

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.01.2002**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č. 8/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/003780**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/058729**

(21) Číslo dokumentu:

2003-1997

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. :
A 61 K 39/395
A 61 P 7/06
A 61 P 37/06

(71) Přihlašovatel:
EMORY UNIVERSITY, Atlanta, CA, US

(72) Původce:
Larsen Christian P., Atlanta, CA, US
Pearson Thomas C., Atlanta, GA, US
Waller Edmund K., Atlanta, GA, US
Adams Andrew B., Milburn, GA, US

(74) Zástupce:
Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Léčivo pro navození smíšeného
hematopoetického chimérismu, pro léčení
hemoglobinopatie a pro inhibici nebo snížení
rejekcí transplantátu**

(57) Anotace:
Je popsáno použití alkylačního činidla pro výrobu léčiva pro navození smíšeného hematopoetického chimérismu u jedince, a použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro léčení hemoglobinopatie. Je rovněž popsáno použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro inhibici nebo snížení rejekcí transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu u jedince.

Léčivo pro navození smíšeného hematopoetického chimérismu, pro léčení hemoglobinopatie a pro inhibici nebo snížení rejekcí transplantátu

Oblast techniky

Tento vynález se týká použití alkylačního činidla pro výrobu léčiva pro navození smíšeného hematopoetického chimérismu u jedince, a použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro léčení hemoglobinopatie. Předmětem tohoto vynálezu je rovněž použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro inhibici nebo snížení rejekcí transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu u jedince.

Dosavadní stav techniky

Transplantace jsou výhodnou metodou pro léčbu mnoha koncových stadií orgánových selhání. Lepší výsledky v klinických transplantacích byly dosaženy primárně díky vývoji účinnějších nespecifických imunosupresivních léků pro inhibici rejekcí (Lancet, 345:1321-1325 (1995)).

Ačkoliv došlo ke zlepšení krátkodobých výsledků, dlouhodobé výsledky jsou stále neuspokojivé. V současnosti je nutno pro zabránění chronické rejekci transplantovaných orgánů podávat dlouhodobě imunosupresivní přípravky a tyto přípravky dramaticky zvyšují rizika kardiovaskulárních onemocnění, infekcí a malignit. Vývoj strategií pro navození

- 1a -

přijetí allogenních tkání bez potřeby chronické imunosuprese by měl nejen redukovat rizika těchto život ohrožujících komplikací, ale také by měl značně rozšířit aplikaci orgánových, tkáňových nebo buněčných transplantací na onemocnění, jako jsou hemoglobinopatie, genetické imunodeficiencie a snad i autoimunitní onemocnění.

Smíšený hematopoetický chimérismus indukuje stav imunologické tolerance (Owen, Science, 102:400-401 (1945); Billingham et al., Nature, 172: 603-606 (1953)). Mnoho protokolů pro indukci hematopoetického chimérismu vyžaduje přípravné režimy, včetně gamma-záření a/nebo deplece periferního imunitního systému (Ilstad et al., Nature, 307: 168-170 (1984); Sharabi et al., J. Exp. Med. 169: 493-502 (1989); Tomita et al., J. Immunol. 153: 1087-1098 (1994); Mayumi et al., J. Exp. Med. 169: 213-238 (1989); a US patenty č. 5,867,692 a 6,217,867). Nadměrná toxicita spojená s těmito režimy, jako je potenciální imunosuprese a/nebo ztráta imunologické paměti při depleci periferních T-lymfocytů, nebo zvýšené riziko malignit při celotělovém ozařování, omezuje klinické použití těchto postupů pro korekci hematologických onemocnění nebo pro indukci tolerance k transplantovaným orgánům.

Simultánní blokáda kostimulačních signálů a podání suprafyziologických dávek kostní dřeně s T-lymfocyty od dárce eliminuje potřebu přípravy před transplantací (Durham et al., Journal of Immunology 165: 1-4 (2000); Wekerle et al., Nature Medicine 6: 464-469 (2000)). Nicméně, tyto protokoly vyžadují taková množství buněk kostní dřeně nezbavené T-lymfocytů, které je v současnosti nemožné získat a stupeň dárcovského chimérismu je příliš nízký pro účinnou léčbu hemoglobinopatií. Dále, tyto protokoly spočívají v použití neseparovaných buněk kostní dřeně. Konkrétně, T-lymfocyty nejsou odstraněny z přípravků. Ačkoliv může ponechání T-lymfocytů v přípravcích zvýšit přenos hematopoetických kmenových buněk, je riziko potenciálně letální reakce štěpu proti hostiteli úměrné kvantitě T-lymfocytů v transplantované kostní dřeni. Protože je

procento T-lymfocytů v kostní dřeni relativně nízké, přenášejí mega dávky kostní dřeně nutné pro tyto protokoly více T-lymfocytů než současné metody používané při transplantacích kostní dřeně v klinice. Dále, stupeň dárcovského chimérismu dosažený při použití těchto protokolů může být příliš nízký pro účinnou léčbu nebo korekci patofyziologie hemoglobinopatií, jako je srpkovitá anemie a thalasemie.

Thalasemie je genetické onemocnění charakterizované abnormální syntézou hemoglobinových řetězců. První úspěšný popis transplantace kostní dřeně pro korekci thalasemie byl uveřejněn v roce 1982 (Thomas et al., Lancet, 2:227-229 (1982)). Busulfan je běžně používán v multi-dávkových režimech společně s dalšími chemoterapeutickými léky při přípravě příjemce v mnoha protokolech pro transplantaci kostní dřeně (Brodsky et al., Cancer Invest. 7:509-513 (1989)). Busulfan je alkylační činidlo, které produkuje specifickou ztrátu hematopoetických kmenových buněk a často se používá jako antiproliferativní chemoterapeutické léčivo (Santos et al., Human bone marrow transplantation, Washington, American Assoc. Of Blood Banks (1976); Basch et al., Stem Cells 15: 314-323 (1997)). Busulfan může být používán s alkylačním činidlem, cyklofosfamidem, pro usnadnění transplantace buněk kostní dřeně a pro navození chimérismu u pacientů s thalasemií (Lucarelli et al., Ann. NY Acad Sci 445: 428-431 (1985); Mentzer and Cowan, J. Pediatr. Hematol. Oncol. 22(6): 598-601 (2000)). Dále se busulfan používá v subablativních dávkách pro navození přijetí kmenových buněk v syngenních myších modelech (Yeager et al., Bone Marrow Transplant. 9: 199-204 (1992)). Obdobně, jak je popsáno v US patentu č. 6,217,867, může být cyklofosfamid a celotělové ozáření použit pro dosažení

přijetí kostní dřeně, které však není dosaženo při použití cyklofosfamidu samotného. Ačkoliv byly protokoly uvedené výše o něco úspěšnější v korekci thalasemie, jsou tyto protokoly toxické pro pacienty. Proto je žádoucí vývoj nových protokolů, které jsou méně toxické pro pacienty.

Srpkovitá anemie (SCD) je genetické onemocnění, jehož příčinou je mutace aminokyselinové sekvence hemoglobinu. Jedinci se srpkovitou anemií mají jak epizody akutních komplikací, tak chronické, progresivní a multisystémové selhávání. Ačkoliv léčba prodlužuje život, je jedinou kurativní léčbou transplantace kmenových buněk. V současnosti jsou však přítomny dvě hlavní překážky transplantace kmenových buněk při srpkovité anemii: (1) vysoká morbidita a mortalita spojená s běžnou transplantací kostní dřeně, jak bylo popsáno výše, a (2) nedostatek vhodných dárců kmenových buněk (Walters et al., Biol. Blood Marrow Transplant., 2:100-104 (1996); Platt et al., New England. J. Med., 335:426-428 (1996)).

Běžná transplantace kostní dřeně srpkovitou anemii, ale vyžaduje toxické myeloablativní přípravné režimy, které jsou nutné pro přijetí dárcovských buněk (Walters et al., Blood, 95:1918-1924 (2000); Vermylen et al. Bone Marrow Transplant., 22:1-6 (1998)). Tyto intenzivní přípravné režimy mají mnoho toxických vedlejších účinků, včetně potenciálního orgánového selhání a dlouhodobého rizika malignity. V určitých populacích pacientů může morbidita a mortality transplantace převážit morbiditu a mortalitu srpkovité anemie (Platt et al., New England. J. Med., 335:426-428 (1996)). Nyní vzniká dilema mezi časnou léčbou transplantací kmenových buněk (která má vyšší přežívání a přežívání bez onemocnění ve srovnání s transplantací

provedenou poté, co se objevily komplikace související s onemocněním) a opatrnějším postupem, při kterém se medikamentosně zmírňují příznaky srpkovité anemie do vyššího věku, kdy může být provedena definitivní terapie (Walters et al., Biol. Blood Marrow Transplant., 2:100-104 (1996); Platt et al., New England. J. Med. 335:426-428 (1996)). Naneštěstí má tento druhý uvedený postup nižší naději na úspěšnou transplantaci kmenových buněk.

Nedostatek vhodných příbuzných dárců vážně omezuje počet pacientů se srpkovitou anemií vhodných pro transplantaci. V Seattle konsorcium studii bylo zjištěno, že pouze 6,5% potenciálních pacientů se srpkovitou anemií je vhodných pro transplantaci kmenových buněk pro závažnost onemocnění a z těchto pacientů se pouze pro 14% najde HLA-odpovídající příbuzný dárců (Walters et al., Biol. Blood Marrow Transplant., 2:100-104 (1996); Walters et al., Blood, 95:1918-1924 (2000)).

Chybění vhodných dárců zhoršuje problémy s toxicitou spojenou s transplantacemi, protože pro přijetí allotransplantátů se musejí používat agresivnější režimy. Aby tedy byly transplantace úspěšnou metodou, jsou potřebné způsoby pro navození allo-chimérismu, které by měly nízkou morbiditu a mortalitu. Klinické zkušenosti s transplantacemi při srpkovité anemii naznačují, že vyléčení může být dosaženo i bez úplného nahrazení kmenových buněk u příjemce (Walters et al., Blood 95:1918-1924 (2000); Vermylen et al., Bone Marrow Transplant., 22:1-6 (1998); Krishnamurti et al., New. Engl. J. Med., 344:68 (2001)). Walters et al. Popisují, že u 4/50 pacientů léčených běžným myeloablativním přípravným režimem došlo mimochodem k indukci smíšené hematopoesy dárce/příjemce (Walters et al., Blood

95:1918-1924 (2000)). Důležité je, že u těchto pacientů se stabilním smíšeným chimérismem se nevyvinuly další komplikace spojené se srpkovitou anemií. V důsledku těchto výsledků, stejně jako podobných výsledků v jiných modelech onemocnění, stoupá zájem o protokoly, které jsou nemyeloablativní a které záměrně generují stabilní smíšený chimérismus (Champlin et al., *Cur. Opin. Oncol.*, 11:87-95 (1999); Spitzer et al., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 6:309-320 (2000); Craddock, *Cur. Opin. Hematol.*, 6:383-387 (1999)). Jedním z problémů, které je potřeba vyřešit, je problém tolerance, protože musí být při smíšeném chimérismu dosaženo koexistence vlastních a dárcovských buněk. Zatímco první protokoly používaly relativně nespecifických imunosupresivních činidel pro indukci tolerance k transplantátům, novější studie na myších se zaměřily na blokování drah aktivace T-lymfocytů jako mechanismu pro vývoj specifické tolerance k dárci a dosažení dlouhodobého smíšeného chimérismu (Tomita et al., *J. Immunol.*, 153:1087-1098 (1994); Sykes et al., *Nature Medicine*, 3:783-787 (1997); Wekerle et al., *J. Exp. Med.*, 187:2037-2044 (1998); Durham et al., *J. Immunol.*, 165:1-4 (2000); Salomon et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 19:225-252 (2001)). Tyto pokusy ukázaly, že narušení kostimulačního signálu pro T-lymfocyty zprostředkované CD28/B7 nebo CD40/CD40L dráhami v době transplantace kostní dřeně může vést k anergii donor-reaktivních T-lymfocytů a k produkci dlouhodobé tolerance ke štěpu.

Při navrhování strategie pro indukci tolerance je třeba brát v úvahu několik rysů. Za prvé, strategie by měla poskytnout prostředek pro kontrolování existující populace donor-specifických T-lymfocytů v imunitním systému příjemce. Za druhé, strategie by měla poskytnout prostředek pro

kontrolování donor-specifických T-lymfocytů, které mohou vzniknout v budoucnu. Za třetí, strategie musí chránit allotransplantát před ireversibilním imunologickým poškozením během indukce a udržování tolerance.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je použití alkylačního činidla pro výrobu léčiva pro navození smíšeného hematopoetického chimérismu u jedince, kde navození smíšeného hematopoetického chimérismu zahrnuje podávání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci.

Předmětem tohoto vynálezu je také použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro navození hematopoetického chimérismu u jedince, kde navození smíšeného hematopoetického chimérismu zahrnuje podání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci.

Předmětem tohoto vynálezu je dále použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro léčení hemoglobinopatie u jedince, kde léčení hemoglobinopatie zahrnuje podání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci.

Předmětem tohoto vynálezu je taktéž použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro inhibici nebo snížení rejekcí transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu u jedince, kde inhibice nebo snížení rejekcí transplantátu

- (8 a 9) -

solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu zahrnuje podání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1A ilustruje procento chimérismu v závislosti na čase. Procento chimérismu se měří jako procento CD45.1⁺ buněk přítomných v periferní krvi po syngenní transplantaci kostní dřeně s busulfanem, jak je popsána v příkladu 1.

Obr. 1B ilustruje procento chimérismu v závislosti na čase. Procento chimérismu se měří jako procento CD45.1⁺ buněk přítomných v periferní krvi po syngenní transplantaci kostní dřeně s busulfanem, jak je popsána v příkladu 1.

Obr. 1C ukazuje procento dárcovských buněk (H-2^{d+}) přítomných v periferní krve ve skupinách, kterým byla podána kostní dřeň zbavená T-lymfocytů (TDBM), provedena blokáda kostimulace (CB), podán busulfan (Bus), nebo kterým byla podána kostní dřeň a provedena blokáda kostimulace (bez busulfanu), jak je popsáno v příkladu 1, dále. Přítomnost CD4⁺ a B220⁺ dárcovských buněk v periferní krvi ukazuje, že bez busulfanu se zvířata nestanou chimérickými.

Obr. 1D ukazuje výsledky titrace kostní dřeně busulfanem, jak je popsáno v příkladu 1.

Obr. 2 ilustruje reakci periferních C57BL/6 leukocytů (WBC) ($\times 10^3/\text{mm}^3$) na ošetření busulfanem (20 mg/kg, den -1), kostní dření bez T-lymfocytů (Balb/c), a blokádu kostimulace (plné čtverečky), a reakci na ozáření 3 Gy (den 0), kostní dření bez T-lymfocytů (Balb/c), a blokádu kostimulace (450 g MR1 v den 0 a 500 g CTLA4-Ig v den 2) (plné trojúhelníčky), jak je popsána v příkladu 1. Počet WBC je uveden v závislosti na čase.

Obr. 3A je obrazem celulosa-acetátového gelu, na němž jsou zobrazeny složky myšního hemoglobinu, jak je popsáno v příkladu 2, dále.

Obr. 3B ukazuje procento retikulocytů v závislosti na čase, jak je popsáno v příkladu 2, dále.

Obr. 4A ukazuje procento zvířat s kožním transplantátem, která přežívají, v závislosti na čase, jak je popsáno v příkladu 3, dále.

Obr. 4B ukazuje procento zvířat, která přežívají po podání kožního transplantátu od třetího subjektu, nebo kožního transplantátu od sekundárního dárce, v závislosti na čase, jak je popsáno v příkladu 3, dále.

Obr. 5A ukazuje počet buněk produkujících IFN v závislosti na terapeutickém protokolu, jak je popsáno v příkladech 4 a 5, dále. Počet buněk se měří 10 dnů po transplantaci kůže a >100 dnů po transplantaci kůže.

Obr. 5B procento specifické lýzy v závislosti na poměru efektorových:cílových buněk (E:T), jak je popsáno v příkladech 4 a 5, dále.

Obr. 5C procento specifické lýzy v závislosti na poměru efektorových:cílových buněk (E:T), jak je popsáno v příkladech 4 a 5, dále. Data byla získána od zvířat s kožními transplantáty od sekundárních dárců.

Obr. 5D ukazuje procento přežívajících zvířat s kožními transplantáty v závislosti na čase, jak je popsáno v příkladech 4 a 5, dále.

Obr. 6A ukazuje procento CD4+ T-lymfocytů versus exprese různých T-lymfocytárních markerů, jak je popsáno v příkladu 6, dále.

Obr. 6B ukazuje histogramy reprezentativních zvířat, které demonstrují, že CD8+ T lymfocyty od příjemců ošetřených Kostní dřením bez T-lymfocytů a bloádou kostimulace (bez busulfanu) se dělí maximálním způsobem (do 8), což je srovnatelné s naivními B6 T-lymfocyty za přítomnosti dárcovské tkáně, jak je popsáno v příkladu 6, dále. Tolerantní zvířata však nevykazují žádnou proliferaci v reakci na dárcovské tkáně, ale normální proliferaci v reakci na transplantáty od třetího subjektu (C3H, H-2^k).

Obr. 7A ukazuje procento H2K^d pozitivních buněk v závislosti na čase u jedinců léčených busulfanem a bloádou kostimulace, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 7B ukazuje procento přijetí transplantátu v závislosti na tkáni nebo orgánu, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 8 je elektroforetický gel s hemoglobinem ilustrující nahrazení periferní krve hemoglobinem dárce, jak je popsáno

v příkladu 7, dále.

Obr. 9 je elektroforetický gel s hemoglobinem ilustrující vznik chimérismu erytrocytů u jedinců, kterým byla aplikována pouze blokáda kostimulace (tj. ne busulfan), jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 10A ukazuje počet V5 pozitivních buněk (jako procento CD4 pozitivních T-lymfocytů) pro myši bez štěpu, se štěpem a pro BALb/c myši, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 10B ilustruje proliferativní kapacitu T-lymfocytů v reakci na dárcovské transplantáty a transplantáty od třetího subjektu za použití in vivo allo-proliferačního modelu s CFSE-značenými T-lymfocyty od zvířat s a bez štěpů, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 11A a 11B jsou nátěry periferní krve od neošetřených zvířat (A) a od transplantovaných zvířat (B), jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 11C ilustruje, že u transplantovaných zvířat došlo k normalizaci hematologických parametrů, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 11D ukazuje, že erytrocyty u transplantovaných myší mají normální poločasy života, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 11E ilustruje, že populace transplantovaných erytrocytů je zdravá, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 12A ukazuje hmotnost sleziny vyjádřenou jako procento

celkové tělesné hmotnosti, u C57BL/6 kontrolních zvířat, u neléčených zvířat se srpkovitou anemií a u transplantovaných zvířat, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 12B ukazuje, že u transplantovaných myši byla normalizována rovnováha hematopoesy ve slezině, jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 12C a 12D jsou histologické řezy slezinou od neléčené myši (C) a od transplantované myši (D), jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 13A a 13B jsou histologické řezy ledvinou od neléčené myši (C) a od transplantované myši (D), jak je popsáno v příkladu 7, dále.

Obr. 14 ukazuje nukleotidové a aminokyselinové sekvence L104EIg (SEQ ID NO.: 1-2), jak jsou popsány v příkladu 8, dále.

Obr. 15 ukazuje nukleotidové a aminokyselinové sekvence L104EA29YIg (SEQ ID NO.: 3-4), jak jsou popsány v příkladu 8, dále.

Obr. 16 ukazuje nukleotidové a aminokyselinové sekvence L104EA29LIg (SEQ ID NO: 5-6), jak jsou popsány v příkladu 8, dále.

Obr. 17 ukazuje nukleotidové a aminokyselinové sekvence L104EA29TIg (SEQ ID NO: 7-8), jak jsou popsány v příkladu 8 dále.

Obr. 18 ukazuje nukleotidové a aminokyselinové sekvence

L104EA29Wig (SEQ ID NO: 9-10), jak jsou popsány v příkladu 8, dále.

Obr. 19 ukazuje nukleotidové a aminokyselinové sekvence CTLA4 receptoru (SEQ ID NO: 11-12).

Obr. 20 ukazuje nukleotidové a aminokyselinové sekvence CTLA4Ig (SEQ ID NO: 13-14).

Obr. 21 ukazuje SDS gel (Obr. 21A) pro CTLA4Ig (dráha 1), L104EIg (dráha 2), a L104EA29YIg (dráha 3A); a chromatografii s vylučováním podle velikosti CTLA4Ig (obr.21B) a L104EA29YIg (obr.21C).

Obr. 22 (levý a pravý obr.) je diagram CTLA4 extracelulárního Ig V-like složení generovaného ze struktury určené NMR spektroskopii. (Obr. 22 (vpravo) ukazuje rozšířený pohled na CDR-1 (S25-R33) region a MYPPPY (SEQ ID NO: 15) region ukazující umístění a lokalizaci vedlejších řetězců u mutací se zvýšenou aviditou, L104 a A29.

Obr. 23A a 23B ukazují FACS testy ukazující vazbu L104EA29YIg, L104EIg a CTLA4Ig na lidské CD80- nebo CD86-transfektované CHO buňky, jak je popsáno v příkladu 9, dále.

Obr. 24A a 24B jsou grafy ukazující inhibici proliferace CD80-pozitivních a CD86-pozitivních CHO buněk, jak je popsáno v příkladu 9, dále.

Obr. 25A a 25B jsou grafy ukazující, že L104EA29YIg je účinnější než CTLA4Ig v inhibici proliferace primárních a sekundárních allostimulovaných T-lymfocytů, jak je popsáno v

příkladu 9, dále.

Obr. 26A-C jsou grafy ilustrující, že L104EA29YIg je účinnější než CTLA4Ig v inhibování produkce IL-2 (Obr. 26A), IL-4 (Obr. 26B), a gamma (γ)-interferonu (Obr. 26C) v allostimulovaných lidských T-lymfocytech, jak je popsáno v příkladu 9, dále.

Obr. 27 je graf ukazující, že L104EA29YIg je účinnější než CTLA4Ig v inhibování proliferace fytohemaglutininem (PHA) stimulovaných opičích T-lymfocytů, jak je popsáno v příkladu 9, dále.

Obr. 28 je graf ukazující analýzu vazebné rovnováhy pro L104EA29YIg, L104EIG, a přirozený CTLA4Ig k CD86Ig, jak je popsáno v příkladu 9, dále.

Obr. 29 je graf ukazující, že infekce LCMV brání výraznějšimu přežívání allotransplantátů po ošetření anti-CD40L a anti-CTLA4-Ig, jak je popsáno v příkladu 10, dále.

Obr. 30 ukazuje, že akutní LCMV infekce brání toleranci, smíšenému chimérismu, a delecii donor-reaktivních T-lymfocytů, jak je popsáno v příkladu 10, dále. A, B6 myším se aplikoval BALB/c kožní štěp spolu s BALB/c kostní dření ve dny 0 a 6 po operaci. Všem skupinám se také podala anti-CD40L a CTLA4-Ig ve dny 0, 2, 4 a 6. Myši se potom léčily busulfanem selektivním pro hematopoetické buňky a v den 5 po transplantaci. B, u neinfikovaných myši se nadále vyvíjelo >60% H-2Kd⁺ buněk v periferní krvi u všech zvířat do dne 120 po transplantaci. Infikované myši, s nebo bez deplece CD8 T-lymfocytů, selhávaly ve vývoji smíšeného

chimérismu. Podskupiny CD4 T-lymfocytů exprimujících V5)C) a V11 (D) byly deletovány u neinfikovaných myši v den 60 po operaci. Tyto podskupiny jsou normálně deletovány u BALB/c, ale ne u B6 myši, v důsledku exprese MMTV superantigenů společně s I-E u BALB/c buněk. Infikované myši, s nebo bez deplece CD8 T-lymfocytů, selhávají v deletování těchto podskupin T-lymfocytů. Všechny chybové sloupce představují SEM.

Obr. 31 ukazuje, že oddálená LCMV infekce nenarušuje (A) indukci tolerance; nebo (B) vývoj smíšeného chimérismu, jak je popsáno v příkladu 10, dále.

Obr. 32 ukazuje, že antivirová T-lymfocytární reakce po oddálené infekci je mírně snížena, ale epitopová hierarchie zůstává nezměněna, jak je popsáno v příkladu 10, dále. Jedné skupině byla podána allogenní (BALB/c) kostní dřev a transplantáty kůže, zatímco druhé skupině se podala syngenní (B6) kostní dřev a transplantáty kůže.

Obr. 33 ukazuje, že tetramer-pozitivní LCMV-imunitní CD8 T-lymfocyty se nedělí v reakci na alloantigen, jak je popsáno v příkladu 10, dále. BALB/c myši byly ozářeny. Naivní a LCMV imunitní dárcovské splenocyty byly obohaceny o T-lymfocyty. Buňky byly označeny fluorescentním barvivem CFSE (Molecular Probes) a byly injekčně aplikovány ozářeným příjemcům. Splenocyty se odebíraly 3 dny po přenosu a barvily se na expresi CD8 a tetramerů. V prvním sloupci byly splenocyty barveny na CD8 expresi a histogramy ukazují CFSE fluorescenci. Píky v pravé části histogramu představují vysoce fluorescentní, nedělící se buňky, zatímco píky směrem doleva měří ztrátu fluorescence stoupající s každým dalším dělením buněk. Potom se splenocyty rozdělily na nedělící se

(střední sloupec) a značně se dělicí (čtyři až osm dělení, pravý sloupec) CD8 T-lymfocyty a hodnotily se na schopnost vazby na tetramery třídy I složené do dvou imunodominantních LCMV peptidů. Jsou uvedeny reprezentativní vzorky od tří myší na skupinu.

Obr. 34 ukazuje, že IFN- γ LCMV-imunitní buňky se nedělí v reakci na alloantigen, jak je popsáno v příkladu 10, dále. Naivní a LCMV imunitní T-lymfocyty značené CFSE se podaly ozářeným BALB/c myším a odebíraly se stejně jako na obr. 33. Splenocyty se inkubovaly s brefeldinem A s LCMV-infikovanými nebo neinfikovanými MC57 fibrosarkomovými buňkami po dobu 5 hodin. Buňky se fixovaly a permeabilizovaly, barvily se na expresi CD8 a IFN- γ^+ , a analyzovaly se průtokovou cytometrií. Splenocyty se třídily podle CD8 exprese (levý sloupec) a testovaly se na CFSE fluorescenci, jak je popsáno na Obr. 33. Nedělící se (střední sloupec) a vysoce se dělicí (čtyři až osm dělení, pravý sloupec) CD8 T-lymfocyty se hodnotily na IFN- γ barvení. Je uveden reprezentativní vzorek ze dvou samostatných pokusů.

Obr. 35 ukazuje, že LCMV stimuluje CD28/CD40-independentní generování alloreaktivních IFN- γ -produkujících T-lymfocytů, jak je popsáno v příkladu 10, dále. C3H/HeJ myším se aplikoval buď BALB/c kožní štěp (SG) nebo kožní štěp s blokádou kostimulace (CE). Třetí skupině se aplikoval kožní štěp a blokáda kostimulace s LCMV infekcí, zatímco čtvrté skupině se aplikovala pouze LCMV infekce. Sleziny se od myší odebraly v uvedené dny a frekvence buněk produkujících IFN- γ specifických pro LCMV nebo alloantigen se určila za použití ELISPLT testu, jak je popsán v příkladu 10. Chybové sloupce představují SEM (n=3 pro všechny skupiny).

Obr. 36 ukazuje, že LCMV infekce řídí CD28/CD40-independentní zrání dendritických buněk, jak je popsáno v příkladu 10, dále. B6 myším se aplikovala buď BALB/c kostní dřeň a blokáda kostimulace, nebo totéž s LCMV infekcí. Sleziny se odebraly v den 6 po transplantaci. CD11c⁺ dendritické buňky se koncentrovaly, barvily se uvedenými Ab a analyzovaly se průtokovou cytometrií. Histogramy reprezentují expresi uvedených molekul v buňkách s expresí CD11. Plné histogramy ukazují myši léčené kostní dření a blokádou kostimulace, plné čáry představují myši se současnou LCMV infekcí, a tečkované čáry představují isotypové kontroly. Tyto histogramy jsou získané ze dvou samostatných pokusů.

Vynález je nyní popsán v následujícím popisu směřujícím k objasnění širších souvislostí a aplikačních možností.

V souladu s předkládaným vynálezem jsou umožněny způsoby pro indukování titrovatelného hematopoetického chimérismu podle zamýšlených aplikací. Například nižší hladiny chimérismu jsou vhodné pro indukci tolerance k transplantovaným orgánům a vyšší hladiny chimérismu jsou vhodné pro léčbu hemoglobinopatií, jako je srpkovitá anemie nebo různé thalassemie. Výhodně je chimérismus indukován bez myeloablativních přípravných režimů nebo léčby. Nicméně, myeloablativní příprava nebo léčba může být provedena před, během nebo po způsobech provedení jako doplňková léčba.

V jednom provedení způsob indukce smíšeného hematopoetického chimérismu zahrnuje podání buněk kostní dřene z bavených T-lymfocytů jedinci, a podání alkylačního

- 18a -

činidla jedinci. Tento způsob dále zahrnuje další krok nebo kroky, kterým je podání imunosupresivního činidla, a/nebo podání další dávky nebo dávek buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů, jedinci. Uvedené metody jsou také vhodné pro léčení hemoglobinopatií, a/nebo inhibování rejekce orgánových nebo tkáňových transplantátů u jedince, jak je zde popsáno.

Aplikace přítomného vynálezu poskytuje způsoby pro léčení hemoglobinopatií u jednice. Ve výhodném provedení způsoby zahrnují kroky podání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů a imunosupresivního činidla jedinci, a podání alkylačního činidla jedinci. Způsoby mohou také zahrnovat další krok podání druhé dávky buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů a/nebo imunosupresivního činidla jedinci. Tyto způsoby mohou také zahrnovat další krok podání dalších dávek imunosupresivního činidla a/nebo alkylačního činidla jedinci. V některých provedeních je hemoglobinopatií beta-thalassemie nebo srpkovitá anemie.

V jiném provedení jsou poskytnuty způsoby inhibice rejekce orgánových nebo tkáňových transplantátů, které zahrnují podání alkylačního činidla a buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci, který je příjemcem transplantátu. Alkylační činidlo může být podáno jedinci během 24 hodin před transplantací.

Vynález dále umožňuje provádět způsoby pro redukci rejekce orgánových transplantátů u jedince, které zahrnují kroky, při kterých je jedinci podána (1) první dávka buněk kostní

- 18b -

dřeně zbavených T-lymfocytů; (2) imunosupresivního činidla, alkylačního činidla, a druhá dávka buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů a imunosupresivního činidla. Alkylační činidlo může být podáno před, během nebo po podání kostní dřeně. Druhá dávka kostní dřeně může být podána před, během nebo po podání alkylačního činidla. Dále, způsoby mohou zahrnovat další krok nebo kroky podání imunosupresivního činidla a/nebo alkylačního činidla jedinci.

Jak bylo uvedeno výše, imunosupresivního činidla použitelná v uvedených způsobech zahrnují prostředky mající molekuly, které přednostně interferují s interakcí kostimulačních molekul T- a B-lymfocytů. Příklady výhodných imunosupresivních činidel jsou molekuly, které interferují s vazbou CD28 antigenu na B7 antigen, a molekuly, které interferují s vazbou gp39 antigenu na CD40 antigen. Příklady takových činidel jsou rozpustné formy CTLA4, (např., CTLA4-Ig), rozpustné formy CD28 (např., CD28-Ig), anti-B7 mAbs a anti-gp39 (anti-CD40L) mAbs.

Dále, jak bylo uvedeno výše, je výhodným alkylačním činidlem použitým v uvedených metodách alkyl-sulfonát. Výhodněji je alkyl-sulfonátem busulfan.

Detailní popis předkládaného vynálezu

Definice

Všechny odborné a technické termíny použité v tomto vynálezu mají běžně používané významy, pokud není uvedeno

- 18c -

jinak. V uvedeném vynálezu mají následující výrazy a fráze tyto významy.

Termín "rejekce transplantátu", jak je zde použit, označuje téměř úplnou nebo úplnou ztrátu živé tkáně transplantátu u příjemce. V případě kožních transplantátů je "rejekce" definována jako téměř úplná nebo úplná ztráta živé tkáně epidermálního štěpu.

Termín "smíšený hematopoetický chimérismus" je definován jako přítomnost krevních progenitorových a zralých buněk

(např. krevních buněk) od příjemce i od dárce za absence (nebo nedetekovatelné přítomnosti) imunitní reakce.

Termín "kostimulační dráha" označuje biochemickou dráhu vznikající při interakci ko-stimulačních signálů na T-lymfocytech a buňkách prezentujících antigen (APC). Kostimulační signály napomáhají při určení velikosti imunologické reakce na antigen. Jeden ko-stimulační signál je dodáván interakcí T-lymfocytárních receptorů CD28 a CTLA4 a B7 molekul na APC. Termín "B7" zahrnuje též B7-1 (též CD80), B7-2 (též označovaný jako CD86), B7-3 (též označovaný jako CD74), a B7 rodinu, např. kombinaci B7-1, B7-2, a/nebo B7-3. Jiný příklad je dodáván interakcí CD40 a gp39 (též označovaného jako CD154). Gp39 je také označovaný jako CD154 nebo CD40L. Termíny gp39, CD154 a CD40L jsou v předkládaném vynálezu zaměnitelné.

Termín "blokáda ko-stimulace" označuje protokol, při kterém jsou jedinci podány jedno nebo více činidel, které blokují nebo interferují s kostimulační dráhou, jak je definována výše. Příklady činidel, která interferují s ko-stimulační blokádou, jsou rozpustný CTLA4, rozpustný CD28, anti-B7 monoklonální protilátky (mAb), rozpustný CD40 a anti-gp39 mAb. Tato činidla jsou také považována za "imunosupresivní činidla". "Imunosupresivní činidlo" je definováno jako prostředek obsahující jedenu nebo více typů molekul, které brání průběhu imunitní reakce nebo oslabují imunitní systém jedince.

Výraz "monoklonální protilátky namířené proti gp39" nebo "anti-gp39 mAb" nebo "anti-CD154 mAb" nebo "anti-CD40L mAb" označují jakoukoliv molekulu protilátka, její fragment nebo rekombinantní vazebný protein, který rozpoznává a váže se na

gp39, nebo její fragment.

Termín "rozpuštěný ligand, který rozpoznává a váže se na B7 antigen" označuje CTLA4-Ig, CD28-Ig nebo jiné rozpustné formy CTLA4 a CD28, včetně rekombinantních a/nebo mutantních CTLA4 a CD28, a označuje jakoukoliv protilátkovou molekulu, její fragment nebo rekombinantní vazebný protein, která rozpoznává a váže se na B7 antigen. Tato činidla jsou také považována za ligandy, které interferují s vazbou CD28 na B7 a gp39 na CD40. Termín "kostní dřeň ochuzená o T-lymfocyty" označuje kostní dřeň odebranou z kosti, která byla zpracována způsobem způsobujícím depleci T-lymfocytů. Způsob způsobující depleci T-lymfocytů označuje způsob vedoucí k odstranění T-lymfocytů z kostní dřeně. Způsoby pro selektivní odstranění T-lymfocytů jsou dobře známy v oboru. Příkladem způsobu pro odstranění T-lymfocytů je ošetření kostní dřeně protilátkou specifickou pro T-lymfocyty, jako je anti-CD3, anti-CD4, anti-CD5, anti-CD8, a anti-CD90 monoklonální protilátka, kde protilátky jsou cytotoxické pro T-lymfocyty. Alternativně, protilátky mohou být navázány na magnetické částice, aby bylo možné odstranit T-lymfocyty z kostní dřeně pomocí magnetického pole. Dalším příkladem způsobu pro odstranění T-lymfocytů je ošetření T-lymfocytů kostní dřeně anti-lymfocytárním sérem nebo anti-thymocytárním globulinem.

Termín "tolerizační dávka kostní dřeně zbavené T-lymfocytů" je definována jako počáteční dávka kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty, která je podána jedinci za účelem inaktivace potenciálních T-lymfocytů reaktivních se štěpem.

Termín "transplantační dávka kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty" je definován jako následující dávka kostní

dřeně ochuzené o T-lymfocyty, která je podána jedinci za účelem navození smíšeného hematopoetického chimérismu. Transplantační dávka kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty bude proto podána po tolerizační dávce kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty.

Termín "tkáňový transplantát" je definován jako tkáň z orgánu nebo celý orgán, která je transplantována příjemci. V některých provedeních je tkáň z jednoho nebo více solidních orgánů. Příklady tkání nebo orgánů jsou kůže, plíce, srdce, slinivka břišní, ledviny, játra, kostní dřeň, buňky ostrůvků pankreatu, buněčné suspenze a geneticky modifikované buňky. Tkáň může být odebrána od jedince nebo může být vykultivována in vitro. Transplantát může být autotransplantát, isotransplantát, allotransplantát nebo xenotransplantát, nebo kombinace uvedených možností.

Termín "podávání" nebo "podání" označuje podání provedené jakýmkoliv způsobem, včetně intravenosního (i.v.) podání, intra-peritoneálního (i.p.) podání, intramuskulárního (i.m.) podání, subkutánního podání, orálního podání, podání ve formě čípků, nebo lokálně, nebo implantace prostředku s dlouhodobým uvolňováním, jako je miniosmotická pumpa, jedinci.

"Přirozený CTLA4" nebo "nemutovaný CTLA4" má aminokyselinovou sekvenci přirozeného, kompletního CTLA4, jak je uvedena na obr. 19 (a popsána v U.S. Patentech č. 5,434,131, 5,844,095, 5,851,795), nebo jakékoliv jeho části nebo derivátu, a rozpoznává a váže se na B7 nebo interferuje s B7 tak, že blokuje vazbu na CD28 a/nebo CTLA4 (např., endogenní CD28 a/nebo CTLA4). V konkrétních provedeních začíná extracelulární doména přirozeného CTLA4 methioninem v

pozici +1 a končí kyselinou asparagovou v pozici +124, nebo začíná extracelulární doména přirozeného CTLA4 alaninem v pozici -1 a končí kyselinou asparagovou v pozici +124. Přirozený CTLA4 je buněčný povrchový protein, který má N-terminální extracelulární doménu, transmembránovou doménu a C-terminální cytoplasmatickou doménu. Extracelulární doména se váže na cílové molekuly, jako je B7 molekula. V Buňce je přirozený CTLA4 protein translatován jako nezralý polypeptid, který obsahuje signální peptid na N-konci. Nezralý polypeptid je post-translačně zpracován, což zahrnuje štěpení a odstranění signálního peptidu za zisku CTLA4 štěpného produktu majícího nově vytvořený N-konec, který se liší od N-konce nezralé formy. Odborníkům v oboru bude jasné, že může proběhnout další post-translační zpracování, které odstraní jednu nebo více aminokyselin z nově vytvořeného konce produktu štěpení CTLA4. Alternativně nemusí být signální peptid odstraněn zcela, za vzniku molekul, které začínají před obvyklou počáteční aminokyselinou, methioninem. Tak může zralý CTLA4 protein začínat methioninem v pozici +1 nebo alaninem v pozici -1. Zralá forma CTLA4 molekuly obsahuje extracelulární doménu nebo jakoukoliv její část, která se váže na B7.

Termín "CTLA4 mutantní molekula" označuje přirozený CTLA4, jak je uveden na obr. 19, nebo jakoukoliv jeho část nebo derivát, který obsahuje mutaci nebo více mutací (výhodně v extracelulární doméně přirozeného CTLA4). CTLA4 mutantní molekula má sekvenci, která je podobná, ale ne identická se sekvencí přirozené CTLA4 molekuly, ale stále ještě váže B7. Mutacemi mohou být jeden nebo více aminokyselinových zbytků substituovaných aminokyselinami majícími konzervativní (např. substituce leucinu isoleucinem) nebo nekonzervativní (např. substituce glycinu

tryptofanem) strukturu nebo chemické vlastnosti, aminokyselinové delece, adice, posuny čtecího rámce nebo zkrácení. CTLA4 mutantní molekuly mohou obsahovat non-CTLA4 molekulu, která je na tuto molekulu navázaná. Mutantní molekuly mohou být rozpustné (tj. cirkulující) nebo vázané na povrch buněk. Mezi další CTLA4 mutantní molekuly patří molekuly popsané v U.S. Patentových přihláškách pořadová č. 09/865,321, 60/214,065 a 60/287,576; v U.S. Patentech č. 6,090,914, 5,844,095 a 5,773,253; a v Peach, R. J., et al., v J Exp. Med. 180:2049-2058 (1994)). CTLA4 mutantní molekuly mohou být vyrobeny synteticky nebo rekombinantně.

"CTLA4Ig" je rozpustný fúzní protein obsahující extracelulární doménu přirozeného CTLA4 navázanou na Ig koncovku, nebo jeho část, která se váže na B7. Konkrétní provedení obsahují extracelulární doménu přirozeného CTLA4 (jak je uvedeno na obr. 19) začínající methioninem v pozici +1 a končící kyselinou asparagovou v pozici +124; nebo začínající alaninem v pozici -1 a končící kyselinou asparagovou v pozici +124; a spojovací aminokyselinový zbytek glutamin v pozici +125; a imunoglobulinovou část obsahující kyselinu glutamovou v pozici +126 až lysin v pozici +357 (DNA kódující CTLA4Ig byla uložena 31.5.1991 v American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, podle podmínek Budapeštské smlouvy, pod ATCC přírůstkovým č. ATCC 68629; Linsley, P., et al., 1994 Immunity 1:793-80). CTLA4Ig-24, Chinese Hamster Ovary (CHO) buněčná linie exprimující CTLA4Ig byla uložena 31.5.1991 pod ATCC identifikačním č. CRL-10762). Solubilní CTLA4Ig molekuly použité ve způsobech a/nebo kitech podle předkládaného vynálezu mohou a nemusí obsahovat signální (vedoucí) peptidovou sekvenci. Obvykle ve způsobech a/nebo kitech podle předkládaného vynálezu molekuly neobsahují

signální peptidovou sekvenci.

"L104IEA29YIg" je fúzní protein, kterým je rozpustná CTLA4 mutantní molekula obsahující extracelulární doménu přirozeného CTLA4 s aminokyselinovou změnou A29Y (tyrosin substituovaný za alanin v pozici 29) a L104E (kyselina glutamová substituovaná za leucín v pozici +104), nebo její část, která se váže na B7 molekulu, navázanou na Ig koncovku (jak je uvedeno na obr. 15; DNA kódující L104EA29YIg byla uložena 20.6.2000 pod ATCC č. PTA-2104; chráněno v U.S. Patentových přihláškách č. 09/579,927, 601287,576 a 601214,065, které jsou zde uvedeny jako odkazy). Solubilní L104EA29YIg molekuly použité ve způsobech a/nebo kitech podle předkládaného vynálezu mohou a nemusí obsahovat signální (vedoucí) peptidovou sekvenci. Obvykle ve způsobech a/nebo kitech podle předkládaného vynálezu molekuly neobsahují signální peptidovou sekvenci.

