



## ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

## ИЗОБРЕТЕНИЕ

## ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

- (21) Регистров № 100991  
 (22) Заявено на 19.11.96  
 (24) Начало на действие  
 на патента от: 25.04.95

## Приоритетни данни

- (31) 234987 (32) 25.04.94 (33) US

- (41) Публикувана заявка в  
 бюлетин № 1 на 30.01.98  
 (45) Отпечатано на 03.06.99  
 (46) Публикувано в бюлетин № 3  
 на 31.03.99  
 (56) Информационни източници:

- (62) Разделена заявка от рег. №

- (73) Патентоприитежател(и):  
 TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE,  
 HANOVER, NH  
 UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS  
 MEDICAL CENTER, WORCESTER, MA (US)

- (72) Изобретател(и):  
 Randolph J. Noelle, Cornish, NH  
 Fiona H. Durie, Seattle, WA  
 David C. Parker, Portland, OR  
 Michael C. Appel, Golden, CO  
 Nancy E. Philips, Shrewsbury, MA  
 John P. Mordes, Newton, MA  
 Dale L. Grenier, Hubbardston, MA  
 Aldo A. Rossini, Sudbury, MA (US)

- (74) Представител по индустриална  
 собственост:  
 Георги Цветанов Перев, 1124  
 София, ул. "Леонардо да Винчи" 3

- (86) № и дата на PCT заявка:  
 PCT/US95/04832, 25.04.95

- (87) № и дата на PCT публикация:  
 WO95/28957, 02.11.95

**(54) МЕТОДИ ЗА ИНДУЦИРАНЕ НА Т-КЛЕТЪЧНА ТОЛЕРАНТНОСТ КЪМ ТЪКАННА ИЛИ ОРГАННА ПРИСАДКА**

(57) Изобретението се отнася до методи за индуциране на Т-клетъчна толерантност към тъканна или органна присадка в реципиент на трансплантат. Методите включват въвеждане в субект на алогенна или ксеногенна клетка, която експресираща донорни антигени и има върху клетъчната повърхност лиганд, взаимодействащ с рецептор от повърхността на реципиентна Т-клетка, опосредстваща контактзависимата помощна (хелперна) ефекторна функция, и на антагонист на рецептора, който инхибира взаимодействието на лиганда с рецептора. В предпочитано приложение алогенната или ксеногенна клетка е В-клетка, за предпочитане В-клетка в покой, а молекулата от повърхността на Т-клетката, която опосредства контактзависимата помощна функция, е др39. Предпочитан антагонист на др39 е анти-др39 антитяло. Алогенната или ксеногенна клетка и антагонистът на др39 като правило се въвеждат в реципиента на трансплантата преди трансплантацията на тъканта или органа. Методите съгласно изобретението могат да се използват за индуциране на Т-клетъчна толерантност към трансплантати като черен дроб, бъбрек, сърце, бял дроб, кожа, мускул, нервна тъкан, стомах или черво. Изобретението се отнася и до метод за лечение на диабет, включващ въвеждане в субект на алогенни или ксеногенни клетки, експресиращи донорни антигени, на антагонист на др39 и на панкреатични островчета.

**(54) МЕТОДИ ЗА ИНДУЦИРАНЕ НА Т-КЛЕТЪЧНА ТОЛЕРАНТНОСТ КЪМ ТЪКАННА ИЛИ  
ОРГАННА ПРИСАДКА**

За да се индуцират антиген-специфично Т-клетъчно активиране и клонална експанзия, до повърхността на Т-лимфоцитите в покой трябва да достигнат два сигнала, които се обезпечават от антиген-представящите клетки (APCs) (Jenkins, M. Schwartz, R. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 302-319; Mueller, D.L., et al. (1990) *J. Immunol.* 144, 3701-3709; Williams, I.R. and Unanue, E.R. (1990) *J. Immunol.* 145, 85-93). Първият сигнал, който придава специфичност на имунния отговор, се опосредства от Т-клетъчния рецептор (TCR) след разпознаване на чуждия антигенен пептид, представен в контекста на главния комплекс на тъканната

съвместимост (ГКТС). Вторият сигнал, наречен костимулация, индуцира Т-клетките към пролиферация и придобиване на функционалност (Schwartz, R.H. (1990) *Science* 248, 1349-1356). Костимулацията не е нито антиген-специфична, нито зависи от ГКТС, като се смята, че тя се осъществява от една или повече различни клетъчноповърхностни молекули, които се експресират от APCs (Jenkins, M.K. et al. (1988) *J. Immunol.* 140, 3324-3330; Linsley, P.S., et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 721-730; Gimmi, C.D. et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 6575-6579; Young, J.W., et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 229-237; Koulova, L., et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 759-762; Reiser, H., et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 271-275; van-Seventer, G. A., et al. (1990) *J. Immunol.* 144, 4579-4586; LaSalle, J.M., et al., (1991) *J. Immunol.* 147, 774-80; Dustin, M.I., et al., (1989) *J. Exp. Med.* 169, 503; Armitage, R.J., et al. (1992) *Nature* 357, 80-82; Liu, Y., et al. (1992) *J. Exp. Med.* 175, 437-445). Един костимулаторен път, участващ в активирането на Т-клетките, включва молекулата CD28 от повърхността на Т-клетките. Тази молекула може да получи костимулаторен сигнал, предаден от лиганд върху В-клетките или други APCs. Лигандите за CD28 включват членове от фамилията антигени B7, активиращи В-лимфоцитите, такива като B7-1 и/или B7-2 (Freedman, A.S. et al. (1987) *J. Immunol.* 137, 3260-3267; Freeman, G.J. et al. (1989) *J. Immunol.* 143, 2714-2722; Freeman, G.J. et al. (1991) *J. Exp. Med.* 174, 625-631; Freeman, G.J. et al. (1991) *Science* 262, 909-911; Azuma, M. et al. (1993) *Nature* 366, 76-79; Freeman, G.J. et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178, 2185-2192). B7-1 и B7-2 са също лиганди за друга молекула, CTLA4, присъстваща върху повърхността на активирани Т-клетки, въпреки че ролята на CTLA4 в костимулацията е неясна.

Предаването на антиген-специфичен сигнал на Т-клетките заедно с костимулаторен сигнал води до активиране на Т-клетките, което може да включва, както Т-клетъчна пролиферация, така и секреция на цитокини. За разлика от това се смята, че предаването на антиген-специфичен сигнал на Т-клетките в отсъствието на костимулаторен сигнал индуцира състояние на невъзприемчивост или анергия в Т-клетката, при което се индуцира антиген-специфична толерантност в Т-клетката.

Взаимодействията между Т-клетките и В-клетките играят централна роля в имунните отговори. Индуцирането на хуморален имунитет към тимус-зависими антигени изисква "помощ", която се осигурява от Т-клетки-помощници (оттук нататък Th-клетки). Макар че до известна степен помощта, оказвана на В-лимфоцитите, се опосредства от разтворими молекули, които се отделят от Th-клетките (например лимфокини, такива като IL-4 и IL-5), активирането на В-клетките изисква също така контакт-зависимо взаимодействие между В-клетките и Th-клетките. Hirohata et al., *J. Immunol.*, 140:3736-3744 (1988); Bartlett et al., *J. Immunol.*, 143:1745-1754 (1989). Това означава, че активирането на В-клетките включва задължително взаимодействие между молекули от повърхността на В-клетките и на Th-клетките. По този начин молекулата(ите) върху Т-клетката опосредства(т) контакт-зависимите помощни ефекторни функции на Т-клетката. Контакт-зависимото взаимодействие между молекулите върху В-клетките и Т-клетките се потвърждава още от наблюдението, че изолирани плазмени мембрани от активирани Т-клетки могат да осигурят помощни функции, необходими за активирането на В-клетките.

Върху повърхността на незрели и зрели В-лимфоцити беше идентифицирана молекула, CD40, която при кръстосано свързване с антитела индуцира пролиферация на В-клетките. Valle et al., *Eur.*

*J. Immunol.*, 19:1463-1467 (1989); Gordon et al., *J. Immunol.*, 140:1425-1430 (1988); Gruber et al., *J. Immunol.*, 142:4144-4152 (1989). CD40 беше молекулно клонирана и характеризирана. Stamenkovic et al., *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989). Лигандът за CD40, gp39 (наречен още CD40-лиганд или CD40L), също беше молекулно клониран и характеризиран. Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.*, 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992). Белтъкът gp39 се експресира върху активирани, но не и върху почиващи, CD4<sup>+</sup> Th-клетки. Spriggs et al., *J. Exp. Med.*, 176:1543-1550 (1992); Lane et al., *Eur. J. Immunol.*, 22:2573-2578 (1992); Roy et al., *J. Immunol.*, 151:1-14 (1993). Клетки, трансфектирани с гена за gp39 и експресиращи белтъка gp39 върху повърхността си, могат да задействат В-клетъчната пролиферация и заедно с други стимулаторни сигнали да индуцират образуването на антитела. Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992).

#### ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Клетъчноповърхностните молекули, които опосредстват контакт-зависимите помощни ефекторни функции на Т-клетките са важни за индуциране на имунни отговори, които изискват Т-клетъчна помощ. Например, взаимодействието на gp39 върху Т-клетките със CD40 върху В-клетките играе централна роля в активирането на В-клетъчни отговори към антиген. Настоящото изобретение се основава, поне отчасти, на откритието, че клетъчноповърхностни молекули, които опосредстват контакт-зависимите помощни ефекторни функции на Т-клетките, играят също така критична роля в отговора на В-клетките към алоантигените. В частност, беше установено, че ако при определени условия се

възпрепятства взаимодействието на gp39 с лиганд върху алогенната клетка, която представя алоантигени на T-клетката, в T-клетката може да се индуцира толерантност. За предпочитане алогенната клетка, която представя алоантигени на T-клетката, изисква взаимодействие между лиганд на gp39 върху клетката и gp39 върху T-клетката, което да е в състояние да произведе сигнали, необходими за активиране на T-клетката. Инхибиране взаимодействието на лиганда за gp39 върху алогенната клетка с gp39 върху T-клетката пречи на активирането на T-клетките и индуцира по-скоро алоантиген-специфична T-клетъчна толерантност. Индуцирането на T-клетъчна толерантност към алоантигени, както е описано тук, може да се използва като препаративен режим за трансплантация на тъкани или органи.

В съответствие с това методите на изобретението са особено подходящи за индуциране на T-клетъчна толерантност към донорна тъкан или орган в реципиента на тъканта или органа. Методите включват въвеждане в реципиент на трансплантата: 1) на алогенна или ксеногенна клетка, която експресира поне един донорен антиген и която има лиганд върху клетъчната повърхност, която взаимодейства с рецептор от повърхността на реципиентна T-клетка, която опосредства контакт-зависимите помощни ефекторни функции; и 2) на антагонист на молекулата от повърхността на реципиентната T-клетка, която опосредства контакт-зависимите помощни ефекторни функции. Антагонистът инхибира взаимодействието между молекулата върху T-клетката и нейния лиганд върху алогенната или ксеногенна клетка.

В предпочетено приложение рецепторът върху повърхността на реципиентната T-клетка, която опосредства контакт-зависимите помощни ефекторни функции, е gp39. В това приложение антагонистът е молекула, която инхибира взаимодействието на gp39

върху Т-клетка с лиганд за gp39 върху алогенна или ксеногенна клетка. Особено предпочитан антагонист на gp39 е анти-gp39 антитяло. В друго приложение антагонистът на gp39 представлява разтворима форма на лиганд за gp39, например разтворим CD40. Предпочита се алогенната или ксеногенна клетка, която се въвежда в реципиента, да бъде лимфоидна клетка, например В-клетка. Като алтернатива алогенната или ксеногенна клетка представлява малка В-клетка в покой. Алогенната или ксеногенна клетка и антагонистът (напр., анти-gp39 антитяло) обикновено се въвеждат в реципиентния субект преди трансплантацията на тъканта или органа в субекта. Например, лимфоидни клетки (напр., В-клетки) от донора на тъканта или органа се въвеждат в реципиента заедно с антагониста преди трансплантацията на тъканта или органа в реципиента.

