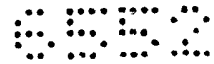


1995.03.14

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



73322

DENDRITIKUS SEJTEK IMMORTALIZÁLÁSA V-MYC ONKOGENNEL

KIVONAT

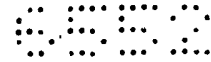
A találmány tárgya immortalizált dendritikus sejtek, eljárás primer tenyészetből történő előállításukra, valamint alkalmazásuk T-limfociták antigén-specifikus módon történő *in vivo* vagy *in vitro* aktiválására.

jellemző adatai

1.1

19503114

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDANY**



Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

DENDRITIKUS SEJTEK IMMORTALIZÁLÁSA V-MYC ONKOGENNEL

Biotop S.A.S. di Rita Cassarin, Milánó, IT

Feltaláló:

GRANUCCI Francesca, Milánó, IT

A bejelentés napja: 1994. 05. 26.

Elsőbbsége: 1993. 05. 31. (MI93A001118) IT

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/01720

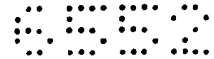
A nemzetközi közzététel száma: WO94/28113

DENDRITIKUS SEJTEK IMMORTALIZÁLÁSA V-MYC ONKOGENNEL

A találmány tárgya immortalizált dendritikus sejtek, eljárás primer tenyészetből történő előállításukra, valamint e sejtek alkalmazása T-limfociták antigén-specifikus módon történő *in vivo* vagy *in vitro* aktiválására.

Az antigén-specifikus immunreakció a T-limfociták, B-limfociták és az antigén-prezentáló sejtek (APC-k) közötti interakciók eredménye. Az antigén által kiváltott immunreakció típusát (sejt-közvetítette citotoxicitás vagy humorális reakciók), és az immun-memória kialakulását az említett sejtek és termékeik közötti interakciók, az interakciók előfordulási helye, valamint az antigén természete befolyásolják. Úgy véljük, hogy az immunrendszer aktiválása és gátlása szintén a fenti tényezők eredménye, mely tényezők, ha nem szabályozottak, autoimmun betegségekhez és tolerancia-indukcióhoz vezethetnek.

Az elsőként Steinman és Cohn által (J. Exp. Med., 137, 1142, 1973) leírt dendritikus sejtek (DC) elszórtan elhelyezkedő leukociták populációját képezik, melyek az immunrendszerben kulcsszerepet játszanak (Steinman, R.M., Annu. Rev. Immunol., 9, 271-196, 1991; Romani, N. és mtsi, Springer Semin. Immunopathol., 13, 265, 1992), mivel ezek a sejtek (i) az antigén-prezentálásban nagymértékben specializáltak; (ii) a nyugvó T-sejtek elsődleges *in vitro* aktivátorai (Inaba, M.D. és mtsi, J. Exp. Med., 160, 858, 1984; Croft,



M. és mtsi. J. Exp. Med., 176, 1431, 1992); (iii) az antigén *in vivo* beadását követően a specifikus T-sejt klónok számára az immunogén epitópok fő forrásai (Inaba, K. és mtsi, J. Exp. Med., 172, 631, 1990; Crowley, M. és mtsi, J. Exp. Med., 172, 383, 1990); és (iv) az *in vivo* primer T-sejt-közvetítette reakciók leghatásosabb iniciátorai (Lechler, R.I. és mtsi, J. Exp. Med., 155, 31, 1982).

Több vizsgálat arra utal, hogy a dendritikus sejtek az aktiváláshoz és a proliferációhoz szükséges összes jellel rendelkező naív T-sejteket produkálnak (Steinman, R.M. és Romani, N. ld. fentebb). Ezeket a jeleket a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekuláiból álló komplexek, illetve az antigén hatású peptidek és a T-sejt receptor közötti interakciók, (Davis, M. és mtsi, Nature, 334, 395, 1988), továbbá a ko-stimulátor molekulák (köztük az antigén-prezentáló sejteken (APC) lévő B7/BB1 molekulák) T-sejt felületen lévő CD28 receptorhoz való kapcsolódása (Young, J.W. és mtsi, J. Clin. Invest., 90, 229, 1992; Nabavi, N. és mtsi, Nature, 360, 266, 1992) képezik. Az első jel önmagában csak az aktivált T-sejtekben vált ki effektor működéseket, s nem képes a naív vagy nyugvó T-sejtek stimulálására, melyek ko-stimulátor jelek nélkül reagálásra képtelen állapotba kerülhetnek (Inaba, K. és mtsi, Science, 229, 475, 1985; Mueller, D.L. és mtsi, J. Immunol., 142, 2617, 1989; Tan, P. és mtsi, J. Exp. Med., 177, 165, 1993). Az utóbbi időben beszámoltak a dendritikus sejteken (DC) lévő B7/BB1 ko-stimulátor molekula expresszáálásáról, s

kimutatták, hogy kulcsfontosságú szerepet játszik a DC-irányított elsődleges T-sejt reakciókban (Larsen, C.P. és mtsi, J. Exp. Med., 176, 1, 1992; Symington, F.W. és mtsi, J. Immunol., 150, 1286, 1993; Liu, Y. és mtsi, Eur. J. Immunol., 22, 2855, 1992).

A dendritikus sejtek hatékony serkentő képességének alapját képező mechanizmusok megértése megvilágítaná a T-sejtek mozgósításának (priming), és az immunreakció beindításának módját. Ezek ismeretében az immunreakciókat nagyon korai stádiumban tudnánk befolyásolni, s biztosíthatnánk az immunitás vagy tolerancia indukálását. A dendritikus sejtek biológiája tanulmányozásának azonban lényeges korlátját jelentette, hogy a különféle szövetekből kevés ilyen sejt állt rendelkezésre, mivel a dendritikus sejtekkel egyértelműen megegyező stabil sejtvonalakat mindezidáig nem sikerült létrehozni.

A dendritikus sejtek fő forrásaként három különböző szövetet alkalmaztak: egérlépet, epidermist (ahol a DC-k Langerhans-sejtekként ismertek), és humán vért. A dendritikus sejtek mindegyik esetben csak kis frakcióját képezik az adott szövetnek: a nyers lépsejt szuszpenzió (Steinman, R.M. és mtsi, J. Exp. Med., 149, 1, 1979) és az epidermális szuszpenzió (Schuler, G. és mtsi, J. Exp. Med., 161, 526, 1985; Romani, N. és mtsi, J. Invest. Dermatol., 93, 600, 1989) kb. 1 %-át, és a perifériás vér egymagvú sejtjeinek 0,1-1 %-át alkotják (Freudenthal, P.S. és mtsi, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA. 87, 7698, 1990). Az utóbbi időben Inaba és munkatársai (J. Exp. Med., 175, 1157, 1992) eljárást irtak le dendritikus sejtek perifériás vér és csontvelő prekurzorokból történő előállítására, de a sejtproliferáció 1-3 héten belül megszűnt.

Egy másik lehetőség, hogy elsődleges tenyészetekből DC sejtvonalakat hozunk létre, és olyan eljárást fejlesztünk ki, amellyel lehetővé válik a dendritikus sejtek immortalizálása. Jelenleg azonban olyan hatásos módszerre van szükség, amellyel a dendritikus sejtekbe genetikai anyagot juttathatunk, és ezáltal elősegíthetjük, hogy olyan genetikai anyagot expresszálnak, amelyet egyébként nem expresszálnak.

E tekintetben Komatsubare és mtsi. (Microbiol. Immunol., 32, (8), 869-875, 1988) kísérletei sikertelenek voltak; egér dendritikus sejtekbe V-SRC és Ha-Ras onkogéneket inszertáltak, de az immortalizált dendritikus sejtek nem rendelkeztek a dendritikus sejtek tulajdonságaival.

Felfedeztünk egy eljárást leukociták fenotípusos és funkcionális jellemzőivel rendelkező sejtvonalak kialakítására, amelyek az immunrendszer sejtei számára antigén hatású peptidek prezentálására, és *in vivo* és *in vitro* specifikus immunreakciók indukálására képesek. Közelebbről, a találmány tárgya antigén-prezentáló sejtek (APC), mint például a dendritikus sejtek (DC)

immortalizálása olyan exogén genetikai anyag bevitelével, amelyet ezek a sejtek normális esetben nem expresszálnak, és amely a transzfektált vagy infektált sejtek korlátlan sejtnövekedésének (immortalizáció) kialakítására képes, anélkül, hogy befolyásolná a sejtek antigén-prezentáló funkcióját.

A találmány szerinti immortalizált antigén-prezentáló sejt exogén genetikai anyagot tartalmaz, illetve expresszálja azt.

Az antigén-prezentáló sejtek, különösen a dendritikus sejtek immortalizálására képes genetikai anyag lehet

- 1) olyan RNS vagy DNS, amely az antigén-prezentáló sejtben normálisan jelen lehet, azonban nem expresszálódik olyan szinten, hogy biológiailag jelentős lenne;
- 2) az antigén-prezentáló sejtben normálisan jelenlevő RNS vagy DNS, amely nem expresszálódik olyan szinten, hogy biológiailag jelentős lenne, de úgy módosítottuk, hogy az antigén-prezentáló sejtekben, különösen a dendritikus sejtekben expresszálódjon;
- 3) antigén-prezentáló sejtben, és különösen dendritikus sejtben normálisan hiányzó RNS vagy DNS, vagy kombinációik, melyek az antigén-prezentáló sejtekben, és különösen a dendritikus sejtekben való expresszió szempontjából hasznosak.

Az antigén-prezentáló sejteket, és különösen a dendritikus

sejteket immortalizálni képes genetikai anyag lehet

- bármely fajú vírus, retrovírus, illetve vírus vagy retrovírus komplexum vagy ezek részei;
- vírusokból vagy retrovírusokból származó bármilyen RNS vagy DNS, vagy ezek kombinációi, vagy rekombinációjukból származó RNS vagy DNS;
- bármilyen, spontán vagy génszűrészetileg módosított virális vagy retrovirális eredetű RNS vagy DNS, vagy ezek kombinációi.

A genetikai anyag (RNS, DNS vagy kombinációik vagy módosításaik) az alábbi hordozókba inszertálhatók:

- vektorok;
- expressziós vektorok;
- az eredeti virális vagy retrovirális genomtól eltérő DNS;
- genetikai markereket tartalmazó vektorok, mely markerek azon sejtek szelektálásához alkalmazhatók, amelyekben a genetikai anyag inszertálódott.

Általában a különböző elemek összeállítási sorrendje nem kritikus jelentőségű, így a gén inszerciója előtt a szegélyező régiókat először egy markert vagy egyéb régiókat, például enhancer-eket, transzkripció szabályozó régiókat, stb. magában foglaló replikációs rendszerhez köthetjük. A különböző fragmentek összehozásához alkalmazott eljárás számos, például az összeállítás egyszerűségével, a restriktációs helyek kiválasztásával, az alkalmazott szelektációs módszerekkel, az adott fragmentek

hozzáférhetőségével, stb. kapcsolatos tényezőtől függ, melyek megválasztása végső soron a szakember feladata.