Termín "rozpustná" označuje jakoukoliv molekulu, nebo její fragmenty a deriváty, nenavázanou na buňku, tj. cirkulující. Například, CTLA4, B7 nebo CD28 mohou být učiněny rozpustnými navázáním na imunoglobulinové (Ig) skupiny na extracelulární doménu CTLA4, B7 nebo CD28, v příslušném pořadí. Alternativně, molekula, jako je CTLA4, může být učiněna rozpustnou odstraněním její transmembránové domény. Obvykle solubilní molekuly použité ve způsobech podle předkládaného vynálezu neobsahují signální (nebo vedoucí) sekvenci.

Termín "rozpustné CTLA4 molekuly" označuje na buňky nenavázané (tj. cirkulující) CTLA4 molekuly (přirozené nebo mutantní) nebo jakoukoliv funkční část CTLA4 molekuly, která se váže na B7, včetně, například: CTLA4Ig fúzních proteinů

(např. ATCC 68629), kde extracelulární doména CTLA4 je fúzovaná na imunoglobulinovou (Ig) skupinu, což způsobuje rozpustnost fúzní molekuly, nebo jejich fragmentů a derivátů; proteiny s extracelulární doménou CTLA4 fúzovanou nebo navázanou na část biologicky nebo chemicky aktivního proteinu, jako je papillomavirový E7 genový produkt (CTLA4-E7), melanomový-asociovaný antigen p97 (CTLA4-p97) nebo HIV env protein (CTLA4-env gp120), nebo jejich fragmenty a deriváty; hybridní (chimérické) fúzní proteiny, jako je CD28/CTLA4Ig, nebo jejich fragmenty a deriváty; CTLA4 molekuly s odstraněnou transmembránovou doménou pro dosažení rozpustnosti proteinu (Oaks, M. K., et al., 2000 Cellular Immunology 201:144-153), nebo jejich fragmenty a deriváty. "Rozpustné CTLA4 molekuly" také zahrnují jejich fragmenty, části a deriváty; a rozpustné CTLA4 mutantní molekuly mající vazebné aktivity CTLA4. Solubilní CTLA4 molekuly použité ve způsobech podle předkládaného vynálezu mohou a nemusí obsahovat signální (vedoucí) peptidovou sekvenci. Obvykle ve způsobech a/nebo kitech podle předkládaného vynálezu molekuly neobsahují signální peptidovou sekvenci.

Termín "extracelulární doména CTLA4" označuje část CTLA4, která rozpoznává a váže se na CTLA4 ligandy, jako jsou B7 molekuly. Například, extracelulární doména CTLA4 zahrnuje methionin v pozici +1 až kyselinou asparagovou v pozici +124 (obr. 19). Alternativně, extracelulární doména CTLA4 zahrnuje alanin v pozici -1 až kyselinou asparagovou v pozici +124 (obr. 19). Extracelulární doména zahrnuje fragmenty nebo deriváty CTLA4, které se váží na B7 molekulu. Extracelulární doména CTLA4, jak je uvedena na Obr. 19, může také obsahovat mutace, které mění vazebnou aviditu CTLA4 molekul pro B7 molekulu.

Termín mutace označuje změnu nukleotidové nebo aminokyselinové sekvence přirozené molekuly, například změnu v DNA a/nebo aminokyselinové sekvenci přirozené CTLA4 extracelulární domény. Mutace v DNA mohou měnit kodony, což vede ke změně aminokyselinové sekvence. Mezi změny v DNA patří substituce, delece, inserce, alternativní sestřih nebo zkrácení. Mezi aminokyselinové změny patří substituce, delece, inserce, adice, zkrácení nebo změny ve zpracování nebo štěpení proteinu. Alternativně, mutace v nukleotidové sekvenci mohou vést ke vzniku silentních mutací aminokyselinové sekvence, jak je dobře známé v oboru. V tomto ohledu některé nukleotidové kodony kódují stejné aminokyseliny. Příklady jsou nukleotidové kodony CGU, CGG, CGC, a CGA kódující aminokyselinu arginin (R); nebo kodony GAU a GAC kódující aminokyselinu kyselinu asparagovou (D). Tak může být protein kódován jednou nebo více molekulami nukleové kyseliny, které se liší ve své specifické nukleotidové sekvenci, ale které kódují proteinové molekuly mající identické sekvence. Aminokyselinové kódující sekvence jsou následující:

Aminokyselina	Symbol	Jednopísmenná zkratka	Kodony
Alanin	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cystein	Cys	C	UGU, UGC
Kyselina asparagová	Asp	D	GAU, GAC
Kyselina glutamová	Glu	E	GAA, GAG
Phenylalanine	Phe	F	UUU, UUC
Glycin	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidin	His	H	CAU, CAC
Isoleucin	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lysin	Lys	K	AAA, AAG

Leucin	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Methionin	Met	M	AUG
Asparagin	Asn	N	AAU, AAC
Prolin	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Arginin	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serin	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Threonin	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valin	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Tryptofan	Trp	W	UGG
Tyrosin	Tyr	Y	UAU, UAC

Mutantní molekula může obsahovat jednu nebo více mutací.

Termín "non-CTLA4 proteinová sekvence" nebo "non-CTLA4 molekula" označuje jakoukoliv proteinovou molekulu, která se neváže na B7 a neinterferuje s vazbou CTLA4 na cílovou sekvenci. Příkladem je imunoglobulinový (Ig) konstantní region nebo jeho část. Výhodně je Ig konstantní region lidský nebo opičí Ig konstantní region, např., lidský C(gamma)1, včetně pantu, CH2 a CH3 region. Ig konstantní region může být mutovaný pro snížení jeho efektorových funkcí (U.S. Patents 5,637,481, 5,844,095 a 5,434,131).

Termín "fragment" nebo "část" označuje jakoukoliv část nebo segment CTLA4 molekuly, výhodně extracelulární doménu CTLA4 nebo její část nebo segment, která rozpoznává a váže

se na cílovou strukturu, např. B7 molekulu.

Termín "B7" označuje B7 rodinu molekul, včetně B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) a B7-3, které rozpoznávají a váží se na CTLA4 a/nebo CD28.

Termín "B7-pozitivní buňky" označuje buňky exprimující na povrchu jednu nebo více molekul typu B7.

Termín "derivát" označuje molekulu mající homologii sekvence a stejnou aktivitu jako původní molekula. Například, derivát CTLA4 je rozpustná CTLA4 molekula mající aminokyselinovou sekvenci z alespoň 70% stejnou jako je extracelulární doména přirozeného CTLA4, a která rozpoznává a váže se na B7, např. CTLA4Ig nebo rozpustný CTLA4 mutantní molekula L104EA29YIg.

Termín "blokování" nebo "inhibice" receptoru, signálu nebo molekuly označuje interferenci s aktivací receptoru, signálu nebo molekuly, detekovanou testy známými v oboru. Například, blokáda buněčné imunitní reakce může být detekována stanovením redukce rejekce transplantátu nebo zmírněním příznaků souvisejících s hemoglobinopatií. Blokáda nebo inhibice může být úplná nebo částečná.

Termín "blokování B7 interakce" označuje interferenci s vazbou B7 na jeho ligandy, jako je CD28 a/nebo CTLA4, což způsobuje blokádu interakce T-lymfocytů a B7-pozitivních buněk. Příklady sloučenin, které blokují B7 interakce, jsou molekuly, jako jsou protilátky (nebo jejich části či deriváty), které rozpoznávají a váží se na jakoukoliv z CTLA4, CD28 nebo B7 molekul (např. B7-1, B7-2); rozpustné formy (nebo jejich části nebo deriváty) molekul, jako je

rozpustný CTLA4; peptidové fragmenty nebo jiné malé molekuly navržené tak, aby interferovaly s buněčnou signalizací přes CTLA4/CD28/B7-zprostředkované interakce. Ve výhodném provedení je blokovacím činidlem rozpustná CTLA4 molekula, jako je CTLA4Ig (ATCC 68629) nebo L104EA29YIg (ATCC PTA-2104), rozpustná CD28 molekula, jako je CD28Ig (ATCC 68628), rozpustná B7 molekula, jako je B7Ig (ATCC 68627), anti-B7 monoklonální protilátka (např. ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 a monoklonální protilátky popsané v Anderson et al., U.S. Patent 6,113,898 nebo Yokochi et al., 1982. J. Immun., 128(2):823-827), anti-CTLA4 monoklonální protilátka (např. ATCC HB-304, a monoklonální protilátky popsané v odkazech 82-83) a/nebo anti-CD28 monoklonální protilátka (např. ATCC HB 11944 a mAb 9.3 popsaná v Hansen (Hansen et al., 1980. Immunogenetics 10:247-260) nebo Martin (Martin et al., 1984. J. Clin. Immun., 4(1):18-22)).

Termín "onemocnění imunitního systému" označuje onemocnění zprostředkované interakcí T-lymfocytů s B7-pozitivními buňkami, včetně, například, autoimunitních onemocnění, onemocnění souvisejících se štěpem a imunoproliferativních onemocnění. Příklady onemocnění imunitního systému jsou reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) (například při transplantaci kostní dřeně nebo při indukci tolerance), imunitní poruchy asociované s rejekcí transplantátu, chronickou rejekcí, tkáňovými nebo orgánovými allo- nebo xenotransplantáty, včetně solidních orgánů, kůže, ostrůvků pankreatu, hepatocytů, neuronů. Příklady imunoproliferativních onemocnění jsou například psoriasis, T-lymfocytární lymfom, T-lymfocytární akutní lymfoblastická leukemie, testikulární angiocentrický T-lymfocytární lymfom, benigní lymfocytární angiitis, lupus (např. lupus

erythematosus, lupus nephritis), Hashimotova thyroiditis, primární myxedem, Gravesova nemoc, perniciosní anemie, autoimunní atrofická gastritis, Addisonova nemoc, diabetes (např. insulin dependentní diabetes mellitus, diabetes mellitus typu I, diabetes mellitus typu II), Good-Pasteurův syndrom, myasthenia gravis, pemphigus, Crohnova nemoc, sympatetická ophthalmie, autoimunitní uveitis, roztroušená sklerosa, autoimunitní hemolytická anemie, idiopatická trombocytrýzdnéie, primární biliární cirhosa, chronická infekční hepatitida, ulcerosní colitis, Sjogrenův syndrom, revmatická onemocnění (např. revmatoidní arthrititis), polymyositis, sklerodermie, smíšené onemocnění pojivové tkáně.

Vynález bude nyní podrobněji popsán v následujícím popisu.

Způsoby

Předkládaný vynález poskytuje způsoby pro navození smíšeného hematopoetického chimérismu u jedinců. Mezi jedince patří, například, lidé, opice, prasata, koně, ryby, psi, kočky a krávy. Hematopoetický chimérismus může být použitelný pro inhibici imunitní reakce, např. pro inhibování rejekce transplantátu, např., tkáňového nebo orgánového transplantátu, a/nebo může být použitelný pro léčení hemoglobinopatií, jako je srpkovitá anemie a thalassemie. Orgánové nebo tkáňové transplantáty mohou být jakékoliv orgány či tkáně vhodné pro transplantaci. Například může být tkáň vybrána ze skupiny zahrnující kůži, kostní dřeň, srdce, plíce, ledviny, játra, slinivku břišní, ostrůvky pankreatu, buněčné suspenze a geneticky modifikované buňky. V jednom provedení jsou tkáňovými

transplantáty kožní transplantáty. Tkáň může být odebrána od dárce nebo může být kultivována in vitro. Transplantátem může být autotransplantát, isotransplantát, allotransplantát nebo xenotransplantát, nebo jejich kombinace.

V jednom provedení předkládaný vynález poskytuje způsoby pro léčení onemocnění imunitního systému a/nebo hemoglobinopatií, který zahrnuje podání alkylačního činidla a kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty, s nebo bez imunosupresivního činidla.

Způsob podle předkládaného vynálezu dále zahrnuje podání jedné nebo více dávek buněk kostní dřeně zbavené T-lymfocytů (tolerizační a/nebo transplantační dávky) jedinci. Způsob podle předkládaného vynálezu také dále zahrnuje podání jedné nebo více dávek alkylačního činidla jedinci. Dále může způsob zahrnovat podání jednoho nebo více imunosupresivních činidel jedinci, současně nebo v různé době.

V jednom provedení je první dávka kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty (tolerizační dávka) a imunosupresivního činidla podána přibližně ve stejnou dobu jako transplantovaný orgán. Výhodně jsou kostní dřeň a imunosupresivní činidlo podány před podáním busulfanu. Způsob může zahrnovat další krok nebo kroky, kterými je podání alespoň jednoho typu imunosupresivního činidla po podání busulfanu. Dále způsob zahrnuje podání druhé dávky kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty (transplantační dávky) jedinci.

Jak bylo uvedeno výše, je alkylačním činidlem výhodně anti-proliferativní činidlo (např. činidlo, které inhibuje buněčnou proliferaci). Jedním příkladem výhodného alkylačního činidla je alkylsulfonát, např. busulfan.

Dalšími příklady alkylsulfonátů jsou alkyl-ptoluensulfonáty, alkyltrifluormethansulfonáty, p-bromfenylsulfonáty, alkylarylsulfonáty a další. Dalšími příklady alkylačních činidel jsou, například, nitrogen mustardy (mechlorethaminy, chlorambucil, melphalan, uracil mustard), oxazaposporiny (cyklofosfamid, perfosfamid, trofosfamid), a nitrosomočoviny.

Ačkoliv výhodná provedení předkládaného vynálezu využívají alkylsulfonát, busulfan, jako anti-proliferativní činidlo, mohou jiná provedení předkládaného vynálezu používat jiná anti-proliferativní, chemoterapeutická činidla. V některých provedeních budou zejména výhodná alkylační chemoterapeutická činidla. Příklady takových alkylačních chemoterapeutických činidel jsou carmustin, chlorambucil, cisplatina, lomustin, cyklofosfamid, melfalan, mechlorethamin, prokarbazin, thiotepa, uracil mustard, triethylenmelamin, pipobroman, streptozocin, ifosfamid, dakarbazin, karboplatina a hexamethyhmelamin.

Podání alkylačního činidla, stejně jako jiných činidel, jedinci, může být provedeno mnoha různými způsoby. Například může být alkylační činidlo podáno intravenosně, intramuskulárně nebo intra-peritoneálně. Alternativně může být činidlo podáno orálně nebo podkožně. Některé metody pro podání busulfanu jsou popsány v U.S. Pat. č. 5,430,057 a 5,559,148. Další metody podání budou známy odborníkům v oboru. Obdobně, kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty mohou být podány mnoha různými způsoby známými odborníkům v oboru. Jedním příkladem je intravenosní infuze. V některých provedeních může být alkylační činidlo podáno během 24-hodin po podání kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty.

Dále, dávka alkylačního činidla a kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty může být určena běžnými pokusy a může být empiricky optimalizována. Dávkování terapeutického činidla nebo imunosupresivního činidla je závislé na mnoha faktorech, jako je například typ jedince (například druh), použité činidlo (např. busulfan nebo rozpustný CTLA4 nebo anti-gp39 mAb), lokalizace antigenní expozice, typ postižené tkáně, typ léčeného onemocnění, závažnost onemocnění, celkový zdravotní stav jedince a reakce na léčbu činidlem. Proto se dávkování činidla liší pro každého jedince, činidlo a způsob podání. Jak je zde popsáno, mohou být dávky busulfanu titrovány za účelem stanovení optimální dávky nutné pro dosažení optimálních účinků. Například, busulfan může být podáván v dávce mezi 0,1 a 20 mg/kg hmotnosti jedince, např. 4 mg/kg, 8-16 mg/kg, 4-16 mg/kg (Slavin, S. et al., Blood 91:756-763 (1998); Lucarelli et al., výše). Podobně, dávka kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty může být titrována v běžných pokusech pro stanovení množství nutného pro dosažení požadovaného efektu.

V některých provedeních je alkylační činidlo, např., busulfan, podáno před transplantací, např. transplantací tkáně nebo solidního orgánu. Konkrétními provedeními je podání busulfanu během dne, během 12 hodin nebo během 6 hodin před transplantací solidního orgánu. Nicméně, busulfan může být podán i dříve, pokud je dosaženo požadovaného efektu z hlediska orgánových nebo tkáňových transplantátů. V alternativním provedení může být žádoucí podání busulfanu po transplantaci orgánu.

Podání alkylačního činidla a/nebo kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty může proběhnout přibližně v téže době jako transplantace solidního orgánu u jedince. Podání alkylačního

čínidla nebo kostní dřeň v přibližně stejné době znamená, že alkylační čínidlo nebo kostní dřeň je podáno jedinci jako součást přípravného postupu pro podání orgánových nebo tkáňových transplantátů. Není nutné, aby bylo alkylační čínidlo nebo kostní dřeň podáno v přesně stejnou dobu (tj. během minut) jako orgánový transplantát. Jak bude odborníkům v oboru jasné, načasování podání prostředků může být různé. Například, podání buněk kostní dřeň zbavené T-lymfocytů může být provedeno před, po nebo současně s podáním busulfanu. Obdobně, načasování podání může být různé z hlediska podání imunosupresivního čínidla nebo provedení orgánové transplantace.

Výhodnými imunosupresivními čínidly jsou čínidla, která inhibují imunitní reakci. Výhodněji čínidla redukuje nebo brání proliferaci T-lymfocytů. Některá čínidla mohou inhibovat Proliferaci T-lymfocytů inhibováním interakce T-lymfocytů s dalšími buňkami prezentujícími antigen. Jedním příkladem buněk prezentujících antigen je B-lymfocyt. Příklady čínidel, které interferují s interakcemi T-lymfocytů s buňkami prezentujícími antigen, a tím inhibují proliferaci T-lymfocytů, jsou ligandy pro B7 antigeny, ligandy pro CTLA4 antigen, ligandy pro CD28 antigen, ligandy pro T-lymfocytární receptor (TCR), ligandy pro gp39 antigeny, ligandy pro CD40 antigeny, ligandy pro CD4, a ligandy pro CDS. Příklady ligandů pro B7 antigeny jsou rozpustný CTLA4 (např. ATCC 68629, ATCC PTA 2104), rozpustný CD28 (např., ATCC 68628), nebo monoklonální protilátky, které rozpoznávají a váží se na B7 antigeny nebo jejich fragmenty (např., ATCC JIB253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC 118-301, ATCC 118-11341; monoklonální protilátky popsané v Anderson et al., U.S. Patent 6,113,898 nebo Yokochi et al., 1982. J. Immun., 128(2)823-827). Jedním

výhodným činidlem je CTLA4-Ig (ATCC 68629). Jiné rozpustné CTLA4 molekuly mohou být také s výhodou použity, včetně rozpustných CTLA4 mutantních molekul (ATCC PTA 2104).

Ligandy pro CTLA4 nebo CD28 antigeny zahrnují monoklonální protilátky, které rozpoznávají a váží se na CTLA4 (např. ATCC HB-304, a monoklonální protilátky popsané v Linsley et al, U.S Patent č. 6,090,914 a Linsley et al., 1992. J. Exp. Med 176: 1595-1604) a/nebo CD28 (např. ATCC HB 11944 a mAb 9.3 popsaná v Hansen (Hansen et al., 1980. Immunogenetics 10: 247-260) nebo Martin (Martin et al., 1984. J. Clin. Immun., 4(1):18-22)), nebo jejich fragmenty. Dalšími ligandy pro CTLA4 nebo CD28 jsou rozpustné B7 molekuly, jako je B7Ig (např., ATCC 68627).

Příklady ligandů pro gp39 jsou rozpustný CD40 nebo monoklonální protilátky, které rozpoznávají a váží se na gp39 antigen (např. anti-CD40L), nebo jejich fragmenty. Jedním příkladem gp39 (anti-CD40L) mAb je MR1 (Bioexpress, Lebanon, Nil). Dalšími příklady anti-lidský-gp39 mAb jsou ATCC HB 11822, ATCC HB 11816, ATCC HB 11821, ATCC HB 11808, ATCC HB 11823, jak jsou popsány v Evropské patentové přihlášce č. EP 8071 75A2.

Příklady ligandů pro CD40 jsou rozpustný gp39 nebo monoklonální protilátky, které rozpoznávají a váží se na CD40 antigen, nebo jeho fragment. Odborníkům v oboru bude jasné, že i další činidla nebo ligandy mohou být použita pro inhibování interakce CD28 s B7, a/nebo gp39 s CD40. Taková činidla mohou být vybrána pro použití ve způsobech podle předkládaného vynálezu podle známých vlastností činidla, například podle toho, zda činidlo interferuje s interakcí CTLA4/CD28 s B7, a/nebo interferuje s interakcí gp39 s CD40.

Pokud činidlo interferuje s těmito interakcemi, tak může odborník v oboru provádět způsoby podle předkládaného vynálezu s těmito činidly.

I další imunosupresivní činidla mohou být použita ve způsobech podle předkládaného vynálezu. Příklady jsou: cyklosporin, azathioprin, methotrexát, lymfocytární imunitní globulin, anti-CD3 protilátky, Rho (D) imunoglobulin, adrenokortikosterody, sulfasalzin, FK-506, methoxsalen, mykofenolátmofetil (CELLCEPT), koňský anti-lidský thymocytární globulin (ATGAM), humanizovaná anti-TAC (HAT), basiliximab (SIMULECT), králičí anti-lidský thymocytární globulin (THYMOGLOBULIN), sirolimus nebo thalidomid.

Ve výhodném provedení jsou imunosupresivní činidla podána jedinci současně (tj. jsou podána v kombinované léčbě). Ve výhodnějším provedení je kombinací kombinace prvního ligandu, který interferuje vazbou CD28 antigenu na B7 antigen, a druhého ligandu, který interferuje s vazbou gp39 antigenu (též označovaného jako CD 154) s CD40 antigenem. Jak bylo popsáno výše, je první ligand výhodně rozpustná CTLA4 molekula, jako je CTLA4-Ig. Druhý ligand je výhodně anti-gp39 mAb (tj monoklonální protilátka, která rozpoznává a váže se na gp39 antigen, nebo jeho fragment). Jedním příkladem je MR1.

V jednom provedení předkládaného vynálezu jsou CTLA4Ig a MR1 podány v kombinaci pro blokování kostimulační aktivity CTLA4/CD28/B7 a gp39/CD40. Další provedení zahrnují CTLA4Ig a anti-lidský-gp39 mAb. Příklady anti-lidský-gp39 mAb jsou ATCC HB 11822, ATCC HB 11816, ATCC HB 11821, ATCC HB 11808, ATCC HB 11823, popsané v Evropské patentové přihlášce č. EP 807175A2. Tato kombinace je zde označována jako "blokáda

kostimulace". Například, rozpustné CTLA4 molekuly mohou být podány v dávce mezi 0,1 a 20,0 mg/kg hmotnosti jedince, výhodně mezi 0,5 a 10,0 mg/kg.

V jednom způsobu předkládaný vynález zahrnuje léčbu hemoglobinopatií u jedinců, kde tato léčba také zahrnuje další krok podání druhé dávky kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty jedinci. Podobně mohou způsoby léčby dále zahrnovat jeden nebo více dalších kroků podání dalších dávek imunosupresivního činidla jedinci.

V některých provedeních je hemoglobinopatií beta-thalassemie. V jiném provedení je hemoglobinopatií srpkovitá anemie. Korekce hemoglobinopatie může být stanovena mnoha způsoby. Jedním příkladem je měření množství hemoglobinových proužků (například hlavních a vedlejších) v krvi příjemce.

Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu způsoby zahrnují podání první dávky kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty a současně podání kombinace rozpustného CTLA4 a gp39 mAb jedinci, potom podání dalších dávek solubilního CTLA4 a gp39 mAb jedinci, potom podání alkylačního činidla jedinci, a podání druhé dávky kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty jedinci. Uvedený způsob je zejména vhodný pro navození hematopoetického chimérismu, pro léčbu beta thalassemie, a pro inhibování rejekce tkáňového nebo orgánového transplantátu.

Prostředky

Vynález poskytuje prostředky použitelné pro navození chimérismu u jedinců. Prostředky budou proto použitelné pro

inhibování imunitní reakce, např. inhibování rejekce tkáňových nebo orgánových transplantátů. Prostředky budou také vhodné pro korekci hemoglobinopatií.

Prostředky podle předkládaného vynálezu výhodně obsahují alkylační činidlo, jako je busulfan, a jedno nebo více typů imunosupresivních činidel. Dále prostředky mohou obsahovat kostní dřeň ochuzenou o T-lymfocyty. Výhodně kostní dřeň ochuzená o T-lymfocyty imunologicky odpovídá léčenému jedinci.

Ve výhodném provedení obsahují prostředky busulfan a/nebo kombinaci rozpustného CTLA4 a anti-gp39 mAb. Specifickými příklady je CTLA4Ig a MR1.

Prostředek podle předkládaného vynálezu je výhodně podán ve farmaceuticky přijatelném nosiči, jak je popsáno výše. Jak bude odborníkům v oboru jasné, není nutné, aby byly prostředky obsahující činidla podány současně. Například, busulfan může být aplikován separovaně od blokády ko-stimulace, a přesto může působit jako kompozice, která může být použita ve způsobech podle předkládaného vynálezu. Alternativně, prostředek může obsahovat busulfan, rozpustný CTLA4, a anti-gp39 mAb v jedno nosiči. Jsou možná i další provedení.

Vynález také zahrnuje použití prostředků podle předkládaného vynálezu společně s dalšími farmaceutickými činidly pro léčbu onemocnění imunitního systému a/nebo hemoglobinopatií. Například, onemocnění imunitního systému nebo hemoglobinopatie mohou být léčeny molekulami podle předkládaného vynálezu společně s - například - imunosupresivy uvedenými výše a dále kortikosteroidy,

cyklosporinem (Mathiesen 1989 Cancer Lett. 44(2):151-156), prednisonem, azathioprinem, methotrexatem (R. Handschumacher, v: "Drugs Used for Immunosuppression str. 1264-1276), TNF blokátory nebo antagonisty (New England Journal of Medicine, vol. 340: 253-259, 1999; The Lancet vol. 354: 1932-39, 1999, Annals of Internal Medicine, vol. 130: 478-486), nebo jakýmkoliv jiným biologickým činidlem cíleně ovlivňujícím zánětlivé cytokiny, nesteroidními protizánětlivými léky/Cox-2 inhibitory, hydroxychlorochinem, sulfasalazopryinem, solemi zlata, etanerceptem, infliximabem, rapamycinem, mykofenolát-mofetilem, azathioprinem, tacrolismem, basiliximabem, cytoxanem, interferonem beta-1a, interferonem beta-1b, glatiramer-acetatem, mitoxantron-hydrochloridem, anakinrou a/nebo jinými biologickými činidly.

Dále, vynález předpokládá použití prostředků podle předkládaného vynálezu společně s anti-virovými činidly pro navození tolerance u jedince se současnou virovou infekcí.

Dále vynález poskytuje terapeutické kombinace, např. kit, např. pro použití v jakékoliv metodě popsané výše, které obsahují rozpustnou molekulu CTLA4, ve volné formě nebo ve formě farmaceuticky přijatelné soli, která je použita konkomitantně nebo v sekvenci s alespoň jedním farmaceutickým prostředkem obsahujícím imunosupresivní činidlo, imunomodulační činidlo nebo protizánětlivé léčivo, a/nebo alkylační činidlo. Kit může obsahovat návod pro jeho podání. Imunosupresivní činidlo, imunomodulační činidlo nebo protizánětlivé léčivo může být ve volné formě nebo ve formě farmaceuticky přijatelné soli. Dále, alkylační činidlo může být ve volné formě nebo ve formě farmaceuticky přijatelné soli.

Rozpustné CTLA4 molekuly jsou výhodnými ligandy, které interferují s CTLA4/CD28/B7 interakcemi. CTLA4 molekuly, s mutantní nebo přirozenými sekvencemi, mohou být upraveny tak, aby byly rozpustné, deletováním CTLA4 transmembránového segmentu (Oaks, M. K., et al., 2000 Cellular Immunology 201:144-153).

Alternativně, rozpustné CTLA4 molekuly, s mutantními nebo přirozenými sekvencemi, mohou být fúzní proteiny, ve kterých jsou CTLA4 molekuly fúzované na non-CTLA4 skupiny, jako jsou imunoglobulinové (Ig) molekuly, které udílejí CTLA4 molekulám rozpustnost. Například, CTLA4 fúzní protein může obsahovat extracelulární doménu CTLA4 fúzovanou na imunoglobulinovou konstantní doménu, což vede ke vzniku CTLA4Ig molekuly (Obr. 20) (Linsley, P. S., et al., 1994 Immunity 1:793-80).

Pro klinické protokoly je výhodné, aby imunoglobulinový region nevyvolával škodlivou imunitní reakci u jedince. Výhodnou skupinou je konstantní region imunoglobulinu, včetně lidského nebo opičího imunoglobulinového konstantního regionu. Příkladem imunoglobulinového regionu je lidský C1, včetně pantového regionu, CH2 a CH3 regiony, které mohou zprostředkovat efektorové funkce, jako je vazba na Fc receptory, zprostředkování komplement-dependentní cytotoxicity (CDC), nebo zprostředkování buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách (ADCC). Imunoglobulinová skupina může obsahovat jednu nebo více mutací (např. v CH2 doméně, pro redukci efektorových funkcí, jako je CDC nebo ADCC), kde mutace moduluje vazebnou kapacitu imunoglobulinu k jeho ligandu tím, že zvyšuje nebo snižuje vazebnou kapacitu imunoglobulinu na Fc receptory.

Například, mutace v imunoglobulinu mohou zahrnovat změny jakéhokoliv nebo všech cysteinových zbytků v pantové doméně, například, cysteinů v pozicích +130, +136, a +139, které jsou substituované serinem (Obr. 20). Imunoglobulinová molekula může také obsahovat prolin v pozici +148 substituovaný serinem, jak je uvedeno na Obr. 20. Další mutací v imunoglobulinové skupině může být substituce leucinu v pozici +144 za fenylalanin, leucinu v pozici +145 za kyselinu glutamovou nebo glycinu v pozici +147 za alanin.

Dalšími non-CTLA4 skupinami vhodnými pro použití v solubilní CTLA4 molekule nebo rozpustné CTLA4 mutantní molekule jsou, například, p97 molekula, env gp120 molekula, E7 molekula, a ova molekula (Dash, B. et al. 1994 J. Gen. Virol. 75 (Pt 6):1389-97; Ikeda, T., et al. 1994 Gene 138(1-2):193-6; Falk, K., et al. 1993 Cell. Immunol. 150(2):447-52; Fujisaka, K. et al. 1994 Virology 204(2):789-93). Vhodné jsou i další molekuly (Gerard, C. et al. 1994 Neuroscience 62(3):721; Byrn, R. et al. 1989 63(10):4370; Smith, D. et al. 1987 Science 238:1704; Lasky, L. 1996 Science 233 :209).

Solubilní CTLA4 molekula podle předkládaného vynálezu může obsahovat sekvenci signálního peptidu navázanou na N-terminální konec extracelulární domény CTLA4 části molekuly. Signálním peptidem může být jakákoliv sekvence, která umožní sekreci molekuly, včetně signálního peptidu z onkostatinu M (Malik, et al., (1989) Molec. Cell. Biol. 9: 2847-2853), nebo CD5 (Jones, N. H. et al., (1986) Nature 323 :346-349), nebo signálního peptidu z jakéhokoliv extracelulárního proteinu.

Solubilní CTLA4 molekula podle předkládaného vynálezu

může obsahovat signální peptid onkostatinu M navázaný na N-terminální konec extracelulární domény CTLA4, a lidskou imunoglobulinovou molekulu (např. pant, CH2 a CH3) navázanou na C-terminální konec extracelulární domény (přirozené nebo mutované) CTLA4. Tato molekula obsahuje signální peptid onkostatinu M mající aminokyselinovou sekvenci s methioninem v pozici -26 až k alaninu v pozici -1, CTLA4 část tvořenou aminokyselinovou sekvencí od methioninu v pozici +1 do kyseliny asparagové v pozici +124, a spojovací aminokyselinový zbytek glutamin v pozici +125, a imunoglobulinovou část tvořenou aminokyselinovou sekvencí mající kyselinu glutamovou v pozici +126 až lysin v pozici +357.

Konkrétně, solubilní CTLA4 mutantní molekuly podle předkládaného vynálezu, obsahující mutované CTLA4 sekvence popsané dále, jsou fúzní molekuly obsahující lidské IgC1 skupiny fúzované na mutované CTLA4 fragmenty.

V jednom provedení obsahují solubilní CTLA4 mutantní molekuly IgC1 skupinu fúzovanou na CTLA4 fragment obsahující jedinou mutaci v extracelulární doméně. Extracelulární doména CTLA4 obsahuje methionin v pozici +1 až kyselinu asparagovou v pozici +124 (např. obr. 19). Extracelulární část CTLA4 může obsahovat alanin v pozici -1 až kyselinu asparagovou v pozici +124 (např. obr. 19).

Příklady jednotlivých mutací jsou uvedeny v následující tabulce, ve které je leucin v pozici +104 změněn na jakoukoliv jinou aminokyselinu:

Mutanti s jednou mutací	změna kodonu
L104EIG	Kyselina glutamová GAG
L104SIG	Serin AGT
L104TIG	Threonin ACG
L104AIG	Alanin GCG
L104WIG	Tryptofan TGG
L104QIG	Glutamin CAG
L104KIG	Lysin AAG
L104RIG	Arginin CGG
L104GIG	Glycin GGG

Dále předkládaný vynález poskytuje mutantní molekuly mající extracelulární doménu CTLA4 se dvěma mutacemi fúzovanou na IgC1 skupinu. Příklady jsou následující molekuly mající leucin v pozici +104 změněn na jinou aminokyselinu (např. kyselinu glutamovou) a glycin v pozici +105, serin v pozici +25, threonin v pozici +30 nebo alanin v pozici +29 změněn na jakoukoliv jinou aminokyselinu:

Mutanti se dvěma mutacemi	změna kodonu
L104EG105FIG	Fenylalanin TTC
L104EG105WIG	Tryptofan TGG
L104EG105LIG	Leucin CTT
L104ES25RIG	Arginin CGG
L104ET30GIG	Glycin GGG
L104ET30NIG	Asparagin AAT
L104EA29YIG	Tyrosin TAT
L104EA29LIG	Leucin TTG
L104EA29TIG	Threonin ACT
L104EA29WIG	Tryptofan TGG

Ještě dále vynález poskytuje mutantní molekuly mající extracelulární doménu CTLA4 obsahující tři mutace fúzanou na IgC1 skupinu. Příklady jsou následující molekuly, ve kterých je leucin v pozici +104 změněn na jinou aminokyselinu (např. kyselinu glutamovou), alanin v pozici +29 je změněn na jinou aminokyselinu (např. tyrosin), a serin v pozici +25 je změněn na jinou aminokyselinu:

Mutantí se třema mutacemi	změna kodonu
L104EA29YS25KIg	Lysin : AAA
L104EA29YS25KIg	Lysin : AAG
L104EA29YS25NIg	Asparagin AAC
L104EA29YS25RIg	Arginin CGG

Rozpustné CTLA4 mutantní molekuly mohou obsahovat spojovací aminokyselinový zbytek, který je umístěn mezi CTLA4 část a Ig část molekuly. Spojovací aminokyselinou může být jakákoliv aminokyselina, včetně glutaminu. Spojovací aminokyselina může být vložena metodami molekulárními nebo chemickou syntézou, jak jsou známy v oboru.

Předkládaný vynález poskytuje CTLA4 mutantní molekuly obsahující signální peptidovou sekvenci navázanou na N-terminální konec extracelulární domény CTLA4 části mutantní molekuly. Signálním peptidem může být jakákoliv sekvence, která umožní sekreci mutantní molekuly, včetně signálního peptidu z oncostatinu M (Malik, et al., 1989 Molec. Cell. Biol. 9: 2847-2853), nebo CD5 (Jones, N. H. et al., 1986 Nature 323:346-349), nebo signálního peptidu z jakéhokoliv extracelulárního proteinu.

Vynález poskytuje rozpustné CTLA4 mutantní molekuly obsahující jedinou mutaci v extracelulární doméně CTLA4, jako je L104EIG (jak je uvedena na Obr. 14) nebo L104SIG, kde L104EIG a L104SIG jsou mutované ve své CTLA4 sekvenci tak, že leucin v pozici +104 je substituovaný kyselinou glutamovou nebo serinem, v příslušném pořadí. Mutantní molekuly s mutací v jednom místě dále obsahují CTLA4 části obsahující methionin v pozici +1 až kyselinu asparagovou v pozici +124, a spojovací aminokyselinový zbytek glutamin v pozici +125, a imunoglobulinovou část tvořenou kyselinou glutamovou v pozici +126 až lysinem v pozici +357. Imunoglobulinová část mutantní molekuly může být také mutovaná tak, že cysteiny v pozicích +130, +136 a +139 jsou substituované serinem a prolin v pozici +148 je substituovaný serinem. Alternativně, rozpustná CTLA4 mutantní molekula s jednou mutací může mít CTLA4 část tvořenou alaninem v pozici -1 až kyselinou asparagovou v pozici +124.

Vynález poskytuje rozpustné CTLA4 mutantní molekuly obsahující dvě mutace v extracelulární doméně CTLA4, jako je L104EA29YIG, L104EA29LIG, L104EA29TIG nebo L104EA29WIG, kde leucin v pozici +104 je substituovaný kyselinou glutamovou, a alanin v pozici +29 je substituovaný tyrosinem, leucinem, threoninem nebo tryptofanem, v příslušném pořadí. Sekvence pro L104EA29YIG, L104EA29LIG, L104EA29TIG a L104EA29WIG, začínající methioninem v pozici +1 a končící lysinem v pozici +357, plus signální (vedoucí) peptidové sekvence, jsou obsaženy v sekvencích uvedených na obr. 15-18, v příslušném pořadí. Mutantní molekuly se dvěma mutacemi dále obsahují CTLA4 části tvořené methioninem v pozici +1 až kyselinou asparagovou v pozici +124, a spojovacím aminokyselinovým zbytkem glutaminem v pozici + 125, a

imunoglobulinovou část tvořenou kyselinou glutamovou v pozici +126 až lysinem v pozici +357. Imunoglobulinová část mutantní molekuly může být také mutovaná tak, že cysteiny v pozicích +130, +136 a +139 jsou substituované serinem, a prolin v pozici +148 je substituovaný serinem. Alternativně, tyto mutantní molekuly mohou obsahovat CTLA4 část tvořenou alaninem v pozici -1 až kyselinou asparagovou v pozici +124.

Vynález poskytuje rozpustné CTLA4 mutantní molekuly obsahující na dvou místech mutace v extracelulární doméně CTLA4, jako je L104EG105FIg, L104EG105WFIg a L104EG105LIg, kde leucin v pozici +104 je substituovaný kyselinou glutamovou a glycin v pozici +105 je substituovaný fenylalaninem, tryptofanem nebo leucinem, v příslušném pořadí. Mutantní molekuly se dvěma mutacemi mohou dále obsahovat CTLA4 část tvořenou methioninem v pozici +1 až kyselinou asparagovou v pozici +124, spojovacím aminokyselinovým zbytkem glutaminem v pozici +125, a imunoglobulinovou část tvořenou kyselinou glutamovou v pozici +126 až lysinem v pozici +357. Imunoglobulinová část může být také mutovaná tak, že cysteiny v pozicích +130, +136 a +139 jsou substituované serinem, a prolin v pozici +148 je substituovaný serinem. Alternativně, tyto mutantní molekuly mohou obsahovat CTLA4 část tvořenou alaninem v pozici -1 až kyselinou asparagovou v pozici +124.

Vynález dále poskytuje L104ES25RIg, což je mutantní molekula se dvěma mutacemi obsahující CTLA4 část tvořenou methioninem v pozici +1 až kyselinou asparagovou v pozici +124, spojovacím aminokyselinovým zbytkem glutaminem v pozici +125, a imunoglobulinovou část tvořenou kyselinou glutamovou v pozici +126 až lysinem v pozici +357. Část obsahující extracelulární doménu CTLA4 je mutovaná tak, že

serin v pozici +25 je substituovaný argininem a leucin v pozici +104 je substituovaný kyselinou glutamovou. Alternativně, L104ES25Rig může obsahovat CTLA4 část tvořenou alaninem v pozici -1 až kyselinou asparagovou v pozici +124.

Vynález poskytuje rozpustné CTLA4 mutantní molekuly obsahující mutace ve dvou místech extracelulární domény CTLA4, jako je L104ET30GIg a L104ET30NIg, kde je leucin v pozici +104 substituovaný kyselinou glutamovou, a threonin v pozici +30 je substituovaný glycinem nebo asparaginem, v příslušném pořadí. Mutantní molekuly s mutacemi na dvou místech dále obsahují CTLA4 části tvořené methioninem v pozici +1 až kyselinou asparagovou v pozici +124, spojovacím aminokyselinovým zbytkem glutaminem v pozici +125, a imunoglobulinovou částí tvořenou kyselinou glutamovou v pozici +126 až lysinem v pozici +357. Imunoglobulinová část může být také mutovaná tak, že cysteiny v pozicích +130, +136 a +139 jsou substituované serinem, a prolin v pozici +148 je substituovaný serinem. Alternativně, tyto mutantní molekuly mohou obsahovat CTLA4 část tvořenou alaninem v pozici -1 až kyselinou asparagovou v pozici +124.

Vynález poskytuje rozpustné CTLA4 mutantní molekuly obsahující mutace ve třech místech extracelulární domény CTLA4, jako je L104IEA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg, L104EA29YS25RIg, kde je leucin v pozici +104 substituovaný kyselinou glutamovou, alanin v pozici +29 je substituovaný tyrosinem, a serin v pozici +25 je změněn na lysin, asparagin nebo arginin, v příslušném pořadí. Mutantní molekuly s mutacemi na třech místech dále obsahují CTLA4 části tvořené methioninem v pozici +1 až kyselinou asparagovou v pozici +124, spojovacím aminokyselinovým

zbytkem glutaminem v pozici +125, a imunoglobulinovou částí tvořenou kyselinou glutamovou v pozici +126 až lysinem v pozici +357. Imunoglobulinová část může být také mutovaná tak, že cysteiny v pozicích +130, +136 a +139 jsou substituované serinem, a prolin v pozici +148 je substituovaný serinem. Alternativně, tyto mutantní molekuly mohou obsahovat CTLA4 část tvořenou alaninem v pozici -1 až kyselinou asparagovou v pozici +124.

Dalšími provedeními rozpustných CTLA4 mutantních molekul jsou chimérické CTLA4/CD28 homologní mutantní molekuly, které se váží na B7 (Peach, R. I., et al., 1994 J. Exp. Med. 180:2049-2058). Příklady těchto chimérických CTLA4/CD2S mutantních molekul jsou HS1, 13152, HS3, HS4, HS5, 13156, HS4A, HS4B, HS7, HS8, 13159, 131510, HS11, HS12, HS13 a HS14 (U.S. patent č. 5,773,253).