Методите на настоящото изобретение могат да се използват, например, за индуциране на Т-клетъчна толерантност към трансплантирани тъкан или органи, такива като черен дроб, бъбрек, сърце, бял дроб, кожа, мускул, нервна тъкан, стомах и черва. В едно приложение трансплантираната тъкан включва панкреатични островчета. В съгласие с това изобретението обезпечава метод за лечение на диабет, който включва въвеждане в субекта при необходимост от лечение: 1) на алогенни или ксеногенни клетки, които експресират донорни антигени; 2) на антагонист на рецептор от повърхността на реципиентните Т-клетки, който опосредства контакт-зависимите помощни ефекторни функции, такъв като антагонист на gp39 (напр., анти-gp39 антитяло); и 3) на донорни панкреатични островчета.

## КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

*Фигура 1* представя графично преживяемостта на трансплантирани алоприсадки от панкреатични островчета в мишки с индуциран по химичен път диабет, претретирани само с анти-gp39 антияло или претретирани само с нефракционирани или фракционирани алогенни галачни клетки.

*Фигура 2A и 2B* представят графично преживяемостта на трансплантирани алоприсадки от панкреатични островчета, която се измерва по понижаване на плазмената концентрация на глюкозата в мишки с индуциран по химичен път диабет, претретирани с единична доза от фракционирани алогенни галачни клетки и заедно с това третирани с анти-gp39 антияло (MR1) 2 седмици (панел A) или 7 седмици (панел B). Всяка крива представя данните за индивидуална мишка. Незапълнените символи идентифицират реципиенти, в които алоприсадката от островчета се отхвърля спонтанно. Запълнените символи показват мишки, чиито присадени островчета са функционирали при прекратяване на експеримента.

*Фигури 3A, B и C* представляват профили от проточна цитометрия, показващи оцветяването на активирани 6 часа човешки лимфоцити от периферна кръв със CD40Ig (панел A), mAb 4D9-8 (панел B) или mAb 4D9-9 (панел C).

*Фигури 4A, B и C* представляват профили от проточна цитометрия, показващи оцветяването на активирани 6 часа човешки лимфоцити от периферна кръв, култивирани в присъствието на циклопорин A, оцветени с mAb 4D9-8 (панел A), mAb 4D9-9 (панел B) или CD40Ig (панел C).

*Фигури 5A и B* представляват профили от проточна цитометрия, показващи оцветяването със CD40Ig на активирани 6 часа човешки лимфоцити от периферна кръв в присъствието на небелязано mAb 4D9-8 (панел A) и небелязяно mAb 4D9-9 (панел B).

Фигура 6 представя графично инхибирането на пролиферацията на човешки В-клетки, индуцирана от разтворими gp39 и IL-4 при култивиране на клетките в присъствието на моноклонални антитела (mAbs) срещу човешки gp39: 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 или 89-79.

Фигура 7 представя графично инхибирането на ало-специфичен смесен лимфоцитен отговор, когато клетките се култивират в присъствието на моноклоналните антитела (mAbs) срещу човешки gp39: 24-31 или 89-79.

#### ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Това изобретение се отличава с методи за индуциране на Т-клетъчна толерантност *in vivo* към донорен трансплантат на тъкан или орган в реципиент на трансплантата. Методите включват въвеждане в реципиента на 1) алогенна или ксеногенна клетка, която експресира донорни антигени и която има лиганд върху клетъчната повърхност, който взаимодейства с рецептор от повърхността на реципиентна Т-клетка, който опосредства контакт-зависимата помощна ефекторна функция и 2) антагонист на рецептора от повърхността на Т-клетката, който инхибира взаимодействието на лиганда с рецептора. Терминът "реципиент", така както се използва тук, се отнася за субект, в който ще се трансплантира тъканна или органна присадка, трансплантира се или е била трансплантирана. "Алогенна" клетка, както е дефинирана тук, се получава от друг индивид на същия вид, както реципиента и експресира "алоантигени", които се различават от антигените, експресирани от клетките на реципиента. "Ксеногенна" клетка се получава от вид, различен от реципиента и експресира "ксеноантигени", които се различават от антигените, експресирани от клетките на реципиента. Терминът "донорни антигени", така

както се използва тук, се отнася за антигени, които се експресират от донорната тъканна или органна присадка, която ще се трансплантира в реципиента. Донорните антигени могат да бъдат алоантигени или ксеноантигени в зависимост от източника на присадката. Алогенната или ксеногенна клетка, въведена в реципиента като част от режима на толеризация, експресира донорни антигени, т.е., експресира всички или някои от същите антигени, представени в донорната тъкан или орган, които ще се трансплантират. Предпочита се алогенната или ксеногенна клетка да се получи от донора на тъканта или органа, но може да се получи и от един или повече източника, които имат общи антигенни детерминанти с донора.

В допълнение към алогенната или ксеногенна клетка, като част от режима на толеризация, в реципиента се въвежда антагонист на молекула върху Т-клетките, която опосредства контакт-зависимите помощни ефекторни функции. Молекула или рецептор, който опосредства контакт-зависимите помощни ефекторни функции, така както е дефиниран тук, представлява такъв, който се експресира върху Th-клетка и взаимодейства с лиганд върху ефекторна клетка (напр., В-клетка), при което взаимодействието на молекулата с нейния рецептор е необходимо за получаване на отговор от ефекторната клетка (напр., В-клетъчно активиране). Понастоящем беше намерено, че освен участието в отговорите на ефекторната клетка, такава молекула или рецептор участва и в отговора на Т-клетката към антиген. Предпочита се молекулата върху Т-клетката, която опосредства контакт-зависимата ефекторна функция, да бъде gp39. В предпочетено приложение, в съответствие с това, методите на изобретението включват въвеждане в реципиента на трансплантата на алогенна или ксеногенна клетка и на антагонист на gp39. Активирането на реципиентните Т-клетки от

алогенната или ксеногенна клетка включва взаимодействие между gp39 върху реципиентните T-клетки и лиганд за gp39 върху алогенната или ксеногенна клетка. При инхибиране на това взаимодействие с антагонист на gp39, T-клетките на реципиента не се активират от донорните антигени, експресирани от алогенната или ксеногенна клетка и стават по-скоро толерантни към донорните антигени. Индуцирането на толерантност към донорните антигени в реципиента по този начин спомага за успешната трансплантация на донорната тъкан или орган без имуно-опосредствано отхвърляне на донорната присадка.

В следващите подраздели с допълнителни подробности са описани различни аспекти на изобретението.

#### I. Антагонисти на gp39

В реципиент се въвежда антагонист на gp39, съгласно методите на изобретението, за да попречи на взаимодействието на gp39 върху реципиентните T-клетки с лиганд за gp39 върху алогенна или ксеногенна клетка, такава като B-клетка, въведена в реципиента. Антагонист на gp39 се дефинира като молекула, която пречи на това взаимодействие. Антагонистът на gp39 може да бъде антитяло, насочено срещу gp39 (напр., моноклонално антитяло срещу gp39), фрагмент или производно на антитяло, насочено срещу gp39 (напр., Fab- или F(ab)'<sub>2</sub>-фрагменти, химерни антитела или хуманизирани антитела), разтворими форми на лиганд за gp39 (напр., разтворим CD40), разтворими форми на слят белтък на лиганд за gp39 (напр., разтворим CD40Ig) или фармацевтични агенти, които преустановяват или интерферира с взаимодействието gp39-CD40.

## А. Антитела

Бозайник (напр., мишка, хамстер или заек) може да се имунизира с имуногенна форма на белтъка gp39 или белтъчен фрагмент (напр., пептиден фрагмент), който предизвиква отговор чрез антитяло в бозайника. Като имуноген може да се използва също клетка, която експресира gp39 върху повърхността си. Алтернативните имуногени включват пречистен белтък gp39 или белтъчни фрагменти. gp39 може да се пречисти от клетка, експресираща gp39, чрез стандартни техники за пречистване. Освен това в клетка-гостоприемник, напр., бактерия или клетъчна линия от бозайник, може да се експресира кДНК за gp39 (Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.*, 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992) и белтъка gp39 да се пречисти от клетъчните култури чрез стандартни техники. Като алтернатива могат да се синтезират пептиди на gp39 на базата на аминокиселинната последователност на gp39 (публикувано в Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.*, 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992)) като се използват известни техники (напр., химична синтеза F-мос или T-мос). Техниките за придаване на имуногенност на белтък включват конюгиране с носители или други техники, добре известни в областта на техниката. Например, белтъкът може да се въведе в присъствието на адювант. Ходът на имунизацията може да се проследи чрез детекция на титрите на антителата в плазмата или сывума. За определяне нивата на антителата могат да се използват стандартна ELISA или други имунологични тестове, ползвайки имуногена като антиген.

След имунизацията могат да се получат антисывумите и ако е желателно поликлоналните антитела да се изолират от сывумите.

За получаването на моноклонални антитела от имунизирано животно могат да се съберат клетки, продуциращи антитела (лимфоцити) и да се слят с миеломни клетки чрез стандартни процедури на соматична фузия, като по този начин тези клетки се обезсмъртяват и се получават хибридомни клетки. Подобни техники са добре известни в областта на техниката. Например, хибридомната техника, първоначално разработена от Kohler и Milstein (*Nature* (1975) 256:495-4997), както и други техники, такива като хибридомната техника за човешки В-клетки (Kozbar et al., *Immunol. Today* (19983) 4:72), EBV-хибридомната техника за получаване на човешки моноклонални антитела (Cole et al., *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy* (1985) (Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96) и скриниране на библиотеки от комбинаторни антитела (Huse et al., *Science* (1989) 246:1275). Хибридомните клетки могат да се скринират имунохимично за продукцията на антитела, реагиращи специфично с белтъка или пептида, а моноклоналните антитела да се изолират.

Терминът антитяло, така както се използва тук, е предвидено да включва негови фрагменти, които реагират специфично с белтъка gp39, с пептид от него или със слят белтък на gp39. Антителата могат да се фрагментират като се използват конвенционални техники и фрагментите да се скринират за пригодност по същия начин, както е описано по-горе за цели антитела. Например,  $F(ab')_2$ -фрагменти могат да се получат чрез обработване на антитялото с пепсин. Полученият  $F(ab')_2$ -фрагмент може да се третира за редуциране на дисулфидните мостове, така че да се получат Fab'-фрагменти. Предвидено е още антитялото на настоящото изобретение да включва биспецифични и химерни молекули, имащи анти-gp39 част.

Когато антитела, получени от не-човешки субекти, се използват за лечение на хора, то те се разпознават до различна степен като чужди и в пациента може да се генерира имунен отговор. Един подход за свеждане до минимум или за елиминиране на проблема, който се предпочита пред генерализираната имносупресия, е получаването на химерни производни на антителата, т.е., на антицялови молекули, които комбинират не-човешка животинска вариабилна област и човешка константна област. Химерните антицялови молекули могат да включват, например, антиген-свързващия домен от антицяло на мишка, плъх или друг вид с човешка константна област. Описани са множество подходи за правене на химерни антитела, които могат да се използват за направата на химерни антитела, съдържащи имуноглобулиновата вариабилна област, която разпознава gp39. Виж, например, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851 (1985); Takeda et al., *Nature* 314:452 (1985), Cabilly et al., U.S. Patent No. 4 816 567; Boss et al., U.S. Patent No. 4 816 397; Tanaguchi et al., European Patent Publication EP171496; European Patent Publication 0173494, United Kingdom Patent GB 2177096B. Очаква се, че подобни химерни антитела биха били по-слабо имуногенни в човешки субект, отколкото съответното не-химерно антицяло.