A genetikai anyag lehetővé teszi a közvetlenül a primer tenyészetből (amelyben a dendritikus sejtek egy kis populációt képviselnek) származó antigén-prezentáló sejtek immortalizációját, anélkül, hogy különösebb szelekciós eljárásra lenne szükség.

A fentebb leírt eredmények megvalósítását lehetővé tevő exogén genetikai anyag a v-myc onkogént tartalmazó retrovírus vektorokból származik. A retrovírus vektort előnyösen két retrovírus (melyek közül legalább az egyik v-myc onkogént tartalmaz) együttes transzfektálásával nyerhetjük.

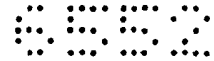
A találmány egy speciális megvalósítási módjában az exogén genetikai anyag egér-eredetű kódoló retrovírus szekvenciával fuzionált madár-eredetű retrovírus onkogént tartalmaz; közelebbről, a madár onkogén az MH₂ madár retrovírusból (T. Graf és mtsi, Biochim. Biophys. Acta, 516, 269-299, 1982) és az egér AKR retrovírusból (R. Risser és mtsi, Ann. Rev. Genet., 17, 85-121, 1983; R. Weiss és mtsi, "RNA Tumor Viruses", Cold Spring Harbor, 2. kiadás, 1985) származó env protein részletével fuzionált mutált v-myc gén. Amint az 1/A ábrán látható, az MH₂ és AKR retrovírusokat együttesen egér makrofágokba transzfektáljuk (ld. Righi és mtsi, Oncogene, 4, 223-230, 1989). Eredményül olyan sejtvonalat kapunk,

amely azonos típusú sejtek immortalizációjára képes retrovírus komplexet (3RV) termel (Righi és mtsi, Eur. J. Immunol., 19, 1443-1448).

Ha ezzel a retrovírus komplexszel agyi makrofágokat fertőzünk, az N11 sejtvonálhoz jutunk, amely a VN11 vírust termeli (Righi és mtsi, Oncogene, 6, 103-111, 1991), amely képes a makrofágok immortalizációjára (L. Pirami és mtsi, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 7543-7547, 1991). Az N11 sejtvonalat 1993. május 12-én a Budapest Szerződés értelmében 93051207 deponálási számon a European Collection of Animal Cell Cultures-nél (Salisbury) helyeztük letétbe.

A VN11 vírus közvetlenül dendritikus sejtek immortalizálására alkalmazható, vagy olyan vektorba klónoozható, amellyel retrovirális vektorokat termelő "packaging" ("csomagoló") sejtvonalak transzfektálhatók, mely retrovirális vektorok viszont dendritikus sejtek transzfektálására alkalmasak.

A dendritikus sejtek transzfektálását úgy valósíthatjuk meg, hogy "packaging" sejtekkel együtt tenyésztjük őket. A találmány értelmében alkalmazható "packaging" sejtvonalak példái a psi2 sejtvonál (ld. "Experimental Manipulation of gene expression", szerk.: M. Inouy, 155-173. old., 1983; és R. Hann és mtsi, Cell, 33, 153-159, 1983); és a psi2 egy egyenértékű származéka, a psi am, melyet R. Clone és mtsi. írtak le (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6349-6353), és az



American Type Culture Collection-nél (Rockville, MD, USA) CRL 8859 deponálási számon helyeztek letétbe.

A találmány szerinti, transzfekcióhoz alkalmazott genetikai anyag az envAKR egér retrovírus szekvencia részletével fuzionált, mutált v-mycMH2 gént tartalmazza (EMBL Database No. Z 26309).

Az antigén-prezentáló sejtek találmány szerinti immortalizálási eljárása, melynek során az említett rekombináns onkogént alkalmazzuk, bármely más celluláris vagy retrovirális onkogénre is kiterjeszhető.

Mivel a gének retrovírus vektor alkalmazásával vihetők be a dendritikus sejtekbe, a retrovírus vektor kontrollja alá kerülhetnek — ilyen esetben a kérdéses gén transzkripciója retrovírus promoterről indul. A promoter egy olyan specifikus nukleotid-szekvencia, amelyet számos transzkripciós faktor felismer, hogy az RNS-polimeráz komplexek számára lehetővé váljon az RNS-szintézis elindítása. A retrovírus vektorok úgy alakíthatók ki, hogy a rekombináns retrovírus promoterén kívül rendelkezzenek egyéb promoter elemekkel is, amelyek a gén transzkripciójáért felelősek. A vektort például külső faktorok által modulált promoter inszertálásával módosíthatjuk, ami lehetővé teszi, hogy a tenyészethez a külső faktorokat hozzáadva szabályozhassuk a dendritikus sejtek által termelt polipeptid szintjét.



Az ilyen vagy más külső tényezők által befolyásolt promoter beépítésével lehetővé válik a génebeszeti úton módosított dendritikus sejt polipeptid-termelésének szabályozása.

Az exogén genetikai anyag bevitelével létrehozott, találmány szerinti sejt vonalak, egyéb tulajdonságaik mellett, rendelkeznek a antigén-prezentáló sejtek jellemzőivel, és képesek az immunrendszer sejtjeit, mint pl. a T-limfocitákat aktiválni.

A találmány szerinti előnyben részesített antigén-prezentáló sejt a dendritikus sejt. A fenti leírásnak megfelelően, a dendritikus sejtekbe exogén genetikai anyagot vittünk be: a találmány céljainak megfelelő dendritikus sejtek (DC) a csontvelőből, perifériás vérből, köldökzsinór vérből, epidermiszből (Langerhans sejtek) származó DC, a germinális központokból származó follicularis és interstitialis DC, és a nyirokszervek összekapcsolódó dendritikus sejtjei. A szöveti eredet a találmányt illetően nem korlátozó jellegű.

Az e sejtekbe bevitt genetikai anyag a dendritikus sejtek immortalizációját (korlátlan sejtnövekedését) eredményezi, és úgy módosítható, hogy más termék termelődjön és/vagy expressziója az aktiválás után konstitutív vagy indukálható legyen. A bevitt genetikai anyag terméke bármilyen, szekretált vagy a sejtmembránban kihorgonyozott polipeptid lehet, például antigén vagy rokon peptid, limfokin vagy membránprotein.

A fenti genetikai anyag ezenkívül egyéb, az immunrendszer aktiválására képes sejttípusokba is bevihető. például makrofágokba vagy olyan sejtekbe, amelyek eredetileg nem képesek az immunrendszer aktiválására, de módosítással vagy indukcióval elérhető a megfelelő hatás.

A találmány egy további tárgya eljárás egy organizmus immunrendszerének egy előre meghatározott immunreakció kialakítására történő indukálására, melynek során a találmány szerinti sejtvonalakat alkalmazzuk.

A találmány szerinti sejtvonalak *in vitro* bármilyen antigénnel "feltölthetők", és az alábbi előnyökkel alkalmazhatók:

1) Képesek a T-limfociták *ex vivo* aktiválására: a "naív" vagy antigén-specifikus T-limfociták antigénnel feltöltött dendritikus sejtvonallal (mint antigén-prezentáló sejttel) együttes tenyésztése az antigén-specifikus T-limfociták mozgósítását és szaporodását eredményezi. Ez különösen jelentős olyan antigének esetében, amelyek *in vivo* nem alakítanak ki védő hatású immunreakciókat (pl. tumorantigének vagy patogének, mint pl. vírusok, gombák és intracelluláris paraziták) vagy amelyek nem kívánatos mellékhatásaik miatt *in vivo* nem alkalmazhatók. A dendritikus sejtvonalak alkalmazásával aktivált és szaporított antigén-specifikus T-limfociták visszavihetők az eredeti organizmusba (adoptív transzfer), ahol kialakítják a

kívánt immunreakciót.

2) Közvetlenül *in vivo* alkalmazhatók a gazda kívánt antigén-specifikus T-limfocitáinak aktiválására; a sejt-vakcinálás e típusa különösen előnyös olyan esetekben, amikor az antigén organizmusba történő bevitele nem kívánatos, vagy amikor a patogén már jelen van az organizmusban, vagy amikor az érett antigén (peptid-MHC komplex) alkalmasabb a vakcináláshoz, mint a teljes, szolubilis patogén.

3) Immunológiai memóriát képesek kialakítani, mivel képesek a nyugvó T-sejtek mozgósítására, illetve memória T-sejtek indukálására *in vivo*; ez különösen lényeges a sejt-vakcinálás esetében. E vonatkozásban a találmány szerinti sejtvonalak természetes adjuvánsoknak tekinthetők.

4) I. vagy II. osztályú MHC molekulával kapcsolódni képes antigénekkal tölthetők fel, attól függően, hogy milyen típusú immunreakcióra van szükség. Ha patogének (mint pl. vírusok vagy intracelluláris baktériumok) antigén-determinánsait kódoló géneket transzfektálunk a dendritikus sejtvonalakba, termékeik elsősorban I. osztályú MHC molekulákkal kapcsolódnak; ezzel szemben, ha a dendritikus sejtvonalakat patogénekből (mint pl. vírusokból vagy intracelluláris baktériumokból) származó tisztított vagy rekombináns proteinekkal töltjük fel, e proteinek elsősorban a II. osztályú MHC molekulákkal kapcsolódnak. Ezen a módon

lehetővé válik, hogy a dendritikus sejt vonalak feltöltési módjától függően, a (sejt-közvetítette vagy antitest-közvetítette) immunreakciót az antigénnel előre feltöltött dendritikus sejt vonal valamelyik típusával *in vivo* irányítsuk.

5) Nem I. vagy II. osztályú MHC-dependens antigének elleni antigén-specifikus immunreakciók indukálására is képesek (mint pl. a CD1 család esetében).

6) Olyan esetekben, amikor az immunrendszer nem képes a kívánt reakciót kialakítani, a dendritikus sejtek felhasználhatók specifikus T-helper sejt szubpopulációk (mint pl. T_H1 vagy T_H2) indukálására.

7) Olyan génekkel módosíthatók, amelyek az immunreakciót modulálni képes termékeket expresszálnak (pl. a citokin gének). Ezek a gének olyan promoter/enhancer elemek kontrollja alatt állnak, amelyek a membrán-receptorok és a ligandumok között interakciót követő specifikus jelölő utakon (signaling pathway) keresztül indukálhatók.

8) Úgy módosíthatók, hogy emberekbe juttatva ne legyenek életképesek, például oly módon, hogy egy faktortól, tenyésztési körülménytől vagy emlősökben eredetileg nem található molekulától tesszük őket függővé.