Výhodnými provedeními předkládaného vynálezu jsou rozpustné CTLA4 molekuly, jako je CTLA4Ig (uvedený na obr. 20, začínající methioninem v pozici +1 a končící lysinem v pozici +357) a rozpustný CTLA4 mutantní L104EA29YIg (uvedený na obr. 15, začínající methioninem v pozici +1 a končící lysinem v pozici +357). Vynález dále poskytuje molekuly nukleové kyseliny kódující aminokyselinové sekvence odpovídající solubilním CTLA4 molekulám podle předkládaného vynálezu. V jednom provedení je molekulou nukleové kyseliny DNA (např. cDNA) nebo její hybrid. DNA kódující CTLA4Ig (Obr. 20) byla uložena 31.5.1999 v American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 a bylo jí přiděleno ATCC přírůstkové č. ATCC 68629. DNA kódující L104EA29YIg (sekvence uvedená na Obr. 15) byla uložena 19.6.2000 v ATCC pod ATCC přírůstkovým č. PTA-2104. Alternativně jsou molekulami nukleové kyseliny RNA

nebo její hybridy.

Dále vynález poskytuje vektor, který obsahuje nukleotidové sekvence podle předkládaného vynálezu. Příklady expresních vektorů jsou, například, vektory pro savčí hostitelské buňky (např., BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2.vydání, Sambrook, Fritsch, a Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRcIRSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc vektory, pCMV vektory, pSG5 vektory (Stratagene)), retrovirové vektory (např., pFB vektory (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) nebo jejich modifikované formy, adenovirové vektory; adeno-associované virové vektory, bakulovirové vektory, kvasinkové vektory (např., pESC vektory (Stratagene)).

Vynález také poskytuje systém hostitel-vektor. systém hostitel-vektor obsahuje vektor podle předkládaného vynálezu ve vhodné hostitelské buňce. Příklady vhodných hostitelských buněk jsou, například, prokaryotické a eukaryotické buňky. V předkládaném vynálezu jsou eukaryotické buňky vhodnými hostitelskými buňkami. Příklady eukaryotických buněk jsou jakékoliv zvířecí buňky, ať primární, nebo imortalizované, kvasinky (např. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a *Pichia pastoris*), a rostlinné buňky. Myelomové, COS a CHO jsou dalšími příklady buněk, které mohou být použity jako hostitelské buňky. Mezi konkrétní CHO buňky patří, například, DG44 (Chasm, et al., 1986 Som. Cell. Molec. Genet. 12:555-556; Kolkekar 1997 Biochemistry 36:10901-10909), CHO-K1 (ATCC č. CCL-61), CHO-K1 Tet-On buněčná linie (Clontech), CHO označená ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO klon 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO klon B (GEIMG, Genova, IT),

CHO-K1/SF označená ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), a RR-CHOK1 označená jako ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Příklady rostlinných buněk jsou tabákové (z celých rostlin, buněčné kultury nebo kalu), kukuřičné, sójové a rýžové buňky. Přijatelná jsou také kukuřičná, sojová a rýžová semena.

CTLA4 mutantní molekuly podle předkládaného vynálezu mohou být izolovány jako přirozené polypeptidy, nebo z jakéhokoliv zdroje, ať je přirozený, syntetický, semi-syntetický nebo rekombinantní. V souladu s tím mohou být CTLA4 mutantní polypeptidové molekuly izolovány jako přirozené proteiny z jakéhokoliv druhu, konkrétně od savců, včetně hovězího dobytka, ovcí, prasat, , myši, koní a - výhodně - člověka. Alternativně mohou být CTLA4 mutantní polypeptidové molekuly izolovány jako rekombinantní polypeptidy, které jsou exprimovány v prokaryotických nebo eukaryotických hostitelských buňkách, nebo které jsou izolovány jako chemicky syntetizované polypeptidy.

Odborník v oboru snadno použije standardních izolačních metod pro získání izolovaných CTLA4 mutantních molekul. Typ a stupeň izolace bude záviset na zdroji a zamýšleném použití izolovaných molekul.

CTLA4 mutantní molekuly a jejich fragmenty nebo deriváty mohou být produkovány rekombinantními metodami. Tak může být izolovaná nukleotidová sekvence kódující přirozenou CTLA4 molekulu upravena tak, aby obsahovala mutace, za zisku nukleotidových sekvencí, které kódují CTLA4 mutantní polypeptidové molekuly. Například, nukleotidové sekvence kódující CTLA4 mutantní molekuly mohou být generovány metodou místně-clené mutagenese, za použití primerů a PCR

amplifikace. Primery mohou obsahovat specifické sekvence určené pro vkládání požadovaných mutací. Alternativně mohou být primery navrženy tak, aby obsahovaly náhodné nebo částečně náhodné sekvence, za účelem vkládání náhodných mutací. Standardní rekombinantní metody (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2.vydání, Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press) a PCR technologie (U.S.Patent č. 4,603,102) mohou být použity pro generování a izolování CTLA4 mutantních polynukleotidů kódujících CTLA4 mutantní polypeptidy.

Vynález zahrnuje farmaceutické prostředky pro použití při léčbě onemocnění imunitního systému, kde tyto prostředky obsahují farmaceuticky účinná množství rozpustné CTLA4 molekuly. V některých provedeních jsou onemocnění imunitního systému zprostředkována CD28/CTLA4/B7 interakcemi. Solubilní CTLA4 molekuly jsou výhodně rozpustné CTLA4 molekuly s přirozenou sekvencí a/nebo rozpustné CTLA4 molekuly obsahující jednu nebo více mutací v extracelulární doméně CTLA4. Farmaceutický prostředek může obsahovat rozpustnou CTLA4 proteinovou molekulu a/nebo molekulu nukleové kyseliny, a/nebo vektor kódující molekulu. Ve výhodném provedení mají solubilní CTLA4 molekuly aminokyselinové sekvence extracelulární domény CTLA4 uvedené na Obr. 20 nebo 15 (CTLA4Ig nebo L104EA29Y, v příslušném pořadí). Ještě výhodněji je solubilní CTLA4 mutantní molekulou L104EA29Yig, jak je zde popsána. Prostředky mohou dále obsahovat další terapeutická činidla, včetně léčivých toxinů, enzymů, protilátek nebo konjugátů.

Jak je standardní praxí v oboru, poskytuje vynález farmaceutické prostředky obsahující molekuly podle předkládaného vynálezu smísené s přijatelným nosičem nebo

adjuvans, které jsou známé odborníkům v oboru. Farmaceutické prostředky výhodně obsahují vhodné nosiče a adjuvans, kterými může být jakýkoliv materiál, který po smísení s molekulami podle předkládaného vynálezu (např. rozpustnou CTLA4 molekulou, jako je CTLA4Ig nebo L104EA29Y) zachovává aktivitu molekuly a je nereaktivní s imunitním systémem jedince. Mezi tyto nosiče a adjuvans patří, například, iontoměniče, kamence; aluminium-stearát, lecitin, sérové proteiny, jako je lidský sérový albumin, pufovací substance, jako jsou fosfáty, glycin, kyselina sorbová, kalium-sorbát, částečné směsi glyceridů nasycených rostlinných mastných kyselin, fosfátem pufované salinické roztoky, voda, emulze (např. emulze olej/voda), soli nebo elektrolyty, jako je protamin-sulfát, hydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný, soli zinku, koloidní oxid křemičitý, křemičitan hořečnatý, polyvinylpyrolidon, substance na bázi celulosy a polyethylenglykol. Jiné nosič mohou také obsahovat sterilní roztoky; tablety, včetně potahovaných tablet a kapslí. Obvykle takové nosiče obsahují přísady, jako je škrob, mléko, cukr (například sacharosa, glukosa, maltosa), některé typy hlinek, želatinu, kyselinu stearovou nebo její soli, magnesium- nebo kalcium-stearát, talek, rostlinné tuky nebo oleje, klovatiny, glykoly, nebo jiné známé přísady. Takové nosiče mohou také obsahovat chuťová nebo pachová korigens nebo jiné složky. Prostředky obsahující takové nosiče jsou připraveny způsoby známými v oboru. Takové prostředky mohou být také formulovány s různými lipidovými kompozicemi, jako jsou například liposomy, stejně jako s různými polymerními prostředky, jako jsou polymerové mikrosféry.

Kity obsahující farmaceutické prostředky pro léčbu onemocnění imunitního systému také spadají do rozsahu

předkládaného vynálezu. V jednom provedení je kit obsahující jeden nebo více farmaceutických prostředků podle předkládaného vynálezu použit pro léčbu onemocnění imunitního systému. Například farmaceutický prostředek obsahuje účinné množství rozpustné CTLA4 mutantní molekuly, která se váže na B7 molekuly na B7-pozitivních buňkách, což vede k blokování vazby B7 molekuly na CTLA4 a/nebo CD28 na T-lymfocytech. Dále může kit obsahovat jedno nebo více imunosupresivních činidel pro společné použití s farmaceutickými prostředky podle předkládaného vynálezu. Mezi možná imunosupresivní činidla patří, například, kortikosteroidy, nesteroidní protizánětlivé léky (např. Cox-2 inhibitory), cyklosporin, prednison, azathioprin, methotrexát, TNF- blokátory a antagonisté, infliximab, jakékoliv biologické činidlo namířené proti zánětlivým cytokinům, hydroxychlorochin, sulfasalazopryin, soli zlata, etanercept a anakinra.

Následující příklady jsou uvedeny pro ilustrování efektu použití busulfanu a kostní dřeně bez T-lymfocytů v navození chimérismu u jedinců. Příklady také ilustrují efekty použití busulfanu, kostní dřeně bez T-lymfocytů, a blokády kostimulace v inhibování rejekcí orgánových/tkáňových transplantátů a v léčbě hemoglobinopatií. Postupy uvedené v příkladech a výsledky mohou být velmi závislé na zamýšleném cíli léčby a použitých postupech. Tyto příklady nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Obecné metody

Myši. Dospělí samci 6-8 týdnů starých C57IBL/6 (H-2^b); Balb/c

(H-2^d), C3H/HeJ (H-2^k), C57BL/6Scid (H-2^b) byly získány od Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). C57BL/6JHbb^{d3th} myši samci (H-2^b) byly získány od Dr. David Archer. Myši byly chovány ve specifických bezpatogenních podmínkách a podle návodu pro chov.

Příprava kostní dřeně a terapeutické protokoly. Kostní dřeň se vysála z tibií, femurů a humerů za použití běžných technik. Provedla se ferro-magnetická deplece T-lymfocytů pomocí anti-CD3 (Pharmingen, San Diego, CA) nebo anti-CD90 protilátky a systému kolon pro magnetické třídění buněk (MAC) (Miltenyi, Auburn, CA) a provedlo se potvrzení průtokovou cytometrií (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 a antiCD5 protilátky, Pharmingen, San Diego, CA). Lýza erytrocytů se provedla za použití Trizma bazického roztoku chloridu amonného. Buňky kostní dřeně se resuspendovaly v koncentraci 2×10^7 buněk/500 l sterilního salinického roztoku a injikovaly se intravenosně příjemci. V některých pokusech se křeččí anti-myši CD40L (MR1, Bioexpress, Lebanon, NH) a CTLA4-Ig (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) podaly ve dnech 0, 2, 4, 6, 14 a 28 (500 kg/dávku i.p.); den 0 představuje den transplantace kostní dřeně. In-vivo deplece CD4+ T-lymfocytů se provedla podáním 100 g anti-CD4 mAb (GK1.5) intraperitoneálně ve dny -3, -2, -1, 0, a potom jednou týdně; weekly thereafter; den 0 představuje den transplantace.

Kožní transplantáty. Kožní transplantáty plné tloušťky (cca 1 cm²) se transplantovaly na dorsální část hrudníku příjemců se zajištěním Band-Aide po dobu 7 dnů.

Analýza průtokovou cytometrií. Periferní krev se analyzovala barvením protilátkami konjugovanými s fluorochromem

(anti-CD3, anti-CD5, anti-CD11b, anti-GR1, anti-B220, anti-H-2K^d, anti-H-2K^b, anti-V11, anti-V5.1/5.2, anti-V8.1/8.2 (Pharmingen), anti-CD4, anti-CD8 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), nebo imunoglobulinovými isotypovými kontrolami (Pharmingen)), potom se provedla lýza erythrocytů a promytí pomocí kitu pro lýzu celých buněk. (R+D Systems, Minneapolis, MN). Barvené buňky se analyzovaly za použití Cellquest softwaru na FACSCalibur průtokovém cytometru (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Testy cytotoxicity. Balb/c CL.7 se použily jako cíle a suspendovaly se v koncentraci cca 1×10^7 /ml s 750Ci ^{51}Cr (NEN Life Science Products, Boston, MA) na dobu 90 minut při 37°C. Cílové buňky se promyly třikrát a umístily se na plotnu v koncentraci 1×10^4 cílových buněk/jamku. Efektory se připravily jako splenocyty protlačené přes nylonovou tkaninu a vnesly se na plotny ve vhodných poměrech ve čtyřech provedeních. Celková lýza se měřila přidáním 2% Triton-X k cílovým buňkám a spontánní lýza se měřila přidáním R-10 bez efektorových buněk. Po 5 hodinách se odebral supernatant a analyzoval se na -kameře. Procento specifické lýzy se určilo za použití následujícího vzorce: $100 \times (\text{cpm neznámá-cpm spontánní}) / (\text{cpm celkový-cpm spontánní})$.

IFN γ ELISpot testy. Allospecifické T-lymfocytární reakce se měřily pomocí IFN γ Enzyme-Linked Immunospot (ELISpot) testu za použití splenocytů protlačených přes nylonovou tkaninu od pokusných C57BL/6 myší. Záchytná protilátka, krysí anti-myší IFN (klon R4-6A2; Pharmingen), se inkubovala v koncentraci 4 $\mu\text{g/ml}$ ve fosfátem-pufrovaném salinickém roztoku (PBS) (100 $\mu\text{g/jamku}$) při teplotě 4 °C přes noc v plotnách s ester-celulosovým dnem (Millipore, France). Po promytí se přidaly různá ředění efektorových buněk. Stimulátory,

dárcovské dendritické buňky, získané adherováním přes noc, se ozářily (2000 rad) a přidaly se v poměru stimulatorových: efektorových buněk 1:10. Efektorové buňky se inkubovaly po dobu 14-16 hodin při 37°C s nebo bez stimulatorů. Po kultivaci se biotinylovaná anti-myší IFN γ (klon XMG1.2; Pharmingen) přidala v koncentraci 4 μ g/ml (100 μ l na jamku). Po 2-3 hodinách při teplotě 4°C se odstranila nenavázaná protilátka a přidala se křenová peroxidasa-avidin D (Sigma, St. Louis, MO). Skvrny se vyvíjely se substrátem 3-amino-9-ethyl-karbazolem, Sigma) s 0,015% H₂O₂. Každá skvrna představuje buňku secernující IFN γ , a frekvence se určila vydělením počtu skvrn v každé jamce celkovým počtem buněk při daném ředění.

CFSR test. Buňky sleziny a mesenterické lymfatické uzliny se odebraly od pokusných myší. Po lýze erytrocytů a protlačení přes nylonové tkanivo se buňky inkubovaly s 10 M karboxyfluorescein-sukcinimidylesteru (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR). Ozářené (1800 rad) Balb/c, C57BL/6, nebo C3H myším se potom intravenosně podalo 1×10^7 - 1×10^9 CFSE značených buněk. Po 66-72 hodinách se splenocyty odebraly od příjemců, provedla se lýze erytrocytů a zbývající buňky se barvily anti-CD4 a anti-CD8 (Pharmingen) a analyzovaly se průtokovou cytometrií, jak je popsáno výše. Koncentrace CFSE v buňkách se při každém dělení snižuje o 50%.

Hematologické monitorování. Hemavet™ série hematologických průstrojů (1500 R serie, CDC Technologies, Oxford, CT) se použila k určení kompletních krevních obrazů.

Elektroforesa hemoglobinu. Elektroforesa hemoglobinu se provedla za použití cystamin-hemoglobin-celulosa acetátové gelové elektroforesy (Whitney et al., Biochem. Genet.,

16:667-672 (1978)). Stručně, 2 l plné krve se smísily se 7 l roztoku obsahujícího 83 mM cystaminu, 0,25% hydroxidu amonného a 0,01 M dithiothreitolu (DTT). Směs se inkubovala při teplotě místnosti po dobu 15 minut a potom se aplikovala na celulosa-acetátové gely (Helena Labs, Beaumont, TX) a zpracovala se elektroforesou po dobu 45 minut při 350 voltech v HighHeme pufu (Helena Labs). Gely se potom barvily pomocí Ponceau S (Sigma, St. Louis, MO) pro vizualizaci hemoglobinu.

Počet retikulocytů. Retikulocyty se kvantifikovaly barvením plné krve RNA-specifickou Thiazol-Orange (Sigma, St. Louis, MO), anti-CD45 a Ter-119 protilátkami (Pharmlingen, San Diego, CA). Retikulocyty se definovaly jako buňky, které jsou Ter-119 pozitivní, Thiazol-Orange-pozitivní a CD45-negativní.

Příklad 1

Blokáda kostimulačních drah a podání busulfanu umožňuje navození titrovatelného smíšeného chimérismu bez myelosuprese.

Tento příklad demonstruje, že podání busulfanu jedinci umožňuje navození titrovatelného smíšeného chimérismu bez myelosuprese.

C57BL/6 (B6) myším (H-2^b, CD45.2) se podala jedna dávka busulfanu (0 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, nebo 30 mg/kg, i.p.; méně než dávka LD50 136 mg/kg, se záchranou kostní dřeně (Yeager et al., výše)) jeden den před intravenosní infúzí 2x10⁷ B6.SJL (H-2^b, CD45.1) buněk kostní dřeně bez T-lymfocytů. Hladiny hematopoetického chimérismu, měřené

průtokovou cytometrií periferní krve, jak bylo popsáno výše, byly přímo úměrné podané dávce busulfanu (obr. 1A). Podobné výsledky byly dosaženy tehdy, když byl busulfan podán 6 nebo 12 hodin před podáním buněk kostní dřeně bez T-lymfocytů.

Byla testována schopnost podobného mikro-kondicionovacího režimu indukovat smíšený alogenní chimérismus a transplantační toleranci v kontextu blokády kostimulace. Podání "tolerizační" dávky dárcovské kostní dřeně společně s bloádou kostimulačních drah (např., CD28/B7 a CD40/CD40L; bloádou kostimulace) by mělo inaktivovat T-lymfocyty periferní krve dárce (Sayegh et al., Transplantation, 64:1646-1650 (1997); Pearson et al., Transplantation, 61:997-1004 (1996); Markees et al., J. Clin. Invest., 101:2446-2455 (1998)).

Pět dnů po první infusi dárcovských buněk se podala jediná dávka busulfanu a potom se další den podala další transplantační dávka kostní dřeně bez T-lymfocytů. Konkrétně, B6 myším se intravenosně podala allogení kostní dřeň zbavená T-lymfocytů (Balb/c (H-2^d) 2×10^7 buněk; den 0 a den 6), aplikovala se bloáda kostimulace (500 g CTLA4-Ig a anti-CD40L; den 0, den 2, den 4, den 6, den 14 a den 28), a různé dávky busulfanu (0 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg a 30 mg/kg; den 5). Kontrolními skupinami byla zvířata, kterým nebyla podána žádná dávka, kostní dřeň bez T-lymfocytů samotná, busulfan a kostní dření bez T-lymfocytů, busulfan samotný, bloáda kostimulace samotná nebo kostní dření bez T-lymfocytů a bloáda kostimulace.

U všech zvířat s experimentální léčbou vznikl vysoký, multi-lineový hematopoetický chimérismus přetrvávající >220 dnů (Obr. 1B). Stejně jako v kongenním pokusu byla úroveň

chimérismu přímo úměrná dávce busulfanu. U zvířat v kontrolních skupinách nebyl nikdy prokázán hematopoetický chimérismus (obr. 1B a 1C). Hladiny hematopoetického chimérismu pozorované u allogenních transplantátů byly podobné hladinám pozorovaným u myší, kterým byla podána kongenní kostní dřeň bez T-lymfocytů, což naznačuje, že přidání dárcovských buněk a blokády kostimulace účinně eliminovalo imunologickou bariéru k transplantaci kostní dřeně bez T-lymfocytů.

Protože iniciální pokusy dosáhly vysoké hladiny chimérismu za použití transplantační dávky kostní dřeně bez T-lymfocytů, která byla pouze jednou desetinou kvantity používané bez přípravy příjemce (Wekerle et al., Nature Medicine 6:464-469 (2000); Durham et al., Journal of Immunology 165:1-4 (2000)), lze předpokládat, že nižší dávky kostní dřeně bez T-lymfocytů mohou indukovat stabilní smíšený chimérismus.

Transplantační dávka kostní dřeně bez T-lymfocytů (den 6) se titrovala od 2×10^7 do 0. V den >120 po transplantaci periferní dárcovské buňky přímo korelovaly s transplantační dávkou kostní dřeně bez T-lymfocytů (2×10^7 -65%, 1×10^7 -57%, 5×10^6 -37%, 2×10^6 -26%; Obr. 1D). Stabilní makrochimérismus byl dosažen za použití transplantační dávky již 2×10^6 buněk kostní dřeně bez T-lymfocytů (10-krát méně buněk kostní dřeně bez T-lymfocytů než ve dřívějších pokusech využívajících nemyelosupresivní režimy).

Tyto výsledky naznačují, že dosažená úroveň chimérismu je titrovatelná buď pomocí změny dávky kostní dřeně nebo modifikací dávky busulfanu. V jiných pokusech může být místo "tolerizační" dávky kostní dřeně použito ozářené kostní dřeně

nebo splenocytů.

Tomita et al. Popisují, že celotělové ozáření (WBI) dávkou 3 Gy je minimální dávkou nutnou pro dosažení spolehlivé dlouhodobé transplantace syngenních pluripotentních hematopoetických kmenových buněk. Dále tito výzkumníci hodnotily profil toxicity asociovaný s tímto transplantačním protokolem spojeným s WBI a zjistili, že 3 Gy byly v podstatě nemyelosupresivní (Tomita et al., Blood 83:939-948 (1994)). Dále, podobný protokol zahrnující 3 Gy WBI a blokádu ko-stimulace byl ověřen jako dostatečný pro dosažení spolehlivých hladin chimérismu v alogenním modelu (Wekerle et al., J. Exp. Med., 187:2037-2044 (1998)).

Pro srovnání se hodnotila toxicita protokolu s busulfanem (2×10^7 Balb/c kostní dřeně bez T-lymfocytů pro C57BL16 příjemce s 500 g blokády kostimulace podané ve dny 0, 2, 4, a 6; 20 mg/kg busulfanu den -1; n=5) a protokolu s ozářením (2×10^7 Balb/c buňky kostní dřeně pro C57BL16 příjemce s 450 g anti-CD40L v den 0 a 500 g CTLA4-Ig v den 2, 3 Gy ozáření v den 0; n=5). Jak je uvedeno na obr. 2, jsou oba protokoly v podstatě nemyelosupresivní (nadir počtu leukocytů: protokol na bázi ozařování - den 13, $2,86 \times 10^3/\text{mm}^3$, protokol na bázi busulfanu - den 13, $4,04 \times 10^3/\text{mm}^3$). Dále, protokolem na bázi busulfanu bylo léčeno více než 200 zvířat a bylo pozorováno pouze jedno úmrtí (v důsledku anestezie). Tyto výsledky ukazují, že vysoká úroveň chimérismu může být dosažena za absence gamma-záření.

Příklad 2

Blokáda kostimulace/busulfanový protokol koriguje hemoglobinopatie

Tento příklad ukazuje efekty mikro-kondicionování a blokády kostimulace v protokolu pro indukci chimérismu v experimentálních modelech hemoglobinopatie.

Byl hodnocen stupeň, na který může protokol pro indukci chimérismu navodit náhradu kompartmentu erytrocytů v Hbb^{th2} myším modelu -thalassemie (Shehee et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3177-3181 (1993)). Tento model -thalassemie, připravený inserčním narušením myšího dospělého genu pro -hlavní globin, vede k perinatální smrti homozygotů, zatímco heterozygoti přežívají, ale vykazují fenotyp podobný lidské intermediární -thalassemii, která je charakterizována zkráceným přežíváním erytrocytů, anemií a retikulocytosou.

β -thalassemičtí heterozygotní příjemci (H-2^b) byly léčeny tolerizační dávkou (2×10^7 buněk) Balb/c kostní dřeně bez T-lymfocytů (den 0), blokádou kostimulace (dny 0, 2, 4, 6), 20 mg/kg busulfanu (den 5) a transplantační dávkou (2×10^7 buněk) Balb/c kostní dřeně bez T-lymfocytů (den 6). Kontrolním příjemcům byla aplikována blokáda kostimulace a kostní dřeň bez T-lymfocytů bez busulfanu. Hodnocení chimérismu leukocytů a erytrocytů, hladin hemoglobinu (Hb) a retikulocytů bylo provedeno před indukcí a 2 týdny, 4 týdny a potom každý měsíc po transplantaci kostní dřeně.

Stejně jako v předešlých pokusech s B6 příjemci vznikl leukocytární chimérismus u příjemců léčených blokádou kostimulace, kostní dřeně bez T-lymfocytů a busulfanem, ale ne u příjemců, kterým byla aplikována pouze blokáda kostimulace a kostní dřeně bez T-lymfocytů. Dále, téměř kompletní nahrazení patologického Hb proužku funkční Balb/c major Hb alelou bylo pozorováno u chimérických příjemců, ale

ne v kontrolní skupině (obr. 3A). Dráha 1 představuje neléčený thalassemický Hb (slabý a jediný proužek) a dráha 2 představuje dárcovský Hb (Balb/c, malý a velký proužek). Dráhy 3-4 reprezentují thalassemická zvířata (>den 150), kterým byl podán busulfan v den 5 (20 mg/kg), allogenní kostní dřeň bez T-lymfocytů (Balb/c) (dny 0 a 6) a blokáda kostimulace. Abnormální thalassemický Hb je téměř kompletně nahrazen normálním Balb/c hemoglobinem. Dráhy 5-6 ukazují Hb z thalassemických zvířat, která byla léčena kostní dření a blokádou kostimulace, ale bez busulfanu. Je zřejmé, že jediný přítomný hemoglobin je hemoglobin od příjemce.

Před indukčním protokolem bylo procento retikulocytů v thalassemické periferní krvi 12,0% u zvířat, kterým nebyl podán busulfan (Obr. 3B; plná kolečka, $n = 3$) a 13,7% (Obr. 3B; plné čtverečky, $n = 3$) u zvířat léčených busulfanem. V den 120 po indukčním protokolu měla zvířata léčená busulfanem normalizovanou retikulocytosu (4,2%), zatímco u nechimérických zvířat přetrvávaly abnormálně vysoké hladiny retikulocytů v periferní krvi (10,1%). Šedé sloupce představují normální počty retikulocytů u normálních B6 zvířat ($n = 10$). Chybové sloupce představují standardní odchylku od průměru. Počty retikulocytů a hladiny hemoglobinu (Hb) se u chimérických thalassemických myší normalizovaly, což naznačuje to, že patogenese onemocnění byla eliminována.

Příklad 3

Protokol blokáda kostimulace/busulfan navozuje toleranci pro orgánové/tkáňové transplantáty

Tento příklad demonstruje efekty mikro-kondicionování,

blokády kostimulace pro navození chimérismu, při transplantacích orgánů/tkání. Pro testování toho, zda protokol "mikro-kondicionování" a blokády kostimulace může navodit toleranci k allotransplantátům solidních orgánů se požil imunologicky rigorosní (Balb/c na B6) model kožních transplantátů.

B6 myším se aplikovalo 2×10^7 buněk Balb/c kostní dřeně bez T-lymfocytů, blokáda kostimulace a busulfan (20 mg/kg), jak bylo popsáno výše. Dále se zvířatům přenesly v den 0 kožní štěpy od Balb/c myší.

Kontrolní skupiny (bez léčby, prázdné kosočtverce, $n=3$; kostní dřeň bez T-lymfocytů a busulfan, prázdné trojúhelníčky, $n=3$; nebo blokáda kostimulace a busulfan; prázdné čtverečky, $n=3$) všechny rychle odmítly Balb/c allotransplantáty (Obr. 4A). Příjemci, kterým byla aplikována kostní dřeň bez T-lymfocytů a blokáda kostimulace bez busulfanu (plné čtverečky, $n=7$) vykazovaly značně prodloužené přežívání (Obr. 4A), ale nakonec odmítly allotransplantáty. Naopak, zvířata, kterým byl podán busulfan, kostní dřeň bez T-lymfocytů a blokáda kostimulace (plná kolečka, $n=7$), přijala kožní transplantáty na dobu delší než >250 dnů bez známek rejekce (Obr. 4A). Podobné výsledky byly dosaženy u obrácené kombinace kmenů myší. Z klinického hlediska je významné, že současné přenesení kožního transplantátu specifického pro dárce nebránilo vzniku hematopoetického chimérismu.

100 dnů po iniciačním protokolu se zvířatům aplikovaly kožní štěpy od druhého dárce (Balb/c, H-2^d) a od třetího subjektu (C3H, H-2^k). Po 100 dnech bylo přežívání kožních štěpů ve skupině s kostní dření a blokádou kostimulace (plné

čtverečky, $n = 7$) 86%, zatímco u zvířat s bloádou kostimulace, kostní dření, busulfanem (plná kolečka, $n = 7$) bylo přežívání štěpu 100%. Po přenesení kožního štěpu od druhého dárce zvířata s aplikovanou kostní dření a bloádou kostimulace bez busulfanu rychle odmítla kožní štěpy jak od primárního, tak od sekundárního dárce (medián doby přežívání (MST) 7 dnů). Naopak, primární kožní transplantáty na zvířatech léčených bloádou kostimulace, kostní dření, busulfanem přežívaly trvale (>250 dnů) i po následné transplantaci štěpu od druhého dárce.

Potom se zvířatům s aplikovanou kostní dření, bloádou kostimulace a busulfanem aplikovaly přibližně 100 dnů po první transplantaci kožní štěpy od dárce (Balb/c) nebo třetího subjektu (C3H/HeJ) (Obr. 4B). Kontrolní zvířata rychle odmítla jak Balb/c, tak C3R/HeJ kožní transplantáty (MST 10 dnů a 12 dnů, v příslušném pořadí). Chimérická zvířata rychle odmítla kožní transplantáty od třetích subjektů (Obr. 41B, prázdná kolečka, MST 10 dnů), zatímco kožní transplantáty od sekundárních darců přežívaly ve 100% více než 150 dnů (Obr. 41B, plná kolečka). Podobné výsledky byly dosaženy v dalších pokusech.

Podání kostní dřeně bez T-lymfocytů a bloáda kostimulačních drah bez indukce smíšeného chimérismu (tj. skupina, které byla aplikována bloáda kostimulace a kostní dřeň bez T-lymfocytů, ale ne busulfan), měla významně delší přežívání primárního allotransplantátu, ale nedošlo u ní k indukci trvalé tolerance (původní štěp MST 107 dnů, dárcovský specifický re-transplantát MST 8 dnů). Naopak, u myší, kterým byl aplikován busulfan, kostní dřeň bez T-lymfocytů a bloáda kostimulace, byly výraznými chimérami a uniformně akceptovaly druhý specifický Balb/c kožní

transplantát (MST >125 dnů), a rychle odmítaly C3H/HeJ transplantáty (MST 10 dnů, Obr. 4B). Důležité je to, že Balb/c kožní transplantáty a chimérický stav byly nezměněny po opakované transplantaci (Obr. 4A).

Kromě toho bylo dosaženo robustní tolerance a stabilního chimérismu při použití jediné dávky 2×10^7 buněk kostní dřeň bez T-lymfocytů v den transplantace kůže s jedinou dávkou busulfanu -24, -12, nebo -6 hodin před aplikací kostní dřeň bez T-lymfocytů.

Příklad 4

Dárcovská kostní dřeň a blokáda kostimulace dočasně eliminují reakci proti T-lymfocytům od dárce, ale smíšený chimérismus je nutný pro dosažení trvalé tolerance

Byla hodnocena schopnost tolerantních a netolerantních myši generovat cytolytickou (CTL) a IFN γ (ELISpot) reakci proti T-lymfocytům od dárce po transplantaci kožních transplantátů jak časně (den 10), tak pozdně (>den 100). Splenické T-lymfocyty se připravily od B6 příjemců Balb/c kožních transplantátů, kterým byla podána buď kostní dřeň bez T-lymfocytů a blokáda kostimulace, kostní dřeň bez T-lymfocytů a busulfan, kostní dřeň bez T-lymfocytů a blokáda kostimulace s busulfanem, žádná léčba, nebo od naivních B6 myši.

Neléčené B6 myši generovaly velké počty buněk produkujících IFN γ (Obr. 5A) a silné CTL reakce (Obr. 5B) 10 dnů po kožní transplantaci. Během indukční periody (v den 10) bylo jako generování buněk produkujících IFN γ , tak CTL reakce, inhibovány ve všech skupinách s blokádou kostimulace

a v podstatě byla eliminována u zvířat s bloádou kostimulace a podáním kostní dřeně (s nebo bez busulfanu, Obr. 5A a 5B).

Nicméně, později (100 dnů po iniciální kožní transplantaci a indukci tolerance), generovala zvířata léčená kostní dření bez T-lymfocytů a bloádou kostimulace významné počty buněk produkujících IFN γ reaktivních s dárce a významnou CTL aktivitu namířenou proti dárce, po přenesení druhého kožního transplantátu; naopak, zvířata léčená kostní dření bez T-lymfocytů, bloádou kostimulace a busulfanem nevyvíjela žádnou CTL aktivitu namířenou proti dárce ani IFN reakci (Obr. 5A a 5C). Obě skupiny si udržovaly podobnou reakci proti třetímu subjektu (C3H, H-2^k). Podobné výsledky byly pozorovány ve dvou dalších pokusech.

Tyto výsledky naznačují, že iniciální dočasná hyporeaktivita k antigenům dárce navozená kostní dření bez T-lymfocytů za přítomnosti bloády kostimulace s časem slábne, pravděpodobně v důsledku přítomnosti nových buněk přesunutých z thymu nebo v důsledku rozpadu regulačních T-lymfocytů. Naopak, přidání jediné, nemyelosupresivní dávky busulfanu, před transplantační dávkou kostní dřeně, vede ke vzniku hematopoetického chimérismu vedoucího k robustní, dlouhodobé specifické toleranci k dárce.

Příklad 5

CD4⁺ T-lymfocyty příjemce jsou nutné pro vznik chimérismu a tolerance, ale ne pro jeho udržení

Dřívější práce naznačily, že dlouhodobé přežívání indukované CD40/CD40L bloádou a donor-specifickou transfúzí

vyžaduje účast CD4+ T-lymfocytů (Markees et al., J. Clin. Invest., 101:2446-2455 (1998)). Nicméně, není známo, zda protokoly, které indukují toleranci cestou navození smíšeného chimérismu, také vyžadují CD4+ T-lymfocyty.

Pro vyřešení této otázky se kostní dřeň příjemců zbavila CD4+ T-lymfocytů in vivo pomocí anti-CD4 monoklonální protilátky před a během indukce tolerance. Za absence CD4+ buněk zvířata ošetřená kostní dření od dárce, 20 mg/kg busulfanu, a bloádou kostimulace (jako výše) uniformně selhávala v navození chimérismu, což ukazuje na zásadní úlohu CD4+ buněk během indukce chimérismu (kožní transplantáty - MST 29 dnů).

Pro výzkum toho, zda jsou CD4+ buňky také nutné pro udržení tolerance/chimérismu, jsme odstranily CD4+ buňky z dlouhodobých chimér (300 dnů). Oproti indukční fázi, kde mají CD4+ buňky zásadní úlohu, nenarušila během udržovací fáze deplece CD4+ buněk ani přežívání kožních transplantátů, ani chimérický stav.

Protože existují silné důkazy, že dominantní regulační mechanismy mohou mít zásadní úlohu v udržování tolerance v jiných modelech bloády kostimulace, provedli jsme také pokusy s adoptivním přenosem, za účelem testování důkazů regulace (Honey et al., J. Immunol. 163:4805-4810 (1999)). Adoptivně se přenesli T-lymfocyty z tolerantních/chimérických myší, T-lymfocyty od naivních B6 myší, nebo směsi tolerantních a naivních T-lymfocytů, do C57BL/6 Scid myší (B6 Scid) s Balb/c a C3H kožními transplantáty. Za přibližně 150 dnů po terapii (poslední kostní dřeň bez T-lymfocytů v den 6 a poslední bloáda kostimulace v den 28) se připravily T-lymfocyty ze slezin myší, které byly ošetřeny tak, že byly

specificky tolerantní k Balb/c kožním transplantátům (ale odmítaly transplantáty od třetích jedinců) podle našeho protokolu. Potom se B6 Scid myším podalo 5×10^6 přenesených T-lymfocytů od chimérických-tolerantních zvířat (kostní dřeň bez T-lymfocytů, blokáda kostimulace, busulfan), buněk od tolerantních zvířat ve směsi s 5×10^6 T-lymfocyty od naivních B6 myší nebo pouze buněk od naivních B6 myší.

T-lymfocyty od naivních zvířat rychle odmítaly transplantáty od dárce (Obr. SD, plné čtverečky) a od třetího subjektu (MST 10 a 12 dnů v příslušném pořadí, Obr. SD, prázdná kolečka). Naopak, 100% zvířat s aplikovanými T-lymfocyty od tolerantních zvířat (plné kolečka) akceptovalo Balb/c kožní transplantáty (>75 dnů) a odmítalo allotransplantáty od třetích subjektů (MST = 12 dnů, Obr. SD). Když byly naivní T-lymfocyty smíseny s tolerantními T-lymfocyty, tak bylo pozorováno rychlé odmítání Balb/c kožních transplantátů (MST 12 dnů, Obr. 5D, plné trojúhelníčky).

Tato data potvrzují, že T-lymfocyty od zvířat léčených podle našeho protokolu kostní dření bez T-lymfocytů, busulfanem a blokádou kostimulace, jsou významně a specificky tolerantní ke kostní dření od dárce, což naznačuje, že ačkoliv může regulační mechanismus hrát významnou úlohu v indukci tolerance, není pravděpodobné, že by byl hlavním mechanismem, kterým je v tomto modelu tolerance udržována.

Příklad 6

Klonální delecce alloreaktivních T-lymfocytů je hlavním mechanismem udržování tolerance

Pro určení toho, zda byl tolerantní stav asociován s klonální delecí T-lymfocytů reaktivních s dárce se testovalo použití V TCR segmentů před, během a po indukci tolerance.

Balb/c myši mají delecí T-lymfocytů s V β 11 a V β 5, zatímco B6 myši neexprimují MHC molekulu třídy II, I-E, a mají V β 11 na 4-5% CD4⁺ T-lymfocytů a V β 5.1/5.2 na 2-3% CD4⁺ T-lymfocytů (Dyson et al., Nature, 349:531-534 (1991); Bill et al., J. Exp. Med., 169:1405-1419 (1989)).

Kontrolní skupiny (blokáda kostimulace nebo kostní dřeň bez T-lymfocytů nebo busulfan samotné) neměly delecí V11⁺ nebo V β 5⁺CD4⁺ T-lymfocytů (Obr. 6A). Hladiny V β 11⁺ a V β 5.1/5.2⁺ odpovídaly hladinám v normálních B6 myších (4-5% a 2-3%, v příslušném pořadí). Naopak, příjemci Balb/c kostní dřeně bez T-lymfocytů, busulfanu a blokády kostimulace měly téměř kompletní depleci CD4⁺ V β 11⁺ a CD4⁺V β 5⁺ T-lymfocytů v den 60. Procento CD4⁺ T-lymfocytů s V8, který je exprimován na přibližně 15-20% Balb/C a B6 CD4⁺ T-lymfocytů, bylo podobné u všech skupin, což naznačuje, že deplece T-lymfocytů byla specifická pro dárce (obr. 6A). Podobné výsledky byly pozorovány u 100 myší v několika pokusech.

Protože MMT systém slouží jako náhradní marker pro alloreaktivitu, provedl se in vivo alloproliferální test reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) pro přímé testování na přítomnost residuální alloreakivity (Lyons et al., Journal of Immunological Methods, 171:131-143 (1994)). T-lymfocyty z chimérických (kostní dřeň depletovaná o T-lymfocyty, blokáda kostimulace, busulfan), non-chimérických (kostní

dřeň depletovaná o T-lymfocyty, blokáda kostimulace) a naivních zvířat se odebraly ze sleziny a mesenteriální lymfatické uzliny (LN) (T-lymfocyty byly získány od zvířat >100 dnů po transplantaci). Po značení 10 pM CFSE se T-lymfocyty přenesly příjemci (Balb/c nebo C3H), který byl ozářen supra-letální dávkou 1800 radů. Po 72 hodinách se splenocyty odebraly a analyzovaly se průtokovou cytometrií.

Zatímco CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty z naivní a non-chimérické skupiny se extenzívně dělily v reakci na Balb/c hostitele, T-lymfocyty od tolerantních myší negenerovaly žádnou proliferativní reakci proti dárce (Obr. 6B). Silné proliferativní reakce proti třetímu subjektu (C3H) byly však podobné ve všech skupinách (Obr. 6B). Dohromady s analýzou repertoáru poskytuje absence CD4⁺ nebo CD8⁺ T-lymfocytů schopných dělení v tomto modelu reakce štěpu proti hostiteli další důkaz toho, že tolerantní stav dosažený tímto protokolem vede k téměř kompletní eliminaci T-lymfocytů specifických pro dárce. Srovnatelné výsledky byly pozorovány v dalších pokusech.

Příklad 7

Non-myeloablativní allogenní transplantace kostní dřeně léčí srpkovitou anemii

Transgenní knock-outované myši, kterým chybí všechny myší hemoglobiny a místo nich produkují výlučně lidský γ , δ a srpkovitý- γ -globin (Paszty et al., Science, 278:876-878 (1997)), se použily pro testování schopnosti transplantačních postupů podle předkládaného vynálezu léčit srpkovitou anemii. Tento myší model napodobuje mnoho z komplexních charakteristik multiorgánového onemocnění u

pacentů se srpkovitou anemií.

Popsané výsledky poprvé prokazují, že nemyeloablativní pre Kondicionování busulfanem společně s bloádou kostimulace může produkovat fenotypové vyléčení myši srpkovité anemie v důsledku navození stabilního smíšeného chimérismu. Dále je toto vyléčení provedeno se zcela chybně MHC-spárovanou dření dárce.

Metody

Myši se srpkovitou anemií byly získány od Dr. Paszty z Lawrence Berkley National Laboratory a v současnosti jsou uchovávány v Emory University. Příjemci transpnatátů (samci; 7-12 týdnů) exprimující výlučně lidský a srpkovitý globin byly křížení pomocí selektivního křížení a existují na smíšeném genetickém pozadí (kmeny: FVB/N; 129; DBA/2; C57BL/6; a Black Swiss). BALB/c myši se použily jako dárce kostní dřeně. BALB/c a C3H/HeJ myši se použily pro testy donor-specifické tolerance, a C57BL/6 myši se použily jako hematologicky normální kontrolní myši.