За терапевтични цели при хората моноклоналните или химерни антитела, които реагират специфично с белтъка gp39 или с пептид (от него), могат допълнително да се хуманизират, при като се получават химери на човешките вариабилни области, в които част от вариабилните области, и по-специално консервативните скелетни (framework) области на антиген-свързващия домен, са с човешки произход, а само хипервариабилните области са с не-човешки произход. Такива изменени имуноглобулинови молекули

могат да се направят по коя да е от няколкото техники, известни в областта на техниката. (напр., Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:7308-7312 (1983); Kozbor et al., *Immunology Today*, 4:7279 (1983); Olsson et al., *Meth. Enzymol.*, 92:3-16 (1982)), като се предпочита те да се направят съгласно доктрината на PCT-публикация W092/06193 или EP 0239400. Хуманизирани антитела могат да се получат чрез промишлено производство, например, на Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britain.

Друг метод за получаване на специфични антитела или на фрагменти от антитела, реагиращи срещу белтъка gp39 или срещу пептид (от него), представлява скринирането на експресионни библиотеки, кодиращи имуноглобулинови гени или фрагменти от тях, с белтъка gp39 или с негов пептид. Например, цели Fab-фрагменти, VH-области или FV-области могат да се експресират в бактерии като се използват фагови експресионни библиотеки. Виж например Ward et al., *Nature*, 341:544-546:(1989), Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); и McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Чрез скринирането на такива библиотеки, например с пептид на gp39, могат да се идентифицират имуноглобулинови фрагменти, реагиращи с gp39. За получаване на антитела или на фрагменти от тях, като алтернатива може да се използва мишката SCID-hu (която може да се достави от Genpharm).

Методологии за получаване на моноклонални антитела, насочени срещу gp39, в това число срещу човешки gp39 и миши gp39, както и на моноклонални антитела, подходящи за използване в методите на изобретението, са описани с повече подробности в Пример 2.

За индуциране на антиген-специфична T-клетъчна толерантност се предпочита да се използват анти-човешките gp39

моноклонални антитела на изобретението. Предпочетените антитела включват моноклоналните антитела 3E1, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 и 89-79, описани в Пример 2. Особено предпочетени антитела са моноклоналните антитела 89-76 и 24-31. Хибридомите 89-76 и 24-31, продуциращи съответно антителата 89-76 и 24-31, са депозирани, съгласно клаузите на Будапещенския договор, в American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, Md., на 2-ри септември 1994. Хибридома 89-76 е заведена под номер за достъп до ATCC HB11713, а хибридома 24-31 е заведена под номер за достъп до ATCC HB11712. Антителата 24-31 и 89-76 са с изотип IgG1.

В друго приложение, анти-човешкото gp39 mAb, използващо се в методите на изобретението, се свързва с епитоп, който се разпознава от моноклонално антитяло, избрано от групата, състояща се от 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 и 89-79. Повече се предпочитат анти-човешкото gp39 mAb да се свързва с епитоп, който се разпознава от моноклоналното антитяло 24-31 или от моноклоналното антитяло 89-76. Способността на mAb да свързва епитоп, който се разпознава от всяко от преди това споменатите антитела, може да се определи чрез стандартни тестове на кръстосана конкурентност. Например антитяло, което свързва същия епитоп, който се разпознава от mAb 24-31, ще конкурира белязано 24-31 (антитяло) за свързване с активирани Т-клетки, докато антитяло, което свързва епитоп, различен от този, който се разпознава от mAb 24-31, няма да се конкурира с белязано 24-31 (антитяло) за свързване с активирани Т-клетки.

#### **В. Разтворими лиганди за gp39**

Другите антагонисти на gp39, които могат да се прилагат за индуциране на Т-клетъчна толерантност, включват разтворими

форми на лиганд за gp39. Моновалентен разтворим лиганд на gp39, такъв като разтворим CD40, може да се свърже с gp39, при което да инхибира взаимодействието на gp39 със CD40 върху В-клетките. Терминът "разтворим" означава, че лигандът не е непрекъснато асоцииран с клетъчната мембрана. Разтворим лиганд за gp39 може да се получи чрез химична синтеза или, за предпочитане, чрез рекомбинантни ДНК-техники, например чрез експресия само на извънклетъчния домен (с липсващ трансмембранен и цитоплазмен домен) на лиганда. Предпочетен разтворим лиганд за gp39 е разтворим CD40. Разтворимият лиганд за gp39, като алтернатива, може да бъде във формата на слят белтък. Такъв слят белтък обхваща поне част от лиганда на gp39, присъединен към втора молекула. Например, CD40 може да се експресира като слят белтък с имуноглобулин (т.е., слят белтък CD40Ig). В едно приложение се получава слят белтък, който обхваща аминокиселинните остатъци на част от извънклетъчния домен на CD40, свързани с аминокиселинните остатъци на последователност, съответстваща на "шарнирните" CH2- и CH3-области от имуноглобулинова тежка верига, напр., Сgamma1, за образуване на слят белтък CD40Ig (виж напр., Linsley et al., (1991) *J. Exp. Med.* 1783:721-730; Capon et al. (1989) *Nature* 337, 525-531; и Capon U.S. 5 116 964). Слетият белтък може да се получи чрез химична синтеза или, за предпочитане, чрез рекомбинантни ДНК-техники на основата на кДНК за CD40 (Stamenkovic et al., *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989)).

## II. Клетки за индуциране на антиген-специфична толерантност

Настоящото изобретение се основава, поне отчасти, на откритието, че представянето на алоантигени на Т-клетките от алогенни клетки в присъствието на антагонист на gp39 води до Т-клетъчна толерантност към алоантигените. Клетките, които са

способни да индуцират толерантност по този механизъм, включват тези, които представят антиген и активират Т-клетките чрез взаимодействие с gp39 (т.е. необходимо е взаимодействие между gp39 върху Т-клетките и лиганд за gp39 върху клетката, представяща антиген, за да достигнат съответните сигнали за Т-клетъчно активиране до Т-клетката). Инхибирането на взаимодействието на лиганда върху алогенната или ксеногенна клетка с gp39 върху реципиентните Т-клетки възпрепятства Т-клетъчното активиране от ало- или ксеноантигени и индуцира по-скоро Т-клетъчна толерантност към антигените. Смущение в активирането на Т-клетката чрез gp39 може да преустанови индукцията на костимулаторни молекули върху алогенната или ксеногенна клетка, (напр. молекули от фамилията В7 върху В-клетка), така че клетката предава само антигенен сигнал на Т-клетката в отсъствието на костимулаторен сигнал, като по този начин индуцира толерантност.

В методите на изобретението, в съответствие с това, в реципиентен субект се въвежда алогенна или ксеногенна клетка. Алогенната или ксеногенна клетка е в състояние да представи антиген на Т-клетките на реципиента и е, например, В-лимфоцит, "професионална" антиген-представяща клетка (напр., моноцит, дендритна клетка, Лангерхансова клетка) или друга клетка, която представя антигени на имунните клетки (напр., кератиноцит, ендотелна клетка, астроцит, фибробласт, олигодендроцит). Предпочита се още алогенната или ксеногенна клетка да има редуциран капацитет за стимулиране на костимулаторен сигнал в реципиентните Т-клетки. Например, алогенната или ксеногенна клетка може да не експресира или да експресира само ниски нива на костимулаторни молекули, такива като фамилията белтъци В7 (напр., В7-1 и В7-2). Експресията на костимулаторни молекули

върху потенциални алогенни или ксеногенни клетки, които ще се използват в метода на изобретението, може да се определи чрез стандартни техники, например чрез проточна цитометрия като се използват антитела, насочени срещу костимулаторните молекули.

Предпочитани алогенни или ксеногенни клетки за индуциране на Т-клетъчна толерантност са лимфоидните клетки, например лимфоцити от периферна кръв или галачни клетки. Предпочитаните лимфоидни клетки за индуциране на Т-клетъчна толерантност са В-клетки. В-клетките могат да се пречистят от смесена популация клетки (напр., от други типове клетки в периферната кръв или галака) чрез стандартни техники за разделяне на клетки. Например, адхезиращи клетки могат да се отстранят чрез култивиране на галачните клетки в пластмасови матраци и изолиране на неадхезиралата клетъчна популация. Т-клетките могат да се отстранят от смесена популация клетки чрез третиране с анти-Т-клетъчно антитяло (напр., анти-Thy1.1 и/или анти-Thy1.2) и комплемент. В едно приложение като антиген-представящи клетки се използват лимфоидни клетки в покой, за предпочитане В-клетки в покой. Лимфоидни клетки в покой, такива като В-клетки в покой, могат да се изолират чрез методи, известни в областта на техниката, например на основата на техния малък размер и плътност. Лимфоидни клетки в покой могат да се изолират чрез проточно центрофугиране, както е описано в Пример 1. Като се използва проточно центрофугиране чрез събиране на фракция(и) при 14-19 мл/мин, за предпочитане 19 мл/мин (на 3200 об/мин), може да се получи популация от малки лимфоидни клетки в покой, лишена от клетки, които могат да активират Т-клетъчни отговори. Като алтернатива малки лимфоцити в покой (напр., В-клетки) могат да се изолират чрез центрофугиране в прекъснат плъностен градиент, например като се използва градиент от Ficoll или Percoll, при

което след центрофугиране може да се получи слой, съдържащ малки лимфоцити в покой. Малките В-клетки в покой могат също така да се различат от активирани В-клетки като се тестват чрез стандартни техники (напр., имнофлуоресценция) за експресия на костимулаторни молекули, такива като В7-1 и/или В7-2, върху повърхността на активирани В-клетки.

Алогенните или ксеногенни клетки, въведени в реципиента, функционират, поне отчасти, като представят донорни антигени на реципиентните Т-клетки. По този начин клетките експресират антигени, които се експресират и от донорната тъкан или орган. Това може да се направи като обикновено се използват алогенни или ксеногенни клетки, получени от донора на тъканната или органна присадка. Например, могат да се изолират периферни лимфоидни клетки, В-клетки или далачни клетки от донора на тъканта или органа и да се използват в методите на изобретението. Като алтернатива могат да се получат алогенни или ксеногенни клетки от източник, различен от донора на тъканта или органа дотолкова, доколкото клетките имат общи антигенни детерминанти с донора на тъканта или органа. Могат да се използват, например, алогенни или ксеногенни клетки, които експресират (всички или повечето) от същите антигени на главния комплекс на тъканната съвместимост, както донорната тъкан или орган. И така, могат да се използват алогенни или ксеногенни клетки от източник, който е от МНС-хаплотип, съответстващ на донора на тъканта или органа (напр., близък роднина на донора на присадката).

T-клетъчна толерантност към тъканна или оргнна присадка, съгласно изобретението, може да се индуцира чрез въвеждане в реципиента на трансплантата на антагонист на др39 съвместно с алогенна или ксеногенна клетка, която експресира донорни антигени и взаимодейства с реципиентните T-клетки посредством др39. В предпочетено приложение алогенната или ксеногенна клетка и антагонистът на др39 се въвеждат в реципиента едновременно или контемпорално. Като алтернатива, антагонистът на др39 може да се въведе преди въвеждане на алогенните или ксеногенни клетки, например когато антагонистът е антитяло с дълъг полуживот. В предпочетено приложение антагонистът и алогенните или ксеногенни клетки се въвеждат в реципиента преди трансплантацията на органа или тъканта в реципиента (т.е., реципиентът се третира предварително с антагониста и клетките). Например, въвеждането на алогенните или ксеногенни клетки и на антагониста може да се извърши няколко дни (напр., 5 до 8 дни) преди трансплантацията на тъканта или органа.

Беше намерено, че въвеждането на единична доза алогенни клетки (в комбинация с антагонист) е достатъчно за индукцията на T-клетъчна толерантност към донорна тъкан или орган (виж Пример 1). Броят на клетките, които се въвеждат, може да варира в зависимост от типа на използваната клетка, типа на тъканната или оргнна присадка, теглото на реципиента, общото състояние на реципиента и други променливи, известни на опитния специалист. Подходящият брой клетки, който да се използва в метода на изобретението, може да се определи от един обикновен специалист чрез конвенционални методи (например, както е описано в Пример 1). Клетките се въвеждат във вид и по начин, който е подходящ за индуциране на T-клетъчна толерантност в реципиента. Клетките могат да се въведат във физиологично приемлив разтвор, такъв

като буфериран солеви разтвор или подобен vehiculum. Предпочита се клетките да се въвеждат интравенозно.