Az ábrák rövid leírása

Az 1/A ábrán az MIB-psi2-N11 retrovírus vektor előállításának vázlata látható.

Az 1/B ábrán az MIB-psi-N11 retrovírus vektor részleges restriktációs térképét, valamint a találmány szerinti CB1 sejtvonal v-myc-MH2 madár génhez való specifikus próbával végzett Northern analízisének eredményét mutatjuk be (A: CB1 sejtek; B: pozitív kontroll). A nyilak genom-méretű, illetve genomnál kisebb méretű virális transzkriptumokat jelölnek.

A 2/A ábrán a CB1 és D2SC/1 dendritikus sejtklónok antitest-sorozat alkalmazásával végzett FACS-analízisének eredményeit mutatjuk be, melyeket az idevonatkozó irodalomban leírt friss dendritikus sejtek eredményeivel hasonlítunk össze.

A 2/B ábrán a CB1 sejtek 2A1 antitest (A) és M342 antitest (B) alkalmazásával végzett immun-hisztokémiai analízisének eredményét mutatjuk be, amit a vonatkoztatási kontrollokkal hasonlítunk össze (B, ill. D).

A 3. ábrán az immortalizált dendritikus klón növekedési görbéjét mutatjuk be.

A 4/A ábrán az MLR (kevert limfocita reakció) vizsgálat, a 4/B ábrán antigén-specifikus T-limfocita aktiválási

vizsgálat eredményeit mutatjuk be.

Az 5. ábrán a FITC-vel (A), illetve DNBS-sel (B) módosított sejtek által indukált kontakt szenzitivitást (CS) mutatjuk be.

Primer szövettényészetekben, melyekben az antigén-prezentáló sejtek a kiindulási anyag csak kis hányadát képezik, az antigén-prezentáló sejtekbe, és különösen a dendritikus sejtekbe exogén genetikai anyag transzdukálható, amely funkcionális antigén-prezentáló sejtek, és különösen funkcionális dendritikus sejtek folytonos sejtvonalának kialakítására alkalmas (a találmány céljainak megfelelő dendritikus sejtek a csontvelőből, perifériás vérből, köldökzsinór vérből, epidermiszből (Langerhans sejtek) származók, a germinális központokból származó follicularis és interstitialis dendritikus sejtek, és a nyirokszervek összekapcsolódó dendritikus sejtjei). A primer tenyészeteket lépsejt-szuszpenziókból készíthetjük. A tenyészetek rendszerint sokféle sejttípusból álló heterogén elegyek, mely sejttípusok mindegyike korlátozott számú generációig indukálhatók szaporodásra. A primer sejtek így megkülönböztethetők az ősi transzformációs esemény (vagy más, a tenyészetben folyamatos vagy korlátlan szaporodást eredményező mutáció) eredményeként immortalizált sejtvonalaktól. Körülbelül három hét után (és mindenféle szelekció nélkül) proliferáló sejteket izolálhatunk és folytonos sejtvonalakat alakíthatunk ki, amelyek tovább



klónoozhatók.

Az immortalizáció RNS- vagy DNS-konstrukcióból álló genetikai anyaggal valósítható meg, amely — a transzformációs képesség biztosítása érdekében — legalább egy onkogént foglal magában, mely onkogén származhat virális vagy celluláris genomból, illetve emlős vagy madár kromoszomális DNS-ből. Általában, egy alkalmas célsejt akut onkogén retrovírussal történő megfertőzése onkogén transzformációt eredményez. Bár az onkogenezishez vezető mechanizmus nem teljesen tisztázott, számos virális onkogént (v-onc), illetve celluláris homológjaikat (melyek proto-onkogén vagy c-onc néven ismertek) osztályozták. Több mechanizmust is felvetettek, melyekkel a proto-onkogének transzformáló képességre tehetnek szert; ezen mechanizmusok közé tartozik az erős virális promoterek által történő szabályozás, a génkópia amplifikálás, virális enhancer szekvenciák alkalmazása, az átrendeződés (rearrangement) és a mutáció. A találmány céljaira megfelelő onkogének közé tartozik minden olyan genomiális anyag, amely lényegében homológ a primer antigén-stimuláló sejtek transzformálására képes onkogén szekvenciákkal. A potenciális transzformáló genomiális anyagok példáiként Bishop és mtsi. ("RNA Tumor Viruses, szerk.: Weiss és mtsi, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1. kötet, 1004-1005. old., 1984) és Watson és mtsi. (Molecular Biology of the Gene, Benjamin Cummings, Menlo Park, CA; 4. kiadás, 1037. old.) által felsorolt onkogének említhetők. Az ismert onkogének közé tartozik az

src, yes, abl, fps, fes, erbB, fms, ros, kit, mos, raf, H-ras, K-ras, sis, myc, myb, fos, ski és erbA. Több onkogén terméke homológoknak tűnik növekedési faktorokkal, növekedési faktor receptorokkal, illetve olyan sejtmagi proteinekkel, amelyek hatásait úgy utánozhatjuk, hogy az onkogének termékeit a sejttenyészethez adjuk. Sok onkogén nyerhető letétbe helyezett biológiai anyagok mindenki számára hozzáférhető gyűjteményeiből.

A sejtek immortalizálásához különböző retrovírusok kombinációi, köztük az *in vitro* spontán rekombinációval létrehozott hibrid retrovírusok, vagy olyan retrovírusok alkalmazhatók, melyekben géneket fuzionáltunk és fúziós termékeket alakítottunk ki. Ezek az események Righi és mtsi. (Oncogene, 4, 233-230, 1989) és Blasi, E. és mtsi. (Nature, 318, 667-669, 1985) leírt eljárások szerint, és az "RNA Tumor Viruses"-ban (szerk.: Weiss és mtsi, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985) leírt mechanizmus alapján myeloid sejtek retrovírusokkal végzett fertőzésével valósíthatók meg.

A fenti eljárások korlátozó tényezője az a tény, hogy a transzdukált genetikai anyag nem karakterizált, és ha egyszer beviszik a célsejtbe, ott utód vírusokat képes létrehozni. Ezek a sajátságok különösen kellemetlenek olyan esetekben, amikor a kapott sejtvonalat egy organizmusba kell injektálni.

Találmányunkkal megoldjuk ezeket a problémákat; a dendritikus sejtek immortalizációjára képes provírusok egyikét molekulárisan *in vitro* lambda fágban klónoztuk. A teljes vírus genomot és az egér sejtéből (amelybe a provírust eredetileg klónoztuk) származó szegélyező régiókat tartalmazó inszertet pUC18 plazmidba klónoztuk. A retrovirális genetikai elemek baktériumokban történő — transzfekció előtti — amplifikálásához alkalmas plazmidvektorokat úgy alakítjuk ki, hogy egy fentebb leírt retrovirális DNS-szekvenciát egy vagy több szelektálható markert és baktérium gazdasejthez (pl. *E. coli*, de más baktériumok is alkalmazhatók) való replikációs kezdőhelyet tartalmazó vektorba inszertálunk. Ennek megfelelően, egy előnyös emlős/baktérium ingázó (shuttle) vektor tartalmazhat egy szelektálható markert és egy bakteriális replikációs kezdőhelyet, amely a jól ismert pBR322 klónozó vektor (ATCC 37017) genetikai elemeit tartalmazó szokványos plazmidokból származik. A kialakított rekombináns retrovírusnak képesnek kell lenni a fertőzött gazdasejt kromoszomális DNS-ébe integrálódni, de az integráció után nem replikálódhat (hogy ne hozzon létre fertőzőképes vírust), kivéve, ha a sejt, amelybe a rekombináns retrovírust bevittük, tartalmaz egy másik provírus inszertet, amely funkcionálisan aktív transz-működésű vírus proteineket kódol. A p316 plazmidot psi sejtekbe ("packaging" sejt vonal) (Mann és mtsi, Cell, 33, 153, 1983) transzfektáltuk, amelyek korlátozott ekotropizmust biztosítanak. A transzfekciót bármely alkalmas módon végezhetjük, például mikroinjektálással, DEAE-dextrán-

-közvetítette transzfekcióval, kalcium-foszfát kicsapásos DNS-transzfekcióval és elektroporációval (ld. Bonerji. J. és mtsi. Cell. 33, 729-740. 1983; Graham. F.L. és Van der Eb. A.J., Virology, 52, 456-467. 1983; és Potter. H. és mtsi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 7161-7165, 1984). A transzfektált "packaging" sejtvonal által termelt vírusrészek korlátozott tropizmussal megfertőzhetik a dendritikus sejteket, lehetővé téve azok *in vitro* proliferációját és a sejtvonalak ezen sejtszármazékok közül való izolálását.

A defektív retrovírusok immortalizálják a fertőzött dendritikus sejteket, a későbbiekben azonban nem szaporodnak tovább. A találmány szerint alkalmazni kívánt retrovírusok számos madár és emlős gazdából származhatnak. Az alkalmazás feltétele azonban, hogy a vírus képes legyen megfertőzni a retrovírusok alkalmazásával transzdukálni kívánt új genetikai anyag recipienseinek szánt sejteket. A retrovírusok példái közé tartoznak a madár retrovírusok, mint pl. madár erythroblastosis vírus (AMV), madár leukosis vírus (ALV), Fujinami sarcoma vírus (FuSV), lép nekrozis vírus (SNV) és Rous sarcoma vírus (RSV); a szarvasmarha leukémia vírus (BLV); a macska retrovírusok, mint pl. macsak leukémia vírus (FeLV) vagy macska sarcoma vírus (FeSV); az egér retrovírusok, mint pl. egér leukémia vírus (MuLV), egér emlőtumor vírus (MMTV) és egér sarcoma vírus (MSV); a patkány sarcoma vírus (RaSV); a főemlős retrovírusok, mint pl. humán T-sejt lymphotróp vírus 1 és 2 (HTLV-1 és -2) és

majom sarcoma vírus (SSV). A szakemberek számára számos egyéb alkalmas retrovírus ismert. A retrovírusok rendszertanát illetően ld. Teich, "RNA Tumor Viruses", (szerk.: Weiss és mtsi, Cold Spring Harbor Laboratory, 2. kiadás, 1-16. oldal, 1985). A retrovírusok korlátozott ekotropizmusának problémája az elektroporációval, protoplaszt sejtfúzióval vagy kalcium-foszfátos precipitációval célsejtekbe transzfektálható klónozott virális genom alkalmazásával megoldható.