Příjemcům bylo podáno 2×10^7 BALB/c kostní dřeně zbavené T-lymfocytů (pomocí anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 protilátek, Miltenyi Inc., Auburn, CA) (TDBM) v den 0, jak bylo popsáno výše, BUSULFEX (busulfan 20 mg/kg, i.p., Orphan Medical, Minnetonka, MN) v den -1, a 500 g křeččí anti-myši-CD40L mAb (MR1, BioExpress, Lebanon, NH) a 500 g lidského CTLA4-Ig (Bristol-Myers Squibb, Princeton, ND, (pro bloádou kostimulace) i.p., ve dny 0, 2, 4, 6 vzhledem ke transplantaci kostní dřeně. Kontrolním myším se aplikovala bloáda kostimulace a kostní dřeň ochuzená o T-lymfocyty, ale žádný busulfan. Základní hematologické parametry se

měřily jeden týden před transplantací a chimérismus se testoval dva týdny, čtyři týdny a jednou za měsíc po transplantaci.

Periferní krev se analyzovala barvením protilátkami konjugovanými s fluorochromem (anti-CD3, anti-CD5, anti-CD11b, anti-GR1, anti-B220, anti-H-2K^d, anti-H-2K^b, antiV V β 5.1/5.2 (Pharmlngen, Inc., San Diego, CA), anti-CD4, anti-CD8 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA)) nebo imunoglobulinovými izotypovými kontrolami (Pharmlngen), a potom se provedla lýza erytrocytů a promytí kitem pro lýzu plné krve (R+D Systems, Minneapolis, MN).

Nabarvené buňky se analyzovaly za použití buď WinList (Verity Software House Inc., Topshani, M7E) nebo Cellquest (Beckton Dickinson, Mountain View, CA) softwaru na FACScan nebo FACSCalibur průtokovém cytometru (Beckton Dickinson). Chimérismus bílých krvinek se stanovil barvením dárcovskými (anti-H2K^d) nebo příjemcovými (anti-H2K^b) protilátkami a specifickými markery pro linie, a analyzováním průtokovou cytometrií. V delece se určila barvením V5 protilátkami a specifickými markery pro linie lineage markers, a analyzováním průtokovou cytometrií.

Kompletní krevní obrazy se stanovily na HEMAVET 1500 analyzátoru krve (1500 R série, CDC technologies, Oxford, CT). Počty retikulocytů se určily pomocí průtokové cytometrie periferní krve barvené protilátkami specifickými pro erytrocyty (anti-Ter-119, Pharmlngen) a leukocyty (anti-CD45, Pharmlngen) a fluorescentní sondou RNA, Thiazol-Orange (Sigma Inc., St. Louis, MO). Počty retikulocytů se definovaly jako procento buněk periferní krve, které jsou Ter-119-pozitivní, Thiazol-Orange-pozitivní

a CD45-negativní. "Stresové" retikulocyty se také analyzovaly barvením protilátkou proti transferrinovému receptoru (CD71, Pharmingen).

Poločas erytrocytové populace byl určen v pokusu s pulsní biotinylací, který se provedl popsáním způsobem (Christian et al., Exp. Hematol., 24:82-88 (1996). Stručně, 50 mg/kg N-hydroxysukcidimid-biotinu (Calbiochem, San Diego, CA; iniciálně rozpuštěného v koncentraci 50 mg/ml v N,-N,-dimethylacetamidu a naředěného do 250 l normálního salinického roztoku bezprostředně před použitím) se injikovalo (i.v.) transplantovaným nebo naivním zvířatům se srpkovitou anemií. Takto se biotinem pulsovala periferní krev. Krev se odebírala po biotinylaci v pravidelných intervalech buď z retroorbitálního venosního plexu nebo z nařiznutého ocasu. Procento erytrocytů v periferní krvi, které byly biotinylované, se určilo průtokovou cytometrií za použití fluorescentního Streptavidin-cychromu (Pharmingen) pro identifikaci biotinylovaných buněk, a fluorescentní Ter-119-fykoerytrinové protilátky (Pharmingen) pro identifikaci erytrocytů. Pokles biotinylace je přímo úměrný eliminaci biotinylovaných erytrocytů z periferní cirkulace a proto může být tímto způsobem určen poločas populace erytrocytů.

Expozice fosfatidylserinu na plasmatických membránách se měřila procentem buněk, které byly pozitivní v testu vazby na Annexin-V (Pharmingen). Testy vazby annexinu V se provedly inkubováním 1×10^6 buněk periferní krve s 5 l Annexinu-V a vhodnou protilátkou specifickou pro linii [v Annexinovém vazebném pufru (Pharmingen) po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Buňky se protom promyly jednou annexinovým vazebným puforem a analyzovaly se průtokovou

cytometrií pro stanovení procenta Annexin-V-pozitivních buněk.

Scramblasové enzymové testy na erytrocytech se provedly způsobem popsaným dříve (Bever et al., Biol. Chem., 8-9:973-986 (1998)). Stručně, 2×10^6 buněk periferní krve se inkubovalo s 3 nanomoly/ml fluorescentního analogu fosfatidylcholinu palmitoyl-C6-(N-(7-nitrobenz-2-oxy-1,3-diazol-4-yl)- fosfatidylcholinem (NIBDPC; Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL) ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku obsahujícím 1 mM CaCl_2 po dobu 30 minut při 37 °C. Buňky se potom ochladily na ledu a promyly se puforem obsahujícím 10 mg/ml beztukového hovězího sérového albuminu (BSA) (Sigma, Inc.) pro zpětnou výměnu neinternalizovaných fosfolipidů. Buňky se potom inkubovaly s vhodnými protilátkami specifickými pro linii (Pharmingen) po dobu 20 minut při 40 °C a potom se analyzovaly průtokovou cytometrií.

Chimérismus erytrocytů se stanovil diferenční elektroforesou hemoglobinu provedenou s hemoglobinem od dárce a od příjemce. Dárcovský -globin se skládá z myšího hlavního a vedlejšího izomeru, které mají jinou elektroforetickou mobilitu než lidský -globin srpkovité anemie příjemce. Elektroforesa hemoglobinu se provedla na Helena Titan III elektroforetickém systému (Helena Laboratories, Beaumont, TX). Gely se skenovaly a procento dárcovského nebo příjemcového hemoglobinu se stanovilo densitometrií za použití Kodak 1-D Image Analysis softwaru (Kodak Inc., Rochester, NY).

CFSE testy se provedly pro stanovení tolerance k antigenům dárce. Od experimentálních myší se odebraly buňky sleziny a mesenteriální mizní uzliny. Po lýze

erytrocytů a protlačení přes nylonovou tkaninu se buňky inkubovaly v 10 M CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR). Ozářeným (1800 rad) BALB/c nebo C3H myším se potom intravenosně podalo 1×10^7 – 1×10^9 CFSE-značených buněk. Po 66–72 hodinách se splenocyty odebraly od příjemce, erytrocyty se lyzovaly a zbývající buňky se barvily anti-CD4 a anti-CD8 protilátkami nebo izotypovými kontrolami a analyzovaly se průtokovou cytometrií, jak bylo popsáno výše.

Pro stanovení hematopoetické rovnováhy v hematopoetických orgánech příjemce se myši utratily a za použití běžných technik se odebraly jejich splenocyty a kostní dřeň. Hematopoetická rovnováha se určila stanovením procenta buněk kostní dřeně a sleziny, které byly buď erytrocyty (Ter-119-pozitivní, CD45-negativní) retikulocyty (Ter-119-pozitivní, CD45-negativní, Thiazol-pozitivní) nebo leukocyty (Ter-119-negativní, CD45-pozitivní).

Výsledky

Vytvoření stabilních chléř za použití busulfanu a blokády kostimulace.

Jak bylo uvedeno výše, byly myši se srpkovitou anémií léčeny režimem, který zahrnoval busulfan (20 mg/kg) v den –1 (den 0 představuje den transplantace kostní dřeně), transplantací kostní dřeně ochuzené o T-lymfocyty od BALB/c myši v den 0, a blokádu kostimulace 500 g každé anti-CD40L a CTLA4-Ig ve dny 0, 2, 4 a 6. Tato skupina zvířat je zde označována jako skupina "léčená busulfanem". Zbývajícím zvířatům byl aplikován kontrolní protokol zahrnující transplantaci kostní dřeně a blokádu kostimulace, ale ne léčbu busulfanem. Tento protokol byl dobře tolerován a byl

nemyelosupresivní u více kmenů myši.

U zvířat léčených busulfanem 11/13 zvířat dosáhlo multi-liniového smíšeného chimérismu leukocytů (průměr 43+10% v den 184), který dosáhl vrcholu za 3 měsíce po transplantaci a který byl stabilní po dobu >150 dnů (obr. 7A). Myši, kterým byla aplikována pouze blokáda kostimulace (ale žádný busulfan) vykazovaly nízké až nedetekovatelné hladiny chimérismu periferních leukocytů (<2,5%) ve stejném pokusném období (Obr. 7A). periferní chimérismus u zvířat léčených busulfanem se odrazil v jejich hematopoetických orgánech, jak je uvedeno na obr. 7B (kostní dřeň (58%), slezina (51%) a thymus (52%)). Myši, kterým byla provedena transplantace kostní dřeně, nejevily žádné známky GVHD, tj. jejich hmotnos tzůstávala stabilní a nekropsie po transplantaci ukázaly normální histologické nálezy na všech orgánech.

Chimérismus periferních leukocytů byl srovnatelný s výsledky dosaženými při použití busulfanu a blokády kostimulace u allogenních přirozených a -thalasemických myši (jak bylo popsáno výše), zatímco chimérismus periferních erytrocytů byl výrazně vyšší u transplantovaných jedinců se srpkovitou anemií. Kvantifikace dárcovských (normální BALB/c -globin, hlavní a vedlejší alela) a příjemcovských (lidský srpkovitý -globin) hemoglobinů separovaných elektroforesou na celulosa-acetátových gelech ukázala 78-90% dárcovský chimérismus ve dvou týdnech, který dosáhl 100% za jeden měsíc u všech transplantovaných myši se srpkovitou anemií (obr. 8). Příjemci měly původně pouze lidský srpkovitý -globin (dráha 1), zatímco dárci měly hlavní a vedlejší alely myšiho .globinu (dráha 2). Dráha 3 ukazuje reprezentativní transplantovanou myš s kompletní periferní

náhradou dárcovským -globinem. Kompletní náhrada periferní krve dárcovským hemoglobinem proběhla během jednoho měsíce po transplantaci a byla stabilní po celé sledované období (>150 dnů po transplantaci) u všech transplantovaných myši (Hu=lidský; Mu= myši). Vyšší hladiny periferního chimérismu erytrocytů ve srovnání s chimérismem leukocytů jsou v souladu s akumulací a delším přežíváním normálních erytrocytů v prostředí s rychlým obratem a degradací srpkovitých erytrocytů.

U 5 z 9 kontrolních myši, které byly léčeny pouze blokádou kostimulace (tj. bez busulfanu), vznikl významný chimérismus erytrocytů (10-54%; Obr. 9) i přes minimální chimérismus leukocytů (<2,5%; Obr. 7A). Dráha 1 na Obr. 9 ukazuje reprezentativní myš bez transplantace, s pouze lidským -srpkovitým hemoglobinem. Dráha 2 ukazuje reprezentativní myš 3 měsíce po transplantaci s RBC chimérismem, která má jak příjemcovský (lidský -srpkovitý hemoglobin), tak dárcovský (myši hlavní a vedlejší -hemoglobin).

Chimérické myši jsou specificky tolerantní k dárcovskému antigenu

BALB/c myši exprimují I-E a proto deletují T-lymfocyty nesoucí V5, zatímco myši se srpkovitou anémií neexprimují I-E a specificky využívají Vb5.1/2 na 2-3% CD4+ T-lymfocytů (Dyson et al. Nature, 349:531-549 (1991); Bill et al., J. Exp. Med., 169:1405-1419 (1989)). Jak se předpokládalo, netransplantovaná zvířata nedeletovala V5-CD4+ T-lymfocyty reaktivní s dárce (Obr. 10A). Naopak, u transplantovaných zvířat došlo k téměř kompletní delecii CD4-V5-T-lymfocytů v den 60. Procento CD4+ T-lymfocytů s V8, normálně tvořící u

BALB/c a srpkovitých CD4+ T-lymfocytů 15-25%, bylo podobné ve všech skupinách, což naznačuje, že delece T-lymfocytů byla specifická z hlediska dárce. Tyto výsledky naznačují, že dárcovské buňky nesoucí I-E odvozené od kostní dřeně ovlivňují selekci repertoáru T-lymfocytů u myši léčených busulfanem, což ve svém důsledku vede k robustní dlouhodobé specifické toleranci k dárce.

Současně s dlouhodobým chimérismem pozorovaným u zvířat léčených busulfanem vykazovala tato zvířata také specifickou toleranci k allogenním transplantátům BALB/c kostní dřeně (Obr. 10B). Rigorózní in vivo allo-proliferální (GVHD) test využívající CFSE barvivo se provedl pro testování na přítomnost přetrvávající alloreaktivity (Lyons et al., J Immunol. Meth., 171:131-137 (1994)). T-lymfocyty od transplantovaných a netransplantovaných zvířat se získaly ze slezin a mesenterálních lymfatických uzlin (T-lymfocyty se získaly od pokusných zvířat >100 dnů po transplantaci). Po značení 10 M CFSE se T-lymfocyty podaly příjemcům (BALB/c (dárce) nebo C3H (třetí subjekt)), kteří byly supraletálně ozáření 1800 rady. Splenocyty se odebíraly o 72 hodin později a analyzovaly se průtokovou cytometrií.

Zatímco CD4+ a CD8+ T-lymfocyty z netransplantovaných skupin se významně dělily v reakci na BALB/c a třetí (C3H) hostitele, ukazují histogramy na obr. 10B, že T-lymfocyty od transplantovaných myši negenerovaly proliferativní reakci proti dárce. Jak se předpokládalo, byly u transplantovaných myši pozorovány jasné proliferativní reakce na třetí subjekt (C3H) (Obr. 10B). Tyto výsledky potvrzují specifickou absenci s dárce alloreaktivních CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů, které by se mohly u chimérických zvířat dělit. Tolerantní zvířata tak nevykazují žádnou proliferaci v reakci na dárce,

ale normální proliferativní reakci vůči třetímu subjektu (C3H, H-2^k). Netransplantovaná zvířata reagují v tomto modelu GVHD podobně na antigeny od dárce i od třetího subjektu.

Chimérické myši jsou vyléčeny ze srpkovité anemie

Transplantované myši se srpkovitou anemií vykazovaly fenotypové vyléčení jejich srpkovité anemie podle mnoha parametrů. Jak je patrné z obr. 11A a 11B, po transplantaci kondicionované busulfanem se v nátěrech periferní krve nevyskytovaly buňky ireversibilně změněné při srpkovité anemii. Šipky na obr. 11A ukazují reprezentativní buňky postižené srpkovitou anemií v krvi neléčených zvířat. U transplantovaných myši také došlo k normalizaci jejich hematologických abnormalit (Obr. 11C), včetně hemoglobinu (Hb; 4,5 µg/dl se upravilo na 10 g/dl), hematokritu (Hct; 16% na 40%), a % periferních thiazol-pozitivních retikulocytů (Retik.; 49% na 3,5%), což je v souladu s vyléčením jejich hemolytické anemie. Dále se u transplantovaných myši upravily abnormálně zvýšené hodnoty leukocytů (WBC) pozorované u naivních myši se srpkovitou anemií (20000/µl na 5100/µl). Normalizace hematologických parametrů byla stabilní po celou dobu pokusu (>150 dnů). Jsou uvedeny průměry scm pro C57BL/6 kontroly, netransplantované myši (černě) a transplantované myši (bíle) v reprezentativním pokusu provedeném tři měsíce po transplantaci.

Stav nových chimérických erytrocytů se hodnotil za použití tří fyziologických markerů. Za prvé se pomocí biotinylačního pokusu určil poločas populace erytrocytů, jak je popsáno v Christian et al., Exp. Hematol., 24:82-88 (1996) (Obr. 11D). neléčeným a transplantovaným myším se

srpkovitou anemií se intravenosně injikoval Nhydroxysukcidimid-biotin pro značení periferní krve biotinem. Poločas erytrocytů (identifikovaných jako Ter-119-pozitivní, CD45-negativní, biotinylované buňky) se určil pomocí úbytku biotinylovaných erytrocytů v čase za použití průtokové cytometrie.

Erytrocyty od naivních zvířat se srpkovitou anemií (plné čtverečky) mají výjimečně krátké periferní poločasy (0,8 dnů) ve srovnání s normálními kontrolními C57BL/6 myši (plné trojúhelníčky; poločas 18 dnů). Transplantovaná zvířata (prázdné čtverečky) mají poločas erytrocytů neodlišitelný od normálních myší, což je v souladu s nahrazením erytrocytů postižených onemocněním normálními erytrocyty. Za druhé se měřila produkce transferin-pozitivních "stresových" retikulocytů u transplantovaných a netransplantovaných myší. Tyto buňky jsou ukazateli nadměrné erytropoesi a soudí se, že přispívají k adhezi srpkovitých retikulocytů k vaskulatuře (Serke et al., Br. J. Haematol.. 81:432-439 (1992); Swerlick et al., Blood 82:1891-1899 (1993); a Joneckis et al., Blood 82:3548-3555 (1993)). Obr. 11E ukazuje, že procento těchto buněk se snížilo z 27% na 3% u transplantovaných myší, což odpovídá normalizaci obratu erytrocytů u těchto zvířat. Za třetí se analyzoval obsah fosfatidylserinu v plasmatické membráně, který se zvyšuje v buňkách postižených srpkovitou anemií (Wood et al., Blood 8:1873-1 880 (1996); Kuypers et al., Blood, 87:1179-1187 (1996)). Předpokládá se, že fosfatidylserin přispívá ke zvýšené eliminaci těchto buněk makrofágy a monocyty a že může též přispívat k abnormální adhezi na endotel (Closse et al., Br. J. Haematol., 107:300-302 (1999)). Použily se dva testy. Jeden test měřil vazbu na Annexin-V, což znamená přímé měření

fosfatidylserinových zbytků (Vermes et al., J. Immunol. Meth., 184:39-51 (1995), a druhý test měřil NBD-PC internalizaci, což je měření enzymu scrablasy, který způsobuje expozici fosfatidylserinových zbytků na plasmatické membráně (Frasch et al., J. Biol. Chem., 275: 23065-23073 (2000); Bevers et al., Biol. Chem. 8-9:973-986 (1998); a Bratton et al., J. Biol. Chem. 272:26159-26165 (1997)). Obr. 11B ukazuje, že myši se srpkovitou anemií mají pravidelně před transplantací vysokou expozici fosfatidylserinu (podle vazby na Annexin-V), ale u transplantovaných myší je patrné významné snížení této expozice fosfatidylserinu. Obr. 11E také ukazuje, že po transplantaci došlo ke dramatickému snížení počty erytrocytů s aktivní scramblasou, což je v souladu se snížením expozice fosfatidylserinu.

Sleziny od transplantovaných myší také vykazují známky reverze srpkovitého fenotypu.

Jedním ze základních příznaků srpkovité anemie u myší je dramatické zvýšení velikosti sleziny ve srovnání s normálními zvířaty (Pastzy et al., Science, 278:876-878 (1997)). Toto souvisí s požadavkem na hematopoesu ve slezině, která je nutná pro doplňování rychle destruovaných srpkovitých erytrocytů. Jak je uvedeno na obr. 12A, dochází u transplantovaných myší k významnému zmenšení sleziny (z 7,3% celkové tělesné hmotnosti u naivních srpkovitých myší na 0,6% celkové tělesné hmotnosti u transplantovaných myší, při měření za 3 měsíce po transplantaci). Obr. 12B ukazuje, že zatímco u neléčených myší je slezina hlavním hematopoetickým orgánem, dochází u transplantovaných myší k navození normálnější rovnováhy mezi bílou a červenou hematopoesou. Obr. 12C a 12D ukazují histologické srovnání

slezin od naivních a transplantovaných myší, kde je patrné, že transplantované myši mají rozlišenou charakteristickou hyperreaktivní hematopoesu a sekvestraci erytrocytů charakteristickou pro srpkovitou anemii. Obr. 12C ukazuje, že slezina od zvířete se srpkovitou anemií je značně abnormální s nahromaděním sprkovitých erytrocytů a oblastmi zvýšené hematopoesy. Šipka označuje reprezentativní shluk erytrocytů. Žádné shlukování erytrocytů není patrné u transplantovaných myší.

Histologické vyšetření ledvin je u transplantovaných myší normální

Kromě defektů v periferní krvi a hematopoetických orgánech se u myší se srpkovitou anemií projevují též patologické změny solidních orgánů, které jsou podobné změnám pozorovaným u pacientů se srpkovitou anemií (Pastzy et al., Science, 278:876-878 (1997)). Stejně jako v původním popisu myšího modelu srpkovité anemie (Pastzy et al., Science, 278:876-878 (1997)) jsme zaznamenali u neléčených zvířat se srpkovitou anemií patologické změny v mnoha orgánech, včetně ledvin, jater, plic a srdce. Pro stanovení efektu transplantace kostní dřeně na strukturu a histologii orgánů se provedly nekropsie naivních a transplantovaných zvířat a tkáně se připravily pro histologickou analýzu. Transplantovaná zvířata měla normální histologii všech testovaných orgánů, včetně ledvin, jater, ssrdce a plic. U těchto zvířat došlo k normalizaci histologických nálezů a obr. 13A a 13B ukazují srovnání histologie ledvin u neléčených a transplantovaných myší. Obr. 13A ukazuje membranoproliferativní glomerulonefritidu pravidelně pozorovanou u neléčených myší se srpkovitou anemií. Šipka ukazuje na zesílenou glomerulární membránu a hrot šiky

ukazuje na zúžený glomerulární prostor. Obr. 13B ukazuje, že transplantovaná zvířata mají normální histologii ledvin, včetně normalizace glomerulárního prostoru a tloušťky glomerulární membrány.

Příklad 8

Tento příklad poskytuje popis metod použitých pro generování nukleotidových sekvencí kódujících CTLA4 molekuly podle předkládaného vynálezu.

Nejprve byl připraven CTLA4Ig kódující plasmid a bylo prokázáno, že exprimuje CTLA4Ig molekuly, jak je popsáno v U.S. Patentech č. 5,434,131, 5,885,579 a 5,851,795. Potom se z CTLA4Ig kódující sekvence připravily mutantní molekuly s jedinou mutací (např., L104E1g), ty se exprimovaly a testovaly se na kinetiku vazby k různým B7 molekulám. L104E1g nukleotidová sekvence (jak je obsažena v sekvenci uvedené na obr. 14) se použila jako templát pro generování CTLA4 mutantních sekvencí s mutacemi na dvou místech (jak jsou obsaženy v sekvencích uvedených na obr. 15-18), které byly exprimovány jako proteiny, které byly testovány na kinetiku vazby. Mezi CTLA4 mutantní sekvence s mutacemi na dvou místech patří: L104EA29Y1g, L104EA29L1g, L104EA29T1g a L104EA29W1g. Také se připravily mutantní molekuly s mutacemi na třech místech.

Konstrukce CTLA4Ig

Genetický konstrukt kódující CTLA4Ig obsahující extracelulární doménu CTLA4 a IgC γ 1 doménu se připravil způsobem popsaným v U.S. Patentech 5,434,131, 5,844,095 a 5,851,795, jejichž obsahy jsou zde uvedeny jako odkazy. Gen

pro extracelulární doménu CTLA4 byl klonován pomocí PCR za použití syntetických oligonukleotidů odpovídajících publikované sekvenci (Dariavach et al., Eur. Journ. Immunol. 18:1901-1905 (1988)).

Protože v CTLA4 genu nebyl identifikován signální peptid pro CTLA4, fúzoval se N-konec předpokládané sekvence CTLA4 ve dvou stupních za použití překrývajících se oligonukleotidů na signální peptid oncostatinu M (Malik et al., Mol. and Cell. Biol. 9:2847 (1989)). Pro první krok se oligonukleotid CTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCAT GGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCC (SEQ ID NO.:16) (který kóduje C-koncových 15 aminokyselin ze signálního peptidu oncostatinu M fúzovaných na N-koncových 7 aminokyselin CTLA4) použil jako kódující primer, a TTTGGGCTCCTGATCAGAATCTGGGCACGGTTG (SEQ ID NO:17) (kódující aminokyselinové zbytky 119-125 aminokyselinové sekvence kódující CTLA4 receptor a obsahující BclI restriční místo) se použil jako reverzní primer. Templátem pro tento stupeň byla cDNA syntetizovaná z 1 g celkové RNA z H38 buněk (HTLV II infikovaná buněčná linie T-lymfocytární leukemie získaná od Drs. Salahudin a Gallo, NCI, Bethesda, MD). Část PCR produktu z prvního stupně se reamplifikovala za použití překrývajícího se kódujícího primeru, který kóduje N-koncovou část signálního peptidu onkostatinu M a obsahuje Hind III restriční místo, CTAGCCACTGAAGCTTCACCAATGGGTG TACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTC (SEQ ID NO:18), a stejného reverzního primeru. Produkt PCR reakce se trávil Hind III a Bcl I a ligoval se s Bcl I/Xba I cDNA fragmentem kódujícím aminokyselinové sekvence odpovídající pantovému, CH2 a CH3 regionům IgC(gamma)1 do Hind III/Xba I štěpeného expresního vektoru, CDM8 nebo Hind III/Xba I štěpeného expresního vektoru pILN (který je také označován jako LN).

DNA kódující aminokyselinové sekvence odpovídající CTLA4Ig byla uložena v ATCC za podmínek Budapeštské smlouvy 31.5.1991 pod ATCC přírůstkovým č. 68629.

Mutagenese CTLA4Ig na bázi kodonů

Byla vyvinuta mutagenní a skrínigová strategie pro identifikaci mutantních CTLA4Ig molekul, které mají nižší rychlosti disociace (off rychlosti) z CD80 a/nebo CD86 molekul, tj. mají lepší vazebnou schopnost. V tomto provedení se mutace provedly v a/nebo poblíž zbytků v CDR-1, CDR-2 (též známém jako C řetězec) a/nebo CDR-3 regionech extracelulární domény CTLA4 (jak je popsáno v U.S. Patentech č. 6,090,914, 5,773,253 a 5,844,095; v související U.S. patentové přihlášce pořadové č. 60/2 14,065; a v Peach, R.J., et al., J. Exp. Med. 1994 180:2049-2058. A CDR-like region zahrnoval každý CDR region a přesahoval, o několik aminokyselin, dopředu nebo dozadu CDR motiv). Tato místa byla vybrána podle studií provedených na chimérických CD28/CTLA4 fúzních proteinech (Peach et al., J. Exp. Med., 1994, 180:2049-2058), a podle modelu předpokládajícím, které vedlejší řetězce aminokyselin mohou být vystaveny rozpouštědлу, a podle chybění identity nebo homologie aminokyselin v některých pozicích mezi CD28 a CTLA4. Také jakýkoliv zbytek, který z prostorového hlediska v těsné blízkosti (5-20 Angstromů) identifikovaných zbytků je považován za součást předkládaného vynálezu.

Pro syntetizování a testování rozpustných CTLA4 mutantních molekul s alterovanými afinitami k B7 molekule (např. CD80, CD86) se použila dvoustupňová strategie. V pokusech se nejprve připravila knihovna mutací ve

specifických kodonech extracelulární části CTLA4 a potom se tato knihovna testovala za použití BIAcore analýzy pro určení mutantů s alterovanou reaktivitou s B7. Biacore testovací systém (Pharmacia, Piscataway, N.J.) využívá detekce pomocí povrchové plasmonové rezonance, který využívá kovalentní vazby CD80Ig nebo CD86Ig na dextranem potažený sensorový čip, který je umístěn v detektoru. Testovaná molekula se potom injikuje do komůrky obsahující sensorový čip a množství komplementárního proteinu, který se naváže, může být hodnoceno podle změny molekulové hmotnosti, která je fyzikálně asociovaná s dextranem-potaženou stranou sensorového čipu; změna molekulové hmotnosti může být měřena detektorovým systémem.

Konkrétně, mutantní nukleotidové sekvence s mutací v jednom místě se generovaly za použití nemutované (např., přirozené) DNA kódující CTLA4Ig (U.S. Patenty č: 5,434,131, 5,844,095; 5,851,795; a 5,885,796; ATCC přírůstkové č. 68629) jako templátu. Mutagenní oligonukleotidové PCR primery se navrhly pro náhodnou mutagenesi specifických kodonů tak, že umožňovaly jakoukoliv bazi v pozici 1 a 2 kodonu, ale v pozici 3 pouze guanin nebo thymin (XXG/T nebo též NNG/T). Tímto způsobem může být náhodně mutovaný specifický kodon kódující každou z 20 aminokyselin. Z tohoto hlediska vede XXG/T mutagenese ke 32 potenciálním kodonům kódujícím každou z 20 aminokyselin. PCR produkty kódující mutace v těsné blízkosti CDR3-like smyčky CTLA4Ig (MYPPPY) se trávily SacI/XbaI a subklonovaly se do podobně tráveného CTLA4Ig (jak je uveden na obr. 20) LN expresního vektoru. Tento způsob se použil ke generování CTLA4 mutantní molekuly L104EIg s mutací na jednom místě (jak je uvedena na obr. 14).

Pro mutagenesi v blízkosti CDR-1-like smyčky CTLA4Ig se nejprve 5 k této smyčce vložilo silentní *NheI* restriční místo, pomocí PCR primerem řízené mutagenese. PCR produkty se trávily *NheI/XbaI* a subklonovaly se do podobně tráveného CTLA4Ig nebo L104EIg expresního vektoru. Tento způsob se použil pro přípravu CTLA4 mutantní molekuly L104EA29Yig s mutacemi na dvou místech (jak je uvedeno na obr.15). Konkrétně, molekula nukleové kyseliny kódující CTLA4 mutantní molekulu s mutací v jednom místě, L104EIg, použila jako templát pro generování CTLA4 mutantní molekuly L104EA29Yig s mutacemi ve dvou místech.

Mutantní nukleotidové sekvence kódující CTLA4 mutantní molekuly s mutacemi na dvou místech, jako je L104EA29YIg (uložená 19.6.200 v American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, pod ATCC přírůstkovým č. PTA-2104), se připravily opakovanou mutagenesí popsanou výše za použití L104EIg jako templátu. Tento způsob se použil pro generování mnoha dvojitych mutantních nukleotidových sekvencí, jako jsou sekvence kódující CTLA4 molekuly L104EA29YIg (jak je uvedena v sekvenci uvedené na obr. 15), L104EA29LIg (jak je uvedena v sekvenci uvedené na obr.16), L104EA29TIg (jak je uvedena v sekvenci uvedené na obr.17), a L104EA29WIG (jak je uvedena v sekvenci uvedené na obr.18). Také se připravily mutanty se třemi mutacemi, jako jsou sekvence kódující L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg a L104EA29YS25RIg.

Solubilní CTLA4 molekuly byly exprimovány z nukleotidových sekvencí a byly použity ve fázi III klinických studií popsaných v příkladu 3, dále.

Odborníkům v oboru bude jasné, že replikace sekvencí

nukleové kyseliny, zejména PCR amplifikace, snadno vnáší změny do DNA řetězců. Nicméně, nukleotidové změny nemusí být nutně translatovány do aminokyselinových změn, protože některé kodony kódují stejné nukleové kyseliny. Jakákoliv změna nukleotidu od původní sekvence, silentní (tj. nezpůsobující změnu translatovanou do aminokyselinové změny) nebo jinou, spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

Příklad 9

Následující příklad poskytuje popis způsobů použitých pro identifikaci mutantních CTLA polypeptidů s jednou nebo dvěma mutacemi, exprimovaných z konstruktů popsanych v příkladu 8, které vykazují vyšší vazebnou aviditu pro B7 molekuly ve srovnání s nemutovanými CTLA4Ig molekulami.

Současné pokusy in vitro a in vivo ukazují, že CTLA4Ig sám není schopen zcela blokovat priming antigenem specificky aktivovaných T-lymfocytů. In vitro studie s CTLA4Ig a buď monoklonální protilátkou specifickou pro CD80, nebo CD86, měřící inhibování proliferace T-lymfocytů ukazují, že anti-CD80 monoklonální protilátka nezvyšuje CTLA4Ig inhibici. Nicméně, anti-CD86 monoklonální protilátka zvyšuje inhibici, což naznačuje, že CTLA4Ig není tak účinný v blokování CD86 interakcí. Tato data podporují dřívější objevy Linsley et al. (Immunity, (1994), 1:793-801), že inhibice CD80-zprostředkované buněčné reakce vyžadovala přibližně 100-krát nižší koncentrace CTLA4Ig než reakce zprostředkovaná CD86. Podle těchto objevů se usoudilo, že rozpustné CTLA4 mutantní molekuly mající vyšší aviditu k CD86 než přirozené CTLA4 by měly být lépe schopny blokovat priming specifických antigenem aktivovaných buněk než CTLA4Ig.

Proto byly solubilní CTLA4 mutantní molekuly popsané v příkladu 8 testovány za použití nové skriningové procedury za účelem identifikace několika mutací v extracelulární doméně CTLA4, které zlepšují vazebnou aviditu pro CD80 a CD86. Tato skriningová strategie poskytuje účinnou metodu pro přímé identifikování mutantů s jasně pomalejší disociační rychlostí bez nutnosti přečištění nebo kvantifikace proteinů, protože stanovení rychlosti disociace je nezávislé na koncentraci (O'Shannessy et al., (1993) Anal. Biochem., 212:457-468).

COS buňky se transfektovaly jednotlivými miniprepy přečištěné plasmidové DNA a propagovaly se po dobu několika dnů. Tří-denní kondicionované kultivační medium se aplikovalo do BIAcore biosenzorových čipů (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) potažených rozpustným CD80Ig nebo CD86Ig. Specifická vazba a disociace mutantních proteinů se měřila povrchovou plasmonovou rezonancí (O'Shannessy, D. J., et al., 1997 Anal. Biochem. 212:457-468). Všechny pokusy se provedly na BIAcore™ nebo BIAcore™ 2000 biosensorech při 25°C. Ligandy se imobilizovaly na NCM5 sensorových čipech pokusné čistoty (Pharmacia) za použití standardní N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)karbodiimid-N-hydroxysukcinimidové vazby (Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277; Khulko, S.N., et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:5425-5434).

Skriningová metoda

COS buňky kultivované ve 24-jamkových kultivačních plotnách se dočasně transfektovaly mutantním CTLA4Ig. Kultivační medium obsahující secernovaný rozpustný mutantní

CTLA4Ig se odebíralo o 3 dny později.

Kondicionované medium COS buněk se nechalo projít přes BIAcore biosensorové čipy derivatizované CD86Ig nebo CD80Ig (jak je popsáno v Greene et al., 1996 J. Biol. Chem. 271: 26762-26771), a identifikovaly se mutantní molekuly s rychlostmi disociace nižšími než jsou rychlosti pozorované pro přirozený CTLA4Ig. DNA odpovídající vybraným vzorkům media se sekvenovaly a připravilo se více DNA pro provedení dočasné transfekce COS buněk ve větším rozsahu a z těchto buněk se potom po přečištění kultivačního media na proteinu A připravil CTLA4Ig mutantní protein.

Podmínky BIAcore analýzy a analýzy vazby byly stejné jako v J. Greene et al. 1996 J Biol. Chem. 271:26762-26771 a v U.S. Patentových přihláškách pořadová č. 09/579,927, a 60/214,065, které jsou zde uvedeny jako odkazy.

Analýza BIAcore dat

Základní hodnoty senosogramů se před analýzou normalizovaly na nulové reakční jednotky (RU). Vzorky se zpracovaly na falešně derivatizovaných průtokových kyvetách pro stanovení základní RU hodnot, které vznikají v důsledku značných rozdílů v idenxech lomu mezi roztoky. Rovnovážné disociační konstanty (K_d) se vypočetly z grafů R_{eq} versus C , kde R_{eq} je rovnovážná reakce minus reakce na falešně derivatizovaném čipu, a C je molární koncentrace analytu. Vazebné křivky se analyzovaly za použití komerčního softwaru pro nelineární křivky (Prism, GraphPAD Software).

Experimentální data se nejprve upravila pro model vazby ligandu na jediný receptor (1-místný model, tj. jednoduchý

langmuir systém, $A+B \rightleftharpoons AB$), a rovnovážné asociační konstanty ($K_d = [A] \cdot [B] / [AB]$) se vypočítaly z rovnice $R = R_{\max} \cdot C / (K_d + C)$. Potom se data upravila pro nejjednodušší dvoumístný odel vazby ligandu (tj. na receptor mající dvě neinteragující nezávislá vazebná místa, jak je popsán rovnicí $R = R_{\max} \cdot C / (K_{d1} + C) + R_{\max2} \cdot C / (K_{d2} + C)$).

Správnost těchto dvou modelů se analyzovala vizuálně srovnáním s experimentálními daty a statisticky za použití F-testu součtu čtverců. Jednomístný model byl vybrán jako nejlepší, pokud nebyl dvoumístný model významně lepší ($p < 0,1$).

Analýza asociace a disociace se provedly za použití BIA hodnotícího 2.1 Softwaru (Pharmacia). Asociační rychlostní konstanty k_{on} se vypočetly dvěma způsoby, za hodnocení pro homogenní jednomístné interakce a paralelní dvoumístné interakce. Pro jednomístné interakce byly hodnoty k_{on} vypočteny podle rovnice $R_t = R_{eq}(1 - \exp^{-k_s(t-t_0)})$, kde R_t je reakce v daném čase, t ; R_{eq} je rovnovážná reakce; t_0 je čas na začátku injekce; a $k_s = dR/dt = k_{on} \cdot C$, kde C je koncentrace analytu, vypočtená ve smyslu monomerního vazebného testu. Pro dvoumístné interakce se hodnoty k_{on} vypočetly podle rovnice $R_t = R_{eq1}(1 - \exp^{-k_{s1}(t-t_0)}) + R_{eq2}(1 - \exp^{-k_{s2}(t-t_0)})$. Pro každý model se hodnoty k_{on} určily z vypočteného sklonu (do přibližně 70% maximální asociace) grafu k_s versus C .

Disociační data se analyzovala podle jednomístných ($AB = A+B$) nebo dvoumístných ($A_i B_j = A_i + B_j$) modelů a rychlostní konstanty (k_{off}) se vypočetly z nejlépe odpovídajících křivek. Použil se model vazebného místa, kromě situace, kdy byly zbytky větší než pozadí přístroje (2-10RU, podle přístroje), a v takové situaci se použil model dvou vazebných míst.

Poločasy obsazení receptoru se vypočetly za použití vztahu $t_{1/2}=0,693/k_{\text{off}}$.

Průtoková cytometrie

Myší mAb L307.4 (anti-CD80) se zakoupila od Becton Dickinson (San Jose, California) a IT2.2 (anti-B7-0 [též označovaná jako CD86]) od Pharmingen (San Diego, California). Pro imunobarvení se CD80-pozitivní a/nebo CD86-pozitivní CHO buňky odebraly z kultivačních nádob pomocí inkubace s fosfátem-pufrovaným salinickým roztokem (PBS) obsahujícím 10 mM EDTA. CHO buňky ($1-10 \times 10^5$) se nejprve inkubovaly s mAb nebo imunoglobulinovými fúzní proteiny v DMEM obsahujícím 10% fetální hovězí sérum (FBS), potom se promyly a inkubovaly se s reakčním činidlem druhého stupně, kterým byl anti-myší nebo anti-lidský imunoglobulin konjugovaný s fluoresceinem isothiokyanátem (Tago, Burlingame, California). Buňky se potom naposledy propláchly a analyzovaly se na FACScan (Becton Dickinson).

SDS-PAGE a chromatografie s vylučováním podle velikosti

SDS-PAGE se provedla na Tris/glycinových 4-20% akrylamidových gelech (Novex, San Diego, CA). Analytické gely se barvily Coomassie Blue a obrázky vlhkých gelů se získaly pomocí digitálního skenování. CTLA4Ig (25 g) a L104EA29YIg (25 g) se analyzovaly chromatografií s vylučováním podle velikosti za použití TSK-GEL G300 SW_{XL} kolony (7,8 x 300 mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA) uvedené do rovnováhy ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku obsahujícím 0,02% NaN_3 při průtoku 1,0 ml/min.

CTLA4X_{c120s} a L104EA29YX_{c120s}.

Jednořetězcový CTLA4X_{C120S} se připravil způsobem popsáním dříve (Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424). Stručně, Briefly, an oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) expresní plasmid se použil jako templát, kódující primer, GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG (SEQ ID NO:19) byl vybrán tak, aby odpovídal sekvenci ve vektoru; a reversní primer, GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGOGCACGGTTC (SEQ ID NO: 20) odpovídal posledním sedmi aminokyselinám (tj. aminokyselinám 118-124) v extracelulární doméně CTLA4, a obsahoval místo pro restrikční enzym a stop kodon (TGA). Reversní primer určoval mutaci C120S (cystein na serine v pozici 120). Konkrétně, nukleotidová sekvence GCA (nukleotidy 34-36) reversního primeru uvedená výše je nahrazena jednou z následujících nukleotidových sekvencí: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, nebo GCT. Jak bude odborníkům v oboru jasné, nukleotidová sekvence GCA je revertovaná komplementární sekvence kodonu TGC pro cystein. Obdobně, nukleotidové sekvence AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, nebo GCT, jsou revertované komplementární sekvence kodonů pro serin. Produkty polymerasové řetězové reakce se trávily HindIII/XbaI a přímo se subklonovaly do expresního vektoru LN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). L104EA29YX_{C120S} se připravil identickým způsobem. Každý konstrukt byl ověřen sekvenováním DNA.

Identifikace a biochemická charakterizace mutantů s vysokou aviditou

24 aminokyselin bylo vybráno pro mutagenesi a získaných 2300 mutantních proteinů bylo testováno na CD86Ig vazbu pomocí povrchové plasmonové rezonance (SPR; jak byla popsána výše). Predominantní efekty mutagenese v každém místě jsou

shrnuty v tabulce II, dále. Náhodná mutagenese některých aminokyselin v CDR-1 regionu (S25-R33) zjevně neovlivňuje vazbu ligandu. Mutagenese E31 a R33 a zbytků M97-Y102 zjevně vede k redukované vazbě na ligand. Mutagenese zbytků S25, A29 a T30, K93, L96, Y103, L104, a G105, vede k zisku proteinů s pomalými "on- a/nebo "off rychlostmi. Tyto výsledky potvrzují předchozí objevy, že zbytky v CDR-1 (S25-R33) regionu a zbytky v nebo poblíž M97-Y102 ovlivňují vazbu ligandu (Peach et al., (1994) J. Exp. Med.. 180:2049-2058).