В субект се въвежда антагонист на изобретението в биологично съвместима форма, подходяща за фармацевтично приложение *in vivo* с цел индукция на Т-клетъчна толерантност. Чрез "биологично съвместима форма, подходяща за приложение *in vivo*" се има предвид да се приложи форма на антагониста, в която всевъзможните токсични ефекти се доминират от терапевтичните ефекти на съединението. Предвижда се терминът субект да включва живи организми, в които може да се предизвика имунен отговор, напр., бозайници. Примерите на субекти включват хора, кучета, котки, мишки, плъхове и техни трансгенни видове. Антагонист на гр39 може да се приложи във всякаква фармацевтична форма, условно с фармацевтично приемлив носител. Приложението на терапевтично ефективно количество от антагониста се дефинира като количество, което е ефективно в дозировки и за периоди от време, необходими за постигане на желания резултат (напр., Т-клетъчна толерантност). Например, терапевтично ефективното количество от антагонист на гр39 може да варира в съответствие с фактори, такива като степен на заболяване, възраст, пол и тегло на индивида и способността на антагониста да предизвика желан отговор в индивида. Дозировъчните режими могат да се донагласяват, за да се обезпечи оптимален терапевтичен отговор. Например, дневно могат да се прилагат няколко разделени дози или дозата може да се редуцира пропорционално, когато към това насочва острата необходимост на терапевтичната ситуация. За лечение с анти-гр39 антитяло, както е описано в Пример 1, един ефективен режим на лечение може да включва започване приложението на антитялото преди трансплантацията на тъканта или органа (напр., пет до осем дни преди трансплантацията), следвано

от повторно въвеждане на антитялото (напр., през ген) в продължение на няколко седмици (напр., две до седем седмици) след трансплантацията.

Активното съединение (напр., антагонист, такъв като антитяло) може да се приложи по подходящ начин, такъв като инжектиране (субкутанно, интравенозно и т.н.), орално приложение, инхалация, трансдермално приложение или ректално приложение. В зависимост от начина на приложение активното съединение може да се включи във вещество, което предпазва съединението от действието на ензими, киселини и други естествени условия, които могат да инактивират съединението. Интравенозното инжектиране е предпочетен начин на приложение.

За да се приложи антагонист на gp39 по начин, различен от парентералното приложение, може да се окаже необходимо антагонистът да се покрие, или антагонистът да се приложи съвместно, с вещество, за да се предотврати неговото инактивиране. Например, антагонистът може да се въведе в индивида в подходящ носител или разредител, да се въведе съвместно с ензимни инхибитори или в подходящ носител, такъв като липозоми. Фармацевтично приемливите разредители включват соли и водни буферни разтвори. Ензимните инхибитори включват панкреатичен трипсинов инхибитор, диизопропилфлуоросфат (DEP) и тразилол. Липозомите включват емулсии вода-в-масло-във-вода, както и конвенционални липозоми (Strejan et al., (1984) *J. Neuroimmunol* 7:27).

Активното съединение може също така да се приложи парентерално или интраперитонеално. Могат да се приготвят също дисперсии в глицерол, течни полиетиленгликоли, в смеси от тях и в масла. При обичайните условия на съхранение и използване тези

препарати могат да съдържат консерванти за предпазване от развитието на микроорганизми.

Фармацевтичните препарати, подходящи за инжектиране, включват стерилни водни разтвори (когато са водоразтворими) или дисперсии и стерилни прахове за непосредствено (*ex tempore*) приготвяне на стерилни разтвори за инжектиране или на дисперсии. Във всички случаи препаратът трябва да бъде стерилен и трябва да бъде течен до степен, че да може лесно да се вземе със спринцовка. Той трябва да бъде стабилен при условията на производство и съхранение и трябва да бъде консервиран срещу контаминиращото действие на микроорганизми, такива като бактерии и гъби. Носителят може да бъде разтваряща или диспергираща среда, съдържаща например, вода, етанол, полиол (например, глицерол, пропиленгликол, течен полиетиленгликол и подобни), както и подходящи смеси от тях. Подходящата текливост (вискозитет) може да бъде съхранена, например, чрез използване на покритие, такова като лецитин, чрез запазване на необходимата големина на частиците в случая на дисперсия и чрез използване на повърхностно активни вещества. Предпазване от действието на микроорганизми може да се постигне чрез различни противобактериални и противогъбни агенти, например, парабени, хлорбутанол, фенол, аскорбинова киселина, тимерозал и подобни. В много случаи е за предпочитане в препарата да се включат изотонични агенти, например, захари, полиалкохоли, такива като манитол, сорбитол, натриев хлорид. Забавена абсорбция на препаратите за инжектиране може да се предизвика чрез включване в препарата на агент, който забавя абсорбцията, например, алуминиев моностеарат и желатин.

Стерилните разтвори за инжектиране могат да се приготвят чрез включване на активното съединение (напр., антагонист на

др39) в необходимото количество и в подходящ разтворител заедно с една или с комбинация от съставките, изброени по-горе, съгласно изискванията, последвано от стерилизация чрез филтруване. Най-общо, дисперсиите се приготвят чрез включване на активното съединение в стерилен vehiculum, който съдържа основната дисперсионна среда и другите изискващи се съставки от тези, изброени по-горе. В случая на стерилни прахове, предназначени за приготвянето на стерилни разтвори за инжектиране, предпочетените методи за приготвяне са изсушаване под вакуум и изсушаване чрез замразяване, което дава прах от активната съставка (напр., антагонист) плюс всяка желана допълнителна съставка от преди това стерилно филтрувания разтвор на съставките.

Когато активното съединение е защитено по подходящ начин, както е описано по-горе, белтъкът може да се приложи орално, например, с инертен разредител или усвоим едлив носител. Както се използва тук, "фармацевтично приемлив носител" включва всеки и всички разтворители, дисперсионни среди, покрития, противобактериални и противогъбни агенти, изотонични и забавящи абсорбцията агенти и други подобни. Използването на такива среди и агенти за приготвянето на фармацевтично активни субстанции е добре познато в областта на техниката. Има се предвид използването в лекарствените препарати на всяка конвенционална среда или агент, с изключение на случая, когато те са несъвместими с активното съединение. В препаратите могат също така да се включат допълнително активни съединения.

Особени предимства има приготвянето на парентералните препарати под формата на дозиращи единици за улесняване на приложението и за уеднаквяване на дозировката. Форма на дозираща единица, така както се използва тук, се отнася за физически

дискретни единици, пригодени като единични дозировки за субектите-бозайници, които ще се лекуват; всяка единица съдържа, в асоциация с изисквания се фармацевтичен носител, предварително определено количество от активното съединение, пресметнато така, че да произведе желания лечебен ефект. Спецификацията за формите на дозиращите единици на изобретението се диктува и зависи непосредствено от (а) уникалните характеристики на активното съединение и конкретния терапевтичен ефект, който трябва да се постигне, и (б) ограниченията, характерни за начина на приготвяне на такова активно съединение за лечението на чувствителност в индивидите.

Донорна тъкан или орган се трансплантират в реципиент на трансплантата, чрез конвенционални техники, след или по време на режимите на толеризация, описани тук.

#### **IV. Използване на методите на изобретението**

Методите на изобретението са приложими при широк кръг от случаи на трансплантация на тъкани или органи. Методите могат да се използват за индуциране на Т-клетъчна толерантност в реципиент на присадка от тъкан или орган, такива като островчета, черен дроб, бъбрек, сърце, бял дроб, кожа, мускул, нервна тъкан, стомах и черва. Ето защо, методите на изобретението могат да се приложат за лечение на заболявания или състояния, които водят до тъканна или органна трансплантация (напр., трансплантация на черен дроб за лечение на хиперхолестеролемия, трансплантация на мускулни клетки за лечение на мускулна дистрофия, трансплантация на нервна тъкан за лечение на Хънтингтонова болест или на Паркинсонова болест и т.н.). В предпочетено приложение трансплантираната тъкан включва панкреатични островчета. В съответствие с това, изобретението

обхваща метод за лечение на диабет чрез трансплантация на клетки от панкреатични островчета. Методът включва въвеждане в субекта при необходимост от лечение : 1) на алогенни или ксеногенни клетки, които експресират донорни антигени, 2) на антагонист на молекула, експресирана върху реципиентните Т-клетки, която опосредства контакт-зависимата помощна ефекторна функция, такава като антагонист на gp39 (напр., анти-gp39 антитяло) и 3) на клетки от панкреатични островчета на донора. За предпочитане е алогенните или ксеногенни клетки и антагонистът да се въведат в реципиента преди въвеждането на панкреатичните островчета.

По-нататък изобретението се илюстрира от следващите примери, които не трябва да се тълкуват като ограничаващи. Списъкът на всички цитирани в тази заявка статии, патенти и публикувани патентни заявки, е включен тук за справка.

#### ПРИМЕР 1

**Индукция на толерантност към алоприсадки от панкреатични островчета чрез третиране на реципиента с алогенни клетки и анти-39**

Изследванията на контемпоралната алотрансплантация са зависими от генерализираната имunosупресия, която неспецифично генерира имунни ефекторни функции. Имunosупресивните фармацевтични препарати, обаче, могат да причинят значителни странични ефекти. Освен това, алотрансплантацията на Лангерхансови островчета за лечение на диабет не се поддава на този подход (виж напр. Robertson, R.P. (1992) *N. Engl. J. Med.* 321, 1861). Терапиите с антитела, насочени срещу Т-клетките, могат да позволят успешно алоприсаждане на островчета в гризачи, но този подход по твърде енозначен начин води до генерализирана имunosупресия (Carpenter, C.V. (1990) *N. Engl. J. Med.* 322,

1224; Roark, J.H. et al. (1992) *Transplantation* 54, 1098; Kahan, B.D. (1992) *Curr. Opin. Immunol.* 4, 553). Толерантност към алоприсадки от островчета в този пример се индуцира в реципиента на трансплантата чрез манипулиране на представянето на алоантигени на Т-клетките, така че да се възпрепятства тяхното активиране. Преживяемостта на алоприсадки от островчета в мишки с индуциран по химичен път диабет C57BL/6(H-2<sup>b</sup>) се изследва като се използва следната методология:

#### *Индукция на диабет*

Мъжки мишки C57B1/6J (H-2<sup>b</sup>) се превръщат в диабетични чрез интравенозно въвеждане на стрептозотоцин (140 мг/кг). Перманентният диабет се потвърждава чрез демонстрацията на плазмена глюкозна концентрация  $\geq$  400 мг/дл на три случая за период от една седмица.

#### **Фракционирание на алогенни галачни клетки**

Донорни алогенни клетки за претретиране на реципиентите на присадките се получават от хибридни животни (C57xBALB/c)(H-2<sup>b/d</sup>)F1, за да се предотврати заболяване от типа присадка-срещу-гостоприемник. За да се изолират малки лимфоцитни клетки, суспензии от галачни клетки на женски мишки (C57xBALB/c)(H-2<sup>b/d</sup>)F1 на възраст осем седмици се пречистват от еритроцити и след това се фракционират по големина чрез проточно центрофугиране, както е описано от Tony, H.P. et al. (1985) *J. Exp. Med.* 161, 223; и Gosselin E.J. et al. (1988) *J. Immunol.* 140, 1408. Накратко, малки лимфоцити се изолират чрез проточно центрофугиране, например като се използва модел центрофуга J-6B (Beckman Instruments, Palo Alto CA). С дезоксирибонуклеаза се третират около  $1-5 \times 10^6$  клетки в 8 мл културална среда или

балансиран солеви разтвор с 1,5% фетален говежди серум, нанасят се в камерата за проточно центрофугиране при начална скорост на обратния поток 13,5 мл/мин и се завъртат на 4°C при постоянна скорост 3200 об/мин. Обикновено при 14-19 мл/мин се елуира фракция от малки клетки с много малко примеси от големи клетки, въпреки че точната проточна скорост може да зависи от средата, в която се суспендират клетките. В експериментите, описани тук, фракцията от малки клетки се събира при 19 мл/мин (на 3200 об/мин). В тази фракция напълно отсъства съпътстващата клетъчна функция на радиационна устойчивост (3000 rads) при тестване с Т-клетъчни линии, специфични и за заешко IgG и за H2<sup>d</sup> (CDC35) или аloreагиращи с H2<sup>b</sup> (D10.G4). Малките клетки и нефракционирани клетки се промиват два пъти със среда, несъдържаща серум, преди да се инжектират в опашната вена на реципиентите на присадките. Използват се приблизително 40-100 x 10<sup>6</sup> (C57 x BALB/c)F1(H-2<sup>b/d</sup>) нефракционирани галачни клетки или 40-100 x 10<sup>6</sup> (C57 x BALB/c)F1(H-2<sup>b/d</sup>) отдекантирани (чрез проточно центрофугиране) малки галачни клетки.