A találmány szerinti sejtvonalakat például úgy alakíthatjuk ki, hogy a szelektálatlan dendritikus sejteket az env AKR egér retrovírus szekvencia (Risser, R. és mtsi, Ann. Rev. Genet., 17, 85-121, 1983) egy részével fuzionált, mutált v-mycM_{H2} madár onkogénnel (Graf, T., Biochim. Biophys. Acta, 516, 269-299, 1982) fertőzzük. Az env AKR egér retrovírus szekvencia a makrofág-eredetű N11 sejtvonalban található, és a VN11 vírust termeli (Righi és mtsi, Oncogene, 6, 103-111, 1991), amely képes a makrofágok immortalizálására (Pirami, L. és mtsi, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 7543-7547, 1991). Az N11 sejtvonalat a Budapest Szerződés értelmében, 93051207 deponálási számon, 1993. május 12-én a European Collection of Animal Cell Cultures-nél (Salisbury, Nagy-Britannia) helyeztük letétbe.

A VN11 vírust közvetlenül dendritikus sejtek immortalizálására használhatjuk, vagy "packaging" vektorokba transzfektálható vektorba klónozzhatjuk. Az utóbbi esetben a

dendritikus sejteket e "packaging" sejtekkel együtt tenyésztve (vagy azok felülúszójával) fertőzzük.

Például, a TN5 transzpozonból származó neo génnel együtt megfelelő plazmidvektorba klónozott VN11 vírus genomját a psi sejtvonalba transzfektálva MIB-psi2-N11 elnevezésű retrovírus vektort kaptunk.

A plazmidvektor hagyományos módszerekkel alakítható ki, pl. oly módon, hogy N11 sejtek DNS-könyvtárának HindIII-EcoRI fragmentjeit pUC18-ba klónozzuk, a kapott konstrukciókkal HB101 *E. coli* sejteket transzformálunk, és a mycMH2 gén egy fragmentjéből származó jelölt próbával hibridizálva screenelést végzünk.

A dendritikus sejteket MIB-psi2-N11 retrovírus vektorral fertőzhetjük, vagy a vírustermelő psi sejtekkel (psi2-N11) együttesen tenésztethetjük. Az együttes tenyésztés egyik példajaként, a vírust termelő psi sejtvonalat 37 °C-on kb. két órán keresztül szérum nélküli RPMI 1640 tápközegben 5 ug/ml mitomycin C-vel kezelhetjük. A psi sejteket 10 centiméteres csészében mitomycin C-vel kezeltük, és több alkalommal DME tápközeggel mostuk. A lépsejt-szuszpenziót a csészére szélesztettük, kb. 24 óráig rajta hagytuk, majd óvatos pipettázással levettük, és egy másik Petri-csészébe szélesztettük.

Retrovírus vektorok

A retrovírus vektor előállításának részletes leírását ld.: Mulligan, R.C., "Construction of Highly Transmissible Mammalian Cloning Vehicles Derived from Murine Retroviruses". Experimental Manipulation of Gene Expression, szerk.: M. Inouye, 155-173. old., 1983; Mann, R. és mtsi, Cell, 33, 153-159, 1983; Williams, D. A. és mtsi, Nature, 310, 476-480, 1984; (e leírásokat hivatkozásul említjük).

A Mulligan és munkatársai által leírt psi2 sejt vonalat NIH 3T3 fibroblasztokat pMOV-psi- klónnal (amely egy ekotróp Moloney egér leukémia vírus [Mo-MuLV] klón) transzfektálva állítottuk elő. A pMOV-psi a vírus genom "enkapszidációjához" szükséges egyetlen szekvencia kivételével valamennyi virális génterméket expresszálja. A pMOV-psi egy ekotróp virális envelope proteint is expresszál, amely csak egér- (és közeli rokon rágcsáló-) sejteken jelenlévő receptort ismer fel.

Egy másik sejt vonal a módosított pMov-Psi- genommal rendelkező NIH Psi am, amelyben az ekotróp envelope glikoprotein helyett a 4070A amfotróp vírustól származó envelope szekvenciák találhatók, miáltal szélesebb amfotróp gazdakörrel rendelkező rekombináns vírust termelő sejt vonal jön létre.

A virális genomot tartalmazó plazmid ráadásul a "packaging"

psi sejt vonalba történő transzfecció előtt más fajból származó exogén genetikai anyaggal módosítható, és azután vihető be a dendritikus sejtbe. A bevitt genetikai anyagok genetikai marker vagy szelekciós gének lehetnek, amelyek intracelluláris membrán-kötött vagy szekretált polipeptideket kódolnak, lehetővé téve az immortalizált dendritikus sejtek azonosítását és szelektálását. A genetikai anyag tartalmazhat továbbá szabályozó szekvenciákat vagy az mRNS termékek stabilizálására képes szekvenciákat, mint pl. néhány messenger RNS 3' transzlátlan régióját vagy intron régiókat. A domináns szelektálható marker bármilyen antibiotikum-rezisztencia fenotípus lehet, pl. neo (G418-rezisztencia), hygro (hygromycin-rezisztencia) vagy gpt (mikofenolsav-rezisztencia) gén, melyek azzal a feltétellel alkalmazhatók, ha az immortalizálni kívánt dendritikus sejtek forrásaként alkalmas donort választunk ki. Az ilyen szelektálható markerek széles körben hozzáférhetők. A vektorba inszertálható egyéb hasznos genomiális anyagok közé tartoznak az olyan géntermékek, amelyek a környezettől (amelyben transzlálódnak) függő értékkel, illetve alkalmazhatósággal rendelkeznek; ilyenek például a virális, bakteriális vagy tumorsejt antigének, vagy a biológiailag aktív molekulák, mint pl. az antigén processing polipeptidek, citokinek, hormonok, növekedési faktorok, valamint a felsoroltak receptorai és homológjai, illetve bármilyen, szövetspecifitással rendelkező polipeptidek.

Az eredeti MIB-psi2-N11 vektorba bevihetők olyan gének is, amelyek protein antigéneket, az azokból származó peptideket, valamint szekretált limfokineket vagy membránproteineket (pl. MHC proteineket) kódolnak.

Az MIB-psi2-N11 vektor alkalmazásával több dendritikus sejtklont immortalizáltunk, és közülük kettőt, melyeket CB1-nek és D2SC/1-nek neveztünk el, széles körűen karakterizáltunk, és példaként írtunk le. A találmány egyik megvalósítási módjában a dendritikus sejtek tápláló (feeder) rétegeként közös tenyészetben alkalmazott fibroblaszt sejtvonal a VN11 vírust termelő Psi am sejtvonal.

Újszülött DBA/2 (CB1 sejtek) és BALB/C egerek (D2SC/1 sejtek) lépsejt-szuszpenzióját az MIB-psi2-N11 retrovírus vektorral fertőztük, és a megfertőzés után körülbelül 2-4 héttel göcöket figyeltünk meg, és a proliferáló sejteket (a tapadó aggregátumoktól elkülönítve) klónoztuk. Ezek a sejtek jellegzetesen rétegszerű ("sheet-like") folyamatokat mutatnak, szembeötlő mozgékonyág mellett, amit más leukociták nem mutatnak. Az immortalizált sejtvonalak becsült kétszereződési ideje kb. 20 óra.

Felületi vagy intracelluláris markerekre specifikus antitestek segítségével két klont (CB1 és D2SC/1) karakterizáltunk részletesen.

A dendritikus sejtvonalakból származó sejtvonalak esetében a

CD11c molekulát felismerő N418 antitest (Metlay és mtsi, J. Exp. Med., 171, 1753-1771, 1990), az M342 antitest (Agger és mtsi, K. Leukoc. Biol., 52, 34-42, 1992) és a 2A1 antitest alkalmazható. A fentiek, illetve más specifikus markereket felismerő sok egyéb antitest alkalmazásával kimutattuk, hogy a CD sejtvonalak sok, a Langerhans sejtekre (De Paufilis és mtsi, J. Invest. Dermatol., 93, 60-69, 1989) és a dendritikus sejtekre (Inaba, K. és mtsi, J. Exp. Med., 176, 1963-1702, 1992) leírt tulajdonsággal rendelkeznek.

A dendritikus sejtek serkentő aktivitása részben a B7/BB1 membránprotein jelenlétével függ össze, amelyet több antigén-prezentáló sejt típuson azonosítottak (Linsley, P. S. és mtsi, J. Exp. Med., 173, 721-730, 1991; Linsley, P. S. és mtsi, Science, 257, 792-795, 1992), és úgy tartjuk, hogy MLR (kevert limfocita reakció) vizsgálatokban kulcsfontosságú az érintetlen T-limfociták proliferációjának indukálásában, és a CD4 markert expresszáló limfociták antigén-specifikus proliferatív reakciójának (Larsen, C.P. és mtsi, J. Exp. Med., 176, 1215-1220, 1992) indukálásában. A B7/BB1 expresszióját például áramlásos citofluorimetriával mérhetjük. Az eredmények azt mutatják, hogy a dendritikus sejt klónokban a B7/BB1 konstitutívan expresszálódik.

A dendritikus sejtek serkentő működése a primer MLR-ben (Steinman, R.M. és mtsi, J. Exp. Med., 157, 613-617, 1983) ezen sejtek jellemző sajátossága. A CB1 sejtvonal MLR-típusú allogén reakcióban *in vitro* a limfociták primer

proliferatív reakciójának indukcióját serkenti.

A dendritikus sejtek további funkcionális tulajdonsága, hogy antigén-specifikus módon képesek serkenteni az antigénnel való első érintkezést követően aktivált T-limfocitákat és az érintetlen T-limfocitákat (Romani, N. és mtsi, J. Exp. Med., 169, 1169-1178, 1989; de Brujin, M.L.H. és mtsi, Eur. J. Immunol., 22, 2347-2352, 1992; Croft, M., J. Exp. Med., 1765, 1431-1437, 1992).

A találmány szerinti sejtvonalak adjuváns hatás nélkül *in vivo* primer antigén-specifikus reakció indukálására alkalmazhatók. A dendritikus sejteket — az antigénnel előbb *in vitro* érintkezésbe hozva — *in vivo* adhatjuk be.

A dendritikus sejtek természetes antigén (például bálna sperma mioglobinja) feldolgozására, és ezen antigénre specifikus T-klón számára történő prezentálására képesek.

A dendritikus sejtek sejt-közvetítette reakciók, például kontakt-szenzitivitás (Sullivan, S. és mtsi, Immunol., 137, 2460-2467, 1986), allogén transzplantátumok graft kilökődése (Lechler, R. I. és mtsi, J. Exp. Med., 155, 31, 1982; Larsen, C.P. és mtsi, J. Exp. Med., 172, 1483, 1990), az MHC-korlátozás alatt álló T-limfociták aktiválása (Inaba, K. és mtsi, (J. Exp. Med., 172, 631, 1990), és T-limfociták által közvetített antitestek (Sornasse és mtsi, J. Exp. Med., 175, 15-21, 1992) indukálására is képesek.