Mutagenese míst S25, T30, K93, L96, Y103 a G105 vedla k identifikaci některých mutantních proteinů, které měly pomalejší "off rychlosti z CD86Ig. Nicméně, v těchto případech byly pomalejší "off rychlosti spojeny s pomalejšími on rychlostmi, což vedlo k zisku mutantních proteinů s celkovou aviditou pro CD86Ig podobnou jako je avidita přirozeného CTLA4Ig. Dále, mutagenese K93 vedla k významné agregaci, která byla odpovědná za pozorované změny kinetiky.

Náhodná mutagenese L104 následovaná transfekcí COS buněk a skríníngem vzorků kultivačního media SPR s imobilizovaným CD86Ig vedla k zisku šesti vzorků media, které obsahovaly mutantní proteiny s přibližně 2-krát pomalejší rychlostí disociace než má přirozený CTLA4Ig. Když se příslušné cDNA těchto mutantů sekvenovaly, tak bylo zjištěno, že každý kóduje mutaci měnící leucin na kyselinu glutamovou (L104IE). Je zřejmé, že substituce leucinu 104 kyselinou asparagovou (L104D) neovlivňuje vazbu CD86Ig.

Mutagenese se potom opakovala v každém místě uvedeném v tabulce II, tentokrát za použití L104E jako PCR templátu

místo přirozeného CTLA4Ig, jak bylo popsáno výše. SPR analýza, opět za použití imobilizovaného CD86Ig, identifikovala šest vzorků kultivačního media z mutagenese alaninu 29, kde tyto proteiny měly přibližně 4-krát pomalejší rychlosti disociace než přirozený CTLA4Ig. Dvěma nejpomalejšími byly tyrosinové substituce (L104EA29Y), dvě byly leucinové substituce (L104EA29L), jedna byla tryptofanová substituce (L104EA29W), a jedna byla threoninová substituce (L104EA29T). V přirozeném CTLA4Ig nebyly pozorovány žádné mutanty s pomalou rychlostí disociace, když byly alanin 29 mutovaný náhodně, samostatně.

Relativní molekulová hmotnost a stav agregace přečištěných L104E a L104EA29YIg se hodnotil SDS-PAGE a chromatografií s vylučováním podle velikosti. L104EA29YIg (cca 1 g; dráha 3) a L104EIg (cca 1 g; dráha 2) měly stejnou elektroforetickou mobilitu jako CTLA4Ig (cca 1 g; dráha 1) za redukujících (-50 kDa; +ME; plus 2-merkaptoethanol) a neredukujících (cca 100 kDa; -ME) podmínek (Obr. 21A). Chromatografie s vylučováním podle velikosti prokázala, že L104EA29YIg (Obr. 21C) má stejnou mobilitu jako dimerní CTLA4Ig (Obr. 21B). Hlavní píky představují proteinový dimer, zatímco rychleji eluující vedlejší pík na Obr. 21B představuje agregáty s vyšší molekulovou hmotností. Přibližně 5,0% CTLA4Ig bylo přítomno jako agregáty s vyšší molekulovou hmotností, ale nebyly patrné známky agregace L104EA29Yig nebo L104EIg. Proto nemůže být silnější vazba na CD86Ig pozorovaná pro L104EIg a L104EA29YIg přisouzena agregaci indukované mutagenesí.

Analýza rovnováhy a kinetiky vazby

Analýza rovnováhy a kinetiky vazby se provedla na

CTLA4Ig, L104EIg a L104EA29YIg přečištěných na proteinu A za použití povrchové plasmonové rezonance (SPR). Výsledky jsou uvedeny v tabulce I, dále. Pozorované rovnovážné disociační konstanty (K_d ; Tabulka I) byly vypočteny z vazebných křivek generovaných v rozmezí koncentrací (5,0–200 nM). L104EA29YIg se váže na CD86Ig silněji než L104EIg nebo CTLA4Ig. Nižší K_d L104EA29YIg (3,21 nM) než L104EIg (6,06 M) nebo CTLA4Ig (13,9 nM) ukazuje na vyšší vazebnou aviditu L104EA29YIg k CD86Ig. Nižší K_d L104EA29YIg (3,66 nM) než L104EIg (4,47 nM) nebo CTLA4Ig (6,51 nM) ukazuje na vyšší vazebnou aviditu L104EA29YIg k CD80Ig.

Analýza kinetiky vazby ukázala srovnatelné "on" rychlosti pro vazbu CTLA4Ig, L104EIg a L104EA29YIg na CD80, stejně jako byly podobné "on" rychlosti pro CD86Ig (Tabulka I). Nicméně, "off" rychlosti pro tyto molekuly nebyly ekvivalentní (Tabulka I). Ve srovnání s CTLA4Ig má L104EA29YIg přibližně 2-krát pomalejší rychlost disociace z CD80Ig, a přibližně 4-krát pomalejší rychlost disociace z CD86Ig. L104E má rychlosti disociace mezi L104EA29YIg a CTLA4Ig. Protože vložení těchto mutací neovlivňuje významnějším způsobem rychlosti asociace, je zvýšení avidity pro CD80Ig a CD86Ig pozorované u L104EA29YIg pravděpodobně způsobeno snížením rychlostí disociace.

Pro stanovení toho, zda je zvýšení avidity L104EA29YIg pro CD86Ig a CD80Ig způsobeno mutacemi ovlivňujícími způsob, kterým je každý monomer asociován v dimer, nebo zda jsou strukturální změny zvyšující aviditu vloženy do každého monomeru, se připravily jednořetězcové konstrukty CTLA4 a L104EA29Y extracelulárních domén, po mutagenesi cysteinu 120 na serin, jak bylo popsáno výše a v Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417–15424 (84). Přečištěné proteiny

CTLA4X_{c120s} a L104EA29YX_{c120s} byly podle gelové permeační chromatografie monomerní (Linsley et al., (1995), výše) před analýzou jejich vazebných schopností pro ligand pomocí SPR. Výsledky ukazují, že vazebná afinita obou monomerních proteinů pro CD86Ig byla přibližně 35-80-krát nižší než afinita pozorovaná pro příslušné dimery (Tabulka 1). Toto podporuje dříve publikovaná data, že dimerizace CTLA4 je nutná pro vysokou aviditu vazby ligandu (Greene et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:26762-26771)

L104EA29YX_{c120s} se vázal s přibližně 2-krát vyšší afinitou než CTLA4X_{c120s} na CD80Ig i CD86Ig. Vyšší afinita byla způsobena přibližně 3-krát pomalejší rychlostí disociace z obou ligandů. Proto byla silnější vazba L104EA29Y na ligand s největší pravděpodobností způsobena strukturálními změnami zvyšujícími aviditu, které byly vneseny do každého monomerního řetězce, a nikoliv změnami v dimerizaci molekuly.

Umístění a strukturální analýza mutací zvyšujících aviditu

Struktura extracelulární IgV-like domény CTLA4 byla nedávno určena NMR spektroskopii (Metzler et al., (1997) Nature Struct. Biol., 4:527-531). Toto umožňuje přesnou lokalizaci leucinu 104 a alaninu 29 ve trojrozměrném obrazu (obr. 22, vlevo a vpravo). Leucin 104 je umístěn poblíž vysoce konzervované MYPPPY aminokyselinové sekvence. Alanin 29 je umístěn poblíž C-terminálního konce CDR-1 (S25-R33) regionu, který prostorově sousedí s MYPPPY regionem. Ačkoliv existuje významná interakce mezi zbytky na bazi těchto dvou regionů, neexistuje žádná přímá interakce mezi L104 a A29, ačkoliv oba tvoří část kontinuálního hydrofobního jádra proteinu. Strukturální následky dvou mutací zvyšujících

aviditu byly hodnoceny modelováním. A29Y mutace může být snadno upravena trhlinou mezi CDR-1 (S25-R33) regionem a MYPPPY regionem a může sloužit pro stabilizaci konformace MYPPPY regionu. V přirozeném CTLA4 vytváří L104 významné hydrofobní interakce s L96 a V94 poblíž MYPPPY regionu. Ze dvou důvodů je značně nepravděpodobné, že by mutace kyseliny glutamové způsobovala konformaci podobnou L104. Za prvé, není dostatek prostoru pro zapojení delšího vedlejšího řetězce kyseliny glutamové do struktury bez významnějšího narušení CDR-1 (S25-R33 region). Za druhé, energetické náklady spojené s negativním nábojem vedlejšího řetězce kyseliny glutamové jsou značné. Modelové studie předpokládají, že vedlejší řetězec kyseliny glutamové vyčnívá na povrch molekuly, kde může být jeho náboj stabilizován solvatací. Taková změna konformace může být snadno upravena G105, s minimálním posunem dalších zbytků v regionu.

Vazba mutantů s vysokou aviditou na CHO buňky exprimující CD80 nebo CD86

FACS analýza (obr. 23) vazby CTLA4Ig a mutantních molekul na stabilně transfekované CD80+ a CD86+ CHO buňky se provedla způsobem, který je zde popsán. CD80-pozitivní a CD86-pozitivní CHO buňky se inkubovaly se stoupajícími koncentracemi CTLA4Ig, L104EA29YIg nebo L104EIIg, a potom se promyly. Navázaný imunoglobulinový fúzní protein se detekoval za použití koziho anti-lidského imunoglobulinu konjugovaného na fluorescein isothiokyanatan.

Jak je uvedeno na obr. 23, CD80-pozitivní nebo CD86-pozitivní CHO buňky ($1,5 \times 10^5$) se inkubovaly s uvedenými koncentracemi CTLA4Ig (plné čtverečky), L104EA29YIg

(kolečka), nebo L104EIg (trojúhelníčky) po dobu 2 hodin při teplotě 23°C, promyly se a inkubovaly se s kozím anti-lidským imunoglobulinem konjugovaným na fluorescein isothiokyanatan. Analyzovala se vazba celkem 5000 živých buněk (jediné stanovení) pomocí FACScan, a průměrná intenzita fluorescence (MFI) se stanovila z dat histogramů za použití PC-LYSYS. Data se korigovala pro fluorescenci pozadí měřenou na buňkách inkubovaných s reakčním činidlem druhého stupně samotným (MFI=7). Kontrolní L6 mAb (80 µg/ml) měla MFI < 30. Tyto výsledky jsou získány ze čtyř nezávislých pokusů.

Vazba L104EA29YIg, L104EIg a CTLA4Ig na lidské CD80-transfektované CHO buňky je přibližně stejná (obr. 23A). L104EA29YIg a L104EIg se váží silněji na CHO buňky stabilně transfektované lidským CD86 než CTLA4Ig (Obr. 23B).

Funkční testy

Lidské CD4-pozitivní T-lymfocyty se izolovaly imunomagnetickou negativní selekcí (Linsley et al., (1992) J. Exp. Med. 176:1595-1604). Izolované CD4-pozitivní T-lymfocyty se stimulovaly forbol-myristát-acetátem (PMA) plus CD80-pozitivními nebo CD86-pozitivními CHO buňkami za přítomnosti titračních koncentrací inhibitoru. CD4-pozitivní T-lymfocyty ($8-10 \times 10^4$ /jamku) se kultivovaly za přítomnosti 1 nM PMA s nebo bez ozářených stimulačních CHO buněk. Proliferační reakce se měřila přidáním 1 Ci/jamku [3H]thymidinu během posledních 7 hodin 72 hodinové kultivace. Provedla se inhibice stimulace T-lymfocytů PMA plus CD80-pozitivními CHO, nebo CD86-pozitivními CHO pomocí L104EA29YIg a CTLA4Ig. Výsledky jsou uvedeny na obr. 24. L104EA29YIg inhiboval proliferaci CD80-pozitivních PMA

ošetřených CHO buněk více než CTLA4Ig (Obr. 24A). L104EA29YIg byl také účinnější než CTLA4Ig v inhibování proliferace CD86-pozitivních PMA ošetřených CHO buněk (Obr. 24B). Tak je L104EA29YIg účinnějším inhibitorem jak CD80-, tak CD86-zprostředkované kostimulace T-lymfocytů.

Obr. 25 ukazuje inhibici allostimulovaných lidských T-lymfocytů připravených způsobem popsáným výše pomocí L104EA29YIg a CTLA4Ig, kde tyto lymfocyty byly dále allostimulovány lidskou B-lymfoblastoidní buněčnou linií (LCL) označovanou jako PM, která exprimuje CD80 a CD86 (T lymfocyty v koncentraci $3,0 \times 10^4$ /jamku a PM v koncentraci $8,0 \times 10^3$ /jamku). Primární allostimulace probíhala po dobu 6 dnů a potom se buňky pulsovaly ^3H -thymidinem po dobu 7 hodin a pak se stanovila inkorporace radioaktivního činidla.

Sekundární allostimulace se provedla následujícím způsobem. 7-dnů primárně allostimulované T-lymfocyty se odebraly pomocí lymfocytárního separačního media (LSM) (ICN, Aurora, OH) a ponechaly se v klidu po dobu 24 hodin. T-lymfocyty se potom restimulovaly (sekundárně) za přítomnosti titračních množství CTLA4Ig nebo L104EA29YIg, za přidání PM ve stejném poměru jako výše. Stimulace probíhala po dobu 3 dnů a potom se buňky pulsovaly radioaktivním činidlem a odebraly se způsobem popsáným výše. Efekt L104EA29YIg na primárně allostimulované T-lymfocyty je uveden na Obr. 25A. Efekt L104EA29YIg na sekundárně allostimulované T-lymfocyty je uveden na obr. 25B. L104EA29YIg inhiboval jak primární, tak sekundární proliferativní reakci T-lymfocytů lépe než CTLA4Ig.

Pro měření produkce cytokinů (Obr. 26) se připravily dvojité plotny pro sekundární allostimulaci. Po 3 dnech se

kultivační medium testovalo za použití ELISA kitů (Biosource, Camarillo, CA) podle návodu výrobce. Bylo zjištěno, že L104EA29YIg je účinnější než CTLA4Ig v blokování produkce IL-2, IL-4, a -IFN γ cytokinů T-lymfocyty po sekundárním allogenním stimulu (obr. 26A-C).

Efekty L104EA29YIg a CTLA4Ig na reakci opičích smíšených lymfocytů (MLR) jsou uvedeny na Obr. 27. Mononukleární buňky periferní krve (PBMC; $3,5 \times 10^4$ buněk/jamku od každé opice) od dvou opic se přečistily pomocí lymfocytárního separačního media (LSM) a smísily se s 2 $\mu\text{g/ml}$ fytohemaglutininu (PHA). Buňky se stimulovaly 3 dny a potom se pulsovaly radioaktivním činidlem po dobu 16 hodin a odebraly se. L104EA29YIg inhiboval proliferaci opičích T-lymfocytů lépe než CTLA4Ig.

Tabulka 1:

Tabulka uvádí rovnovážné a zřetelné kinetické konstanty (hodnoty jsou průměry standardní odchylky ze tří různých pokusů:

Imobilizovaný Protein	Analyt	$k_{on} (x 10^5)$ $M^{-1} S^{-1}$	$k_{off} (x 10^{-3})$ S^{-1}	K_d nM
CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 ± 0.29	2.21 ± 0.18	6.51 ± 1.08
CD80Ig	L104EIg	3.02 ± 0.05	1.35 ± 0.08	4.47 ± 0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 ± 0.20	1.08 ± 0.05	3.66 ± 0.41
CD80Ig	CTLA4X _{C120S}	12.0 ± 1.0	230 ± 10	195 ± 25
CD80Ig	L104EA29YX _{C120S}	8.3 ± 0.26	71 ± 5	85.0 ± 2.5
CD86Ig	CTLA4Ig	5.95 ± 0.57	8.16 ± 0.52	13.9 ± 2.27
CD86Ig	L104EIg	7.03 ± 0.22	4.26 ± 0.11	6.06 ± 0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 ± 0.40	2.06 ± 0.03	3.21 ± 0.23
CD86Ig	CTLA4X _{C120S}	16.5 ± 0.5	840 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	L104EA29YX _{C120S}	11.4 ± 1.6	300 ± 10	267 ± 29

Tabulka II

Efekt mutagenese CTLA4Ig v uvedených místech na vazbu CD86Ig, jak byl určen SPR, jak je popsáno výše. Převládající efekt je označen +

Místo mutagenese	Efekt mutagenese		
	Žádný zjevný efekt	Pomalá asociace/ pomalá disociace	Redukovaná vazba ligandu
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

Jak bude odborníkům v oboru jasné, zahrnuje vynález i jiná než popsaná provedení a tato provedení spadají do rozsahu předkládaného vynálezu. Uvedená provedení jsou proto ilustrativní a nijak neomezují rozsah vynálezu.

Příklad 10

Následující příklad uvádí charakterizaci virem zprostředkované inhibice smíšeného chimérismu a allospecifické tolerance. Konkrétně tento příklad ukazuje, že LCMV infekce brání přežívání allotransplantátu po CD28/CD40 kombinované bloádě.

Myši a virová infekce. Dospělí samci BALB/c, B6, a C3H/HeJ myši stáří 6-8 týdnů se zakoupily od Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Myši se infikovaly 2×10^5 PFU LCMV Armstrong, který se injikoval intra-peritoneálně (i.p.) Zásobní viry se kultivovaly a kvantifikovaly dříve popsáním způsobem (Ahmed et al., J. Exp. Med., 160:521 (1984)).

Kožní transplantáty. Kožní transplantáty plné tloušťky (1 cm^2) se transplantovaly na zadní část hrudníku myši a zajistily se Band-Aid (Johnson & Johnson, Arlington, TX) na dobu 7 dnů. Přežívání transplantátu se sledovalo denně vizuálně. Rejekce se definovala jako kompletní ztráta živé epidermální tkáně transplantátu. Statistická analýza se provedla za použití Mann-Whitney U testu.

Příprava kostní dřeně a léčebné protokoly: Příjemci kožních transplantátů se léčili 500 g křeččí anti-myší CD40L Ab (MR1) a lidského CTLA4-Ig podaných i.p. v den transplantace (den 0) a postoperační dny 2, 4 a 6. CD4- a CD8-depletované experimentální skupiny dostaly 100 g krysí anti-myší CD4 (GK1.5) nebo krysí anti-myší CD8 (TIB105) i.p. ve dny -3, -2, -1, a jednou týdně do odběru. Myši léčené busulfanem (Busulfex; Orphan Medical, Minnetonka, MN) dostaly 600 g v den 5 po operaci. Kostní dřeň se aspirovala z tibií,

femurů a humerů a erytrocyty se lyzovaly za použití Tris-pufrovaného roztoku chloridu amonného. Buňky se resuspendovaly v salinickém roztoku a injikovaly se intra-venosně (i.v.) v koncentraci 2×10^7 buněk/dávku ve dny 0 a 6 po operaci.

CFSE značení a adoptivní přenosy. Značení naivních nebo imunních B6 T-lymfocytů a adoptivní transfer do ozářených BALB/c myši se provedli způsobem popsáným dříve (Williams et al., J. Immunol., 165:6849 (2000)). Získané splenocyty se analyzovaly průtokovou cytometrií.

Intracelulární IFN- γ test. Intracelulární exprese IFN- γ v odpovědi na restimulaci LCMV peptidy se analyzovala způsobem popsáným dříve (Murali-Krishna et al., Immunity 8:177 (1998)). V případě ozářených příjemců buněk značených CFSE se získané splenocyty inkubovaly po dobu 5 hodin s LCMV-infikovanými nebo neinfikovanými MC57 fibroblasty za přítomnosti brefeldinu A (GolgiPlug; BD PharMingen, San Diego, CA). V GVHD testu se peptid-specifická produkce IFN- γ hodnotila restimulací neinfikovaných IC21 makrofágů pulsovaných vhodným LCMV peptidem v dávce 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Po barvení povrchů se buňky permeabilizovaly a barvily se na expresi IFN- γ za použití Cytofix/Cytoperm kitu (BD PharMingen) podle návodu výrobce.

IFN- γ ELISPOT testy. Odpovědi allospecifických T-lymfocytů se měřily za použití IFN- γ ELISPOT testu. Trojnásobná ředění splenocytů od příjemců (H-2^k nebo H-2^b) se stimulovaly přes noc 5×10^5 ozářených splenocytod dárce (H-2^d) na jamku v plotnách s ester-celulosovým dnem (Millipore, Bedford, MA), které byly předem potaženy IFN- γ záchytnou Ab. Pro

měření LCMV-specifických reakcí se splenocyty restimulovaly přes noc infikovanými L929 (H-2^k) nebo MCS7 (H-2^b) buňkami. Plotny se potáhly a vyvíjely se způsobem popsáným dříve (Williams et al., J. Immunol. 165:6849 (2000)).

Buněčné přípravky a průtoková cytometrie. Připravily se tetramery MHC třídy I a skládaly se s α_2 -mikroglobulinem a vhodným peptidem způsobem popsáným dříve (Murali-Krishna et al., Immunity 8:177 (1998)). Analýzy splenocytů od ozářených příjemců T-lymfocytů značených CFSE se provedly za použití Ab konjugovaných s fluorochromem (kryší IgG2a PE, kryší IgG2b PE, anti-CD4 PE, anti-CD8 PE; BD PharMingen) a APC značených tetramerů. Pro intracelulární barvení se buňky značily anti-CD8 PE a kryším IgG2b APC nebo anti-IFN- γ APC (BD PharMingen). Periferní krev se analyzovala barvením Ab konjugovaných na fluorochrom (kryší IgG2a APC, anti-CD4 APC, myší IgG2a FITC, anti-H-2K^d FITC, myší IgG1 FITC, anti-V5 FITC, kryší IgG2b FITC, anti-V11 FITC; BD PharMingen), a potom se provedla lýza erytrocytů a promytí kitem pro lýzu plné krve (R&D Systems, Minneapolis, MN). Slezině dendritické buňky se koncentrovaly na Optiprep koloně (Nyconied, Oslo, Norway) způsobem popsáným dříve (Ruedl et al., Eur. J Immunol. 26:1801(1996)) a analyzovaly se za použití Ab konjugovaných na fluorochrom (ham IgG PE, anti-CD11c PE, ham IgM FITC, anti-CD40 FITC, anti-CD54 FITC, kryší IgG2a FITC, anti-CD80 FITC, anti-CD86 FITC, myší IgG2a FLTC, anti H-2K^d FITC, anti-I-A^b FITC; BD PharMingen). Průtoková cytometrie se provedla za použití FACSCaliber, s odběrem dat pro CFSE fluorescenci na FLI (FITC) kanálu. Data se analyzovala za použití CellQuest softwaru (BD Biosciences, Braintree, MA).

Buněčné linie. Fibrosarkomová buněčná linie MC57 (H-2^{b+}) a

játerní buněčná linie L929 (H-2^{k*}) se kultivovaly a pasážovaly v RPMI 1640 doplněném 10% FBS, antibiotiky a 2-ME.

Výsledky

Akutní LCMV infekce narušuje dlouhodobé přežívání allotransplantátu indukované bloádou CD28/CD40 T-lymfocytární kostimulační dráhou.

Nedávné důkazy naznačovaly, že některé virové infekce (např., LCMV a PV) inhibují dlouhodobé přežívání kožních allotransplantátů indukované bloádou CD40 dráhy a podáním splenocytů od dárce (Welsh et al., J. Virol. 74:2210 (2000)). Bylo hodnoceno zda akutní LCMV infekce může alterovat dobu přežívání kožních transplantátů při simultánní bloádě CD28 a CD40 T-lymfocytárních kostimulačních drah. C3H/HeJ myším se aplikovaly Balb/c kožní allotransplantáty společně s CTLA4-Ig a anti-CD40L ve dny 0, 2, 4 a 6 po transplantaci. Medián doby přežívání (MST) byl > 80 dnů (n = 5). C3H/HeJ myši, kterým se aplikovaly BALB/c kožní allotransplantáty a bloáda kostimulace, přežívaly >80 dnů (Obr. 29). Naopak, myši, které měly stejné procedury a léčbu, současně s konkomitantní infekcí 2×10^5 - LCMV Armstrong v nebo okolo dnu transplantace, rychle odmítly transplantáty (MST = 20 dnů; Obr. 29). Pro určení relativního přispění každé subpopulace T-lymfocytů k rejekci kožních allotransplantátů resistantní na bloádu kostimulace po akutní LCMV infekci se CD4+ a CD8+ T-lymfocyty depletovaly in vivo za použití GK1.5 a TIB105 Ab, v příslušném pořadí. Jak je uvedeno na obr. 29, deplece CD4+ T-lymfocytů nemění schopnost C3H/HeJ myši odmítat BALB/c kožní transplantáty po infekci LCMV (MST = 18

dnů). Deplece CD8+ T-lymfocytů vede k mírnému oddálení rejekce kožních transplantátů (MST=26 dnů). Deplece obou podskupin současně vedla k dlouhodobému přežívání allotransplantátů (MST> 60 dnů) (Obr. 29), což naznačuje, že deplece byly účinné a že virus není přímo škodlivý pro allotransplantáty.

Tyto výsledky demonstrují, že LCMV indukuje akcelerovanou rejekci transplantátu při kombinované blokádě CD28 a CD40 T-lymfocytárních kostimulačních drah. Výsledky také ukazují, že CD4+ nebo CD8+ T-lymfocyty jsou dostatečné pro zprostředkování rejekce kožních transplantátů indukované LCMV infekcí.

Akutní LCMV infekce narušuje vznik částečného hematopoetického chimérismu, delecí alloreaktivních T-lymfocytů a indukci tolerance specifické pro dárce.

Zjišťovalo se, zda má LCMV infekce stejný efekt v modelu indukce robustní tolerance, konkrétně to, zda akutní LCMV infekce může narušit blokádou kostimulace-zprostředkovanou indukci smíšeného hematopoetického chimérismu a tolerance specifické pro dárce. Podání kostní dřeně od dárce následované podáním toxinu selektivního pro kmenové buňky, busulfanu, společně s blokádou CD40/CD28 kostimulačních drah, vedlo k vysokým hladinám chimérismu, delecí donor-reaktivních T-lymfocytů a trvalé donor-specifické tolerance (Adams et al., J. Immunol. 167:1103 (2001)).

Jak je vidět na obr. 30A, 5/5 B6 myši, které dostaly BALB/c kožní transplantát a kostní dřeň, stejně jako busulfan a blokádu ko-stimulace, mělo více než 200-denní přežívání kožního transplantátu u 100% testovaných myši.

Naopak, 5/5 myši, které měly stejnou léčbu konkomitantně s akutní LCMV infekcí, odmítlo rychle transplantáty (MST = 14 dnů). Tyto výsledky jsou získané ze tří samostatných pokusů. Stejně jako ve dřívějším modelu predeplece CD8+ T-lymfocytů prokázala, že CD4+ T-lymfocyty mohou zprostředkovat rejekce, ačkoliv o něco pomalejším způsobem. Po depleci nebyly žádné CD8+ T-lymfocyty detekovatelné v periferní krvi, a simultánní deplece obou subpopulací během infekce vedla k trvalému přežívání štěpu, což naznačuje, že deplece byla účinná.

Podle výše uvedeného postupu se u neinfikovaných myši vyvinul významný hematopoetický chimérismus (obr. 30B). V den 125 bylo více než 60% leukocytů periferní krve u všech myši H-2K^d (n = 5). Chimérismus byl pozorován ve všech testovaných liniích, včetně CD4+, CD8+, B220+, CD11b+ a GR-1+ buňkách.

Naopak, u myši se stejnou léčbou současně s LCMV v době transplantace se nikdy nevyvinul detekovatelný dlouhodobý chimérismus. Predeplece CD8+ T-lymfocytů (obr. 30B) neměnila schopnost infekce rušit vznik chimérismu.

Donor-specifická tolerance po transplantaci kostní dřeně a blokádě kostimulace je způsobena alespoň částečně delecí alloreaktivních T-lymfocytů (Wekerle et al., J. Exp. Med. 187:2037 (1998), Durham et al., J. Immunol. 165:1 (2000)). Pro stanovení toho, zda LCMV-indukovaná rejekce kožních transplantátů byla asociovaná s narušenou periferní delecí T-lymfocytů reaktivních s dárce se srovnávalo využití V β 11 a V β 5.1/2 CD4+ T-lymfocyty od B6 příjemců v neinfikované skupině (která akceptovala jak kostní dřeň, tak kožní transplantáty) a v infikované skupině (která odmítla kostní

dřeň a kožní transplantáty). BALB/c myši deletují V β 11 a V β 5-nesoucí T-lymfocyty v thymu v důsledku jejich vysoké afinity pro endogenní retrovirové superantigeny (virus myších mamárních tumorů (MMTV)) prezentované I-E molekulami MHC třídy II. B6 myši neexprimují I-E a proto využívají V β 11 na 5–7% CD4+ T-lymfocytů a V β 5.1 na 3–5% CD4+ T-lymfocytů. V tomto pokusu vykazovaly neinfikované myši léčené po transplantaci kůže bloádou kostimulace, kostní dřeně a busulfanem snížené procento V β 11-CD4+ a V β 5-CD4+ T-lymfocytů v periferní krvi v den 28 po transplantaci. V den 60 po transplantaci byla exprese těchto buněčných populací téměř nedetekovatelná v periferní krvi, kde tvořily téměř stejné procento celkové CD4+ populace jako u BALB/c myši. Naopak, myši, kterým bylo podáno 2×10^5 PFU LCMV Armstrong v době transplantace nedeletovaly V β 5-CD4+ a V β 11-CD4+ T-lymfocyty v žádnou dobu po transplantaci (Obr. 30, C a D). Chybění delece těchto buněčných populací proběhlo bez ohledu na přítomnost CD8+ T-lymfocytů. Toto koreluje s dřívějším pozorováním, že LCMV-indukuje inhibici periferní delece alloreaktivních T-lymfocytů po narušení CD40/CD40L dráhy (Turgeon et al., J. Surg. Res. 93:63 (2000)).

Tyto výsledky ukazují na úlohu LCMV v překonání tolerizačních efektů kombinované bloády kostimulace a podání kostní dřeně. Data ukazují, že je přítomna rychlá rejekce kožních a hematopoetických allotransplantátů po akutní infekci, což brání indukci tolerance specifické pro dárce. Dále, za použití stejné léčby byly provedeny heterotopní allotransplantace srdce za použití stejných podmínek, a opět LCMV inhibovala indukci tolerance specifické pro dárce. Tento efekt nemůže být přisouzen CD8+

nebo CD4+ T-lymfocytům samotným, protože obě subpopulace se zdají být schopny indukovat rychlou CD40/CD28-independentní rejekci transplantátu po akutní infekci. Podle přežívání transplantátu nejsou u infikovaných myši deletovány T-lymfocyty, zatímco u neinfikovaných myši tolerizační režim deletuje subpopulaci T-lymfocytů reaktivní s MMTV superantigenem během 60 dnů.

LCMV infekce nenarušuje již vzniklou toleranci

Je nepravděpodobné, že by oddálená infekce LCMV mohla indukovat rejekci transplantátů kůže nebo kostní dřeně u tolerantních chimérických myši. Pro testování této hypotézy byly myši infikovány LCMV 4-5 týdnů po transplantaci a indukci tolerance. 5/5 myši bylo více než z 20% chimérických v periferní krvi v době infekce. Po infekci se sledovalo přežívání kožních transplantátů a vývoj chimérismu. Jak je vidět na obr. 31, A a B, kožní transplantáty na myších oddáleně infikovaných LCMV přežívaly trvale a hematopoetický chimérismus se vyvíjel normálně, ve srovnání s neinfikovanými kontrolami.

LCMV infekce může generovat T-lymfocytární reakci, která je zkříženě reaktivní s alloantigenem na úrovni TCR, a tato reakce je zásadní pro rejekci transplantátu indukovanou LCMV. Na základě předchozích výsledků ukazujících delecii T-lymfocytů reaktivních s dárce a nemožnost detekovat jejich přítomnost u chimérických tolerantních myši (Wekerle et al., J. Exp. Med. 187:203-7 (1998); Durham et al., J. Immunol., 165:1 (2000)) je možné předpokládat, že alloreaktivní T-lymfocyty, které také rozpoznávají LCMV epitop, budou v den 28 deletovány nebo inaktivovány. Proto je možné předpokládat změnu repertoáru T-lymfocytů

dostupných pro reakci na LCMV u tolerantních myší. Pro testování této možnosti se u tolerantních myší analyzovaly LCMV-specifické imunitní reakce. Selektivní narušení T-lymfocytární reakce na jakýkoliv konkrétní epitop bylo v souladu s TCR zkříženou-reaktivitou.

B6 myši se aplikovaly BALB/c kožní transplantáty a kostní dřeň, společně s bloádou ko-stimulace a busulfanem. Kontrolním myším se aplikoval stejný režim, ale se syngenní kostní dření a kožními transplantáty. V den 28 po transplantaci se myši infikovaly LCMV. O 8 dnů později se získaly splenocyty, ty se restimulovaly po dobu 5 hodin LCMV peptidy za přítomnosti brefeldinu A a barvily se na intracelulární expresi IFN- γ . Testovanými peptidy byly nukleoprotein (NP)396-404, gp33-41, gp276-286, NP205-214 a třídou II restrihovaný peptid gp61-80. Všechny testované epitopy generovaly velké množství Ag-specifických T-lymfocytů ve slezině v den 8 po infekci u zvířat se syngenními transplantáty kůže a kostní dřeně. U myší s allogenními transplantáty byl počet antivirových T-lymfocytů ve slezině 8 den po infekci o něco nižší pro všechny testované epitopy (1,5- až 2-krát), patrně v důsledku migrace APC neexprimujících H-2^b. Nicméně, nebyla detekována žádná významná delece jakéhokoliv konkrétního epitopu, ani žádná zjevná změna v hierarchii epitopů mezi zvířaty se syngenními transplantáty a zvířaty s allogeními transplantáty (viz obr. 32). Tyto výsledky naznačují, že je přítomno mírné snížení antivirové reakce po indukci smíšeného chimérismu, ale neukazují na TCR zkříženou reaktivitu žádného specifického epitopu s alloantigenem.

LCMV-specifické T-lymfocyty se nedělí v reakci na alloantigen.

Pro přímé vyřešení otázky, zda jsou LCMV-specifické CD8 T-lymfocyty také alloreaktivní se použil dříve popsáný model GVHD (Wells et al., J. Clin. Invest. 100:3173 (1997)). T-lymfocyty od LCMV-imunních B6 myší (>30 dnů po infekci) se značily fluorescentním barvivem CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) a injikovaly se i.v. do ozářených (1800 rad) allogenních BALB/c myší. V tomto modelu ztrácení allogenní T-lymfocyty reagující na Ag s každým dělením fluorescenci, což umožňuje kvantifikaci a analýzu rychle se dělících alloreaktivních buněk průtokovou cytometrií. Za použití LCMV-imuních myší jako dárců jsme hodnotili to, zda se LCMV-reaktivní T-lymfocyty také dělí v reakci na alloantigen, za použití přímého barvení D^b/NP396-404, D^b/gp33-41, a K^b/gp34-43 MHC tetramerů třídy I. Splenocyty se odebraly 72 hodin po transferu, barvily se anti-CD8 Ab a tetramery a analyzovaly se průtokovou cytometrií.

CD8-T-lymfocyty od naivních a imuních myší se významně dělily v reakci na alloantigen, a velký počet buněk z obou skupin dosáhl alespoň 8 dělení. Naopak, CD8+ T-lymfocyty od každé skupiny injikované do ozářených syngenních příjemců se nedělily více než 3-krát. Proto se třídily nedělené a maximálně dělené (4-8 dělení) CD8+ T-lymfocyty a analyzovala se vazba tetrameru v každé populaci (obr. 33). LCMV-specifické CD8 T-lymfocyty byly snadno detekovatelné v nedělené populaci u příjemců LCMV-imuních T-lymfocytů pro každý testovaný tetramer. Nicméně, žádné detekovatelné barvení vyšší než pozadí nebylo detekováno pro jakýkoliv tetramer v maximálně dělené populaci (obr. 33). Výsledky jsou shrnuty v tabulce III. Pro kontrolu toho, že nemožnost detekce tetrameru nebyla pouze důsledkem TCR down-modulace ve vysece se dělících buňkách exprese TCR stanovila

barvením. Snížená exprese TCR v dělicích se buňkách nebyla v tomto testu detekována. Dále, v předchozích studiích se zjistilo, že proliferace LCMV specifických CD8 T-lymfocytů v lymfopenických hostitelích nevykazuje sníženou vazbu na MHC tetramery (Murali-Krishna et al., J. Immunol., 165:1733 (2000)).

Ačkoliv tento pokus vylučuje tři základní epitopy jako kandidáty pro alloreaktivitu, určilo se to, zda může být u buněk od imuních myší detekována zkřížená reaktivita po restimulaci celými LCMV a specifickými LCMV peptidy in vitro. Pro dosažení tohoto cíle se myší splenocyty odebraly od BALB/c myší v den 3 způsobem popsáným výše, tyto buňky se restimulovaly po dobu 5 hodin infikovanými nebo neinfikovanými buňkami MC57 a brefeldinem A, permeabilizovaly se a barvily se na intracelulární expresi IFN- γ a analyzovaly se průtokovou cytometrií. Jak je patrné z obr. 34, žádná exprese IFN γ vyšší než pozadí nebyla detekována v nedělicích se CD8 T-lymfocytech stimulovaných infikovanými MC57 buňkami. Reakce na čtyři LCMV epitopy byly potom analyzovány stejným způsobem. V těchto pokusech se místo stimulace infikovanými buňkami získané splenocyty restimulovaly MC57 buňkami pulsovanými LCMV peptidy (NP396-404, gp33-41, gp276-286, NP205-214). Žádný z těchto peptidů neindukoval produkci IFN γ vyšší než pozadí u dělicích se, alloreaktivních CD8 T-lymfocytů. Naopak, LCMV specifické CD8 T-lymfocyty byly snadno detekovatelné v nedělicí se populaci po restimulaci těmito peptidy. Jednou z překážek v tomto pokusu je vysoká základní produkce IFN γ ve značně se dělicích se buňkách, pravděpodobně vzniklá v důsledku cyklování a nízké hladiny stimulace těchto buněk během inkubace s brefeldinem A.

Tabulka 3: LCMV-specifické T-lymfocyty se nedělí v reakci na alloantigen

Tetramer	LCMV imunní dárci	
	0-1 div.	4-8 div.
D ^b /NP396-404	1.83 ± .046%	.13 ± .074%
D ^b /GP33-41	1.59 ± .088%	.15 ± .135%
K ^b /GP34-43	1.73 ± .250%	.26 ± .094%

2x10⁷ CFSE značených T-lymfocytů od LCMV imuních (>30 dnů po infekci) B6 myši se injekčně i.v. podalo ozářeným (1800 rad) Balb/c myším. Splenocyty od těchto myši se odebíraly o 72 hodin později a analyzovaly se trojbarevnou průtokovou cytometrií na expresi CD8, CFSE fluorescenci a vazbu na MHC tetramer. Čísla ukazují procento CD8+ T-lymfocytů v uvedených dělicích se populacích, které váže MHC tetramer. Uvedené chyby představují standardních odchylky od průměru (n=3).

LCMV usnadňuje CD28/CD40-nezávislou tvorbu alloreaktivních buněk produkujících IFN γ

Pro lepší charakterizování allogenní a antivirové T-lymfocytární reakce po LCMV infekci se splenocyty monitorovaly na svou schopnost produkovat IFN γ po restimulaci in vitro za použití ELISPOT testu. V tomto pokusu se u C3H/HeJ myši s BALB/c kožními transplantáty tvořilo ve slezině 3–4x10⁵ allospecifických T-lymfocytů v den 8 po transplantaci a tento počet buněk mírně poklesl v den 15. Aplikace blokády kostimulace zcela zrušila allogenní reakci v těchto časech. U myši s aplikovanými kožními transplantáty a blokádou kostimulace současně s akutní infekcí LCMV se tvořilo malé množství (9x10⁴ allospecifických

buněk ve slezině v den 8. V den 15 překonaly tyto myši imunosupresivní účinek blokády kostimulace a generovaly alloreakci srovnatelnou s neošetřenými kontrolami ($2,5 \times 10^5$). Jak bylo popsáno dříve, vede akutní LCMV infekce za absence kožních transplantátů ke generování nějakých allospecifických buněk produkujících IFN γ v den 8 (3×10^5). V den 15 se tento efekt znatelně snížil na 4×10^4 buněk produkujících IFN γ na slezinu (Obr. 35).

Pro měření LCMV-specifické reakce se splenocyty z každé skupiny inkubovaly s infikovanými L929 buňkami přes noc na ELISPOT plotně. Jak se předpokládalo, infekce LCMV samotná indukovala silnou antivirovou reakci, generující ve slezině $1,2 \times 10^7$ T-lymfocytů produkujících IFN γ , zatímco myši, kterým byla aplikována kombinace blokády a BALB/c kožních transplantátů produkovaly sice významnou reakci, ale tato reakce byla 3xkrát nižší v počtu LCMV-specifických buněk ve slezině (4×10^6). V den 15 vykazovaly sleziny od LCMV-infikovaných myši 3- až 4-násobné snížení počtu LCMV-specifických buněk. U myši s kombinovanou blokádou byl pokles o něco větší (obr. 35).

Pro generování toho, zda vzniká u myši infikovaných LCMV paměť na alloantigen se B6 myši infikovaly a počet allospecifických buněk ve slezině se kvantifikoval v době vrcholu infekce (den 8) a po vzniku imunitní paměti (30 dnů po infekci) za použití IFN- γ ELISPOT. LCMV-infikované myši generovaly allospecifické T-lymfocyty ($7,29 \times 10^5$ $1,78 \times 10^5$, $n = 3$) v době vrcholu infekce, ale v den 30 po infekci počet těchto buněk ve slezině poklesl 50- až 100-krát ($1 \times 10^4 \pm 9,9 \times 10^2$, $n=3$). Naopak, počet T-lymfocytů specifických pro několik známých imunodominantních a subdominantních LCMV epitopů (NP396-404, gp33-41, gp276-286, NP205-214) poklesl

ve slezině za stejnou dobu 10- až 12-násobně ($1,52 \times 10^7$ $1,13 \times 10^6$ až $1,40 \times 10^6$ $1,38 \times 10^5$, $n=3$ pro obě skupiny). Tato úroveň LCMV paměti je podobná jako v předchozích zprávách (Murali-Krishna et al., Immunity 8:177 (1998)).

Tyto výsledky demonstrují, že LCMV infekce stimuluje aktivaci alespoň subpopulace allogenních T-lymfocytů CD40/CD28-independentními mechanismy, které překonávají imunosupresivní efekty blokády kostimulace a vedou k časně rejekci transplantátu. Podle výsledků CFSE a ELISPOT je pravděpodobné, že frekvence virus-specifických T-lymfocytů majících také TCR specificitu k alloantigenu je nízká.

LCMV infekce indukuje CD28/CD40-independentní maturaci dendritických buněk ve slezině

Zkoumaly se další možné mechanismy, kterými může LCMV infekce rušit toleranci k transplantátu a stimulovat aktivaci alloreaktivních T-lymfocytů. Dřívější pokusy studující delecí V subpopulací zjistily, že za přítomnosti LCMV infekce nejsou CTLA4-Ig a anti-CD40L schopné iniciovat delecí alloreaktivních T-lymfocytů. LCMV infekce může být schopná ovlivňovat indukci a/nebo aktivaci kostimulačních drah pro T-lymfocyty prostřednictvím APC. Dále, LCMV může indukovat expresi molekul nebo faktorů ovlivňujících přežívání, které brání delecí alloreaktivních T-lymfocytů. Pro testování této hypotézy se analyzovaly efekty LCMV infekce na expresi kostimulačních molekul a MHC v CD11c⁺ dendritických buňkách sleziny.