#### **Предварително третиране на реципиентите на присадките**

Реципиентите на присадките се претретират поотделно с нефракционирани (C57 x BALB/c)F1(H-2<sup>b/d</sup>) алогенни галачни клетки, отдекантирана "фракция 19" от галачни клетки с малък диаметър, лишени от APC-активност (изолирани, както е описано по-горе), анти-gr39 моноклонално антитяло (MR1, виж Пример 2, Експеримент 3) или с комбинация от алогенни клетки и анти-gr39 антитяло. Клетките от фракция 19 се тестват при два различни дозови обхвата, ниска дозировка от 40-44 x 10<sup>6</sup> клетки или висока доза от 77-88 x 10<sup>6</sup> клетки. Контролните животни не се третират нито с алогенни клетки, нито с антитяло. Алогенните клетки се

въвеждат в реципиентите на присадките чрез инжектиране в опасната вена пет до осем дни преди трансплантацията на алоприсадките от островчета. Третирането с анти тялото MR1 се извършва при доза 250 мкг/мишка два пъти седмично, като се започва 7 дни преди трансплантацията на островчета и се продължава 2-7 седмици или докато се отхвърли присадката. Първата инжекция на анти тяло се прави обикновено в същия ден, в който се прави и първата инжекция на алогенни галачни клетки.

### Трансплантация на алоприсадки от островчета

Алогенни островчета BALB/c(H-2<sup>d</sup>) се изолират чрез модифицирания метод на смилане с колагеназа (Gottlieb, P.A. et al (1990) *Diabetes* 39, 643). Непосредствено след изолирането в субреналната капсула на реципиентната мишка C57B1/6J (H-2<sup>b</sup>) се имплантират островчета при доза 30 островчета/г телесно тегло. Преживяемостта на присадките се дефинира като поддържане концентрацията на глюкоза в плазмата  $\leq$  200 мг/дл.

### Резултати

В първата серия от експерименти реципиентите на алоприсадките от островчета се претретират или само с алогенни клетки, или само с анти-gr39 анти тяло. Както е показано във Фигура 1, в отсъствие на претретиране с галачни клетки всички алоприсадки от островчета се отхвърлят в рамките на 13 дни от трансплантацията (9 $\pm$ 2 d; обхват 5-13 d; N=23). Слаба преживяемост на островчетата се наблюдава също и в животни, третирани само с нефракционирани галачни клетки, имащи нормална APC-активност (6 $\pm$ 3 d; обхват 4-12 d; N=7) или с ниска доза (40-44 x 10<sup>6</sup> клетки) галачни клетки от Фракция 19, лишени от APC (7 $\pm$ 3 d; обхват 3-14 d, N=16). За разлика от това, инжектирането

на по-висока доза Фракция 19 от APC-лишени малки спленоцити ( $75-88 \times 10^6$  клетки) удължава преживяемостта на алоприсадките ( $19 \pm 10$  d; обхват 7-40 d; N=16). Този ефект върху продължителността на преживяемост на присадките е статистически достоверен ( $F_{3,56}=17,3$   $p < 0,001$  при сравняване с групи, нетретирани с нищо, третирани с цели галачни трансфузии или с по-ниската доза галачни клетки от фракция 19), но не е постоянен. Удължената, но крайна преживяемост на алогенните островчета в диабетични реципиенти на малки клетки от фракция 19, лишени от APC, навежда на мисълта, че тези клетки не могат сами да поддържат преживяемостта на присадките. Допълнителна кохорта от реципиенти на присадки се третира със  $77-88 \times 10^6$  клетки от фракция 20. Тази фракция също се състои предимно от малки лимфоцити, но се различава от популацията на фракция 19 по това, че съдържа измерима APC-функция. Всички реципиенти на тези клетки (N=6) веднага отхвърлят своите присадки (средно=8,5 d, обхват 6-12). Друга група реципиенти на присадки се третира единствено с анти-gr39 моноклоналното антитяло, MR1. Фигура 1 илюстрира това, че алоприсадките от островчета се отхвърлят в рамките на 15 дни в 7/11 мишки, третирани само с анти-gr39 mAb. Останалите 4 мишки при приключването на експеримента на 48-мия ден имат функциониращи присадки. Тези резултати показват, че въвеждането само на MR1 анти-gr39 антитялото в реципиента може да удължи преживяемостта на алоприсадките от островчета (средно  $20=19$ ; обхват 9 неопределен; N=5). Степента на удължаване е статистически сходна с тази, постигната при използване само на по-високата доза от Фракция 19 галачни клетки и значително по-голяма, отколкото тази, постигната в останалите три групи ( $p < 0,05$ ).

Серията експерименти, описани по-горе, показва че високи дози галачни клетки от Фракция 19, лишени от APC, или само третиране с анти-gr39 mAb може да увеличи преживяемостта на алоприсадките от островчета в сравнение с нетретирането. Нито едно третиране, обаче, само по себе си не е ефективно за индуциране на дълготрайна толерантност към алоприсадките от островчета в реципиентите. В следващата серия експерименти третирането с алогенни галачни клетки се комбинира с третиране на реципиента с анти-gr39. Беше намерено, че комбинираното приложение на алогенни галачни клетки и анти-gr39 е по-ефективно, отколкото прилагането на всеки реагент поотделно. Резултатите са показани във Фигура 2, където всяка крива представя данните за индивидуална мишка. Празните символи идентифицират реципиенти, в които алоприсадката от островчета се отхвърля спонтанно. Запълнените символи означават мишки, чиито присадки от островчета функционират при прекратяване на експеримента. Фигура 2 (панел В) показва, че в животни, третирани 7 седмици с анти-gr39 mAb и с единична инжекция на лишени от APC галачни клетки на Фракция 19 (N=6), се постига неопределена преживяемост на присадките. Изменението на този протокол чрез редуциране продължителността на третиране с анти-gr39 отслабва, но не премахва благоприятния ефект върху преживяемостта на присадките. Когато анти-gr 39 се прилага само 2 седмици в комбинация в галачни клетки от Фракция 19, се постига неопределена преживяемост на присадките в 6/8 реципиента (Фигура 2, панел А). Неопределена преживяемост на присадките се наблюдава също и в реципиенти, третирани с анти-gr39 за 2 до 7 седмици в комбинация с едно инжектиране на нефракционирани алогенни галачни клетки.

За да се потвърди функцията на присажените островчета и липсата на инсулинова секреция от страна на остатъчните нативни островчета, неразрушени при третирането със стрептозотоцин, се отстраняват бъбреците, носещи субренални имплантати. Унилатералната нефректомия във всички случаи води до рецидивирание на хипергликемията (>300 мг/дл) за 3 дни.

Алоприсадките от островчета и нативният панкреас се изследват хистологично във всички животни, или при отхвърляне на присадката, или в края на експеримента. Хистологични срези от алоприсажените островчета в бъбреците на реципиентите на фракционирани малки алогенни лимфоцити, третирани непрекъснато (7 седмици) с mAb MR1, показват струпване на интактни островчета, които се забелязват под реналната капсула и които са лишени от мононуклеарна инфилтрация и съдържат добре гранулирани инсулинови и глюкагонови позитивни клетки. За разлика от това, хистологични срези от алоприсажени островчета в бъбреците на реципиенти, третирани само с анти-gp 39 mAb, показва характерно интензивно възпаление от мононуклеарни клетки и съпровождащо го разграждане на островните клетки. В панкреасите на всички гостоприемници морфологията на островчетата съответства еднозначно на стрептозотоцинов диабет.

## ПРИМЕР 2

### Получаване и характеристика на анти-gp39 антитела

#### *Експеримент 1 – антитела, насочени срещу човешки gp39*

За индуцирането на антиген-специфична Т-клетъчна толерантност в човешки субект е за предпочитане да се приложи антитяло, насочено срещу човешки gp39. За получаването на миши анти-човешки gp39 моноклонални антитела се използва следната

методология. Мишки Balb/c се имънизират с разтворим слят белтък на gp39. gp39-CD8, в пълнен адювант на Freund (CFA). Впоследствие, 6 седмици по-късно, мишките се заразяват с разтворим gp39-CD8 в непълнен адювант на Freund (IFA). Разтворим gp39-CD8 се прилага в разтворима форма 4 седмици след втората имунизация. След това, две седмици по-късно на мишките се прави бустер с активирани човешки лимфоцити от периферна кръв, следван от финален бустер с разтворим gp39-CD8 след още две седмици. На четвъртия ден след последната имунизация спленоцитите се сливат с партньора за фузия NS-1, както е по стандартните протоколи.

На основата на сложен процес на скриниране се отбират клонове, продуциращи анти-човешки gp39 антитела. Най-напред клоновете се скринират чрез тест за свързване с плаките като се използва gp39-CD8. След това положителните клонове се скринират срещу контрола слят белтък на CD8, CD72-CD8. Клоновете, които се отчитат като положителни при CD8-CD72 теста на свързване с плаките, се елиминират. Останалите клонове впоследствие се скринират чрез проточен цитометричен анализ с почиващи и активирани 6 часа човешки лимфоцити от периферна кръв (PBL). Хибридомите, които оцветяват активирани, но не и PBL в покой, се смятат за положителни. Най-накрая, останалите клонове се тестват за способността им да блокират свързването на CD40Ig със свързан за плаките gp39.

В теста по свързване с плаките първоначално се скринират приблизително 300 клона срещу gp39-CD8 и CD72-CD8. Намира се, че 30 от тези клонове детектират свързан с плаките gp39, но не и CD8. Впоследствие тези клонове се скринират за детекция на gp39 върху активирани човешки PBL. Приблизително 15 клона детектират молекула върху активирани PBL, но не и върху клетки в покой. Специфичността се потвърждава още чрез определяне капацитета на

клоновете да блокират детектирането чрез CD40Ig на свързан с плаките gp39. В този тест 3 от 10 тестирани клона блокират свързването на CD40Ig. Тези клонове са 3E4, 2H5 и 2H8. Такива клонове са предпочетени за използване в методите, описани тук. Клонове, които се тестват като положителни върху активирани, но не и върху PBL в покой, се скринират също така за реакция с активирани плъши Т-клетъчен клон, POMCB. Клонът 2H8 проявява кръстосана реакция с тази плъша Т-клетъчна линия.

#### *Експеримент 2 - антитела, насочени срещу човешки gp39*

За получаване на допълнителни антитела, насочени срещу човешки gp39, се използва процедура на имунизация, сходна с тази, описана в Експеримент 1. Една мишка Balb/c се имунизира с разтворим gp39-CDB в CFA, последвано четири седмици по-късно от заразяване с активирани 6 часа човешки лимфоцити от периферна кръв. След това на мишката се прави бустер с разтворим gp39-CDB четири гена преди фузията на спленоцитите с партньора за фузия NS-1 по стандартни протоколи. Скринирането на хибридомните клонове се извършва чрез проточно цитометрично оцветяване на активирани 6 часа човешки PBL. Отбират се клоновете, оцветяващи активирани, но не и човешки PBL в покой. За по-нататъшен анализ се отбират шест клона, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 89-76 и 89-79.

