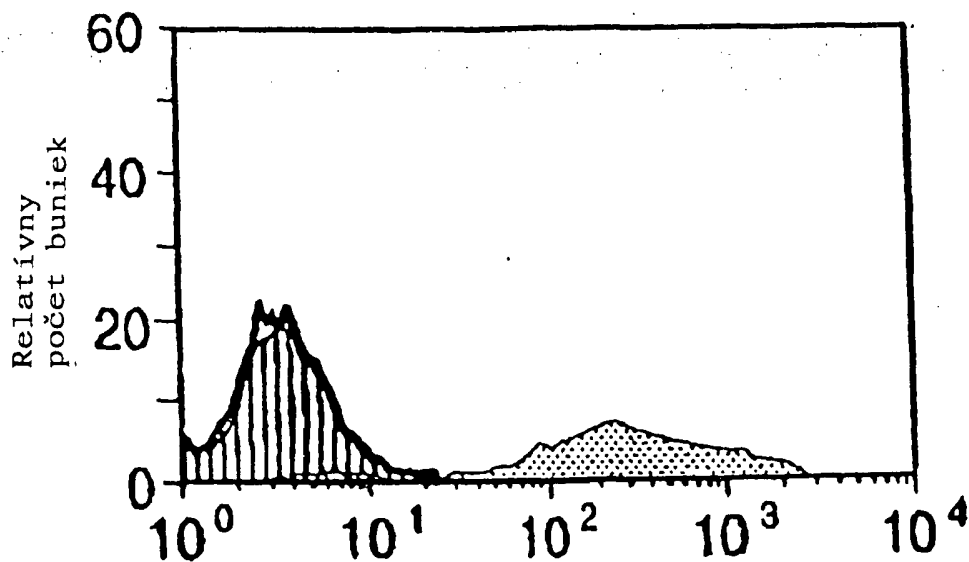
5. Použitie MHC-II väzbových molekúl podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že farmaceutická formulácia je určená na prevenciu a/alebo liečenie zápalových ochorení; septického šoku, graft-versus-host ochorenia po transplantácii orgánov, ako sú transplantácie kostnej drene; reakcií odmietnutia štepu; zápalových reakcií v jednom alebo viacerých ľudských orgánoch, ktoré vznikli v dôsledku popálenín, nehôd, infekcií pankreasu, ako je syndróm respiračnej nedostatočnosti u dospelých (ARDS), atď.; zápalových reakcií jedného alebo viacerých ľudských

orgánov po chirurgických zákrokoch, ako je syndróm zvýšenej permeability kapilár, alergických ochorení jedného alebo viacerých ľudských orgánov; zápalových reakcií v jednom alebo viacerých ľudských orgánoch, spojených s autoimúnnymi ochoreniami, ako je Lupus Erythematoses (LE) a jeho subformy, sklerodermia a jej subformy, eozinofilný zápal fascie, Sjögrenov syndróm, polymyozitída, dermatomyozitída, nodózna periarteriitída, Wegenerova granulomatóza, temporálna arteritída, reumatická polymyalgia, atď.; zápalových reakcií v jednom alebo viacerých ľudských orgánoch, spojených s reumatoidnými ochoreniami, ako je reumatoidná artritída, juvenilná chronická artritída, Feltyho syndróm, Caplanov syndróm, ankylozujúca spondylitída, (Marie-Strümpell-Bechtereva choroba), psoriáza, Reiterov syndróm, Behcetov syndróm; zápalových reakcií v jednom alebo viacerých ľudských orgánoch, spojených s ochoreniami, ktoré sú aspoň čiastočne výsledkom autoimúnnych mechanizmov, ako je diabetes mellitus, Crohnova choroba, ulcerózna kolitída, vredy tráviaceho traktu, obličkové zápaly, ako je glomerulonefritída a nefritída, artériosklerotické ochorenia, skleróza multiplex, Alzheimerova choroba, hypertyreóza, hypotyreóza; zápalových reakcií v jednom alebo viacerých ľudských orgánoch, spojených s onkologickými ochoreniami, ako je leukémia, krvinkové tumory, karcinóm, fibróm, sarkóm a rôzne typy histiocytózy; a vírusových ochorení, ako je AIDS.