A kontakt-szenzitivitás (CS) a késői típusú immunreakció egy sajátos fajtája, amely akkor fordul elő, ha az organizmust epikután szinten immunizáljuk, s a reaktív hapténnel azután éri a stimuláció (Sullivan, S. és mtsi, J. Immunol., 137, 2460-2467). A kontakt-szenzitivitás akkor is kimutatható, ha a Langerhans sejteket vagy a dendritikus sejteket *in vitro* a hapténnel konjugáljuk, és szingénikus organizmusba injektáljuk (Macatonia, S.E., Immunology, 59, 509-514, 1986). A FITC vagy DNBS hatásának kitett CE1 sejteket ezután szubkután természetes szingénikus egerekbe injektáljuk, ahol CS típusú elsődleges reakció indukálására képesek. A reakciót az egér fülének (melybe a sejteket injektáltuk) duzzadásával mérjük: CS reakció indukálásához 10 000 sejt szükséges.

Ez a reakció antigén-specifikus, mivel a kezeletlen sejtek nem képesek indukciót kiváltani. A CB1 sejtek az érintetlen T-limfociták *in vivo* aktiválására képesek. A találmány szerinti sejtvonalak több előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, melyek különösen hasznossá teszik őket.

Például, a CB1 sejtek *ex vivo* antigén-specifikus T-limfociták serkentésére alkalmazhatók. Egy másik lehetőség szerint, ezeket a sejteket a T-limfociták *in vivo* serkentése érdekében élő szervezetbe vihetjük be. Az antigén a sejtekkel együtt, vagy azoktól elkülönítve adható be, illetve (patogének esetében) már eredetileg jelen lehet az organizmusban. A CB1 sejtek további előnye, hogy az

antigénnel *in vitro* azelőtt tölthetők fel, hogy a sejteket *in vivo* bevinnénk az organizmusba. ezáltal sokkal kevesebb antigén alkalmazására van szükség, és lehetővé válik az antigén *in vitro* feldolgozása, anélkül, hogy szolubilis proteinként *in vivo* injektálására lenne szükség.

A találmány szerinti sejtvonalak további előnye, hogy az antigén önmagában vagy egy vagy több adjuvánssal együttes injektálásával kiváltott immunreakcióktól eltérő immunreakciók indukálására alkalmazhatók, azaz segítségükkel T-helper limfocita szubpopulációk (mint pl. TH₁ és TH₂) indukálhatók.

A provirus molekuláris klónozásának előnye, hogy génszabványos módszerekkel végzett módosításokat tesz lehetővé, és retrovirális vektorokat alkalmazhatunk.

A találmány szerinti sejtvonalak olyan komponensek vagy termékek izolálására alkalmazhatók, amelyek az antigén-prezentáló sejtek (különösen a dendritikus sejtek) kis száma miatt (azon szervezetben, amelyekben jelenlétük bizonyított) általában nem férhetők hozzá.

Az alábbi példákat a találmány további szemléltetéseként írjuk le, anélkül, hogy annak tárgykörét korlátozni szándékoznánk.

A példákban szokványos vagy a tudományos irodalomban leírt

sejteket alkalmaztunk. A sejteket általában 2 mM β -merkapto-
-etanolt és 10 %, hővel inaktivált magzati borjúsérumot
tartalmazó RPMI tápközegben, 5 % CO₂-ot tartalmazó
párásított atmoszférában 37 °C-on tenyésztettük.

Rekombináns DNS eljárások

Ahol lehetséges, analitikai tisztaságú reagenseket
alkalmaztunk. Ha másképpen nem jelezzük, a folyékony és
szilárd tápközégeket Maniatis, T. és mtsi. (Molecular
Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., 1982;
a továbbiakban "Maniatis") által leírtak szerint állítottuk
elő.

Immunológiai vizsgálati technikák

A vizsgálatokhoz analitikai tisztaságú reagenseket
alkalmaztunk. Ha másképpen nem jelezzük, a sejttenyésztéshez
alkalmazott tápközégek, pufferek és mosóoldatok
előállítását, illetve az egyéb eljárásokat Coligan, J. E. és
mtsi. leírása ("Current Protocols in Immunology", J. Wiley
and Sons Inc., Media, PA, USA, 1992; a továbbiakban
"Coligan") alapján végeztük.

1. példa

Az N11 sejtvonalból pUC18 plazmidban, ismert eljárások
szerint (Maniatis) genom DNS-könyvtárat készítettünk. A

könyvtár screeneléséhez, és a próba "nick" transzlációval történő előállításához használt eljárások ismertek (Maniatis). A genom DNS-fragmentek HindIII és EcoRI enzimekkel végzett emésztéssel kialakított ligálási termékét az exogén genetikai anyag beépítéséhez kompetenssé tett HB101 *E. coli* törzs transzformálásához alkalmazott eljárással linearizált pUC18 plazmidba inszertáltuk (Maniatis).

A sejteket ampicillint tartalmazó szilárd LB agar táptalajra szélesztettük, olyan hígításban, hogy különálló telepeket kapjunk.

37 °C-on 18 óráig végzett növesztés után a telepeket nitrocellulóz filterre (Schleicher és Schuell Co.) vittük. A filtereket szárítottuk, mostuk, és vákuum alatt 70 °C-on kezeltük (Maniatis). Az előhibridizációt és a pMH2Hd plazmidban lévő myc-MHz génfragmentből származó jelölt próbával végzett hibridizációt Maniatis eljárása szerint végeztük.

A filtereket, megfelelő mosás után, megszáritottuk, és röntgenfilmekre exponáltuk, melyeket 12-24 óra múlva hívtunk elő. A screenelés után a másolati filteren azonos helyen pozitívnak talált telepeket izoláltuk, és ampicillint tartalmazó LB agar táptalajra szélesztettük, hogy olyan telepeket kapjunk, melyek bizonyosan egyetlen transzformált sejtől származnak.



A kapott telepeket a fentivel megegyező második szelekciós ciklusnak vetettük alá. A második screenelési ciklusban gyakorlatilag valamennyi telep pozitív jelet adott. Ezek egyikét választottuk ki a további vizsgálathoz, melyet p316-nak neveztük el.

Az inszertet Sanger eljárása alapján, kereskedelmi úton beszerezhető reagensek alkalmazásával a gyártó útmutatásai szerint teljesen megszekvenáltuk.

2. példa

Az MIB-psi2-N11 retrovirális vektort termelő sejtvonala előállítás

A p316 plazmidba klónoztott VN11 vírus genomot a TN5 transzpozonból származó, és a G418 neomicin-analóggal szemben rezisztenciát biztosító neo génnel együtt psi sejtvonalba transzfektáltuk. Ez a sejtvonala (a vírusrészecskében termelt RNS beépüléséhez információkat tartalmazó) exogén genetikai anyaggal transzformálva fertőzőképes vírusrészecskéket képes kialakítani. A transzformált klónokat először G418 antibiotikum jelenlétében növekedési kapacitásra, majd a v-myc-MH2 génre specifikus próba alkalmazásával a VN11 provírus által kódolt genom RNS jelenlétére szelektáltuk. Az így kapott retrovirális vektort MIB-psi2-N11-nek neveztük el.

3. példa

Dendritikus sejtvonalak kialakítása

Újszülött DEA/2 vagy BALB/C egerekből (Charles River, Olaszország) a vörösvérsejtek ammónium-kloriddal végzett lizisével (a vörösvérttesteket ismert eljárással [Caligan] eltávolítva) lépsejt-szuszpenziókat készítettünk. A sejteket 10 % FCS-sel (Gibco), glutaminnal, penicillinnel, sztreptomocinnal és 0,5 mM β -merkaptó-etanollal kiegészített RPMI-1640 tápközegben (Sigma) szuszpendáltuk, és 10^6 sejt/ml sűrűségben 35 mm átmérőjű Petri-csészékbe szélesztettük. Az immortalizációt a MIB-psi2-N11 retrovírus vektorral végeztük, oly módon, hogy a vírustermelő sejtvonalt 24 órás szubkonfluens tenyészetének 10 μ g/ml polibrént (Sigma) tartalmazó komplett tápközeggel 1:1 arányban hígított felülszóját 0,22 μ steril filteren (Nalgene) szűrtük. 5 % CO₂-ot tartalmazó inkubátorban, 37 °C-on 1 óráig végzett inkubálás után a tenyészethez 1/2 térfogatnyi friss tápközéget adtunk, s a tápközéget hetente kétszer rendszeresen cseréltük. A fertőzés utáni első héten a sejteket 10 % L929.6C-vel kiegészített tápközeggel tápláltuk, a következő két héten az L929.6C mennyiségét 5 %-ra csökkentettük, majd fokozatosan elhagytuk.

A fertőzés után 20-30 nappal a Petri-csészékben az osztódó sejtek több góciát figyeltük meg. A sejtvonalt 20 passzálás után tekintettük stabilnak, majd határhígítással 96 üregű lemezre szélesztettük, és klónoztuk.



4. példa

Notrhern blot analízis

A CB1 sejtekből származó mRNS-ek és egy pozitív kontroll Northern blot analízisét korábban leírt specifikus myc MHz próba alkalmazásával végeztük (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 7546, 1991). A myc MHz 3'-próba csirke genom-könyvtárból származik, és a madár myc gén 3'-régióját reprezentálja, amely nem kereszt-hibridizálódik az egér myc génekkel.

5. példa

A dendritikus sejtvonalak immunhisztológiai vizsgálata

A CB1 és D2SC/1 klónt a dendritikus sejtek felületi, illetve intracelluláris markereire specifikus antitestek (mint pl. az N418, CD11c és anti-B7 antitestek) segítségével karakterizáltuk részletesebben (az antitestek leírása megtalálható a fentebb említett hivatkozásokban). Az antitesteket ismert eljárások (Coligan) alkalmazásával biotinnal jelöltük. Röviden: 10^6 sejtet szobahőmérsékleten 15 percig 10 % egér vagy patkány (nem immun-) szérumot tartalmazó PBS-ben inkubáltunk, majd a tápközeget biotinnal jelölt primer antitestet tartalmazó, 0,1 % (m/V) BSA-val (Sigma) kiegészített PBS-sel helyettesítettük, és a mintát 30 percig 4 °C-on inkubáltuk. A sejteket ezután 0,1 % (m/V) BSA-t tartalmazó PBS-sel (PBS/BSA) háromszor mostuk, és 4 °C-on 30 percig sztreptavidin/fikoeritrin (Boehringer) tartalmazó PBS/BSA oldatban a gyártó útmutatásai szerint

inkubáltuk.

A sejteket lézer-impulzusos áramlásos citofluorimetriával (FACSort, Beckton & Dickinson) analizáltuk; az elpusztult sejteket propidium-jodiddal előkezelve, adatanalízis segítségével távolítottuk el.