Специфичността на отбраните антитела се потвърждава чрез няколко теста. Първо, проточният цитометричен анализ показва, че всичките шест mAbs оцветяват активирани, но не и Т-клетки от периферна кръв в покой (виж Фигура 3B и 3C като представителен пример, отразяващ оцветяването на активирани Т-клетки с 4D9-8 и 4D9-9, съответно). Експресията на молекулата, която се разпознава от всяко от шестте антитела, се детектира 4 часа след активирането, максимална е между 6-8 часа след активирането и не

може да се детектира 24 часа след активирането. Всички шест mAbs разпознават молекула, която се експресира върху активирани CD3<sup>+</sup>PBLs, предимно от CD4<sup>+</sup>-фенотип, но част от CD8<sup>+</sup>T-клетките също експресира молекулата. Експресията на молекулата, разпознаваща се от шестте mAbs, се инхибира от наличието на циклоспорин А в културалната среда, подобно на експресията на gp39 (виж Фигура 4А и 4В като представителен пример, показващ оцветяването на Т-клетки, третирани с циклоспорин, с 4D9-8 и 4D9-9, съответно). Кинетиките и разпределението на експресията на молекулата, разпознаваща се от тези антитела, са идентични с тези на gp39, което се детектира чрез слетия човешки белтък CD40Ig. Освен това, всичките шест антитела блокират оцветяването на gp39 със CD40Ig (виж Фигура 5А и 5В като представителен пример, показващ инхибирането на оцветяването на gp39 със CD40Ig в присъствието на 4D9-8 и 4D9-9, съответно). В ELISA-тест всички шест mAbs разпознават gp39-CD8, разтворима слята форма на gp39-молекулата. Нещо повече, всичките шест антитела имунопреципитират молекула с приблизително 36 kDa от активирани човешки PBL, белязани с <sup>35</sup>S-метионин. Имунопреципитираната молекула е идентична с тази, която се преципитира от човешкия слят белтък CD40Ig.

Функционалната активност на шестте избрани mAbs (4D9-8, 4D9-9, 24-32, 24-43, 89-76 и 89-79) се тестира, както следва. Най-напред се измерва способността на mAbs да инхибират пролиферацията на пречистени човешки В-клетки, култивирани с IL-4 и разтворим gp39. Пречистени човешки В-клетки се култивират с gp39 и IL-4 в присъствието или отсъствието на пречистени моноклонални антитела или CD40Ig при дозировки между 0 и 12,5 мкг/мл. Пролиферацията на В-клетките се определя след 3 дни в среда чрез включване на тимидин. Резултатите (показани на Фигура

6) показват, че всички шест mAbs могат да инхибират В-клетъчната пролиферация, индуцирана от gp39 и IL-4. Най-ефективни в инхибирането на индуцираната В-клетъчна пролиферация са mAbs 89-76 и 24-31.

След това се изследва способността на mAbs да инхибират диференциацията на В-клетките, което се измерва чрез продукцията на Ig, индуцирана от IL-2 и от Т-клетки, активирани с анти-CD3. Пречистени IgD<sup>+</sup> човешки В-клетки се получават чрез позитивна селекция с FACS (флуоресцентно активирано клетъчно сортиране) и след това се култивират с човешки Т-клетки, активирани с анти-CD3 (третиран с митомицин С) и с IL-2 за 6 дни в присъствието или отсъствието на пречистени анти-gp39 моноклонални антитела при дозировки между 0 и 10 мкг/мл. Продукцията на IgM, IgG и IgA се тестира на шестия ден чрез ELISA. Резултатите (показани по-долу в Таблица 1) показват, че всичките шест антитела могат да инхибират В-клетъчната диференциация, зависима от Т-клетките, което се измерва чрез продукцията на IgM, IgG и IgA.

Таблица 1

mAb	мкг/мл	Продукция на имуноглобулин		
		IgM	IgG	IgA
Без	-	17 500	6710	4471
4D9-8	0,1	4813	2130	2819
	1,0	4394	2558	1519
	10,0	1081	389	396
4D9-9	0,1	3594	919	1731
	1,0	2659	1233	1606

	10,0	374	448	266
24-31	0,1	3863	981	344
	1,0	1287	314	165
	10,0	1120	596	23
24-43	0,1	6227	4132	432
	1,0	3193	2130	192
	10,0	7021	1232	1081
89-76	0,1	3783	1069	344
	1,0	2180	352	171
	10,0	818	551	19
89-79	0,1	9763	1924	3021
	1,0	2314	460	156
	10,0	183	135	434

За да се изследва ефектът на анти- $\text{gp39}$  mAbs върху T-клетъчните отговори, mAbs се включват в стандартни реакции от смесени лимфоцити (MLR). 300 000 човешки лимфоцити от периферна кръв (отговарящи=R) се култивират със 100 000 облъчени алогенни лимфоцити от периферна кръв (стимулатори=S) в присъствието или отсъствието на анти- $\text{gp39}$  mAbs (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Културите се бележат пулсово с 3H-тимидин в дни 4, 5 или 6 и се събират 18 часа по-късно. Всички шест анти-човешки  $\text{gp39}$  mAbs инхибират алоспецифичните отговори, което се измерва чрез MLR (виж Фигура 7 като представителен пример, показващ инхибирането на алоспецифичните отговори, когато R и S се инкубират в присъствието

на 24-31 или 89-76; като положителни контроли се използват слят белтък CTLA4-имчноглобулин и анти-CD28 mAb).

Провеждат се експерименти на кръстосано блокиране, за да се определи дали шестте mAbs разпознават различни епитопи от молекулата на човешкия gp39. Активирани човешки PBLs най-напред се блокират с всяко от шестте mAbs (25 мкг/мл неконюгирано анти тяло). Клетките се промиват и след това се оцветяват с 10 мкг/мл анти тяло, конюгирано с биотин, последвано от реакция с авидин, конюгиран с фитоеритрин (PE-Av). Оцветяването на клетките с PE-Av се анализира чрез FACS. Резултатите са показани по-долу в Таблица 2.

Таблица 2

Блокиращо	Оцветяващо анти тяло						
	Ab	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
без	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	HO	-	++++	++++	+++	+++	
4D9-9	+++	HO	+++	++++	+++	+++	
24-31	+	+	HO	+++	++	++	
24-43	+	+	+++	HO	++	+	
89-76	+	+	+++	+++	HO	+++	
89-79	+	++	+++	+++	+++	HO	

Интензивността на оцветяването и процентът положителни клетки са представени чрез символа + (++++ = MI>200; +++ = MI>125; ++ = MI>50; + = MI>25; - = липса на оцветяване над фона). HO = неопределяно

Всички антитела блокират свързването на CD40Ig с активирани човешки PBLs. Данните, показани в Таблица 2, обаче, ясно демонстрират неспособността на някои антитела да блокират свързването на други антитела с активирани човешки PBLs, което предполага, че те разпознават различни епитопи от молекулата на човешкия gp39.

Хибридомите 89-76 и 24-31, продуциращи антителата 89-76 и 24-31, съответно, са депозирани, съгласно клаузите на Будапещенския договор в American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, Md., на 2 септември, 1994 г. Хибридомата 89-76 е с депозитен номер за достъп до ATCC HB11713, а хибридомата 24-31 е с депозитен номер за достъп до ATCC HB11712.

### *Експеримент 3 - антитела, насочени срещу миши gp39*

Антагонистът на gp39 в едно приложение на изобретението представлява анти-мише gp39 моноклонално антитяло, MR1. За получаване на MR1 се използва следния метод, който може да се използва и за получаването на други антитела, насочени срещу gp39.

Хамстери се имунизират интраперитонеално с  $5-10^6$  активирани клетки T<sub>H</sub>1 (d1.6) на седмични интервали в продължение на шест седмици. Когато серумният титър срещу миши T<sub>H</sub>1 стане по-голям от 1:10 000, се правят клетъчни фузии с полиетиленгликол като се използват имунни спленоцити от хамстерите и NS-1. Супернатантата от ямки, съдържащи растящи хибриди, се скринира чрез проточна цитометрия с почиващи и активирани T<sub>H</sub>1-клетки. Една конкретна хибридома, която продуцира Mab, което избирателно разпознава активирани T<sub>H</sub>, се тестира допълнително и се субклонира за получаване на MR1. MR1 се продуцира в асцити и се

пречиства чрез йонообменна HPLC (високоэффективна течна хроматография). Хибридомата MR1 е депозирана в American Type Culture Collection и е с депозитен номер HB11048.

#### ЕКВИВАЛЕНТИ

Като използват единствено рутинно експериментиране опитните специалисти ще различат или ще са в състояние да установят много еквиваленти на специфичните приложения на изобретението, описани тук. Предвижда се такива еквиваленти да се обхванат от претенциите, които следват. За справка е включен списъкът на всички статии и публикувани патентни заявки, цитирани навсякъде в тази заявка.

## ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за индуциране на Т-клетъчна толерантност към донорна тъкан или орган в реципиент на тъканта или органа, характеризираш се с това, че включва въвеждане в реципиента на:
  - a) алогенна или ксеногенна клетка, която експресира най-малко един донорен антиген и която има лиганд върху клетъчната повърхност, която взаимодейства с рецептор от повърхността на реципиентна Т-клетка, която опосредства контакт-зависимата помощна ефекторна функция; и
  - b) антагонист на рецептора от повърхността на Т-клетката, който инхибира взаимодействието на лиганда с рецептора.
2. Метод съгл. претенция 1, характеризираш се с това, че рецепторът от повърхността на реципиентната Т-клетка, която опосредства контакт-зависимата помощна ефекторна функция, е gp39.
3. Метод съгл. претенция 2, характеризираш се с това, че антагонистът е анти-gp39 антитяло.
4. Метод съгл. претенция 3, характеризираш се с това, че анти-gp39 антитялото е моноклонално антитяло.
5. Метод съгл. претенция 3, характеризираш се с това, че анти-gp39 антитялото е анти-човешко gp39 антитяло.
6. Метод съгл. претенция 4, характеризираш се с това, че моноклоналното антитяло е MR1.
7. Метод съгл. претенция 4, характеризираш се с това, че моноклоналното антитяло е химерно антитяло.
8. Метод съгл. претенция 4, характеризираш се с това, че моноклоналното антитяло е хуманизирано моноклонално антитяло.
9. Метод съгл. претенция 1, характеризираш се с това, че алогенната или ксеногенна клетка е лимфоидна клетка.

10. Метод съгл. претенция 9, характеризираш се с това, че лимфоидната клетка е В-клетка.
11. Метод съгл. претенция 10, характеризираш се с това, че В-клетката е В-клетка в покой.
12. Метод съгл. претенция 1, характеризираш се с това, че алогенната или ксеногенна клетка и антагонистът се въвеждат в реципиента преди трансплантацията на тъканта или органа.
13. Метод съгл. претенция 1, характеризираш се с това, че тъканта или органът включват панкреатични островчета.
14. Метод съгл. претенция 1, характеризираш се с това, че тъканта или органът се избират от групата, състояща се от черен дроб, бъбрек, сърце, бял дроб, кожа, мускул, нервна тъкан, стомах и черво.
15. Метод за индуциране на Т-клетъчна толерантност към донорна тъкан или орган в реципиента на тъканта или органа, характеризираш се с това, че включва въвеждане в реципиента на:
- a) алогенна или ксеногенна клетка, която експресира най-малко един донорен антиген; и
  - b) на антагонист на gp39.
16. Метод съгл. претенция 15, характеризираш се с това, че антагонистът на gp39 е анти-gp39 антитяло.
17. Метод съгл. претенция 16, характеризираш се с това, че анти-gp39 антитялото е моноклонално антитяло.
18. Метод съгл. претенция 16, характеризираш се с това, че анти-gp39 антитялото е анти-човешко gp39 антитяло.
19. Метод съгл. претенция 17, характеризираш се с това, че моноклоналното антитяло е MR1.
20. Метод съгл. претенция 17, характеризираш се с това, че моноклоналното антитяло е химерно моноклонално антитяло.