OBR. 1

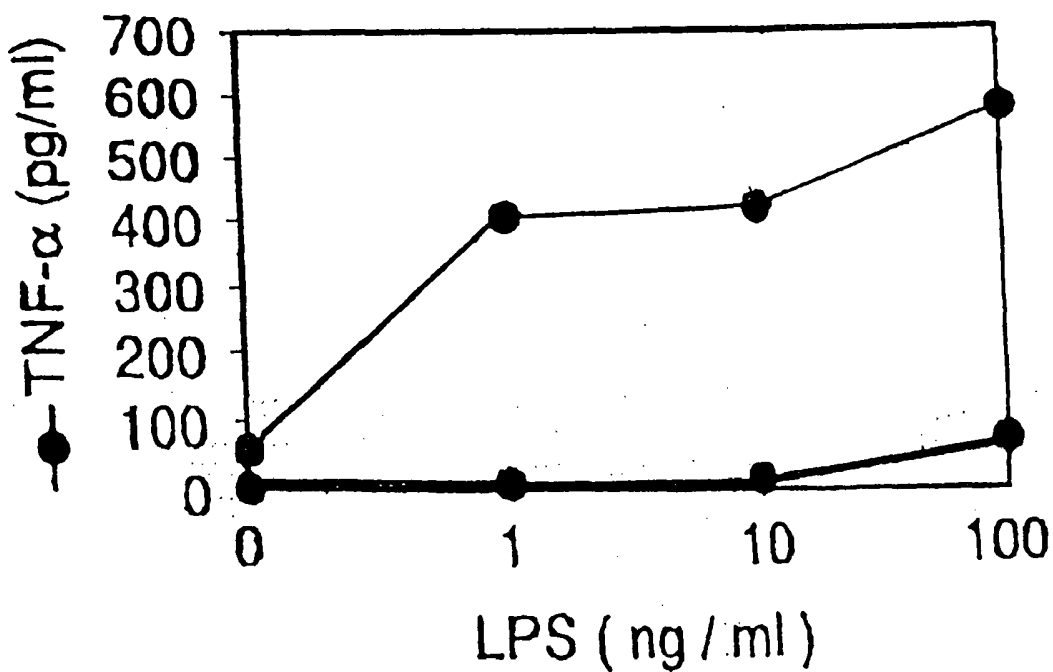


2/7