I. TABLAZAT

Publikált dendritikus lépsejt felületi markerek
összehasonlítása a CB1 és D2SC/1 sejtvonallal

Antigén	Crowley és mtsi. 1989. (Steinman)	Vremec és mtsi. 1992. (Shortman)	Agger és mtsi, 1990.	D2SC/1	CB1
MHCI	++	++++	+++	D +++ K n.d. L (AP+++)	D + K n.d. L (AP+++)
MHCII	+++	++++	+++	I-A ++ I-E ++	I-A ++ I-E ++
CD8 α	-/+++*	\pm /+++*	-/+*	\pm	\pm
IL2-R α	\pm	-	\pm	-	-
CD28	n.d.	n.d.	n.d.	++	++
B7	n.d.	n.d.	n.d.	+	++
CD2	n.d.	+	n.d.	+	+
CD11a (FA-1)	n.d.	n.d.	+	++	++
CD54 (ICAM-1)	n.d.	n.d.	n.d.	+++	+++
C11b (Mac-1)	+	+	+	n.d.	n.d.

I. TABLAZAT (folytatás)

Antigén	Crowley és mtsi, 1989. (Steinman)	Vremec és mtsi, 1992. (Shortman)	Agger és mtsi, 1990.	D2SC/1	CB1
CD11c (N418)	n.d.	n.d.	++	++	++
α4 Integrin (R1-2)	n.d.	n.d.	n.d.	+++	++
CD18	n.d.	n.d.	+++	+++	+++
CD44 (Pgp-1)	++	++++	n.d.	++++	++++
HSA (J11D)	-/+++*	+++	+/+*	+/++++*	+/++++*
B220	-	-	-	-	-
F4/80	±	+	-	++	+
CDw32 (FcγRII)	-	+	-	++	+
FcεRI+II	n.d.	n.d.	n.d.	-	-

- negatív

± < 10 %

+ 10-50 %

++ 50-90 %

+++ > 90 %

++++ 100 % (átlag: a háttérszint több, mint ötvenszerese)

n.d. nem detektált

AP H-2 L korlátozás alatt álló antigén-prezentálás

* két populáció

Agger, R., Crowley, M.T. és Witmer-Pack, M.D., Intern. Rev.

Immunol., 6, 89-101, 1990;

Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M.D. és Steinman, R.M.,
Cellular Immunology, 118, 108-125, 1989;

Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J.,
Ardavin, C.F., Wu, L. és Shortman, K., J. Exp. Med., 176,
47-58. 1992.

6. példa

Immunhisztokémiai analízis

Az intracelluláris markerek analízise érdekében a CB1 sejteket a fentiek szerint steril csészékben növesztettük, majd szobahőmérsékleten 2 percig acetonnal rögzítettük. A sejteket ezután 1 % (nem immun-) egérszérumot tartalmazó PBS-ben, szobahőmérsékleten egy órán keresztül az első antitesttel inkubáltuk, PBS/BSA eleggyel háromszor mostuk, majd patkány immunglobulinok elleni (2A1 antitest) vagy hörcsög immunglobulinok elleni, peroxidázzal jelölt egér antitestekkel (M342 antitest) inkubáltuk. A sejteket ezután, pozitivitásuk értékelése érdekében, diamino-benzidin jelenlétében inkubáltuk.

7. példa

A CB1 sejtek *in vitro* serkentő aktivitásának vizsgálata

A kevert limfocita reakció (MLR) vizsgálatot allogén C57BL/6 egerekből a fentiek szerint nyert lépsejt-szuspenzió alkalmazásával végeztük. Serkentő sejtekként a CB1

dendritikus sejteket vagy az MT2/1 makrofág sejtvonalat (P. Ricciardi-Castagnoli és mtsi, Res. Immunol., 143, 101-106. 1992) alkalmaztuk, melyeket előzetesen polisztirol csövekben 37 °C-on 20 percig 25 µg/ml mitomicin C-vel kezeltünk. Mosás után a serkentő sejteket komplett tápközeggel mostuk, és C57BL/6 egerekből származó 30000 sejt/ml T-sejttel együtt növekvő dózisokban 96 üregű lemezeken szélesztettük. A sejteket 2 µCi/ml ³H-TdR-t tartalmazó komplett tápközegben tenyésztettük. A lépsejt-szuszpenzióból a T-sejteket nylon membránon tisztítva nyertük. A sejteket 72 óráig a fenti körülmények között inkubáltuk, üvegszűrőn szűrtük, és a beépült radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóval (Betaplate, LKB-Wallac) mértük.

Az antigén-prezentálási vizsgálat során előzetesen 100 egység/ml IFN/ -val vagy 200 µg/ml mrGM/CSF-fel aktivált 10000 darab antigén-prezentáló sejthez (CB1), 0,5 µM-tól kiindulva, növekvő dózisú bálna sperma mioglobint (SpWMB) adtuk. Az előaktivált antigén-prezentáló sejteket lapos fenekű, 96 üregű lemezeken 10000 darab 13.26.8 egér T-T hibridoma sejttel (melyet Dr. A. Livingston-tól [Basel Institute for Immunology, Bazel, Svájc] kaptunk) együttesen tenyésztettük. Az antibiotikumokat, glutamint, β-merkaptó-etanolt és 5 % magzati borjúsérumot tartalmazó Iscove tápközegben (Sigma) 24 óráig végzett növesztés után minden egyes üreg felülúszójából 100 µl-t IL-2-dependens HT.2 sejtvonalat tartalmazó 96 üregű lemezekre vittünk, és a felülúszókat MTT-n (Sigma) alapuló kolorimetriás

vizsgálattal. ismert eljárás szerint (Coligan), IL-2 tartalmára vizsgáltuk.

8. példa

A CB1 sejtek *in vivo* T-dependens reakciókat indukáló képességének vizsgálata

A CB1 sejteket Macatonia, S.E. és munkatársai által leírt eljárás (Immunology, 59, 509-514) szerint, 37 °C-on 30 percig 200 µg/ml FITC-vel (Sigma) vagy 1 mg/ml DNB5-tel (2,4-dinitro-benzol-szulfonsav, Eastman Kodak) kezeltük. 250 µl HBSS-ben (Sigma) 10000 darab sejtet szingénikus egerek hátába szubkután injektáltunk. Öt nap múlva a kezelt, illetve (kontrollként) a kezeletlen sejtekkel injektált egereket füleik mindkét oldalán 25 µg FITC-vel vagy 15 µg DNFB-vel kezeltük. A fülek vastagságát közvetlenül a kezelés előtt, és 24, 48 és 72 órával később, mikromérővel mértük.

9. példa

Az MHC génekben deléciós mutációkat tartalmazó MHC-dendritikus sejtváltozatok kialakítása

A tenyésztett sejteket cézium forrásból származó gamma sugárzással (300-1000 rad dózissal) mutagenizáltuk, és I. és II. típusú MHC molekulák elleni antitestekkel, majd Complementtel végzett kezeléssel negatív szelekciót végeztünk.

Moretta és munkatársai által leírt eljárás szerint (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 1654-1658, 1987) lehetőség van arra, hogy citofluorimetriával az MHC gének expresszióját illetően (a besugárzás után) negatív (vagy kétszeresen negatív) változatokat szelektáljunk.

Ezzel az eljárással MHC⁻ (negatív) dendritikus sejt vonalakat nyerhetünk, amelyek a kívánt I. vagy II. osztályú MHC génekkel transzformálhatók. Például, a neo gén cDNS-ét tartalmazó plazmidot lipofektin segítségével dendritikus sejtekbe transzfektáltuk. Ehhez 1×10^6 sejtet 2 ml tenyésztő tápközegben szélesztettünk, amelyhez előzetesen 50 μ l tenyésztő tápközegben 5 μ g DNS-t tartalmazó oldatot adtunk. 16 óra elteltével a tenyészethez további 2 ml tápközéget adtunk, és az inkubálást újabb 48 óra hosszat folytattuk, majd kisselektáltuk a transzfektánsokat.

Alkalmazhatóság

Találmányunkban eljárásokat biztosítunk a T-limfociták antigén-specifikus *in vivo* és *in vitro* aktiválására.

Például, az organizmusból T-sejteket veszünk ki, az adott antigénre specifikus T-sejteket stimuláljuk, majd azokat visszajuttatjuk az eredeti organizmusba, hogy az antigén ellen immunreakciót váltsunk ki. Másrészt, a találmány szerinti sejt vonalakat egy adott antigénnel szenzibilizálhatjuk, és a szenzibilizált sejteket

visszajuttathatjuk az MHC-kompatibilis organizmusba. Találmányunk különösen alkalmas olyan esetekben, amikor az antigén tisztítása bonyolult vagy költséges; amikor az organizmus, amely ellen immunreakciót akarunk kiváltani, veszélyes; ha az ugyanazon organizmussal végzett kezelés mellékhatásokat okoz; és különösen, ha egyébként bonyolult hatásos és hosszan tartó immunreakciót kiváltani.

Szabadalmi igénypontok

1. Immortalizált dendritikus sejtek.

2. Az 1. igénypont szerinti immortalizált dendritikus sejtek, azzal jellemezve, hogy a sejteket v-myc onkogént tartalmazó retrovírus vektorral transzfektáltuk.

3. A 2. igénypont szerinti immortalizált dendritikus sejtek, azzal jellemezve, hogy a sejteket két retrovírus együttes transzfekciójából származó retrovírus vektorral transzfektáltuk, mely retrovírusok közül legalább az egyik v-myc onkogént tartalmaz.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti immortalizált dendritikus sejtek, azzal jellemezve, hogy a sejteket egy retrovirális glikoproteint kódoló részhez fuzionált v-myc onkogént tartalmazó retrovirissal transzfektáltuk.

5. A 4. igénypont szerinti immortalizált dendritikus sejtek, azzal jellemezve, hogy a sejteket az ECACC-nél 93051207 deponálási számon letétbe helyezett N11 egér makrofág sejtvonalból származó onkogén retrovírus vektorral transzfektáltuk.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti immortalizált dendritikus sejtek, azzal jellemezve, hogy a sejteket "packaging" sejtvonalakból származó onkogén retrovírus

vektorral transzfektáltuk.

7. A 6. igénypont szerinti immortalizált dendritikus sejtek, azzal jellemezve, hogy a sejteket az N11 sejtvonal VN11 vírusával transzformált psi2 sejtekből származó onkogén retrovírus vektorral transzfektáltuk.

8. A 7. igénypont szerinti immortalizált dendritikus sejtek, azzal jellemezve, hogy a sejteket onkogén retrovirális vektorként MIB-psi2-N11 vektorral transzfektáltuk.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti immortalizált dendritikus sejtek, azzal jellemezve, hogy a sejtek csontvelőből, epidermiszből (Langerhans sejtek) származó dendritikus sejtek, germinális központokból származó follicularis és interstitialis dendritikus sejtek, illetve nyirokszervek összekapcsolódó dendritikus sejtjei.