Myším se aplikovaly BALB/c kožní transplantáty a kostní dřeň, blokáda ko-stimulace a busulfan. Jedna skupina se infikovala LCMV Armstrong v den 0, zatímco další se

neinfikovala. Splenocyty se odebraly v den 6 a separovaly se podle buněčné density na Optiprep koloně (Nycomed) způsobem popsáným dříve (Ruedl et al., Eur. J. Immunol. 26:1801 (1996)). Frakce s nízkou hustotou, bohatá na dendritické buňky, se odebrala a barvila se na CD11c expresi, společně s barvením na MHC třídy I a II, ICAM-1, CD40, CD80 a CD86. Po analýze průtokovou cytometrií se analyzovala exprese těchto molekul na CD11c⁺ buňkách. Jak je patrné z obr. 36, vedla infekce LCMV ke zvýšené expresi všech těchto molekul, bez ohledu na přítomnost blokády kostimulace. Tak indukuje LCMV infekce vyšší aktivaci dendritických buněk. Nepříznivé efekty LCMV infekce na indukci tolerance mohou být způsobeny vyšší schopností APC stimulovat a aktivovat alloreaktivní T-lymfocyty.

Tento příklad ukazuje, že LCMV infekce způsobuje rychlou rejekci allotransplantátu po kombinované terapii CTLA4-Ig a anti-CD40L. Tento efekt může být rozšířen na model indukce robustní tolerance, protože LCMV infekce narušuje jak trvalé přežívání kožního allotransplantátu, tak smíšený hematopoetický chimérismus po podání kostní dřeně od dárce, busulfanu, CTLA-Ig a anti-CD40L. Ačkoliv je tento efekt o něco pomalejší v absenci CD8 T-lymfocytů, probíhá bez detekovatelné exprese CD8 v krvi a deplece CD4 T-lymfocytů má malý nebo žádný vliv na přežívání štěpu. Rejekce allotransplantátu indukovaná LCMV koreluje se selháním deplece CD4 T-lymfocytů reaktivních s dárce, jak je měřeno podle sledování subpopulace T-lymfocytů reaktivních se superantigenem V. Infekce musí proběhnout v během nebo blízko transplantace, protože opoždění infekce o 3-4 týdny nemá žádný vliv na přežívání transplantátu nebo indukci smíšeného chimérismu. Tyto pokusy potvrzují dřívější práce ukazující na LCMV-zprostředkované narušení přežívání kožních

transplantátů po podání dárcovských splenocytů a anti-CD40L (Welsh et al., J. Virol., 74:22 10 (2000)), a rozšiřují je o zjištění, že LCMV-indukovaná rejekce transplantátu není zprostředkovaná CD40-independentní up-regulací B7.1 nebo B7.2. Jednou z obav doprovázejících použití strategií indukce tolerance je možnost indukce tolerance k současné virové infekci. Je velmi zajímavé, že imunitní reakce na LCMV se nestanou tolerantními po použití režimu spočívajícím v bloádě kostimulace a toto je v souladu s dřívějšími pozorováními, že LCMV T-lymfocytární reakce jsou značně nezávislé na CD28 a CD40 (Whitmire et al., J. Virol. 70:8375 (1996); Andreassen et al., J. Immunol., 164:3689 (2000); Shahinian et al., Science 261:609 (1993)).

Jedním možným vysvětlením škodlivých účinků LCMV infekce na přežívání transplantátů je přítomnost zkřížené reaktivity k alloantigenu na úrovni TCR/MHC rozpoznávání během antivirové reakce (Welsh et al., J. Virol., 74:2210 (2000)). V tomto scénáři antivirové reakce zahrnují také některé buňky, které jsou specifické pro alloantigen. Na podporu této hypotézy bylo prokázáno, že LCMV indukuje H-2^d-specifické CD8 T-lymfocyty v době vrcholu T-lymfocytární reakce (Yang et al., J. Immunol, 136:1186 (1986)). Ačkoliv výše uvedený příklad poskytuje podobné výsledky, existuje málo důkazů pro významnou zkříženou reaktivitu LCMV-specifických CD8 T-lymfocytů generovaných in vivo s H-2^d alloantigenem. Opožděná primární infekce (4 týdny po transplantaci) vyvolává antivirovou reakci s nezměněnou hierarchií epitopů, ačkoliv počet aktivovaných CD8 T-lymfocytů je celkově o něco nižší. Dále, za použití citlivého single cell testu využívajícího intracelulárního barvení na cytokiny a MHC tetramery nebylo dělení LCMV-imuních CD8 T-lymfocytů v reakci na alloantigen

detekováno. Nicméně, jak bylo popsáno dříve, LCMV primární infekce negeneruje alloreaktivní buňky. Počet těchto buněk významně klesá v den 15 po infekci a jsou stěží detekovatelné u LCMV-imunních myší (>30 dnů po infekci). Tyto pokusy naznačují, že frekvence LCMV-specifických CD8 T-lymfocytů, které jsou zkříženě reaktivní s alloantigenem, je nízká a že mohou být přítomny zkříženě reaktivní CD4 T-lymfocyty.

Primární mechanismus, kterým jsou alloreaktivní T-lymfocyty aktivovány během LCMV infekce, zůstává neznámý. V posledních letech pokusy ukázaly, že velká většina aktivovaných CD8 T-lymfocytů generovaných během antivirové reakce jsou Ag-specifické (Murali-Krishna et al., *Immunity* 8:177 (1998); Butz et al., *Immunity* 8:167 (1998); Zarozinski et al., *J. Exp. Med.* 185:1629 (1997)). Za dané vysoké frekvence alloreaktivních CD8 T-lymfocytů u naivních myší může existovat významná zkřížená reaktivita na úrovni TCR/MHC interakce. Nebyli jsme však schopni detekovat významné hladiny allospecifické aktivace CFSE značených LCMV specifických CD8 T-lymfocytů po injekci ozářeným BALB/c dárčům. Dále, LCMV-indukované alloreaktivní buňky se nechovají jako jiné virus-specifické populace, protože mají přehnanou death fázi po vrcholu reakce. Jak CD4, tak CD8 T-lymfocytární subpopulace samotné jsou schopné zabránit indukci tolerance a vzniku smíšeného chimérismu. Zajímavé je, že narušení kostimulačních drah během LCMV infekce má malý vliv na CD8⁺ T-lymfocytární reakce, ale blokuje tvorbu CD4⁺ antivirových T-lymfocytů (Whitmire et al., *J. Immunol.*, 163:3194 (1999)). Nicméně, CD4⁺ T-lymfocyty jsou dostačující pro zprostředkování LCMV-indukované prevence indukce tolerance k alloantigenu. Ačkoliv zkřížená reaktivita k alloantigenu na nějaké úrovni patrně existuje, naznačují

tato data, že tato reaktivita je málo častá během LCMV infekce. Je zajímavé, že LCMV reakce jsou u myši s aplikovaným režimem indukce tolerance nižší. Toto může být způsobeno nespecifickými imunosupresivními efekty allogenní kostní dřeně a blokády kostimulace. Alternativně, vstup H-2d⁺ dárcovských APC do imunitního systému může naředit dostupný Ag pro stimulování H-2^b-restrihované reakce. Jsou nutné další pokusy pro hodnocení dlouhodobých efektů indukce tolerance na imunitní reakce k jiným patogenům.

Bez ohledu na rozsah, ve kterém jsou během primární LCMV infekce generovány prostřednictvím TCR zkřížené reaktivity alloreaktivní buňky, mají další mechanismy významnou roli v LCMV-zprostředkovaném překonání CD28/CD40 drah. Například, MCMV a VV oba generují allogenní reakce během primární infekce (Yang et al., J. Immunol., 142:1710 (1989)), i když bylo zatím prokázáno, že infekce těmito viry nenarušuje přežívání transplantátu (Welsh et al., J. Virol. 74:2210 (2000)). Bylo prokázáno, že primární CD8⁺ anti-LCMV reakce samotná je značně nezávislá na CD28 a CD40 dráhách (Whitmire et al., J. Virol., 70:8375 (1996); Andreassen et al., J. Immunol., 164:3689 (2000); Shahinian et al., Science 261:609 (1993)). Zajímavé je, že nedávný pokus prokázal, že LCMV-specifické reakce, ale ne reakce namířené proti VV, mohou být řízeny parenchymovými buňkami (Lenz et al., J. Exp. Med. 192:1135 (2000)). Toto naznačuje, že LCMV, ale ne VV, může snižovat práh nutný pro plnou aktivaci efektorových buněk. Jednou možností je to, že LCMV spouští specifické vrozené imunitní mechanismy, které umožňují obejítí těchto drah při generování T-lymfocytární reakce. Dále, anti-LCMV reakce mohou dodávat cytokiny a růstové faktory, které napomáhají generování CD40/CD28-independentní kostimulačních drah. Pro podporu této poslední uvedené možnosti výše

uvedený příklad ukazuje, že LCMV infekce zprostředkuje CD28/CD40-independentní zvýšení exprese MHC a kostimulačních molekul na dendritických buňkách. Tak může infekce LCMV usnadňovat aktivaci alloreaktivních buněk v případě blokády kostimulace cestou zvýšení exprese alternativních kostimulačních molekul na povrchu APC. V tomto modelu může být potřeba kostimulace a aktivace dendritických buněk prostřednictvím CD28 nebo CD40 drah vyrušena infekcí LCMV.

Odborníkům v oboru bude jasné, že předkládaný vynález má i jiná provedení, než jsou provedení popsaná výše, která se neodchylují od myšlenky či základních charakteristik předkládaného vynálezu. Konkrétní provedení vynálezu popsaná výše jsou proto pouze ilustrativní a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu, který je vymezen pouze připojenými patentovými nároky.

Seznam sekvencí

- <110> Emory University
Larsen, Christian P
Pearson, Thomas C
Waller, Edmund K
Adams, Andrew B
- <120> Způsoby pro indukci tolerance k transplantovaným orgánům a pro korekci hemoglobinopatií
- <130> D0136PCT/30436.58WO1
- <140> není známo
- <141> 2002-01-25
- <150> 60/264,528
- <151> 2001-01-26
- <150> 60/303,142
- <151> 2001-07-05
- <160> 20
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1152
- <212> DNA
- <213> Artificiální sekvence
- <220>
- <223> : Popis artificiální sekvence: L104EIG
: sekvence
- <400> 1
- | | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atgggtgtac | tgctcacaca | gaggacgctg | ctcagtctgg | tccttgcaact | cctgtttcca | 60 |
| agcatggcga | gcatggcaat | gcacgtggcc | cagcctgctg | tggtactggc | cagcagccga | 120 |
| ggcatcgcta | gctttgtgtg | tgagtatgca | tctccaggca | aagccactga | ggtccgggtg | 180 |
| acagtgcctc | ggcaggctga | cagccagggtg | actgaagtct | gtgcggcaac | ctacatgatg | 240 |
| gggaatgagt | tgaccttctc | agatgattcc | atctgcacgg | gcacctccag | tggaaatcaa | 300 |
| gtgaacctca | ctatccaagg | actgagggcc | atggacacgg | gactctacat | ctgcaagggtg | 360 |
| gagctcatgt | acccacggcc | atactacgag | ggcataggca | acggaacca | gatttatgta | 420 |
| attgatccag | aaccgtgccc | agattctgat | caggagccca | aatcttctga | caaaactcac | 480 |
| acatccccac | cgtccccagc | acctgaactc | ctggggggat | cgtcagtctt | cctcttcccc | 540 |
| ccaaaaccca | aggacaccct | catgatctcc | cggacccttg | aggtcacatg | cgtgggtggtg | 600 |
| gacgtgagcc | acgaagaccc | tgaggtcaag | ttcaactggg | acgtggacgg | cgtggaggtg | 660 |
| cataatgcca | agacaaagcc | gcgggaggag | cagtacaaca | gcacgtaccg | tgtggtcagc | 720 |
| gtcctcaccg | tcttgcacca | ggactggctg | aatggcaagg | agtacaagtg | caaggtctcc | 780 |
| aacaaagccc | tcccagcccc | catcgagaaa | accatctcca | aagccaaagg | gcagcccccga | 840 |
| gaaccacagg | tgtacaccct | gccccatcc | cgggatgagc | tgaccaagaa | ccaggtcagc | 900 |
| ctgacctgcc | tggtcaaagg | cttctatccc | agcgacatcg | ccgtggagtg | ggagagcaat | 960 |
| gggcagccgg | agaacaacta | caagaccacg | cctcccgtgc | tggactccga | cggctccttc | 1020 |
| ttcctctaca | gcaagctcac | cgtggacaag | agcagggtggc | agcaggggaa | cgtcttctca | 1080 |
| tgctccgtga | tgcatgaggc | tctgcacaac | cactacacgc | agaagagcct | ctccctgtct | 1140 |
| ccgggtaaat | ga | | | | | 1152 |

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Artificiální sekvence

<220>
 <223> Popis artificioální sekvence: L104EIg
 sekvence

<400> 2
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30
 Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45
 Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60
 Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80
 Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95
 Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110
 Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125
 Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160
 Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

245 250 255
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 3

<211> 1152

<212> DNA

<213> Artificiální sekvence

<220>

<223> Popis artificiální sekvence: L104EA29YIg
sekvence

<400> 3

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctccagtctgg tcccttgcact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactaggc cagcagccga 120
 ggcacgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180
 acagtgttc gccaggctga cagccagggt actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
 gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
 gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaacca gatttatgta 420
 attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
 acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540
 ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacctctg aggtcacatg cgtgggtggtg 600
 gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggtg 660
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
 gtcttcaccg tcttgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggctccttc 1020
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
 ccgggtaaat ga 1152

08.12.03

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 5

<211> 1152

<212> DNA

<213> Artificiální sekvence

<220>

<223> Popis artificiální sekvence: L104EA29Lig
 sekvence

<400> 5

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcaagtctgg tccttgcaact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtaactggc cagcagccga 120
 ggcategcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aattgactga ggtccgggtg 180
 acagtgtctc ggcaggctga cagccagggt actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcaagg gcacctccag tggaaatcaa 300
 gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
 gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420
 attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
 acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540
 ccaaaaccca aggacacctt catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600
 gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggtg 660
 cataatgcca agacaaagcc gcgaggaggc cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
 gtctctacag tcttgacca ggaactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
 gaaccacagg tgtacacctt gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020
 ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaata ga

1152

<210> 6

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificiální sekvence

<220>

<223> 1 Popis artificiální sekvence: L104EA29LIg
sekvence

<400> 6

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Leu Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Tyr
115 120 125Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacaacgc agaagagcct ctcctgtct 1140
 ccgggtaa at ga 1152

<210> 10

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificiální sekvence

<220>

<223> Popis artificiální sekvence: L104EA29WIG
 sekvence

<400> 10

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Trp Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220

08.12.03

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 11
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 atgggtgtac tgctcacaca gaggacgtg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtactggc cagcagccga 120
 ggcacgcga gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
 acagtgcctc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
 gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
 gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca acggaacca gatttatgta 420
 attgatccag aaccgtgccc agattctgac ttctcctct ggatccttgc agcagttagt 480
 tcgggggtgtg ttttttatag ctttctctc acagctgttt ctttgagcaa aatgctaaag 540
 aaaagaagcc ctcttacaac aggggtctat gtgaaaatgc cccaacaga gccagaatgt 600
 gaaaagcaat ttcagoccta ttttattccc atcaat 636

<210> 12
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala

```
<210> 13
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificiální sekvence
```

```
<400> 13
atgggtgtac  tgctcacaca  gaggacgctg  ctcagtcctg  tccttgcact  cctgtttcca  60
agcatggcga  gcatggcaat  gcacgtggcc  cagcctgctg  tggtagtggc  cagcagccga  120
ggcatcgcta  gctttgtgtg  tgagtatgca  tctccaggca  aagccactga  ggtccgggtg  180
acagtgcctc  ggcaggtctg  cagcaggtg  actgaagctc  gtgcggcaac  ctacatgatg  240
gggaatgagt  tgacctctct  agatgattcc  atctgcacgg  gcacctccag  tggaaatcaa  300
```

```

gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataaggca acggaaccca gatttatgta 420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagtctt cctcttcccc 540
ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg 600
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 720
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
gaaccacagg tgtacacct gcccccattc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
tgctcctgta tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
ccgggtaaat ga 1152

```

<210> 14

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificiální sekvence

<220>

<223> Popis artificiální sekvence: CTLA4Ig
sekvence

<400> 14

```

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
  1              5              10              15
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
      20              25              30
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
      35              40              45
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
      50              55              60
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
      65              70              75              80
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
      85              90              95
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
      100              105              110
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
      115              120              125
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
      130              135              140
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
      145              150              155              160

```

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 1 5

<210> 16
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificiální sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primerová
sekvence kódující fúzní protein onkostatin M-CTLA4

<400> 16

ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc 60
cagcc 65

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Umělé sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primerová
sekvence kódující CTLA4 sekvenci

<400> 17

tttgggctcc tgatcagaat ctgggcacgg ttg 33

<210> 18

<211> 72

<212> DNA

<213> Umělé sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primerová
sekvence kódující sekvenci signálního peptidu onkostatinu M

<400> 18

ctagccactg aagcttcacc aatgggtgta ctgctcacac agaggacgct gtcagtctg 60
gtccttgcaac tc 72

<210> 19

<211> 41

<212> DNA

<213> Umělé sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primerová
sekvence z vektorové sekvence

<400> 19

gaggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

<213> Umělé sekvence

<220>

<223> Popis umělého sekvence: primerová
sekvence kódující CTLA4 sekvenci

<400> 20

gtggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc

. 42

11.05.04

TV 2003-1994

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Použití alkylačního činidla pro výrobu léčiva pro navození smíšeného hematopoetického chimérismu u jedince, kde navození smíšeného hematopoetického chimérismu zahrnuje podávání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci.
2. Použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro navození hematopoetického chimérismu u jedince, kde navození smíšeného hematopoetického chimérismu zahrnuje podání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci.
3. Použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro léčení hemoglobinopatie u jedince, kde léčení hemoglobinopatie zahrnuje podání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci.
4. Použití podle nároku 3, kde hemoglobinopatií je beta-thalassemie.
5. Použití podle nároku 3, kde hemoglobinopatií je srpkovitá anemie.
6. Použití alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty pro výrobu léčiva pro inhibici nebo snížení rejekcí transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu u jedince, kde inhibice nebo snížení rejekcí transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu zahrnuje podání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů jedinci.

7. Použití podle nároku 6, kde transplantátem solidního orgánu nebo tkáňovým/buněčným transplantátem je kožní transplantát.
8. Použití podle některého z předcházejících nároků, kde alkylační činidlo je podáváno před, během nebo po podání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů.
9. Použití podle některého z nároků 6 až 8, kde alkylační činidlo je podáváno jeden den před umístěním transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu.
10. Použití podle některého z nároků 6 až 8, kde alkylační činidlo je podáváno 12 hodin před umístěním transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu.
11. Použití podle některého z nároků 6 až 8, kde alkylační činidlo je podáváno 6 hodin před umístěním transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu.
12. Použití podle některého z nároků 6 až 8, kde alkylační činidlo je podáváno následně po umístění transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu.
13. Použití podle některého z nároků 6 až 12, kde buňky kostní dřeně zbavené T-lymfocytů jsou podávány v podstatě současně s umístěním transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu.
14. Použití podle některého z předcházejících nároků, kde podávání buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů zahrnuje první dávku a druhou dávku.

15. Použití podle některého z předcházejících nároků, kde podávání alkylačního činidla a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty je prováděno současně nebo odděleně.

16. Použití podle některého z nároků 6 až 15, kde první dávka buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty je prováděno přibližně současně s umístěním transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu.

17. Použití podle některého z předcházejících nároků, kde alkylační činidlo je podáváno následně po podání první dávky buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty.

18. Použití podle některého z předcházejících nároků, kde podávání imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty, zahrnuje alespoň dvě dávky.

19. Použití podle některého z nároků 6 až 18, které zahrnuje

- a) podání první dávky buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů a imunosupresivního přípravku, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty;
- b) umístění transplantátu solidního orgánu nebo tkáňového/buněčného transplantátu;
- c) podávání alkylačního činidla; a
- d) podávání druhé dávky buněk kostní dřeně zbavených T-lymfocytů a imunosupresivního činidla, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty.

20. Použití podle některého z předcházejících nároků, kde alkylačním činidlem je busulfan.

21. Použití podle některého z předcházejících nároků, kde imunosupresivní přípravek, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty se použije v kombinaci s doplňkovým imunosupresivním přípravkem.

22. Použití podle nároku 21, kde doplňkovým imunosupresivním přípravkem je přípravek, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty.

23. Použití podle některého z předcházejících nároků, kde imunosupresivním přípravkem, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty, je ligand, který interferuje s vazbou CD28 na B7 antigen.

24. Použití podle nároku 23, kde ligandem, který interferuje s vazbou CD28 na B7 antigen, je ligand pro B7 antigen.

25. Použití podle nároku 24, kde ligand pro B7 antigen je vybrán ze souboru sestávajícího z rozpustné formy CTLA4 molekuly, rozpustné formy CD28 molekuly, anti-B7 mAbs a jejich fragmentů.

26. Použití podle nároku 25, kde rozpustná forma CTLA4 molekuly zahrnuje extracelulární doménu CTLA4, která váže B7 antigen.

27. Použití podle nároku 26, kde extracelulární doména CTLA4 obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která začíná methioninem v pozici +1 a končí kyselinou asparagovou v pozici +124, jak

je znázorněno na obr. 20, nebo začíná alaninem v pozici -1 a končí kyselinou asparagovou v pozici +124, jak je znázorněno na obr. 20.

28. Použití podle nároku 25, kde rozpustnou CTLA4 molekulou je rozpustná CTLA4 mutantní molekula.

29. Použití podle nároku 28, kde rozpustná CTLA4 mutantní molekula zahrnuje mutantní extracelulární doménu CTLA4, která váže B7 antigen.

30. Použití podle nároku 29, kde mutantní extracelulární doména CTLA4 obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která začíná methioninem v pozici +1 a končí kyselinou asparagovou v pozici +124, jak je znázorněno na obr. 14, nebo začíná alaninem v pozici -1 a končí kyselinou asparagovou v pozici +124, jak je znázorněno na obr. 14.

31. Použití podle nároku 29, kde mutantní extracelulární doména CTLA4 obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která začíná methioninem v pozici +1 a končí kyselinou asparagovou v pozici +124, jak je znázorněno na obr. 15, nebo začíná alaninem v pozici -1 a končí kyselinou asparagovou v pozici +124, jak je znázorněno na obr. 15.

32. Použití podle některého z nároků 26 až 31, kde molekulou je fúzní protein, ve kterém extracelulární doména je navázána na non-CTLA část.

33. Použití podle nároku 32, kde non-CTLA část zahrnuje imunoglobulinovou skupinu.

34. Použití podle nároku 33, kde imunoglobulinovou skupinou

je imunoglobulinový konstantní region nebo jeho část.

35. Použití podle nároku 34, kde imunoglobulinový konstantní region nebo jeho část obsahuje jeden nebo více mutantů pro snižování efektorových funkcí.

36. Použití podle nároku 34 nebo 36, kde imunoglobulinový konstantní region zahrnuje pantový region, CH2 a CH3 region molekuly imunoglobulinu.

37. Použití podle některého z nároků 34 až 36, kde imunoglobulinovým konstantním regionem nebo jeho částí je konstantní region imunoglobulinu člověka nebo opice.

38. Použití podle nároku 32, kde fúzním proteinem je CTLA4Ig obsahující aminokyselinovou sekvenci, která začíná methioninem v pozici +1 a končí lysinem v pozici +357, jak je znázorněno na obr. 20, nebo začíná alaninem v pozici -1 a končí lysinem v pozici +357, jak je znázorněno na obr. 20.

39. Použití podle nároku 32, kde fúzním proteinem je L104EIg obsahující aminokyselinovou sekvenci, která začíná methioninem v pozici +1 a končí lysinem v pozici +357, jak je znázorněno na obr. 14, nebo začíná alaninem v pozici -1 a končí lysinem v pozici +357, jak je znázorněno na obr. 14.

40. Použití podle nároku 32, kde fúzním proteinem je L104EA29YIg obsahující aminokyselinovou sekvenci, která začíná methioninem v pozici +1 a končí lysinem v pozici +357, jak je znázorněno na obr. 15, nebo začíná alaninem v pozici -1 a končí lysinem v pozici +357, jak je znázorněno na obr. 15.

41. Použití podle nároku 22, kde doplňkovým imunosupresivním přípravkem, který blokuje kostimulační signály pro T-lymfocyty, je ligand, který interferuje s vazbou CD154 na CD40.

42. Použití podle nároku 41, kde ligandem, který interferuje s vazbou CD154 na CD40, je ligand pro CD154.

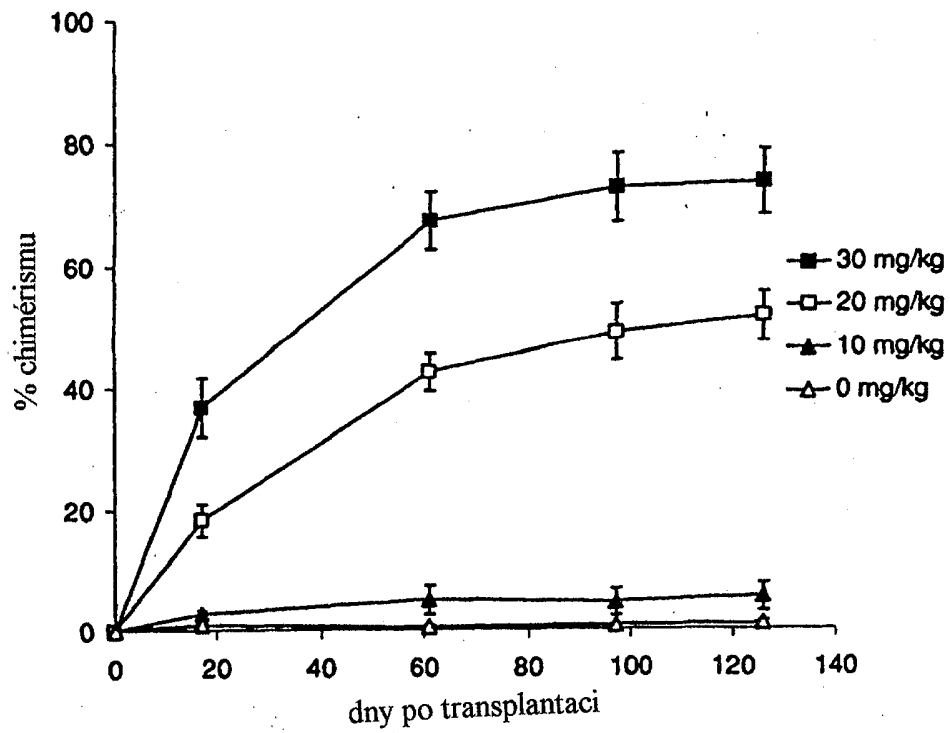
43. Použití podle nároku 42, kde ligand pro CD154 je vybrán ze souboru sestávajícího z rozpustné formy CD40 molekuly, anti-CD154 mAbs a jejich fragmentů.

44. Použití podle nároku 43, kde anti-CD154 je vybrán ze souboru sestávajícího z MR1, ATCC HB 11809, ATCC HB 11815, ATCC HB 11816, ATCC HB 11817, ATCC HB 11819, ATCC HB 11821, ATCC HB 11822, ATCC HB 11808 a ATCC HB 11823.

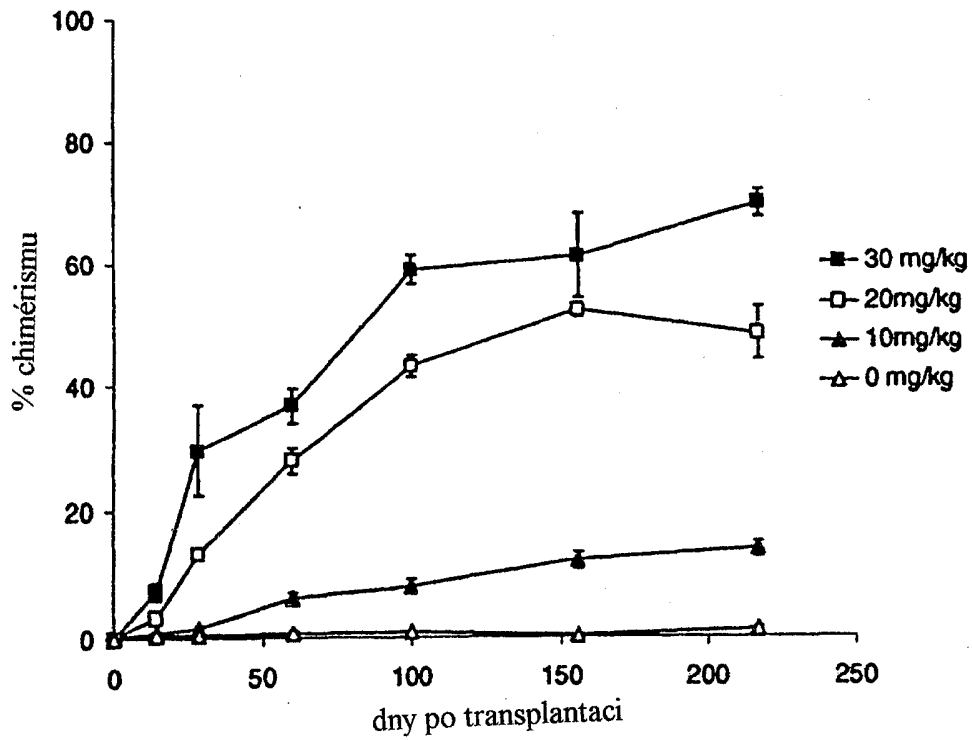
45. Použití podle nároku 41, kde ligandem, který interferuje s vazbou CD154 na CD40, je ligand pro CD40.

46. Použití podle nároku 45, kde ligand pro CD40 je vybrán ze souboru sestávajícího z rozpustné formy CD154 molekuly, anti-CD40 mAbs a jejich fragmentů.