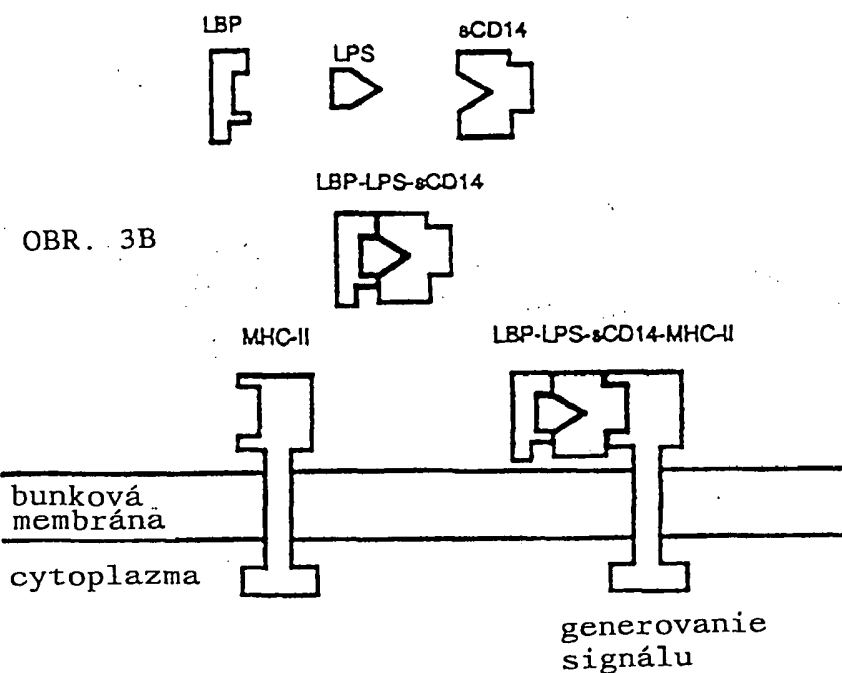
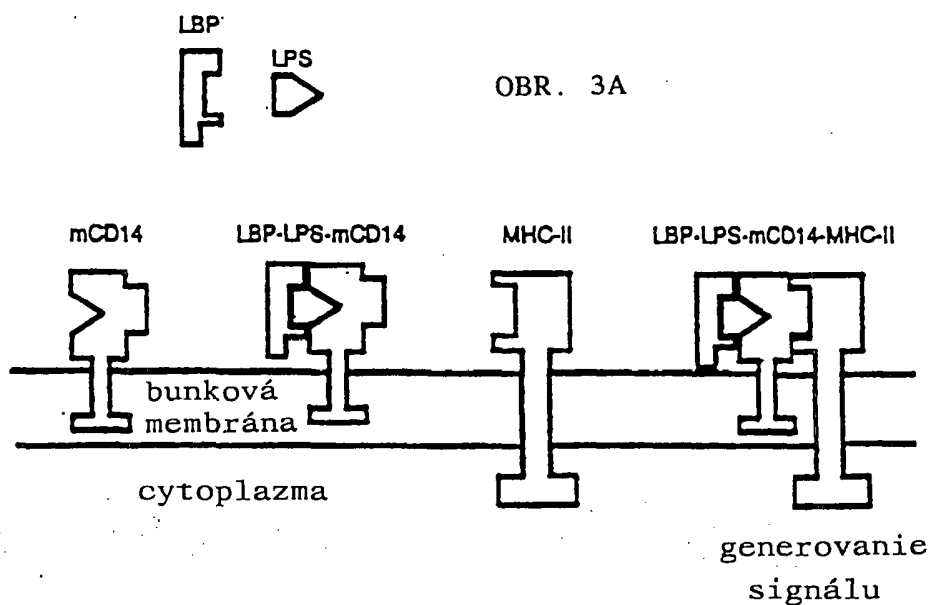