10. Eljárás dendritikus sejtek immortalizálására, azzal jellemezve, hogy dendritikus sejtek primer tenyészetét v-myc onkogént tartalmazó retrovírus vektorral transzfektáljuk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a dendritikus sejteket az ECACC-nél 93051207 deponálási számon letétbe helyezett N11 egér makrofág sejtvonalból származó onkogén retrovírus vektorral transzfektáljuk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a dendritikus sejteket az N11 sejtvonaltól által termelt VN11 vírussal transzfektált "packaging" sejtvonallal végzett együttes tenyésztéssel transzfektáljuk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a "packaging" sejtvonalként a psi2 sejtvonalt alkalmazzuk.


14. Az 1-9. igénypontok szerinti dendritikus sejtek alkalmazása az immunrendszer T-sejtjeinek antigén-specifikus és MHC-korlátozta aktiválására.

15. Az 1-9. igénypontok szerinti dendritikus sejtek alkalmazása a specifikus MHC génekkel végzett transzfekcióban az immunrendszer T-sejtjeinek antigén-specifikus és MHC-korlátozta aktiválására.

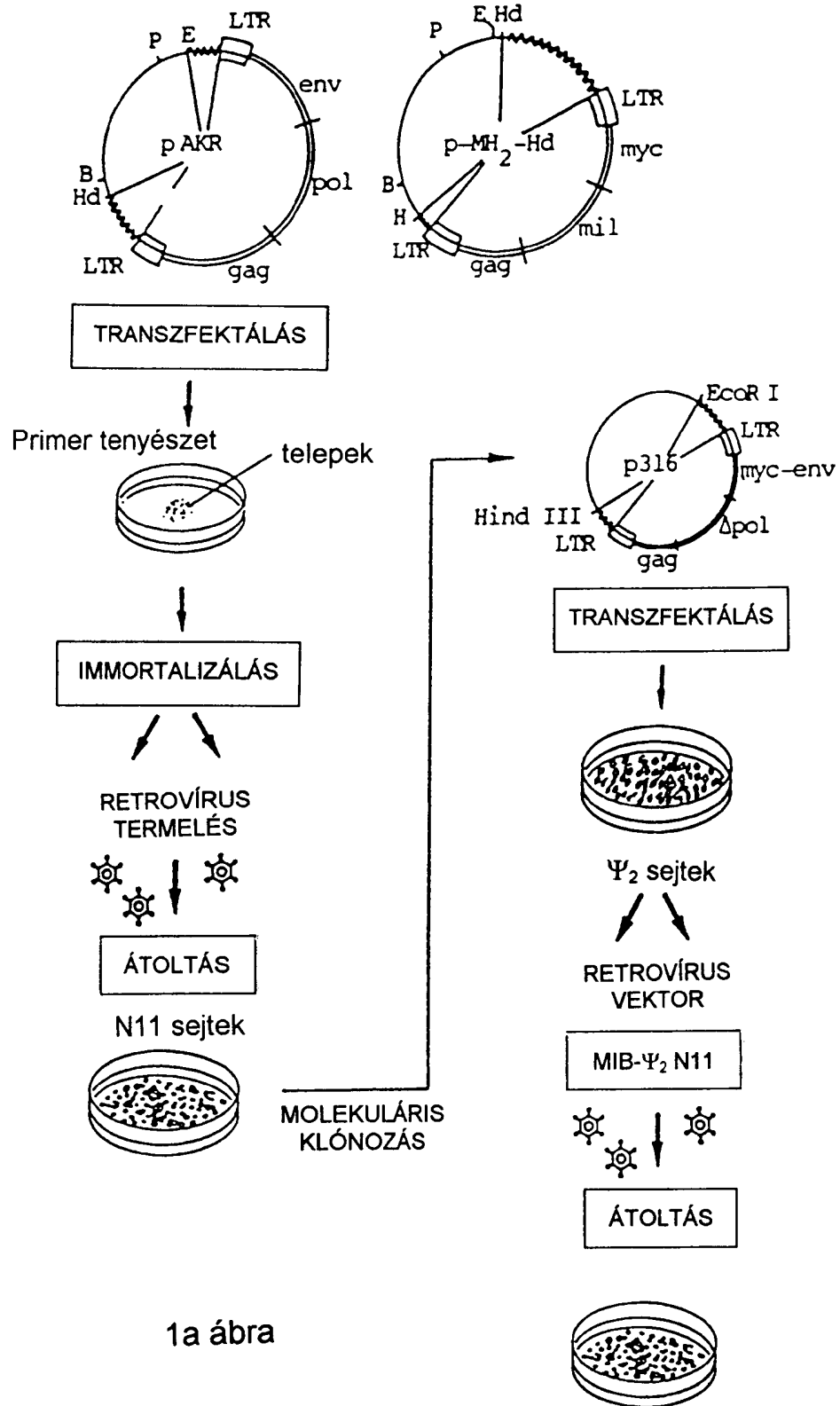
43 oldal
 17 ábrával

 Dr. Cs. Cs.
 J. J.

A meghatalmazott:

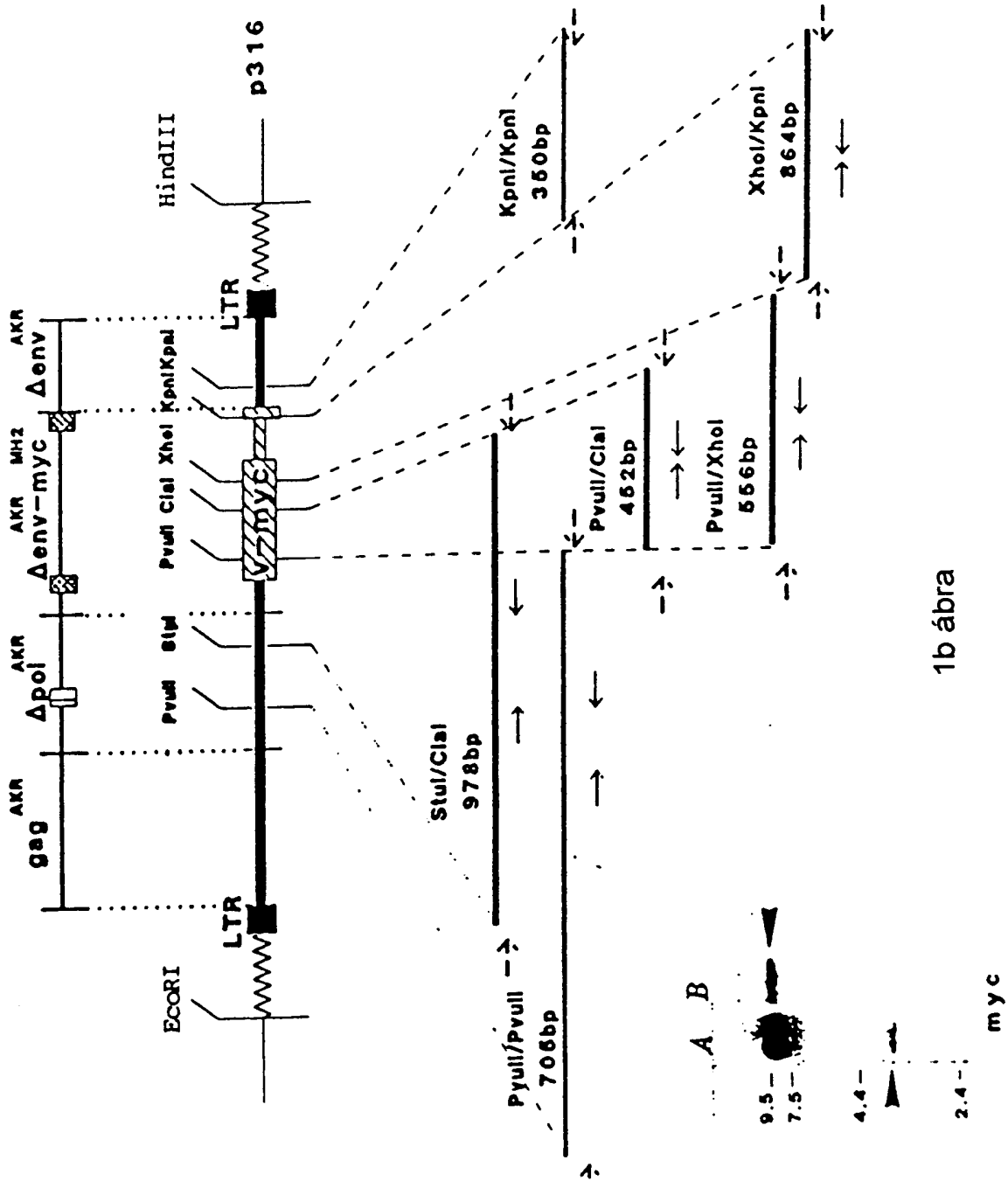
Dr. Cs. Cs.