1/39

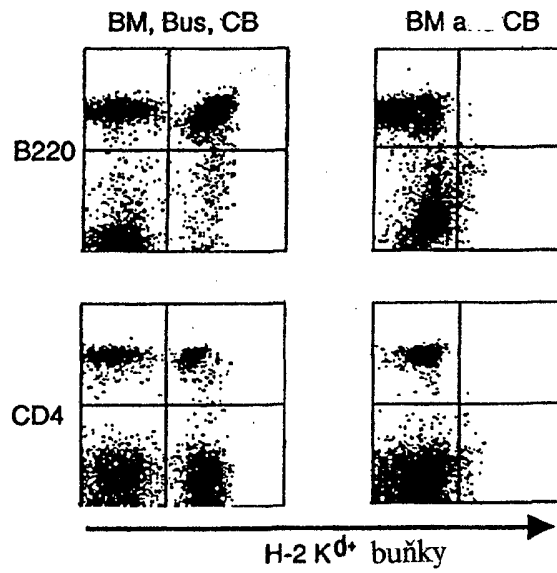


Obr. 1A

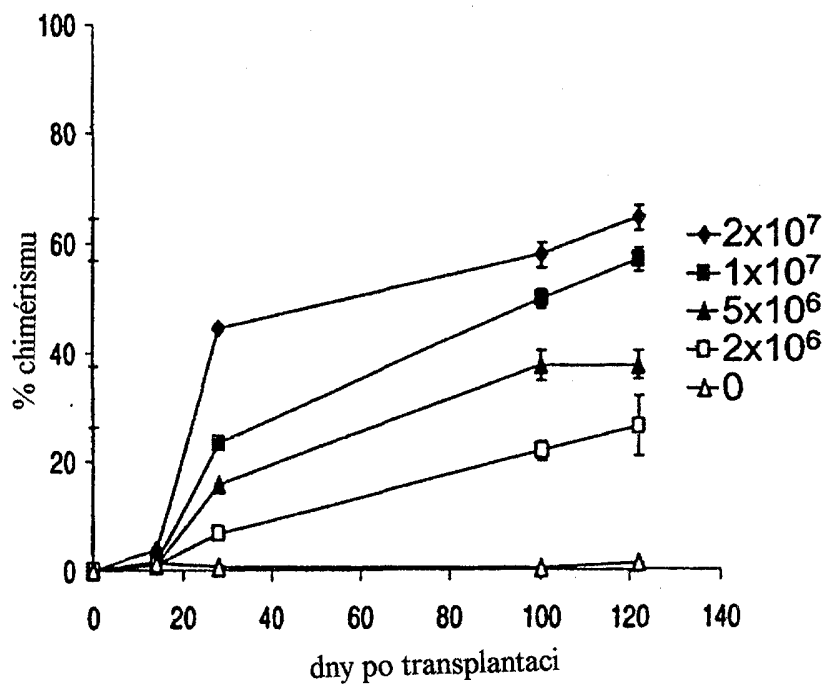


Obr. 1B

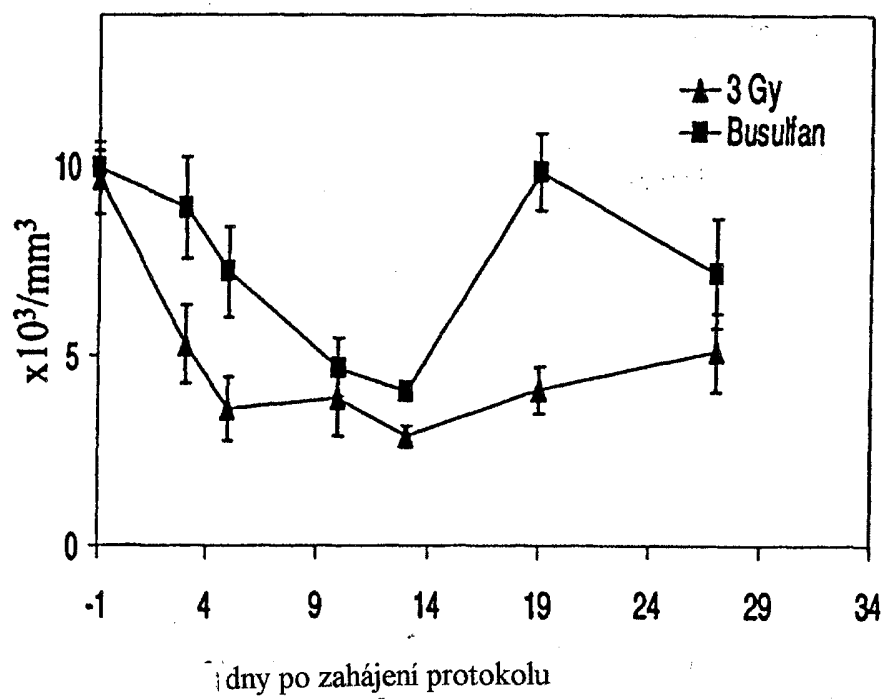
2/39



Obr. 1C

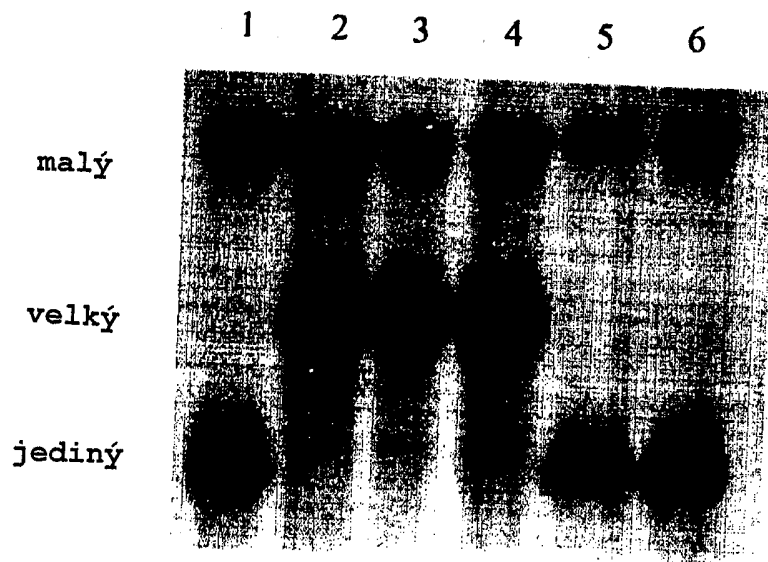


Obr. 1D

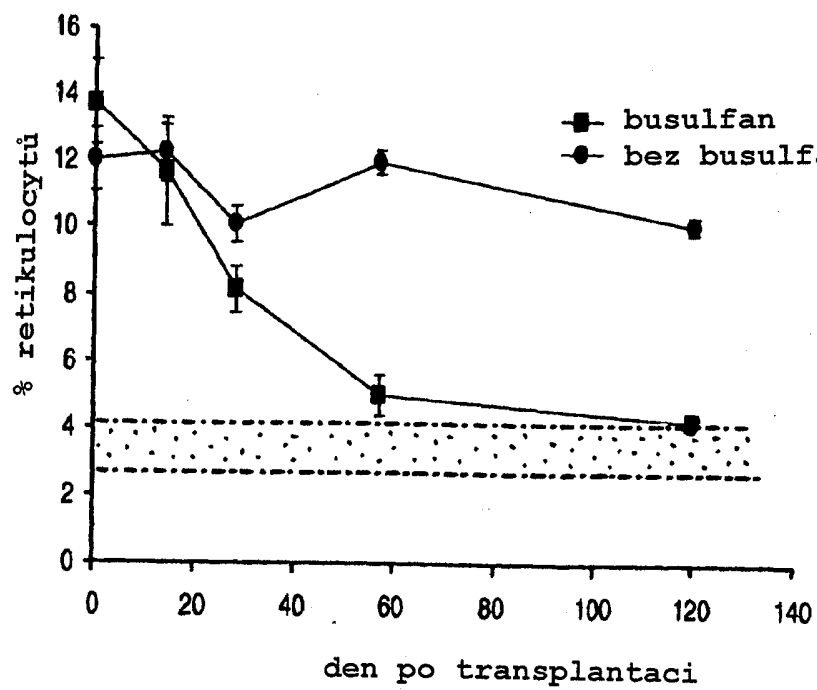


Obr. 2

4/39

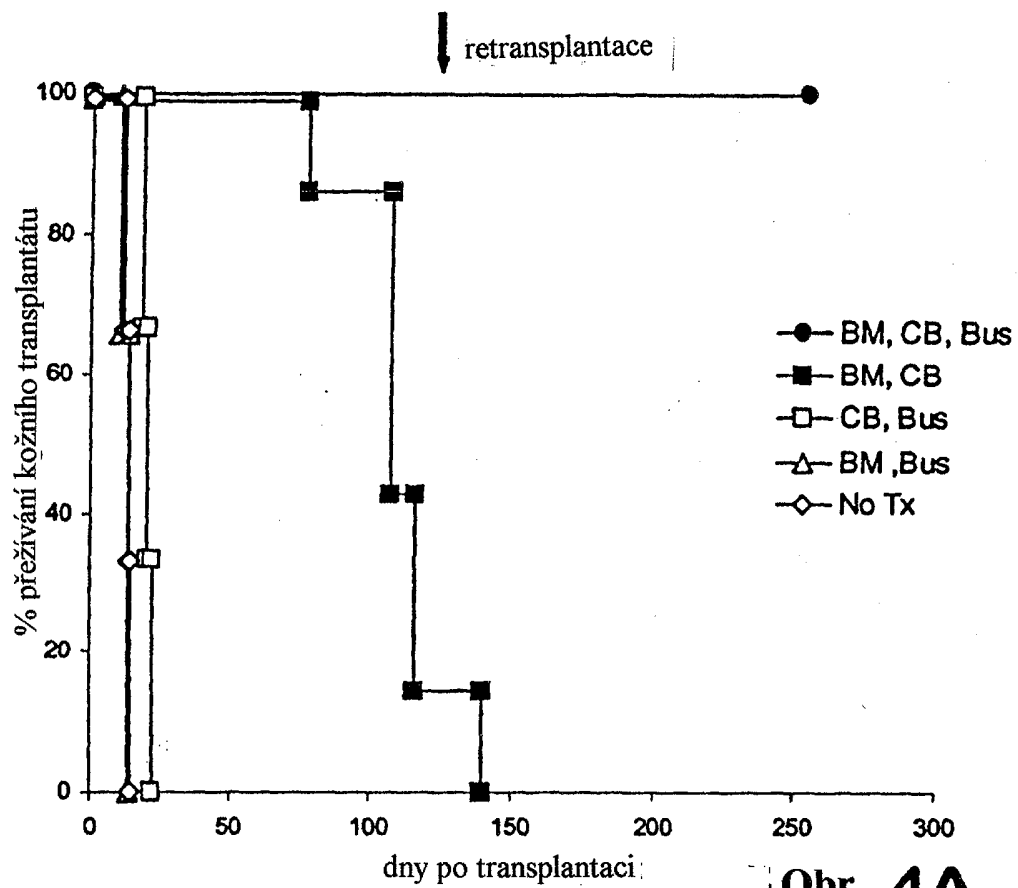


Obr. 3A

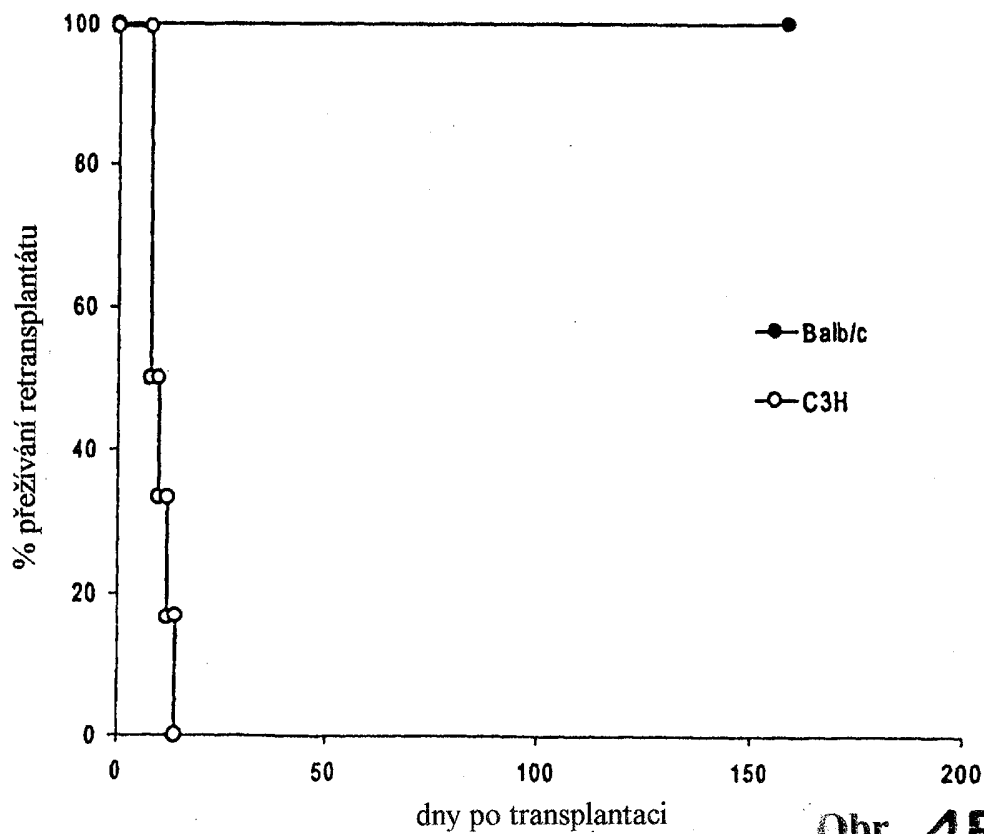


Obr. 3B

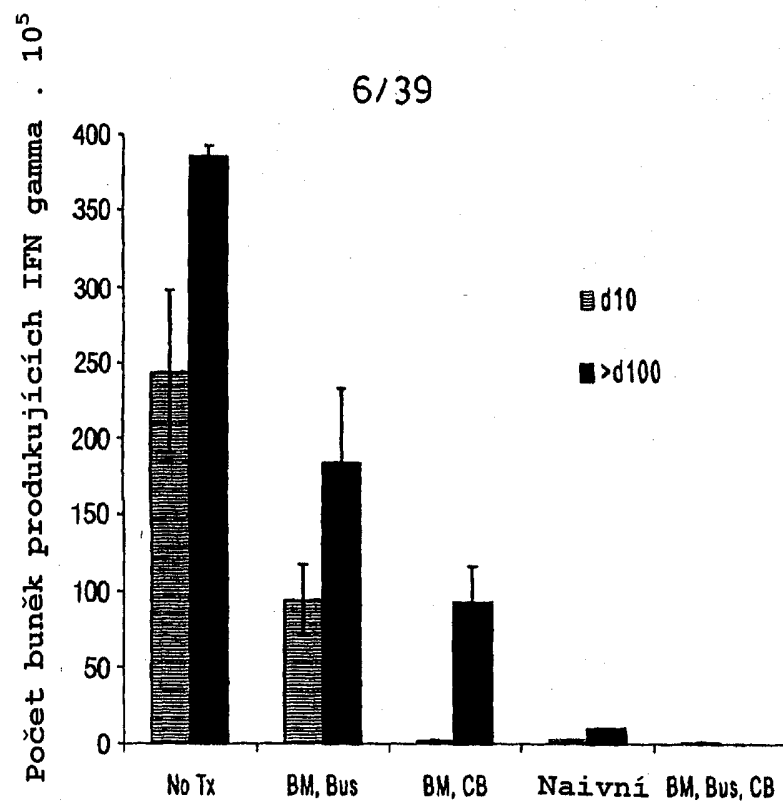
5/39



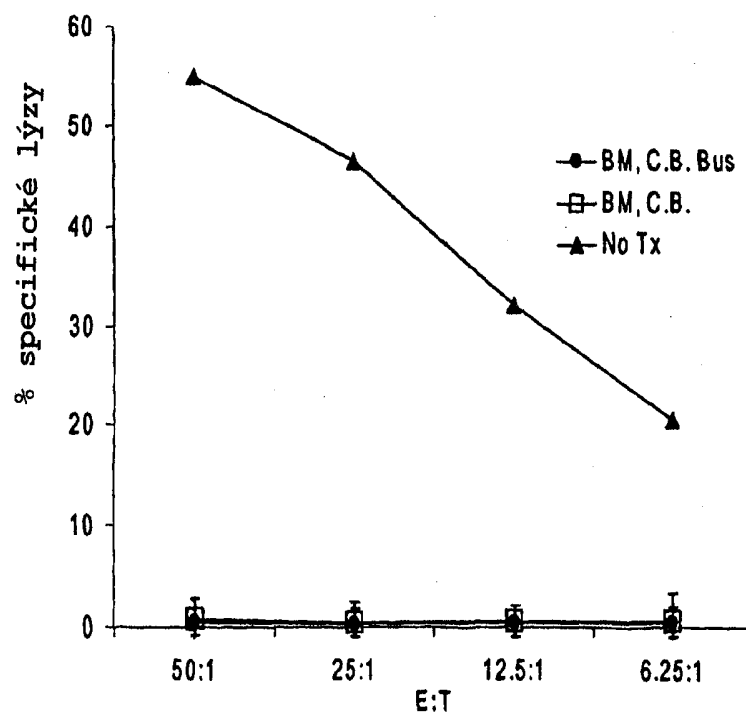
Obr. 4A



Obr. 4B

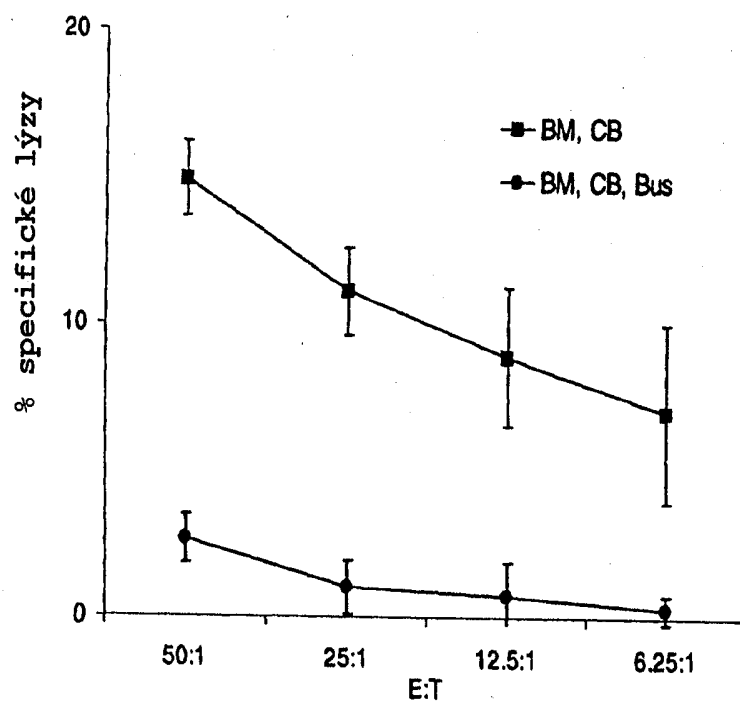


Obr. 5A

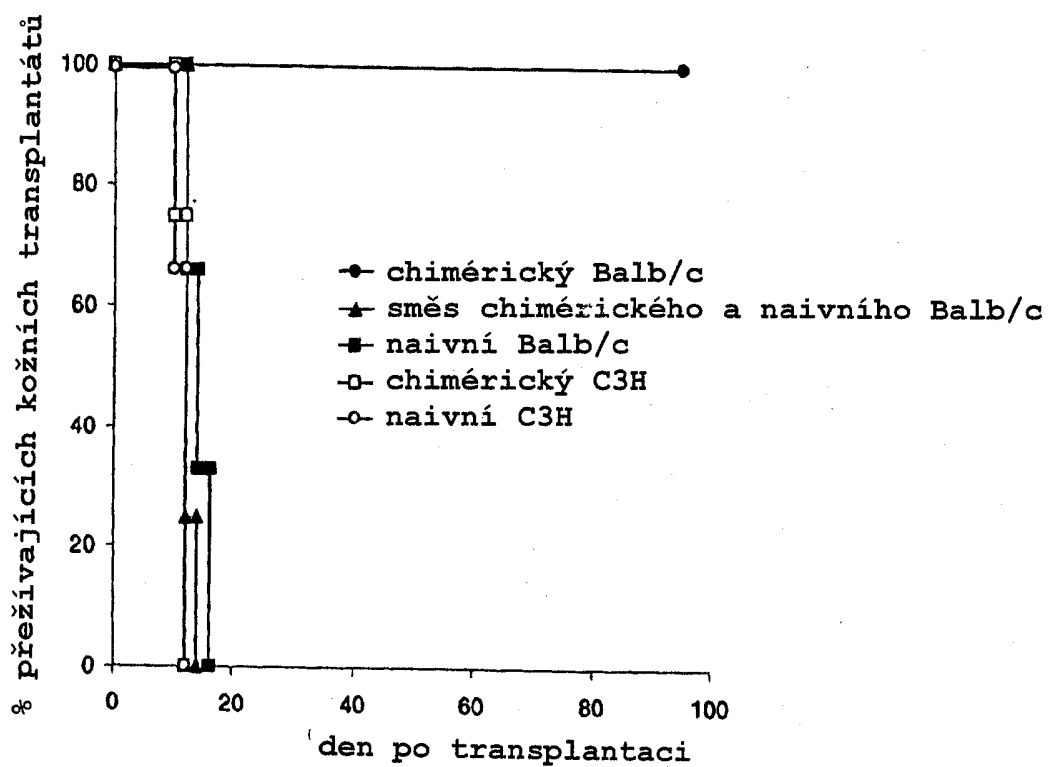


Obr. 5B

7/39

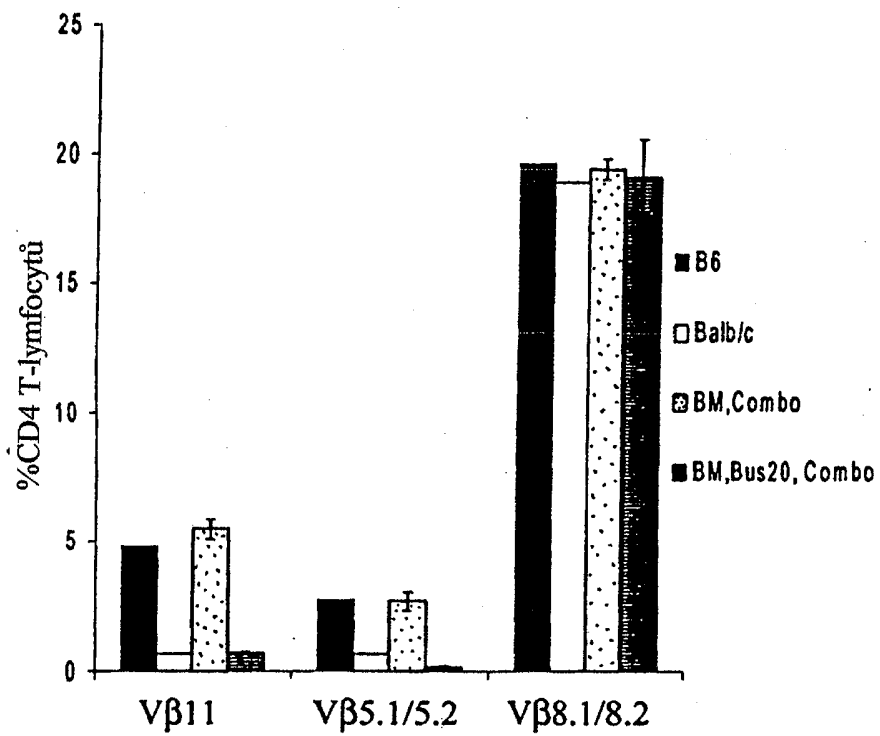


Obr. 5C

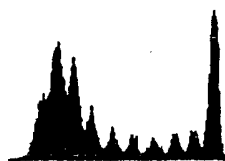


Obr. 5D

8/39

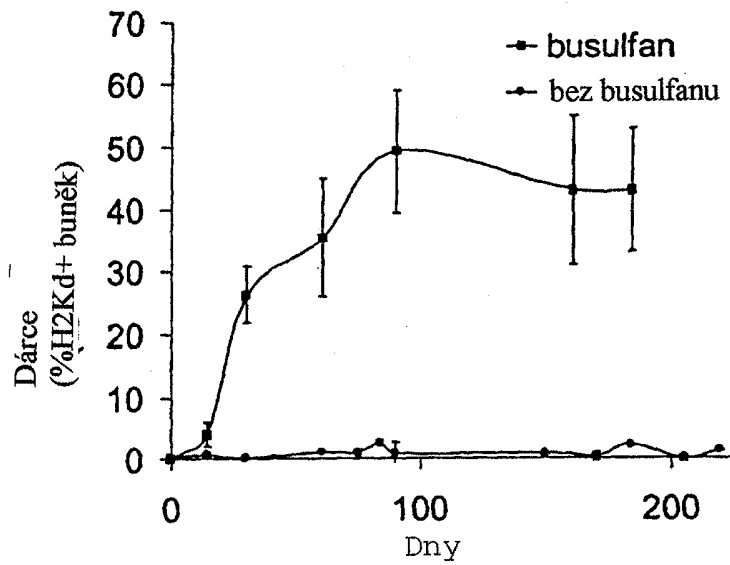


Obr. 6A

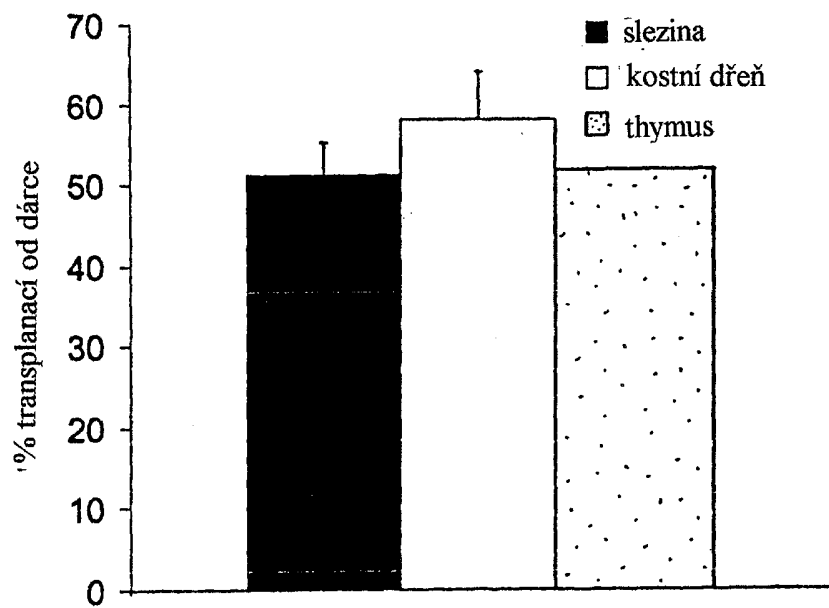
Naivní
vs. Balb/cBM, Combo
vs. Balb/cBM, Bus, CB
vs. C3HBM, Bus, CB
vs. Balb/c

Obr. 6B

9/39

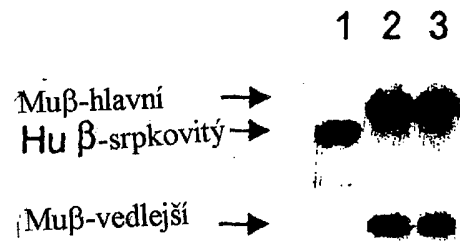


Obr. 7A

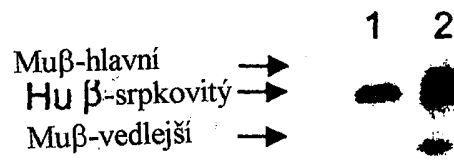


Obr. 7B

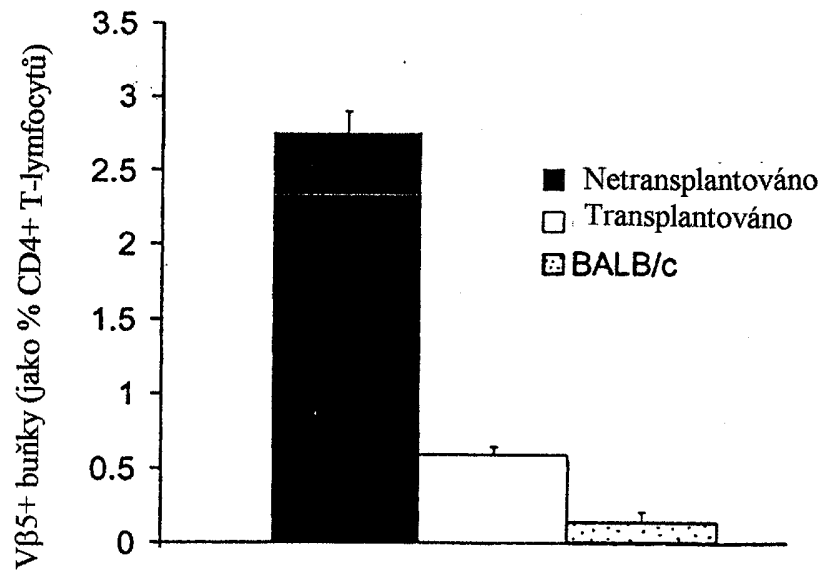
10/39



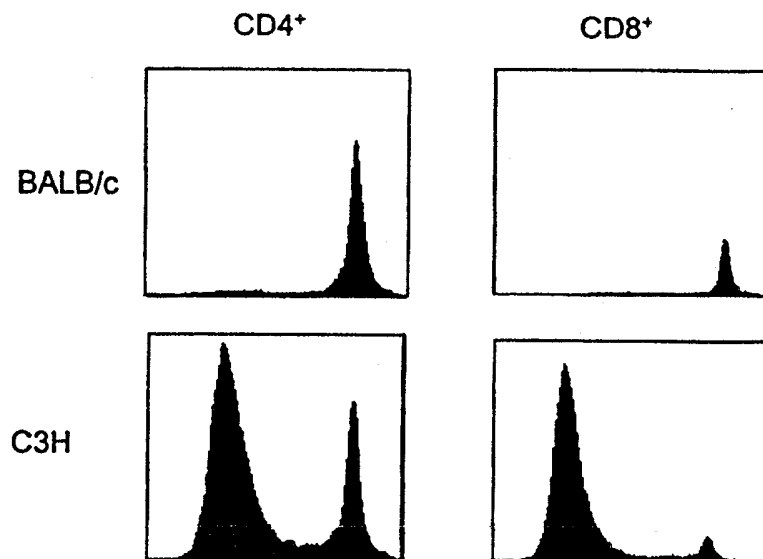
Obr. 8



Obr. 9



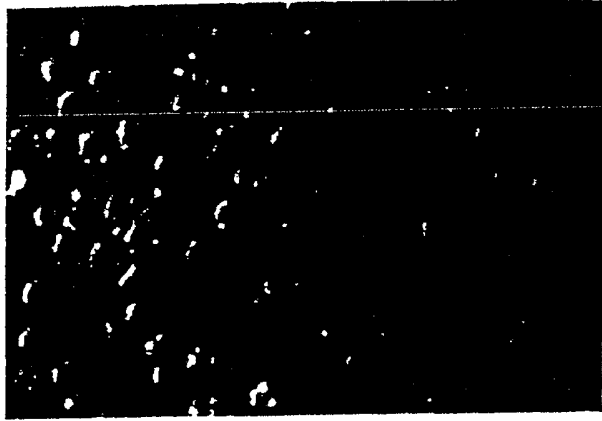
Obr. 10A



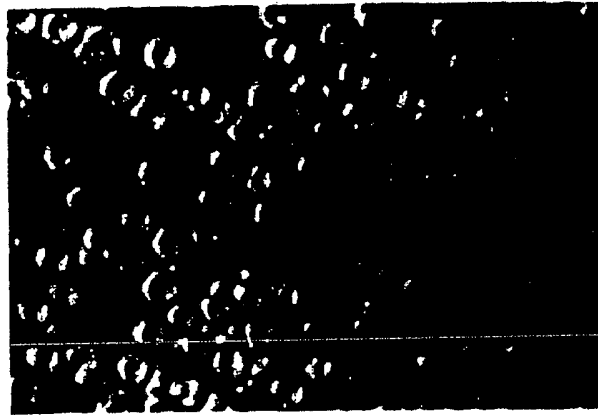
Obr. 10B

08.12.03

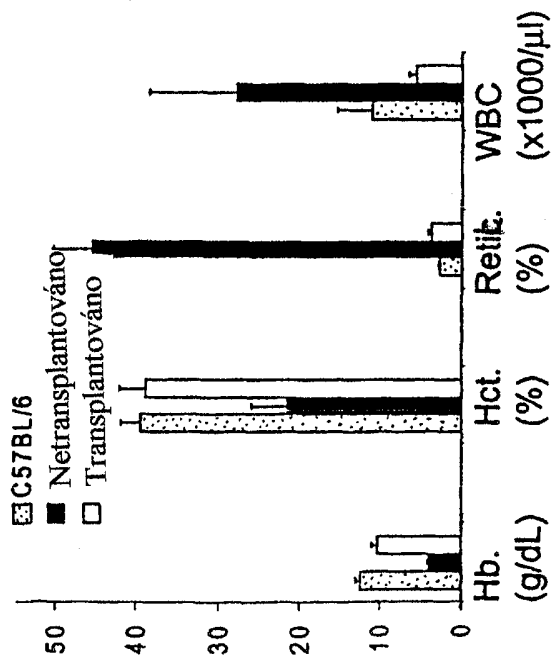
12/39



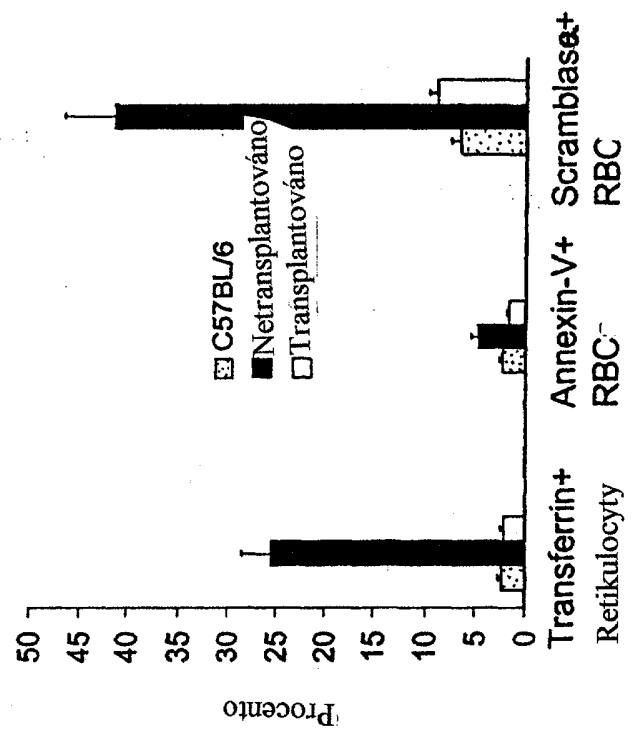
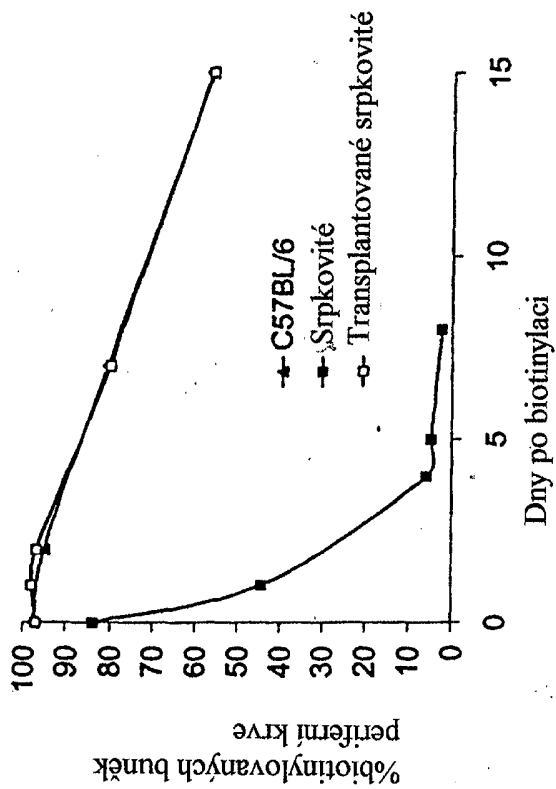
Obr. 11A



Obr. 11B

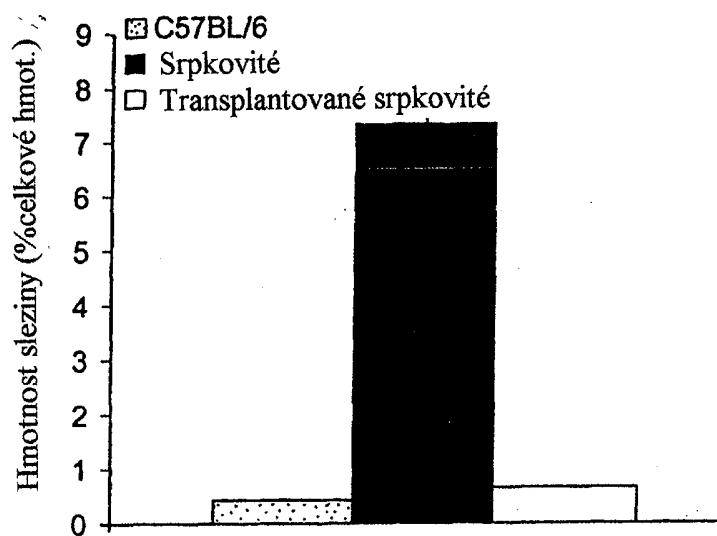


Obr. 11C

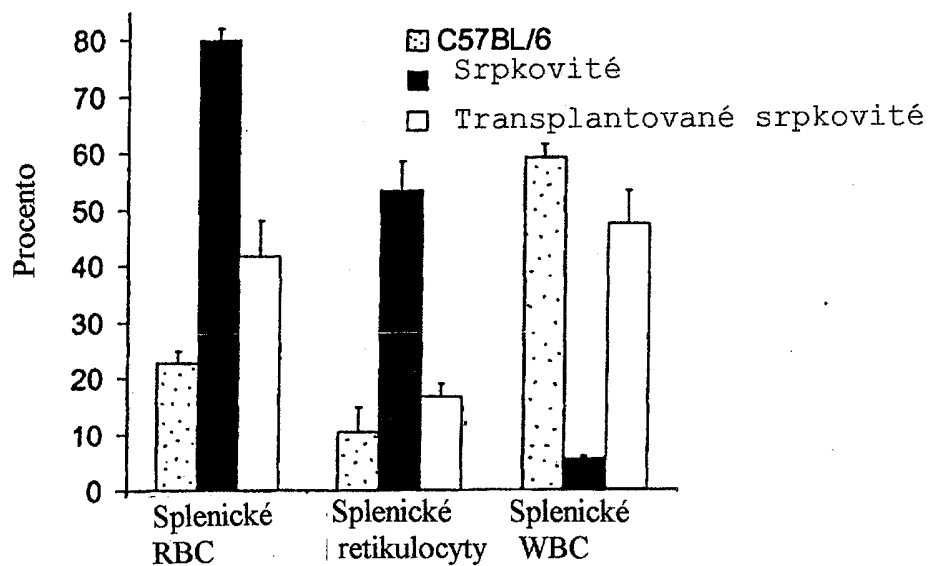


Obr. 11E

Obr. 11D



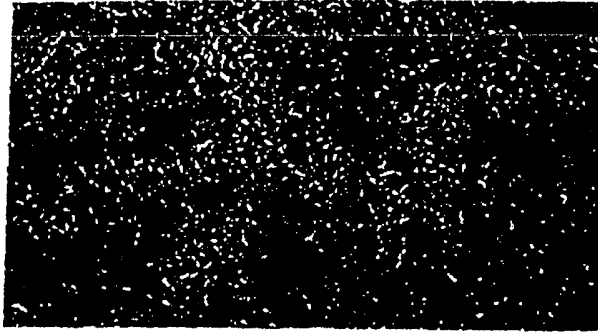
Obr. 12A



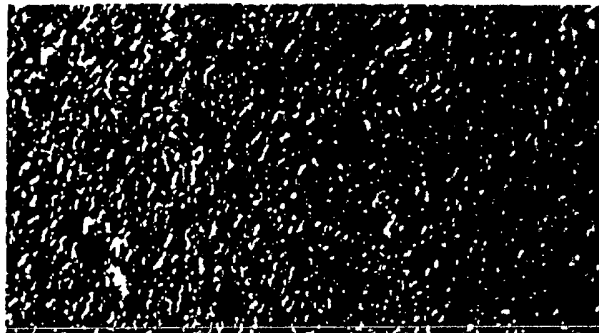
Obr. 12B

08-12-03

15/39



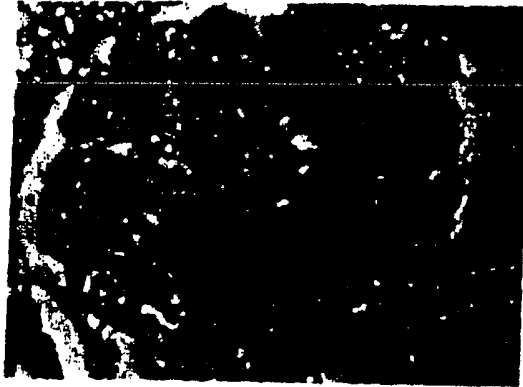
Obr. 12C



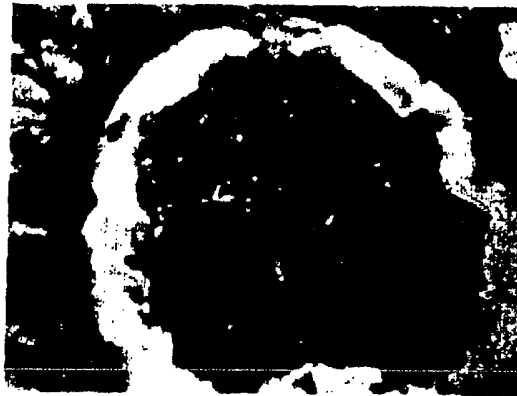
Obr. 12D

08.12.03

16/39



Obr. 13A



Obr. 13B

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M~G~V~L~L~T~Q~R~T~L~L~S~L~V~L~A~L~L~F~P~	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S~M~A~S~M~A~M~H~V~A~Q~P~A~V~V~L~A~S~S~R~	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G~I~A~S~F~V~C~E~Y~A~S~P~G~K~A~T~E~V~R~V~	+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T~V~L~R~Q~A~D~S~Q~V~T~E~V~C~A~A~T~Y~M~M~	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA	+222
G~N~E~L~T~F~L~D~D~S~I~C~T~G~T~S~S~G~N~Q~	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V~N~L~T~I~Q~G~L~R~A~M~D~T~G~L~Y~I~C~K~V~	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E~L~M~Y~P~P~P~Y~Y~E~G~I~G~N~G~T~Q~I~Y~V~	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCCGAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I~D~P~E~P~C~P~D~S~D~Q~E~P~K~S~S~D~K~T~H~	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC	+462
T~S~P~P~S~P~A~P~E~L~L~G~G~S~S~V~F~L~F~P~	+154
CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P~K~P~K~D~T~L~M~I~S~R~T~P~E~V~T~C~V~V~V~	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D~V~S~H~E~D~P~E~V~K~F~N~W~Y~V~D~G~V~E~V~	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H~N~A~K~T~K~P~R~E~E~Q~Y~N~S~T~Y~R~V~V~S~	+214
GTCCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V~L~T~V~L~H~Q~D~W~L~N~G~K~E~Y~K~C~K~V~S~	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N~K~A~L~P~A~P~I~E~K~T~I~S~K~A~K~G~Q~P~R~	+254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E~P~Q~V~Y~T~L~P~P~S~R~D~E~L~T~K~N~Q~V~S~	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L~T~C~L~V~K~G~F~Y~P~S~D~I~A~V~E~W~E~S~N~	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G~Q~P~E~N~N~Y~K~T~T~P~P~V~L~D~S~D~G~S~F~	+314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F~L~Y~S~K~L~T~V~D~K~S~R~W~Q~Q~G~N~V~F~S~	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C~S~V~M~H~E~A~L~H~N~H~Y~T~Q~K~S~L~S~L~S~	+354
CCGGGTAAATGA	
P~G~K~*	

ATGGGTGTA	CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M~G~V~L~L~T~Q~R~T~L~L~S~L~V~L~A~L~L~F~P~		-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA		+42
S~M~A~S~M~A~M~H~V~A~Q~P~A~V~V~L~A~S~S~R~		+14
	+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG		+102
G~I~A~S~F~V~C~E~Y~A~S~P~G~K~Y~T~E~V~R~V~		+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG		+162
T~V~L~R~Q~A~D~S~Q~V~T~E~V~C~A~A~T~Y~M~M~		+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA		+222
G~N~E~L~T~F~L~D~D~S~I~C~T~G~T~S~S~G~N~Q~		+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG		+282
V~N~L~T~I~Q~G~L~R~A~M~D~T~G~L~Y~I~C~K~V~		+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA		+342
E~L~M~Y~P~P~P~Y~Y~E~G~I~G~N~G~T~Q~I~Y~V~		+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC		+402
I~D~P~E~P~C~P~D~S~D~Q~E~P~K~S~S~D~K~T~H~		+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC		+462
T~S~P~P~S~P~A~P~E~L~L~G~G~S~S~V~F~L~F~P~		+154
CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG		+522
P~K~P~K~D~T~L~M~I~S~R~T~P~E~V~T~C~V~V~V~		+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG		+582
D~V~S~H~E~D~P~E~V~K~F~N~W~Y~V~D~G~V~E~V~		+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC		+642
H~N~A~K~T~K~P~R~E~E~Q~Y~N~S~T~Y~R~V~V~S~		+214
GTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC		+702
V~L~T~V~L~H~Q~D~W~L~N~G~K~E~Y~K~C~K~V~S~		+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA		+762
N~K~A~L~P~A~P~I~E~K~T~I~S~K~A~K~G~Q~P~R~		+254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC		+822
E~P~Q~V~Y~T~L~P~P~S~R~D~E~L~T~K~N~Q~V~S~		+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT		+882
L~T~C~L~V~K~G~F~Y~P~S~D~I~A~V~E~W~E~S~N~		+294
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC		+942
G~Q~P~E~N~N~Y~K~T~T~P~P~V~L~D~S~D~G~S~F~		+314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA		+1002
F~L~Y~S~K~L~T~V~D~K~S~R~W~Q~Q~G~N~V~F~S~		+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT		+1062
C~S~V~M~H~E~A~L~H~N~H~Y~T~Q~K~S~L~S~L~S~		+354
CCGGGTAAATGA		
P~G~K~*		

19/39

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA
 M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--P--P--
 AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGTACTGGCCAGCAGCCGA
 S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
 +1
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATTGACTGAGGTCCGGGTG
 G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--L--T--E--V--R--V--
 ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG
 T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--
 GGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA
 G--N--E--L--T--P--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--
 GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG
 V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--
 GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACOGAACCCAGATTTATGTA
 E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
 ATTGATCCAGAACCGTGCCCGAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAACTCAC
 I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--
 ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
 T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--P--P--
 CCAAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
 P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG
 D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAGC
 H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
 GTCTTCACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--
 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
 N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC
 E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
 CTGACCTGCTGTGCTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--
 GGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC
 G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
 F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--P--S--
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
 C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
 CCGGGTAAATGA-----
 P--G--K-------

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCCTGCACTCCTGTTTCCA
 M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--
 AGCATGGCCAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA
 S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
 +1
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAACTACTGAGGTCCGGGTG
 G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--X--T--T--E--V--R--V--
 ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG
 T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--
 GGGAAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA
 G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--
 GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG
 V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--
 GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA
 E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
 ATTGATCCAGAACCGTGCCCAAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC
 I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--
 ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCACTCTTCTCTTCCCC
 T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--P--L--P--P--
 CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
 P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
 D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--N--Y--V--D--G--V--E--V--
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAC
 H--N--A--X--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
 GTCCTCACCGTCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--X--E--Y--K--C--K--V--S--
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
 N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
 GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGC
 E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--
 GGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGGTCTCTTC
 G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
 F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
 C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
 CCGGTAAATGA-----
 P--G--K-----

08.12.03

21/39

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACCTCTGTTCCTCA
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--Y--P--
AGCATGGCGAOCATGGCAATGCACGTGGCCCGAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA
S--M--A--S--M--A--N--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
+1
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATGGACTGAGGTCCGGGTG
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--W--T--E--V--R--V--
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA
G--N--B--L--T--P--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG
V--N--L--T--I--Q--G--L--X--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
ATTGATCCAGAACCGTGCCCGAGATTCTGATCAAGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC
I--D--P--B--P--C--P--D--S--D--Q--B--P--K--S--S--D--K--T--H--
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTTCCCC
T--S--P--P--S--P--A--P--B--L--L--G--G--S--S--V--P--L--P--P--
CCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCCTGTGTGTG
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAOTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--P--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGTGTGAGC
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
GTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--
GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC
G--Q--P--B--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
P--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--P--S--
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
CCGGGTAAATGA-----
P--G--K--+-----

Obr. 18

08.12.03

22/39

Signální peptid okostatinu M

M G V L L T Q R T L L S L V L
 ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT 45

A L L F P S M A S M A M H V A
 GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC 90

Q P A V V L A S S R G I A S F
 CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT 135

V C E Y A S P G K A T E V R V
 GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG 180

T V L R Q A D S Q V T E V C A
 ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG 225

A T Y M M G N E L T F L D D S
 GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC 270

I C T G T S S G N Q V N L T I
 ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC 315

Q G L R A M D T G L Y I C K V
 CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG 360

E L M Y P P P Y Y L G I G N G
 GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA 405

T Q I Y V I D P E P C P D S D
 ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC 450

F L L W I L A A V S S G L F F
 TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT 495

Y S F L L T A V S L S K M L K
 TAT AGC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG 540

K R S P L T T G V Y V K M P P
 AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA 585

T E P E C E K Q F Q P Y F I P
 ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC 630

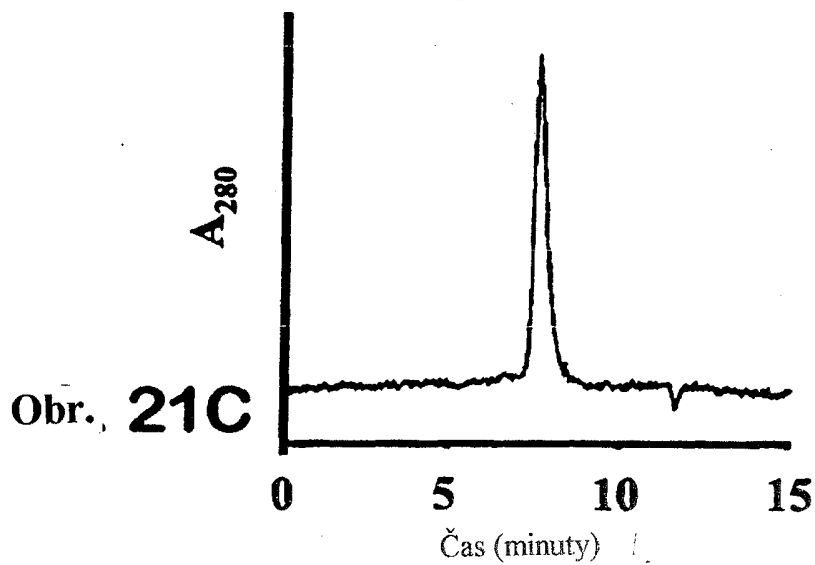
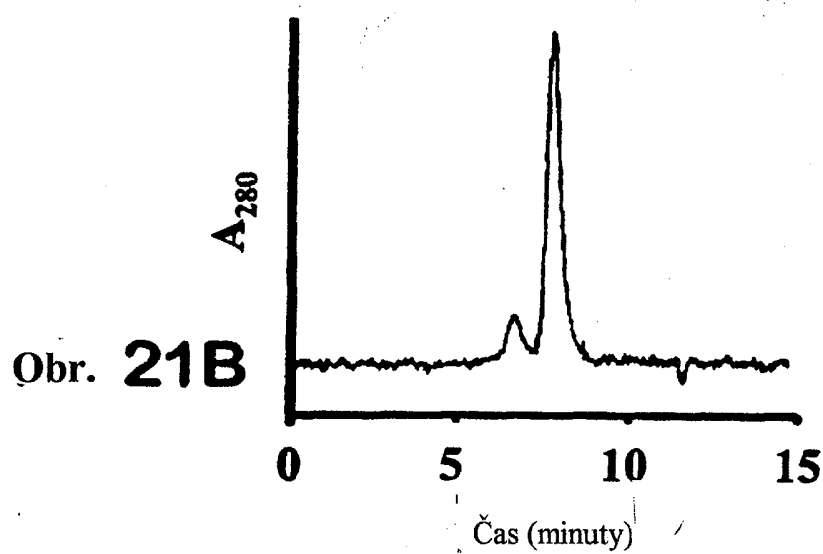
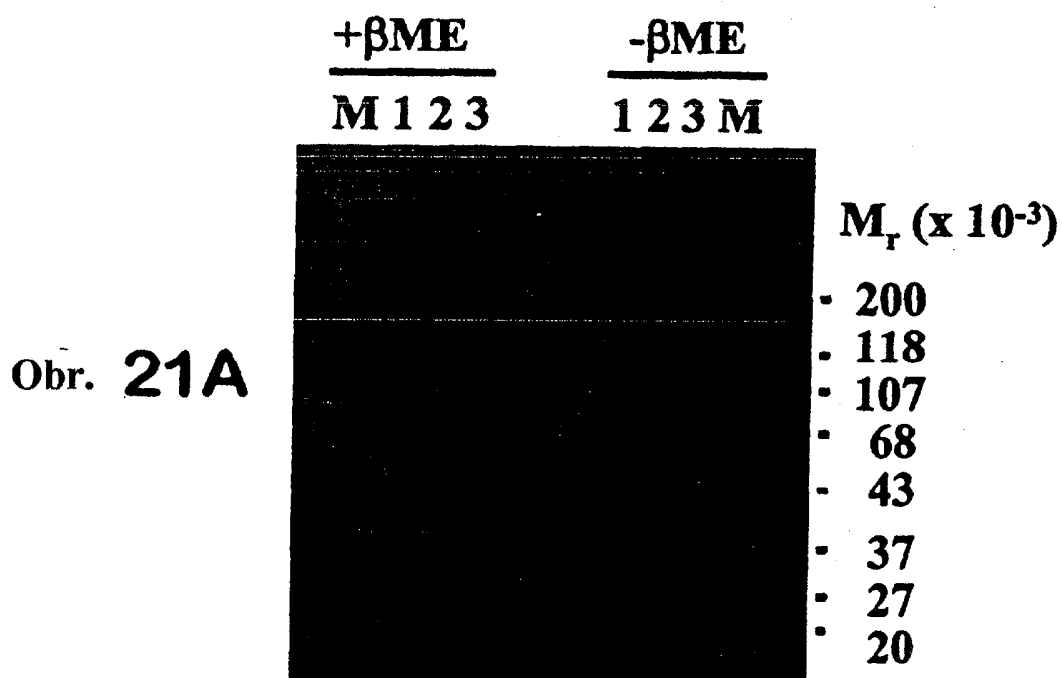
I N
 ATC AAT 636