OBR. 2

log fluorescenčnej intenzity

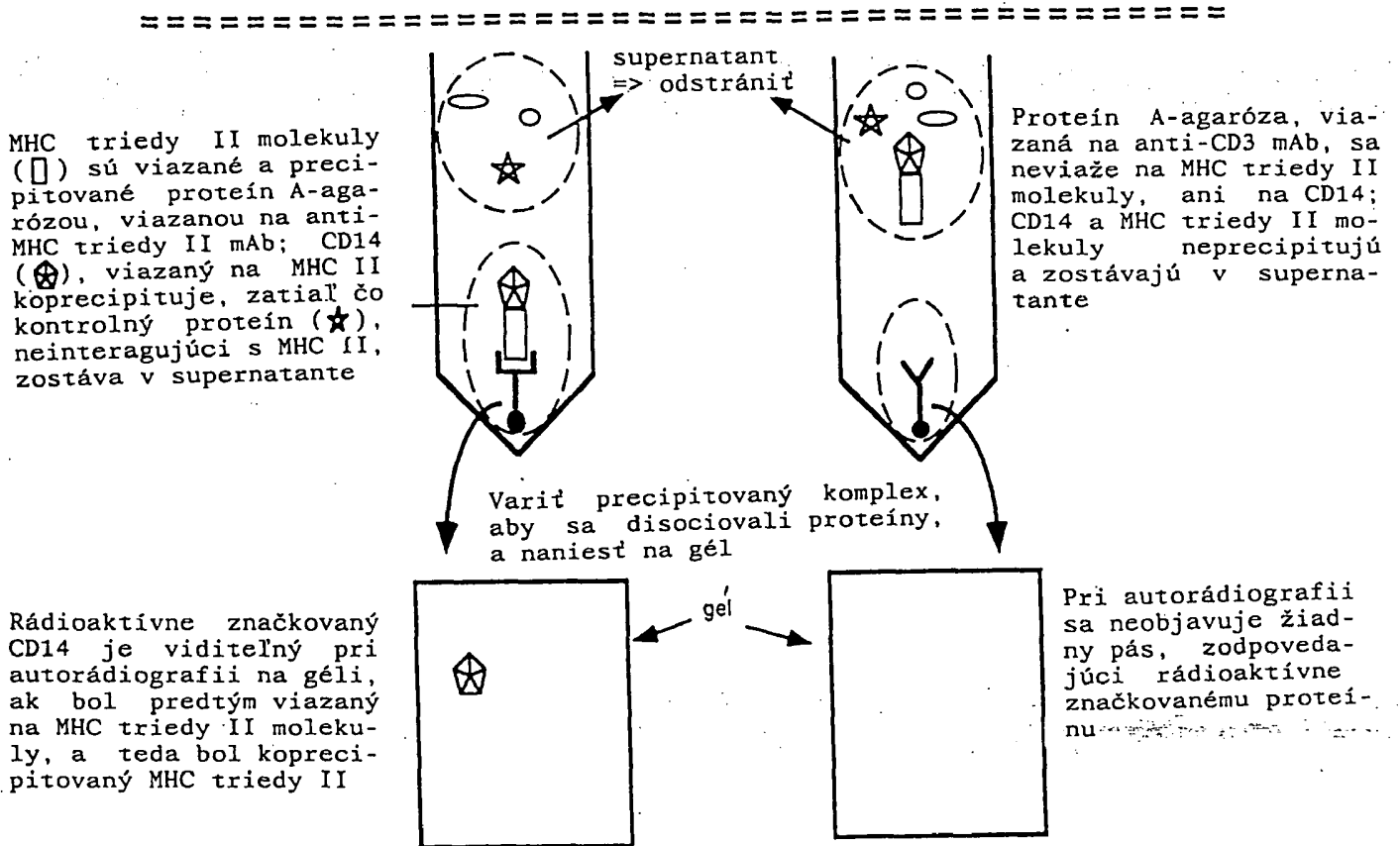


3/7



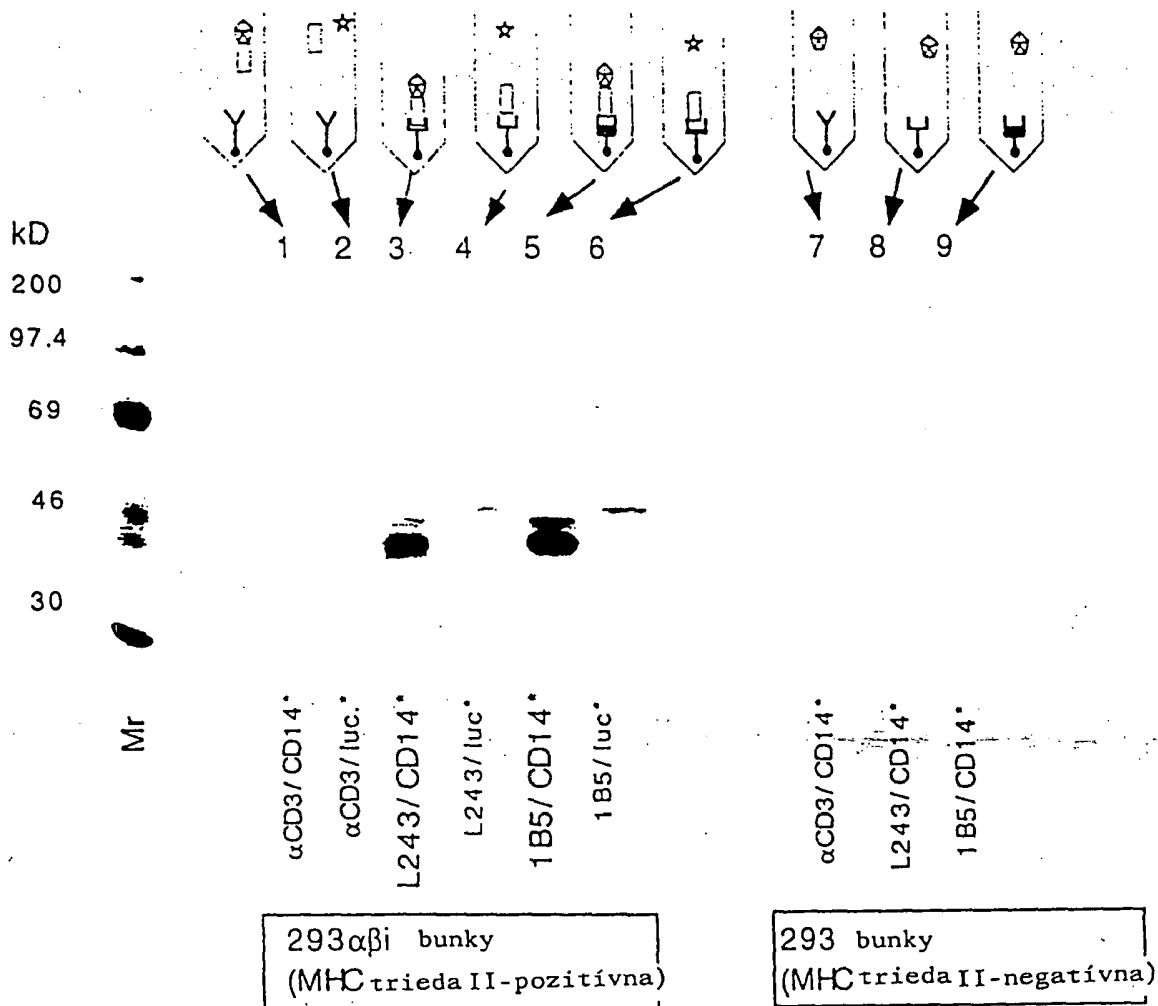
4/7


Koprecipitácia MHC triedy II molekúl a rCD14:
experimentálny prístup





- MHC triedy II molekula
- iné proteíny, neinteragujúce s MHC II alebo CD14
- ⊕ rekombinantný CD14, vytvorený in vitro transkripciou/transláciou a značkovaný rádioaktívnym ³⁵S metionínom
- ☆ rekombinantná luciferáza, vytvorená in vitro transkripciou/transláciou a značkovaná rádioaktívnym ³⁵S metionínom (negatívna kontrola)
- └ anti-MHC triedy II mAb, viazaná k proteín A-agaróze
- └ anti-CD3 mAb (negatívna kontrola), viazaná k proteín A-agaróze