21. Метод съгл. претенция 17, характеризираш се с това, че моноклоналното антитяло е хуманизирано моноклонално антитяло.
22. Метод съгл. претенция 15, характеризираш се с това, че антагонистът на gp39 е разтворима форма на лиганд за gp39.
23. Метод съгл. претенция 22, характеризираш се с това, че разтворимата форма на лиганд за gp39 е слят белтък на CD40.
24. Метод съгл. претенция 15, характеризираш се с това, че алогенната или ксеногенна клетка е лимфоидна клетка.
25. Метод съгл. претенция 24, характеризираш се с това, че лимфоидната клетка е В-клетка.
26. Метод съгл. претенция 25, характеризираш се с това, че В-клетката е В-клетка в покой.
27. Метод съгл. претенция 15, характеризираш се с това, че алогенната или ксеногенна клетка и антагонистът се въвеждат в реципиента преди трансплантацията на тъканта или органа.
28. Метод съгл. претенция 15, характеризираш се с това, че тъканта или органа включват панкреатични островчета.
29. Метод съгл. претенция 15, характеризираш се с това, че тъканта или органът се избират от групата, състояща се от черен дроб, бъбрек, сърце, бял дроб, кожа, мускул, нервна тъкан, стомах и черво.
30. Метод за лечение на диабет, характеризираш се с това, че при необходимост от лечение в субекта се въвеждат:
- а) алогенна или ксеногенна клетка, която експресира поне един донорен антиген; и
  - б) донорни клетки от панкреатични островчета
31. Метод съгл. претенция 30, характеризираш се с това, че анти-gp39 антитялото е моноклонално антитяло.
32. Метод съгл. претенция 30, характеризираш се с това, че анти-gp39 антитялото е анти-човешко gp39 антитяло.

33. Метод съгл. претенция 31, характеризираш се с това, че моноклоналното анти тяло е MR1.

34. Метод съгл. претенция 31, характеризираш се с това, че моноклоналното анти тяло е химерно моноклонално анти тяло.

35. Метод съгл. претенция 31, характеризираш се с това, че моноклоналното анти тяло е хуманизирано моноклонално анти тяло.

36. Метод съгл. претенция 30, характеризираш се с това, че антагонистът на gp39 е разтворима форма на лиганд за gp39.

37. Метод съгл. претенция 36, характеризираш се с това, че разтворима форма на лиганд за gp39 е слят белтък на CD40.

38. Метод съгл. претенция 30, характеризираш се с това, че алогенната или ксеногенна клетка е лимфоидна клетка.

39. Метод съгл. претенция 38, характеризираш се с това, че лимфоидната клетка е В-клетка.

40. Метод съгл. претенция 39, характеризираш се с това, че В-клетката е В-клетка в покой.

41. Метод съгл. претенция 30, характеризираш се с това, че алогенната или ксеногенна клетка и антагонистът се въвеждат в реципиента преди трансплантацията на клетките от панкреатични островчета.

42. Метод за индуциране на Т-клетъчна толерантност към донорна тъкан или орган в реципиент на тъканта или органа, характеризираш се с това, че включва въвеждане в реципиента на:

а) донорна алогенна клетка; и

б) анти-gp39 анти тяло,

където донорната алогенна клетка и анти-gp39 анти тялото се въвеждат в реципиента преди трансплантацията на тъканта или органа.

43. Метод съгл. претенция 42, характеризираш се с това, че анти-gp39 анти тялото е моноклонално анти тяло.

44. Метод съгл. претенция 42, характеризираш се с това, че анти-gp39 анти тялото е анти-човешко gp39 анти тяло.

45. Метод съгл. претенция 43, характеризираш се с това че моноклоналното анти тяло е MR1.

46. Метод съгл. претенция 44, характеризираш се с това, че моноклоналното анти тяло е химерно моноклонално анти тяло.

47. Метод съгл. претенция 44, характеризираш се с това, че моноклоналното анти тяло е хуманизирано моноклонално анти тяло

48. Метод съгл. претенция 42, характеризираш се с това, че алогенната клетка е лимфоидна клетка.

49. Метод съгл. претенция 48, характеризираш се с това, лимфоидната клетка е В-клетка.

50. Метод съгл. претенция 49, характеризираш се с това, че В-клетката е В-клетка в покой.

## ТЕКСТ КЪМ ФИГУРИТЕ

## Фигура 1

1. Дни; 2. Кумулативна преживяемост на присадките (%); 3. Без клетки (N=23); 4. Цели далачни клетки,  $75-88 \times 10^6$  (N=7); 5. Далачни клетки от Фракция 19,  $75-88 \times 10^6$  (N=13); 6. Далачни клетки от Фракция 19,  $40-44 \times 10^6$  (N=16); 7. Само анти-gp39 анти тяло (N=11)

## Фигура 2А и 2Б

1. Далачни клетки от Фракция 19 F1; 2. MR1 Ab x 2 седмици; 3. Далачни клетки от Фракция 19 F1; 4. MR1 Ab x 7 седмици; 5. Дни; 6. Концентрация на глюкоза в плазмата (мг/дл)

---

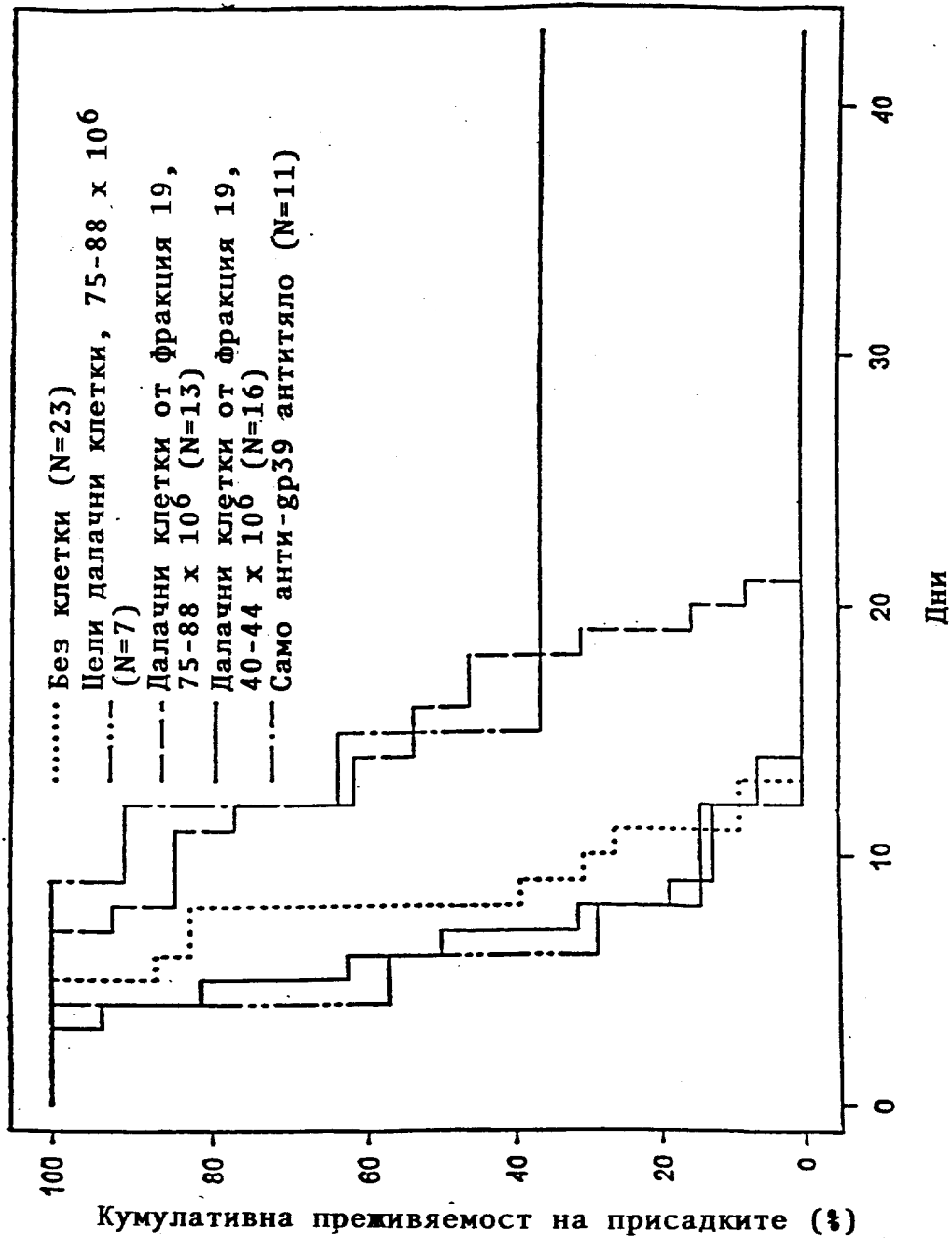
Издание на Патентното ведомство на Република България  
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: И. Червенкова

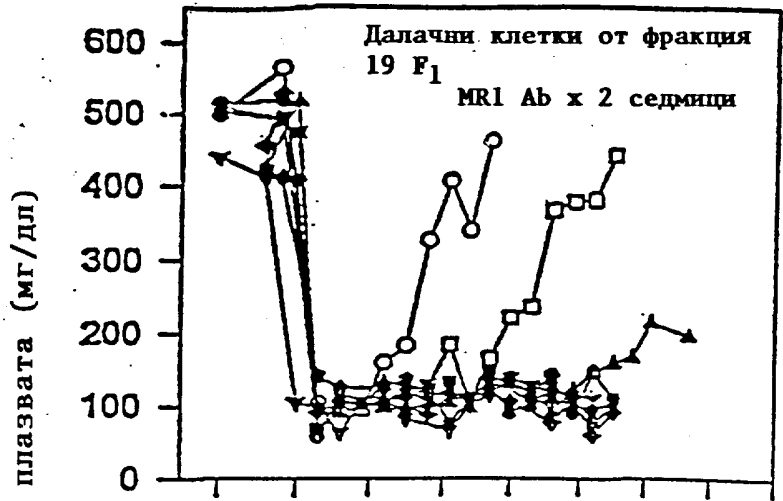
Редактор:

Пор. № 39428

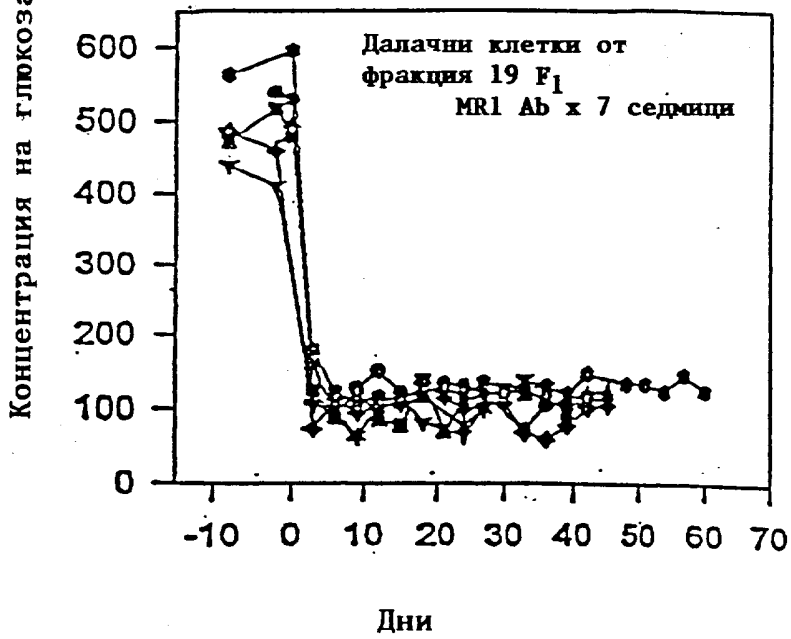
Тираж: 40 MB



ФИГУРА I



Фигура 2А



Фигура 2В

FIGURE 3A

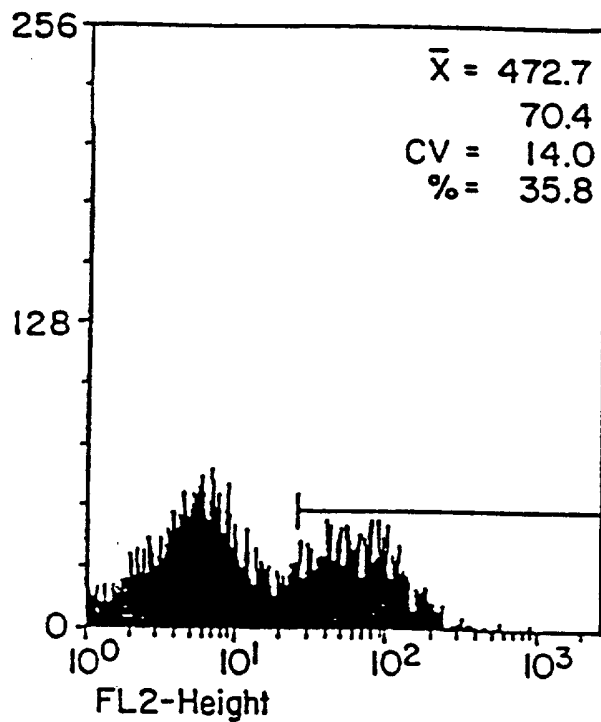


FIGURE 3B

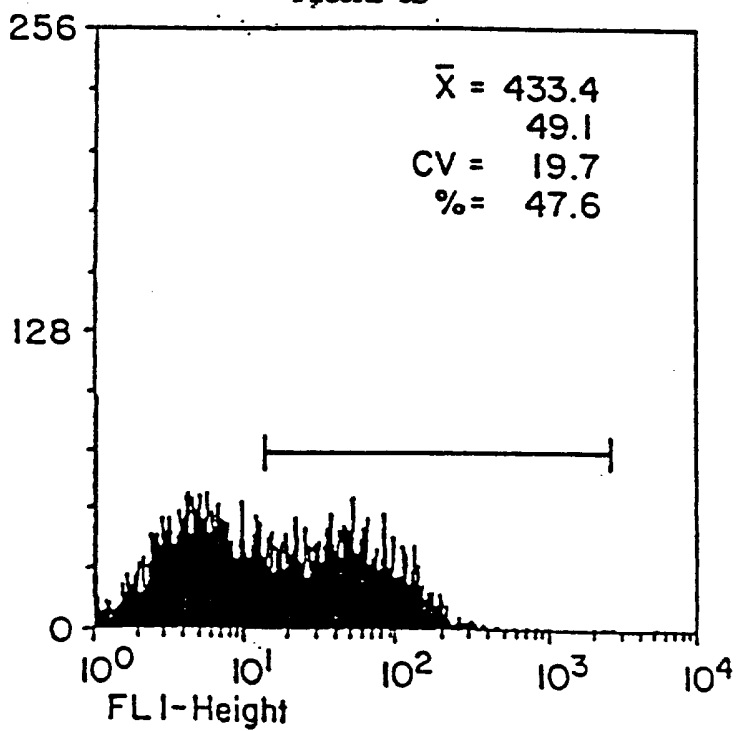


FIGURE 3C

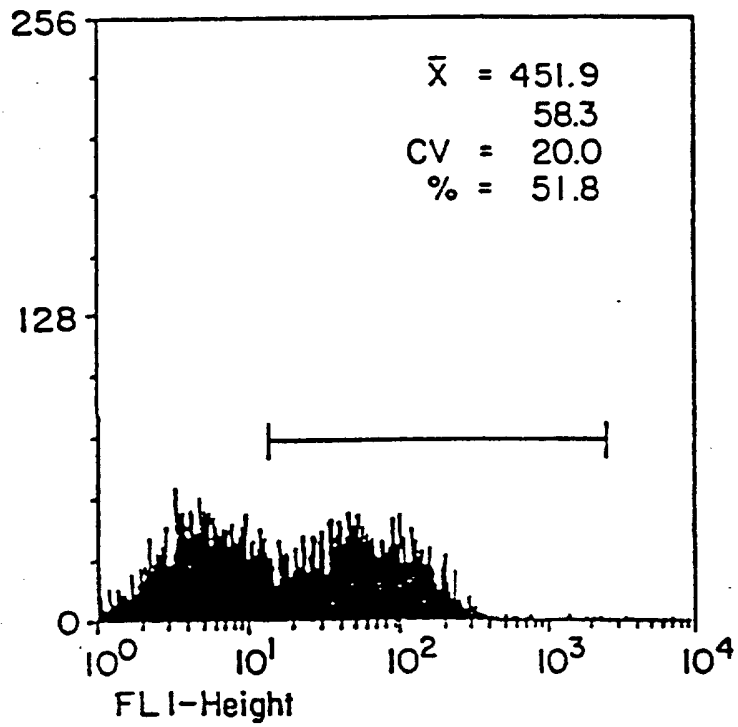


FIGURE 4A

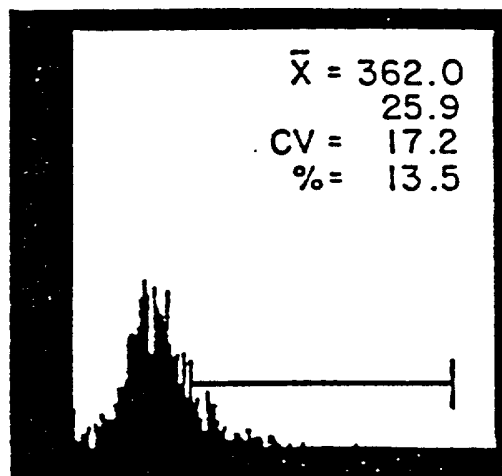


FIGURE 4B

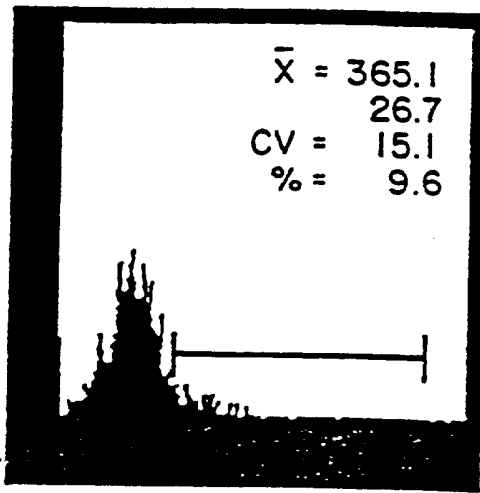


FIGURE 4C

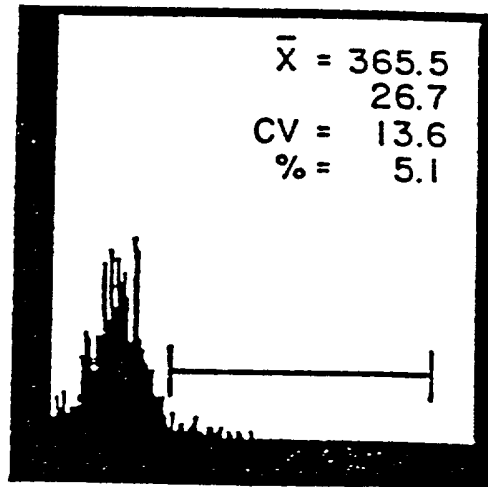


FIGURE 5A

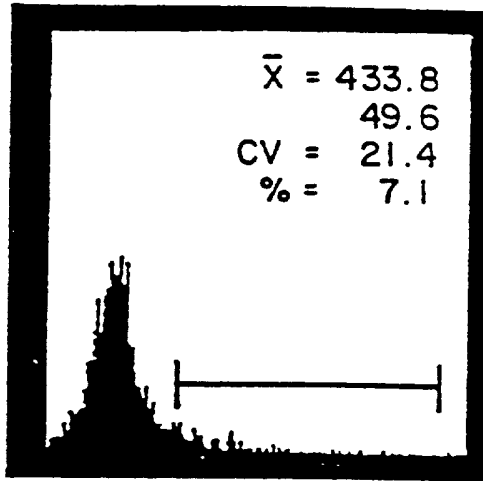


FIGURE 5B

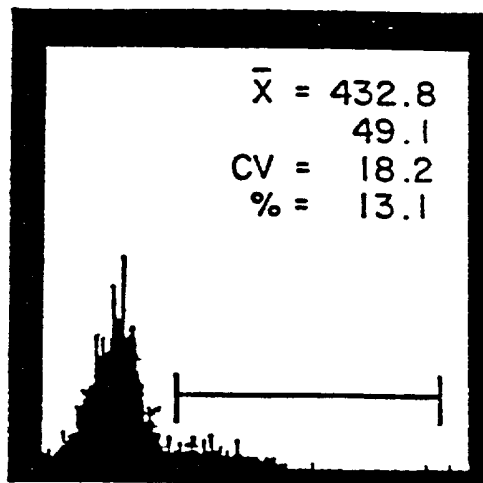


FIGURE 6

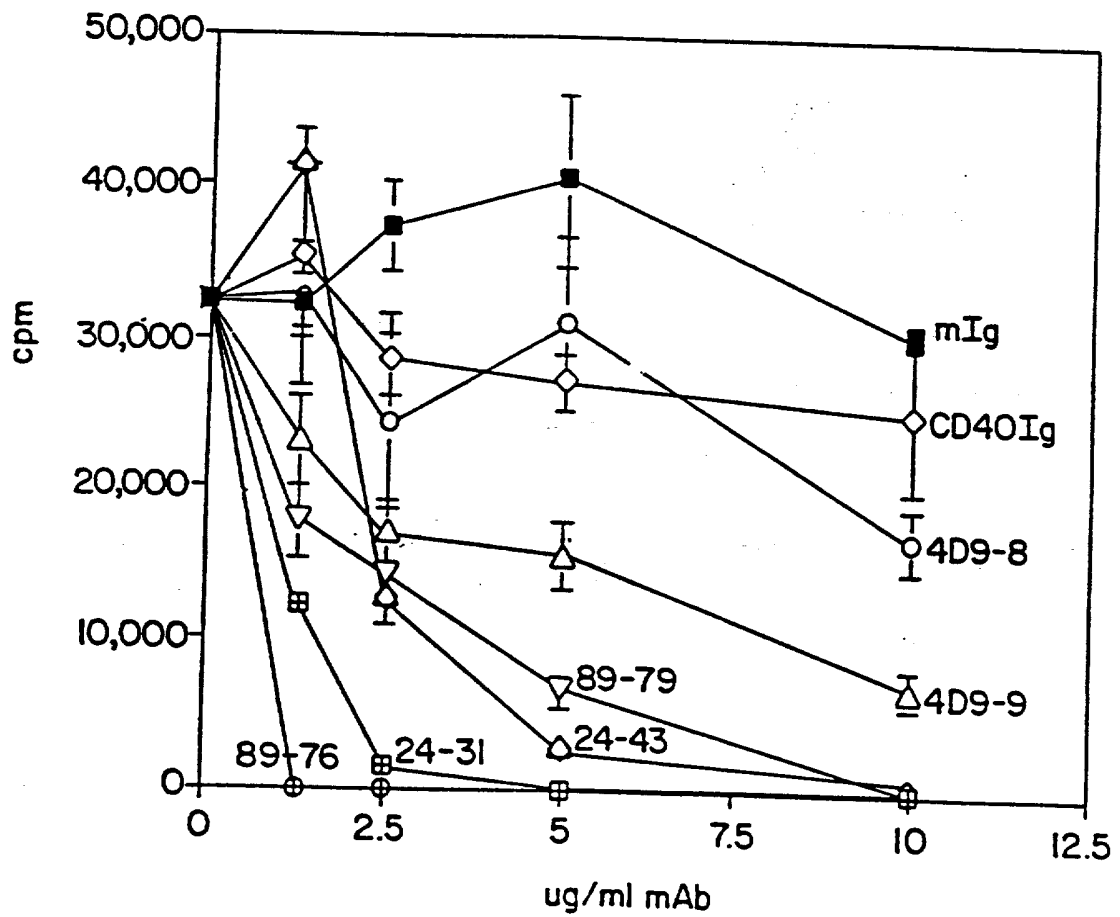


FIGURE 7