P 95 03414



1a ábra

P9503414

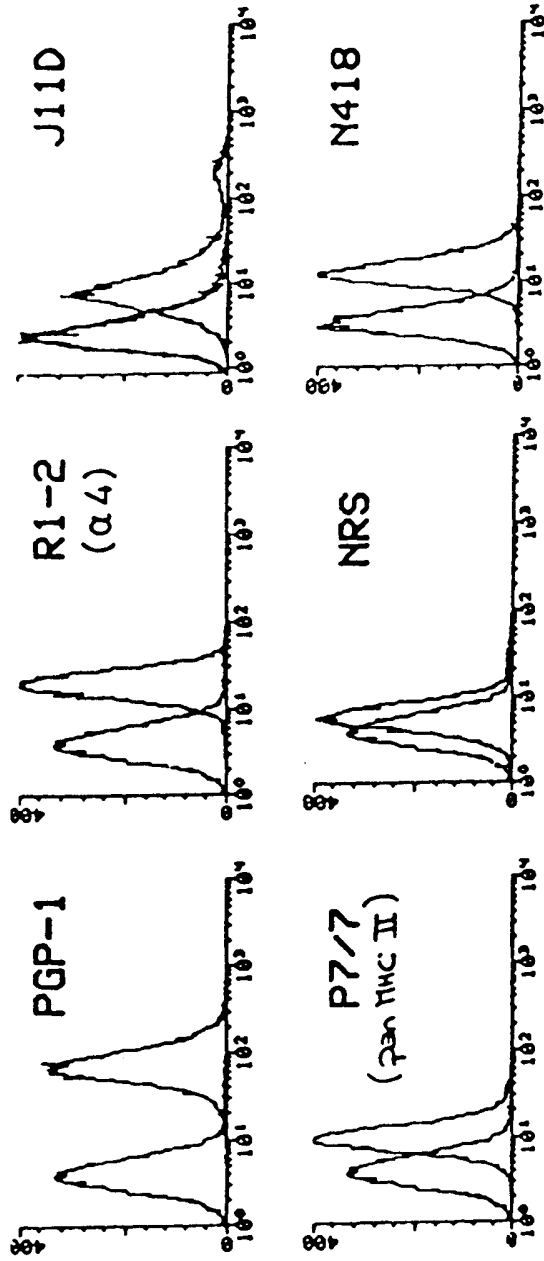


- rekombináns terület
- deléció
- AKR
- MH2
- pUC18
- egér DNS

1b ábra

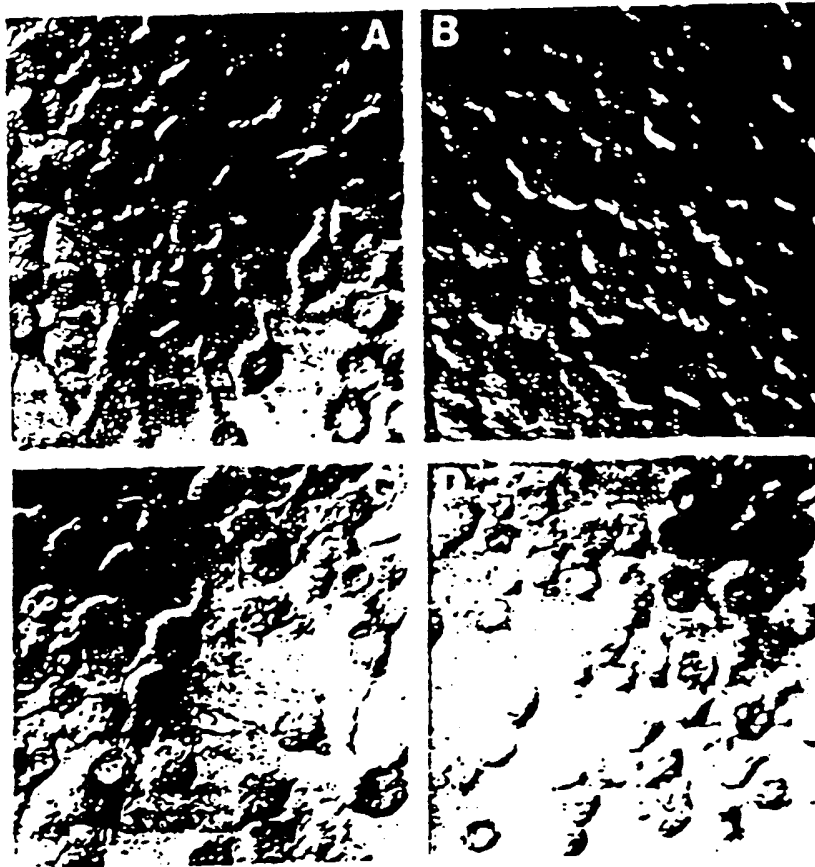


D2SC/1 sejtek FACS elemzése



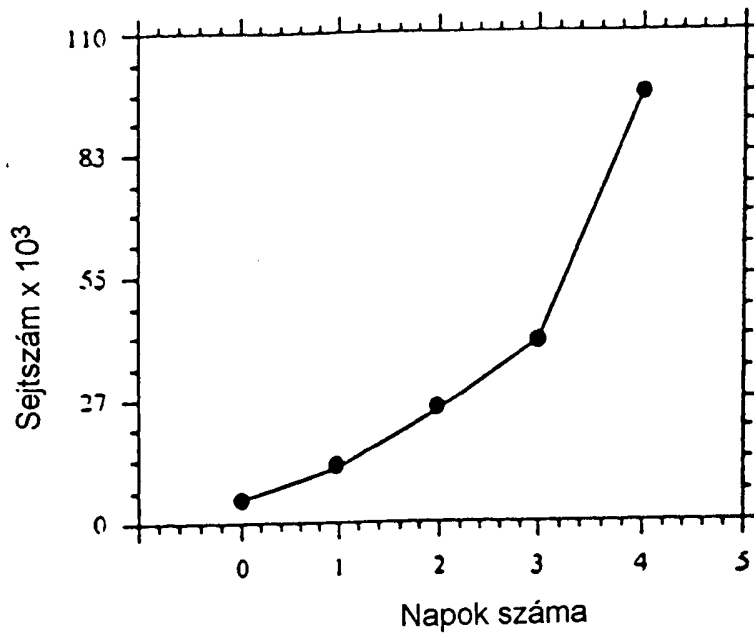
2a ábra

P9503414



2b ábra

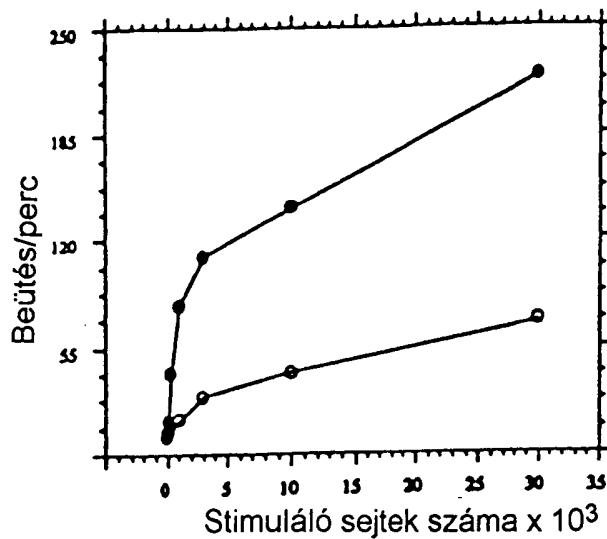
P9503414



3. ábra

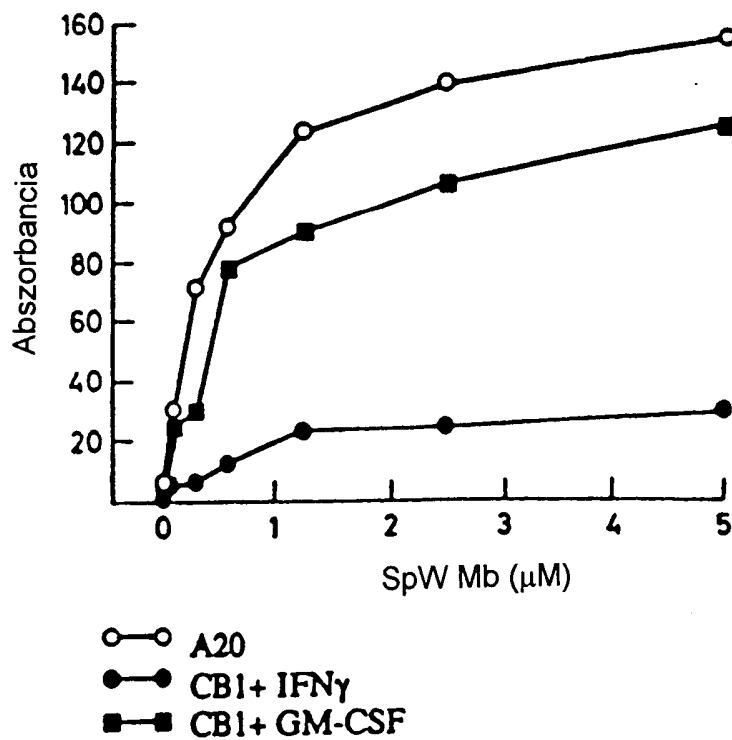
P9503414

MLR: CB1(●) DC, illetve MT2 (○) ∅ mint stimulátor



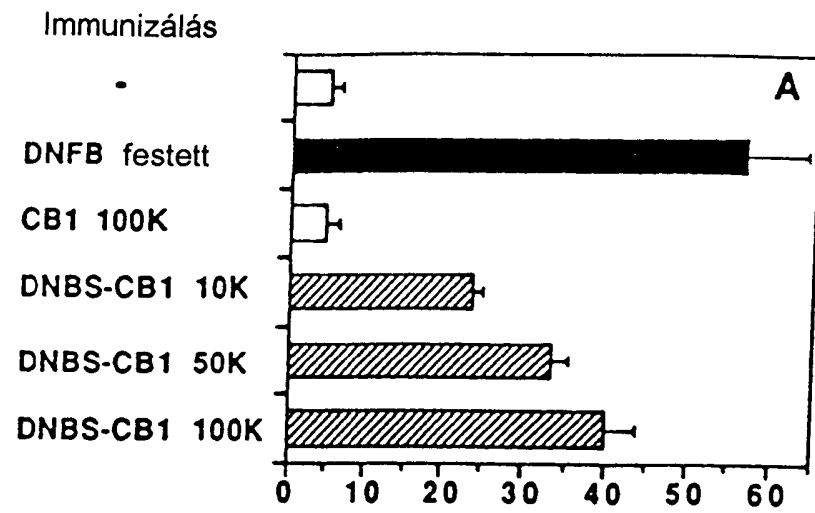
4a ábra

ANTIGÉNPREZENTÁCIÓ

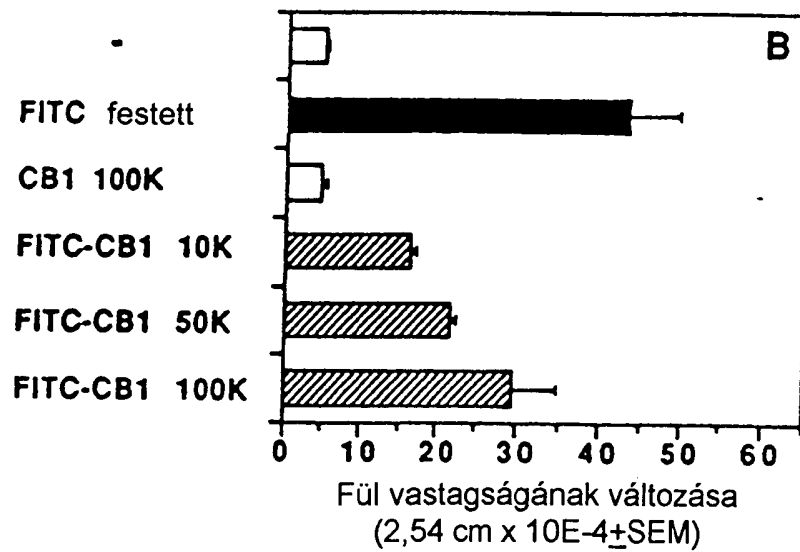


4b ábra

CB1 SEJTEK KONTAKT SZENZITIVITÁS
VÁLASZT INICIÁLNAK



5a ábra



5b ábra