5/7





 MHC triedy II molekula

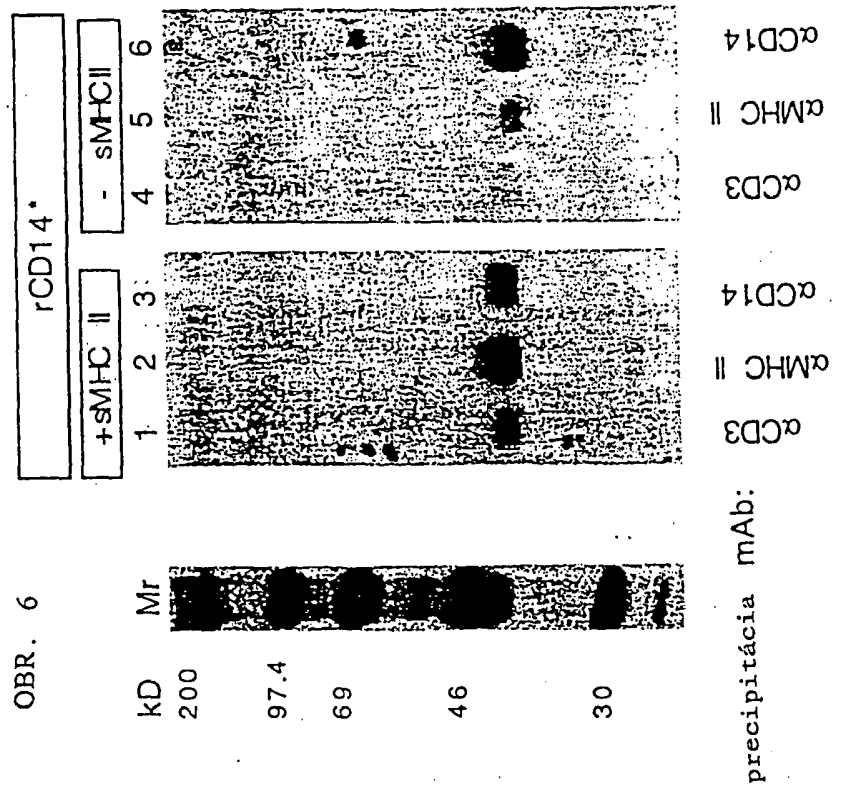
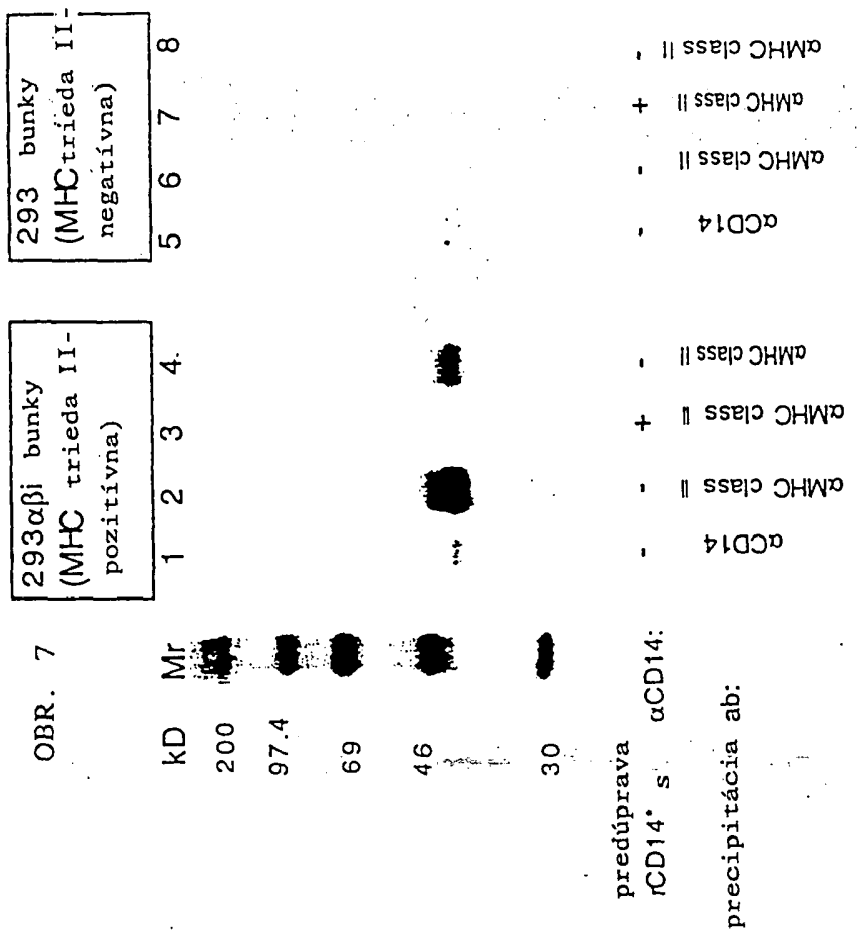
 rekombinantný CD14 (CD14*), vytvorený in vitro transkripciou/transláciou a značovaný rádioaktívnym ³⁵S metionínom

 rekombinantná luciferáza (luc.*), vytvorená in vitro transkripciou/transláciou a značovaná rádioaktívnym ³⁵S metionínom (negatívna kontrola)

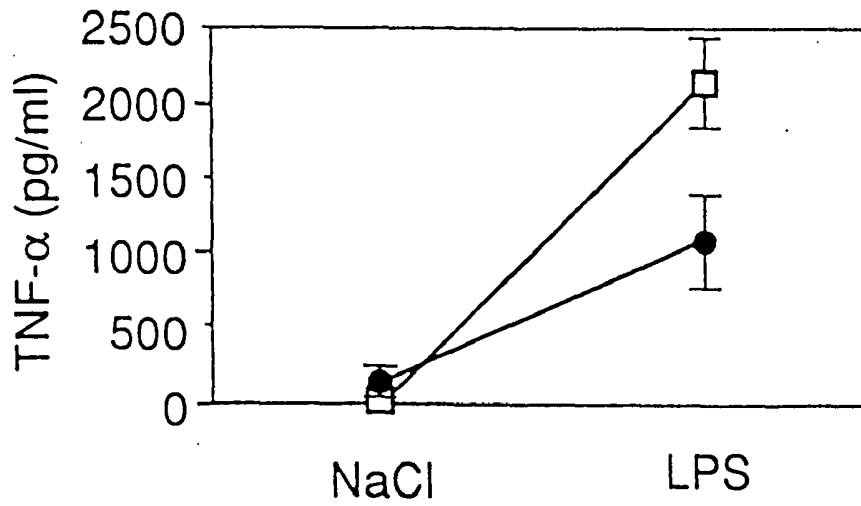
 anti-MHC triedy II mAb (L243)

 anti-MHC triedy II mAb (1B5)

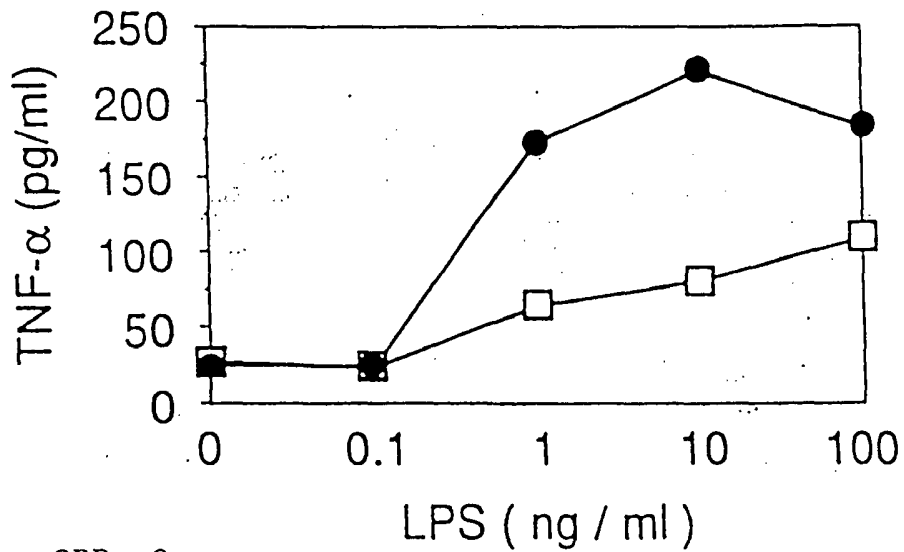
 anti-CD3 mAb (negatívna kontrola)



7/7



OBR. 8



OBR. 9