23/39

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCCTTGCCTCCTGTTTCCA	-19
M~G~V~L~L~T~Q~R~T~L~L~S~L~V~L~A~L~L~F~P~	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S~M~A~S~M~A~M~H~V~A~Q~P~A~V~V~L~A~S~S~R~	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G~I~A~S~F~V~C~E~Y~A~S~P~G~K~A~T~E~V~R~V~	+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T~V~L~R~Q~A~D~S~Q~V~T~E~V~C~A~A~T~Y~M~M~	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGAAATCAA	+222
G~N~E~L~T~F~L~D~D~S~I~C~T~G~T~S~S~G~N~Q~	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V~N~L~T~I~Q~G~L~R~A~M~D~T~G~L~Y~I~C~K~V~	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E~L~M~Y~P~P~P~Y~Y~L~G~I~G~N~G~T~Q~I~Y~V~	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I~D~P~E~P~C~P~D~S~D~Q~E~P~K~S~S~D~K~T~H~	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC	+462
T~S~P~P~S~P~A~P~E~L~L~G~G~S~S~V~F~L~F~P~	+154
CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG	+522
P~K~P~K~D~T~L~M~I~S~R~T~P~E~V~T~C~V~V~V~	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D~V~S~H~E~D~P~E~V~K~F~N~W~Y~V~D~G~V~E~V~	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC	+642
H~N~A~K~T~K~P~R~E~E~Q~Y~N~S~T~Y~R~V~V~S~	+214
GTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V~L~T~V~L~H~Q~D~W~L~N~G~K~E~Y~K~C~K~V~S~	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N~K~A~L~P~A~P~I~E~K~T~I~S~K~A~K~G~Q~P~R~	+254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E~P~Q~V~Y~T~L~P~P~S~R~D~E~L~T~K~N~Q~V~S~	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L~T~C~L~V~K~G~F~Y~P~S~D~I~A~V~E~W~E~S~N~	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G~Q~P~E~N~N~Y~K~T~T~P~P~V~L~D~S~D~G~S~F~	+314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F~L~Y~S~K~L~T~V~D~K~S~R~W~Q~Q~G~N~V~F~S~	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C~S~V~M~H~E~A~L~H~N~H~Y~T~Q~K~S~L~S~L~S~	+354
CCGGGTAAATGA	
P~G~K~*	

08.12.03

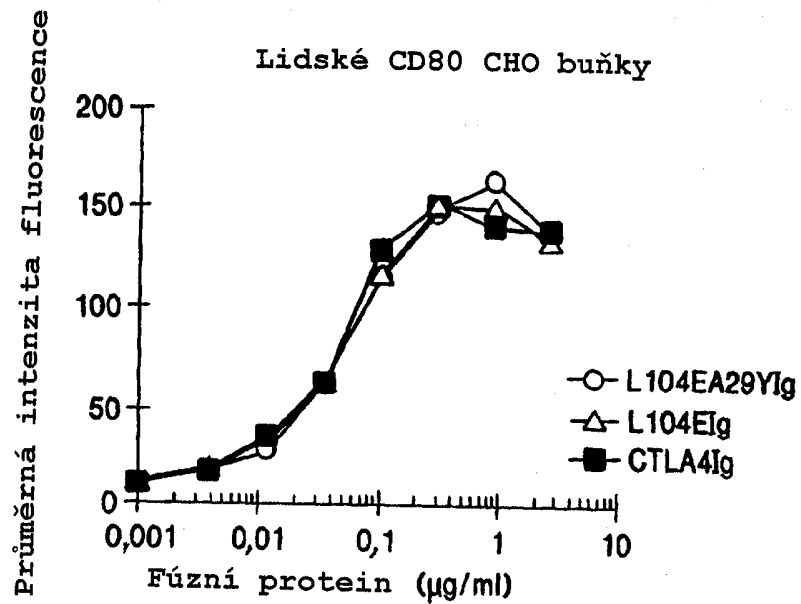
24/39



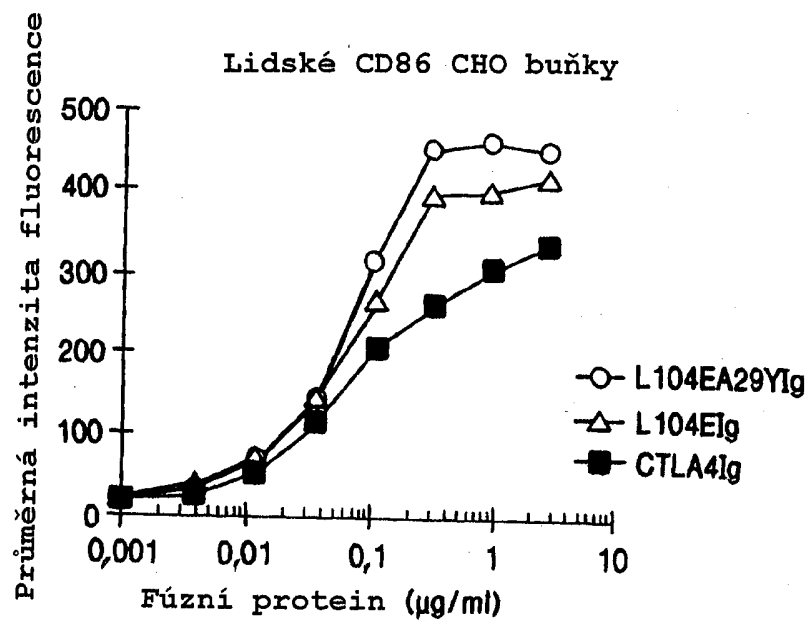
25/39



Obr. 22

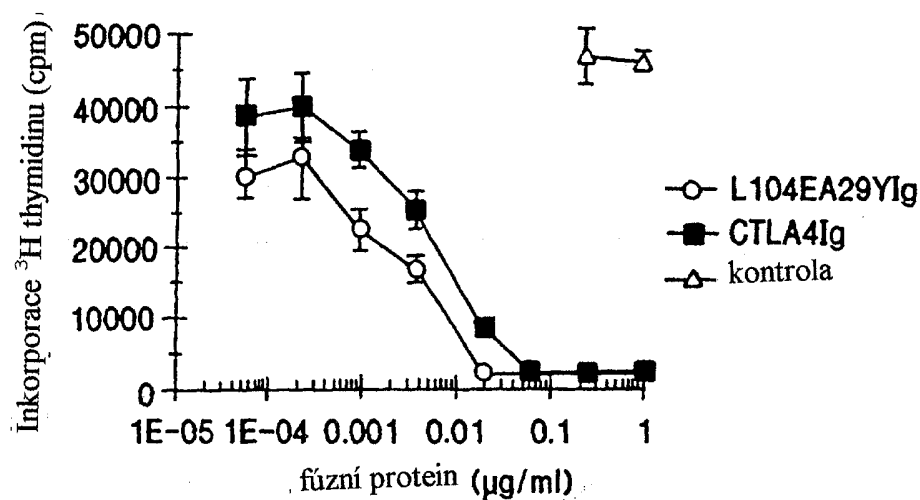


Obr. 23A



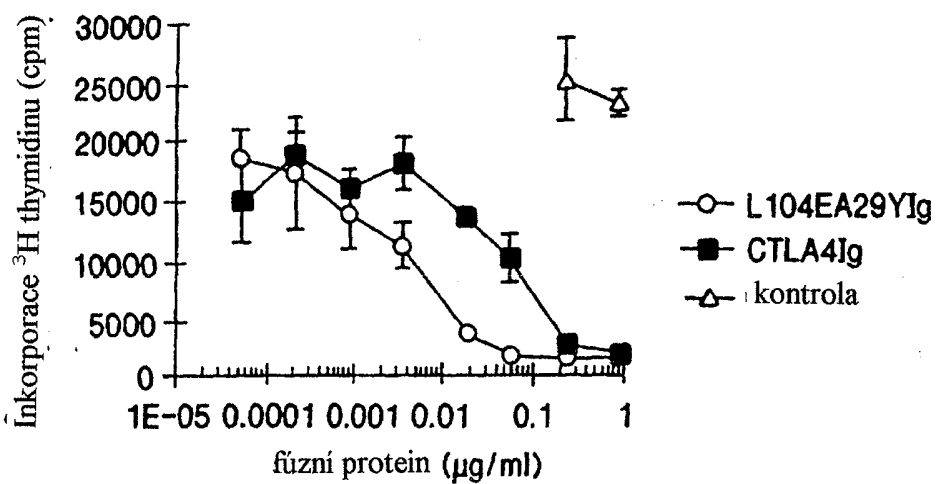
Obr. 23B

CD80 CHO + PMA (Kostimulace)

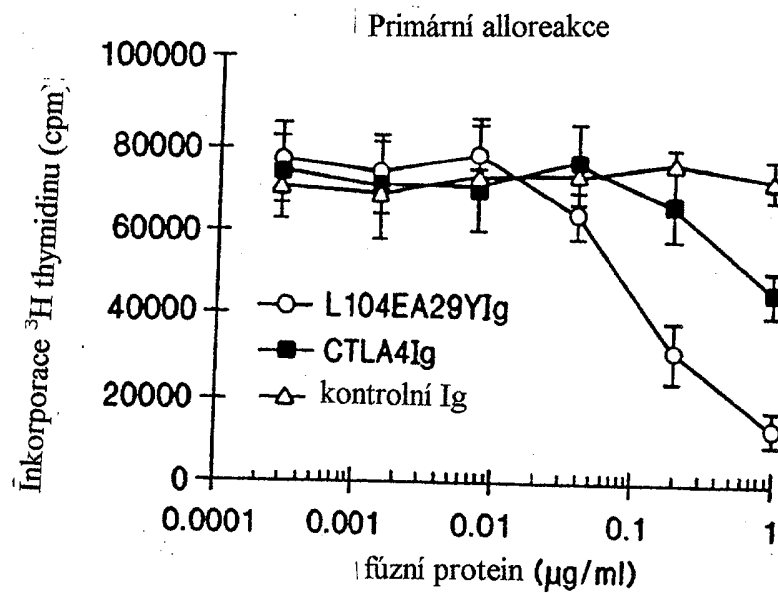


Obr. 24A

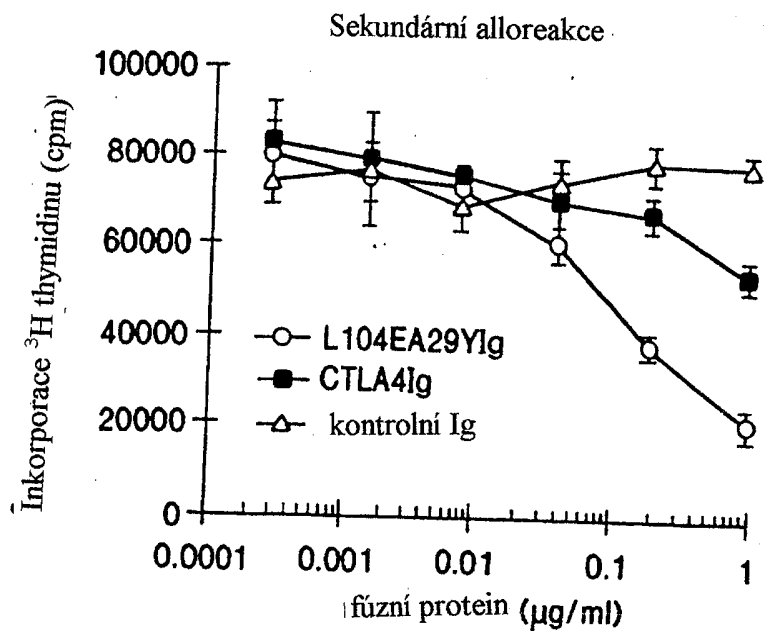
CD86 CHO + PMA (Kostimulace)



Obr. 24B

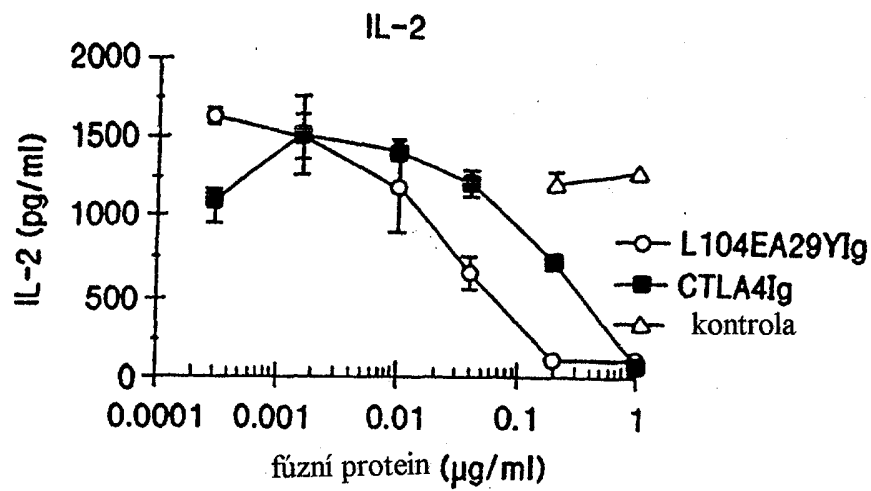


Obr. 25A

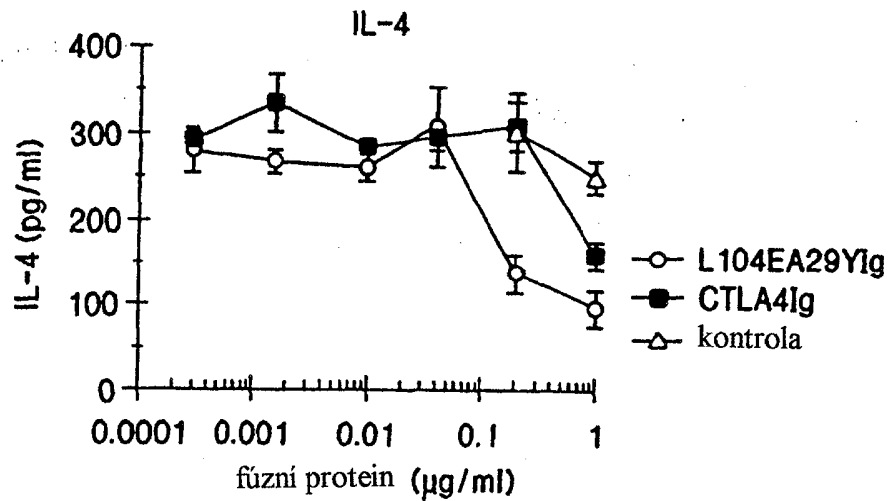


Obr. 25B

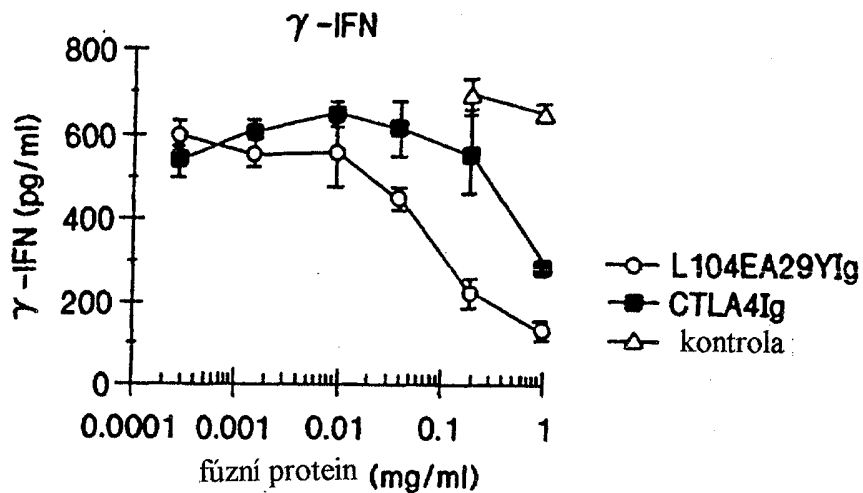
29/39



Obr. 26A

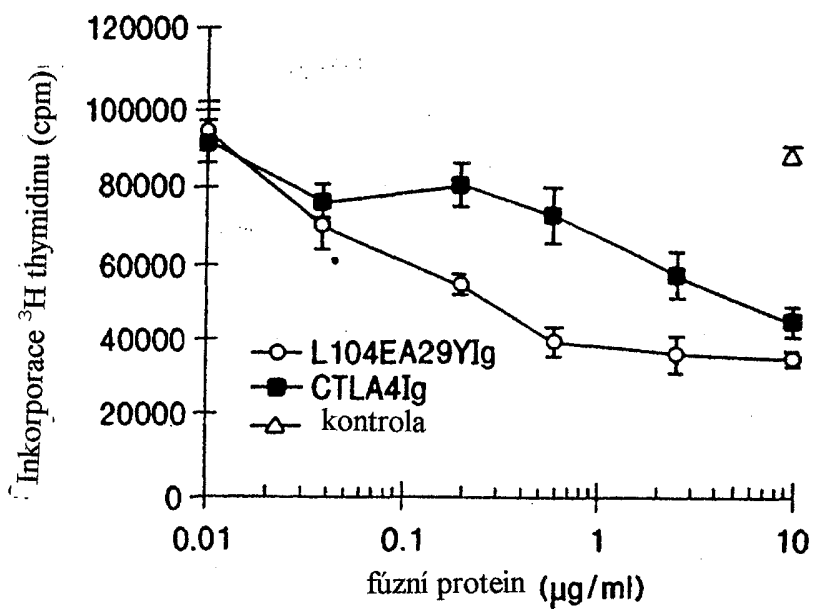


Obr. 26B



Obr. 26C

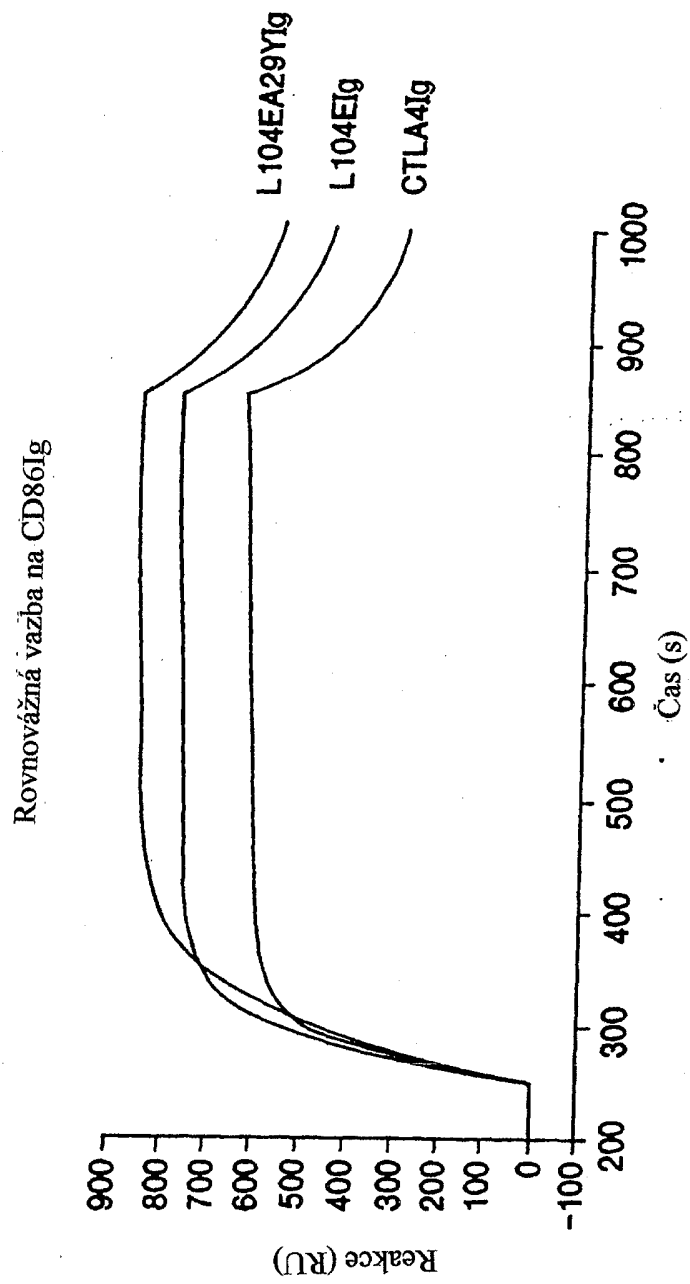
Inhibice proliferace opičích T-lymfocytů indukovaná PHA



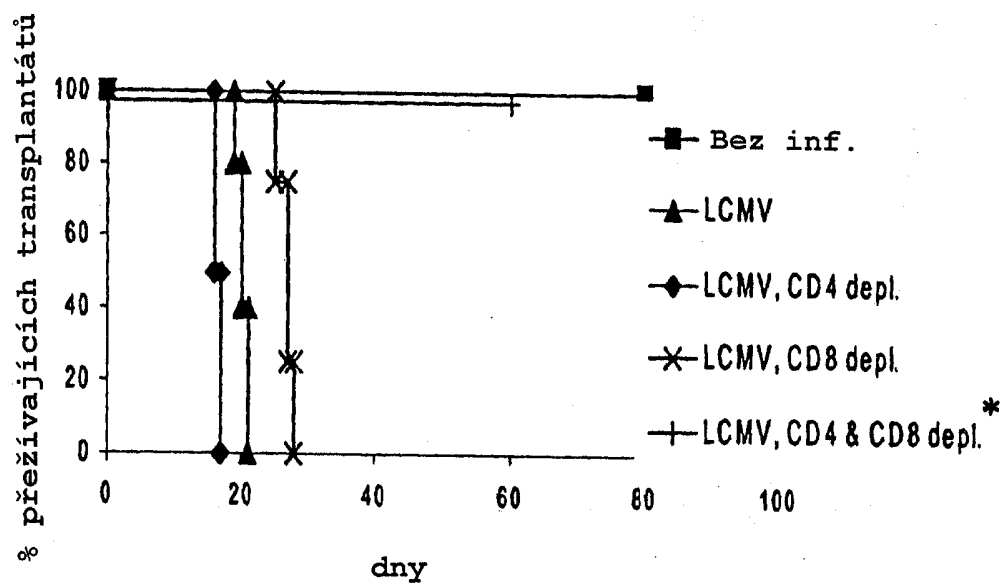
Obr. 27

08.12.03

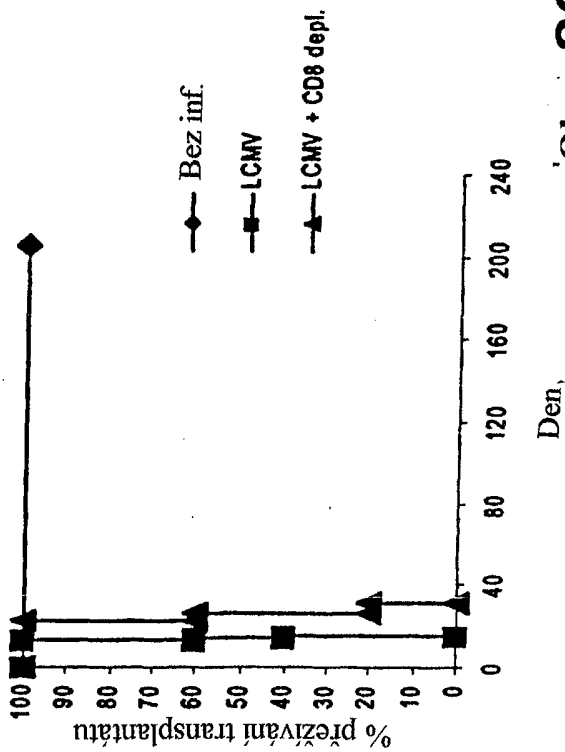
31/39



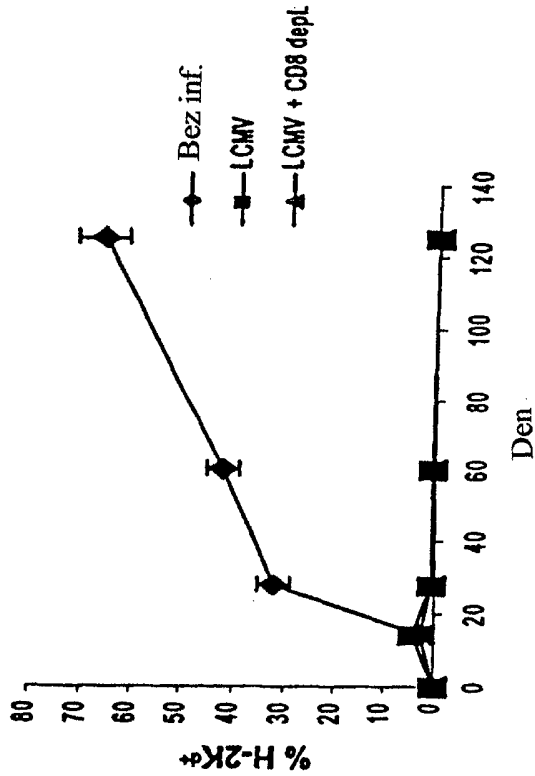
Obr. 28



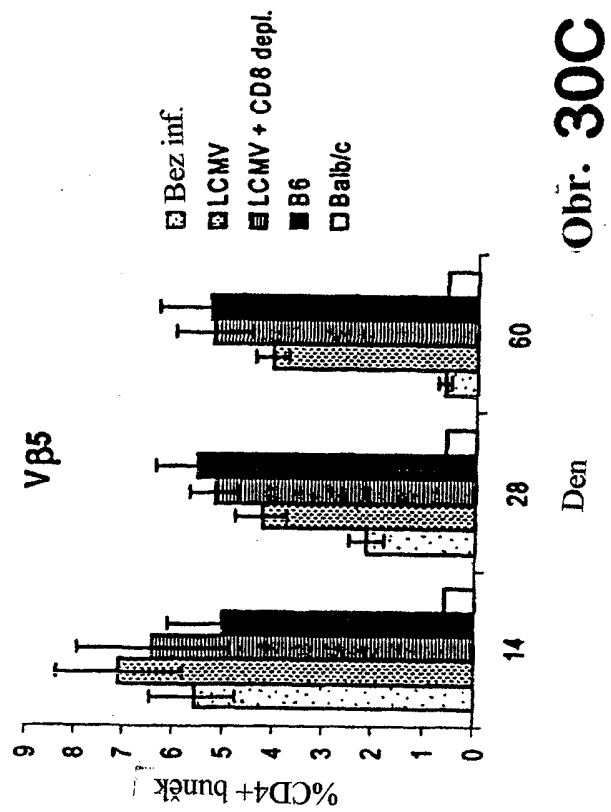
Obr. 29



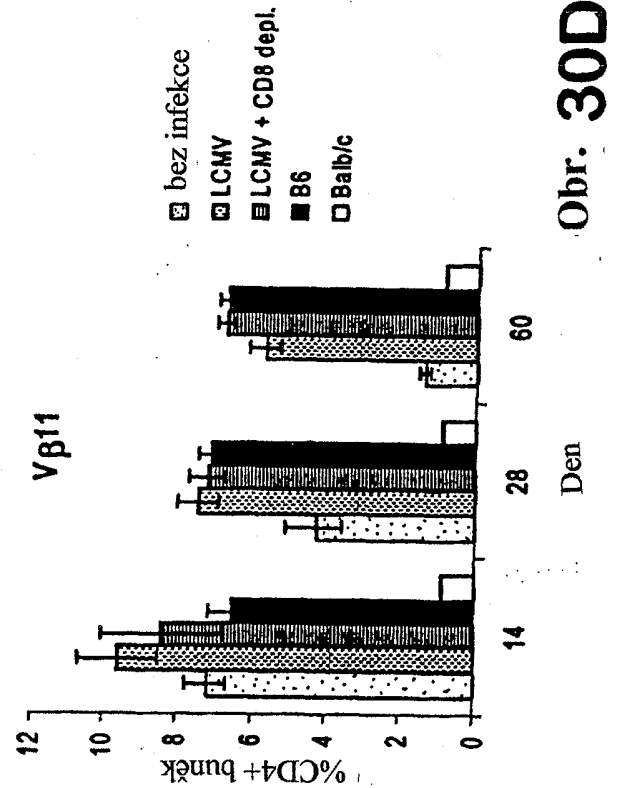
Obr. 30A



Obr. 30B



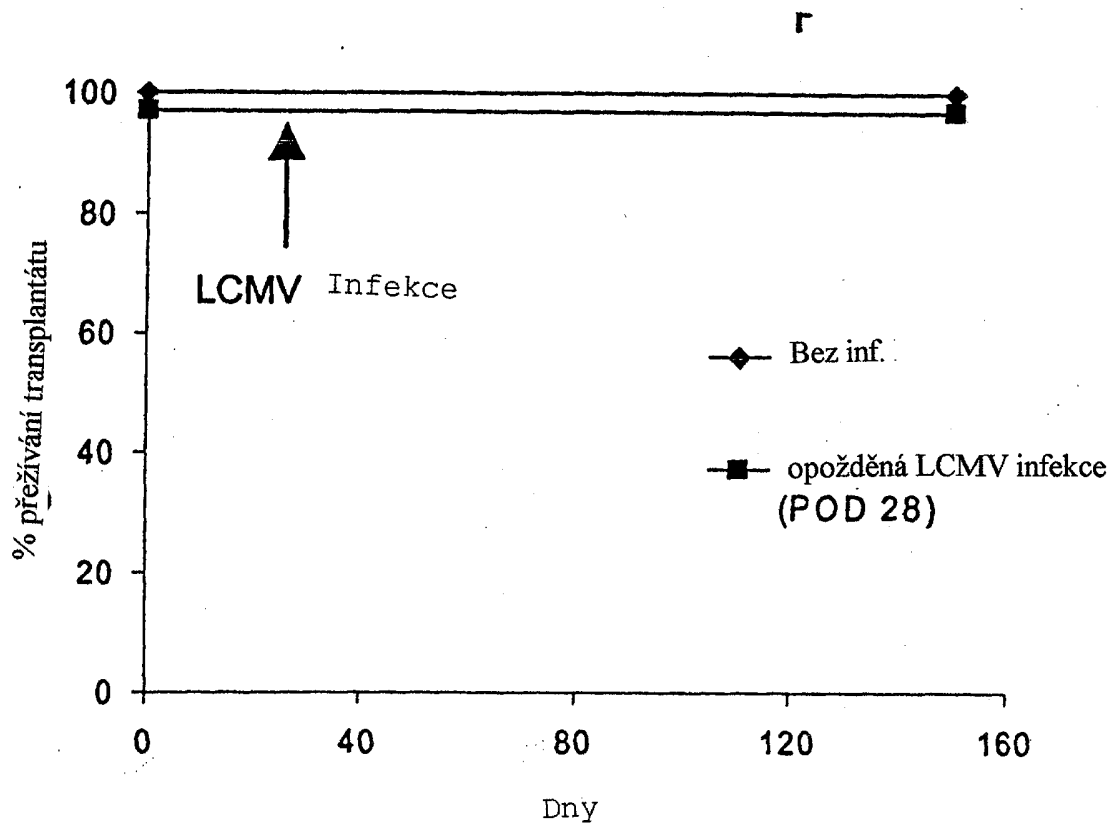
Obr. 30C



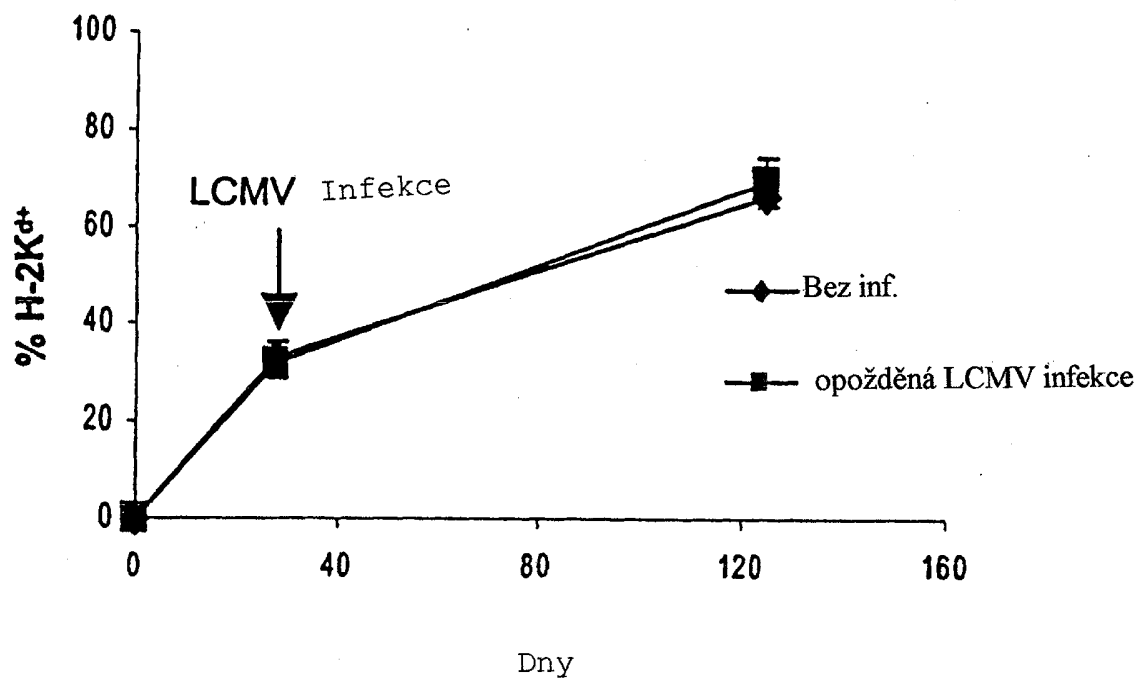
Obr. 30D

08.12.03

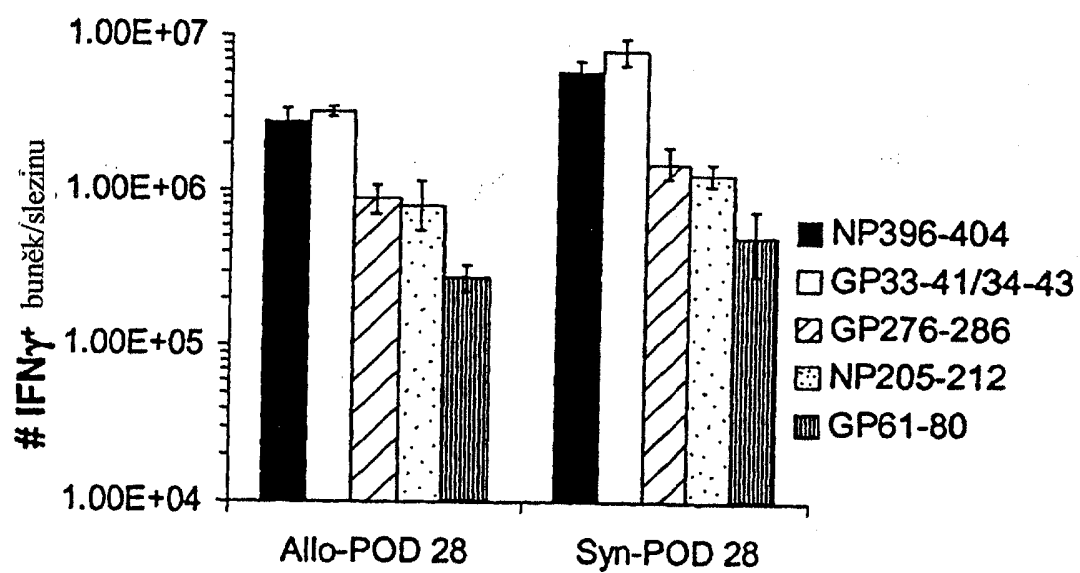
34/ 39



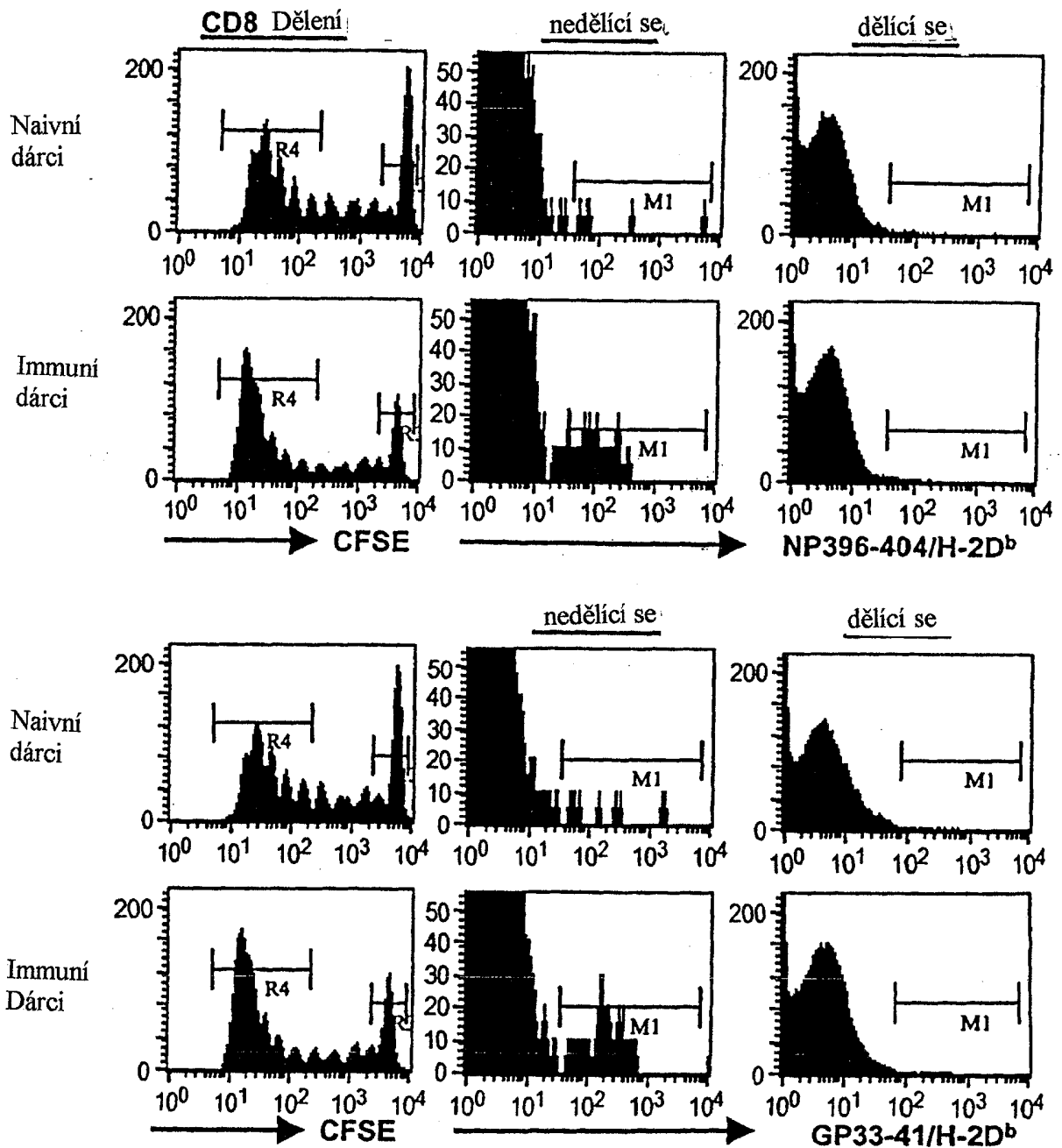
Obr. 31A



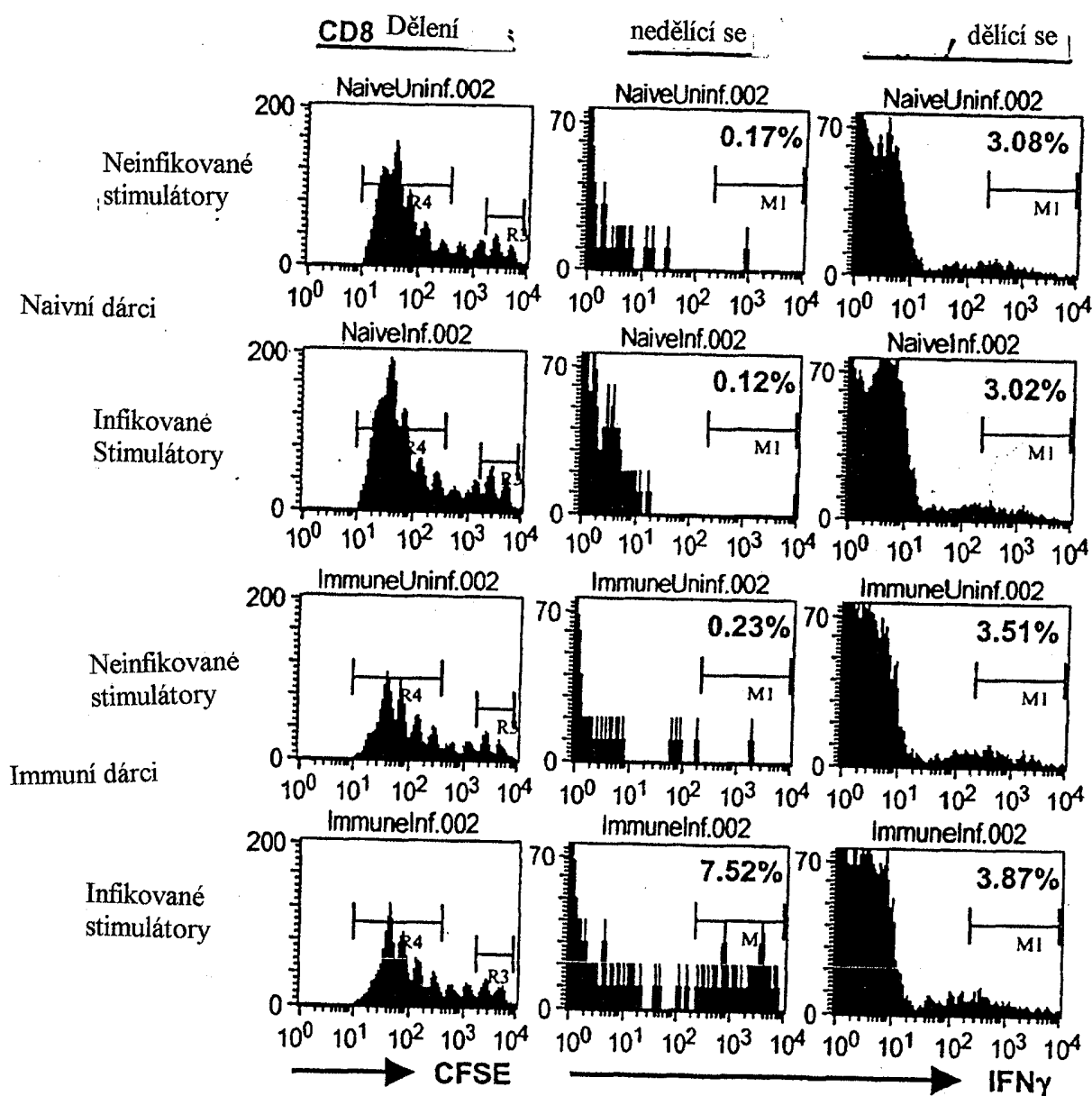
Obr. 31B



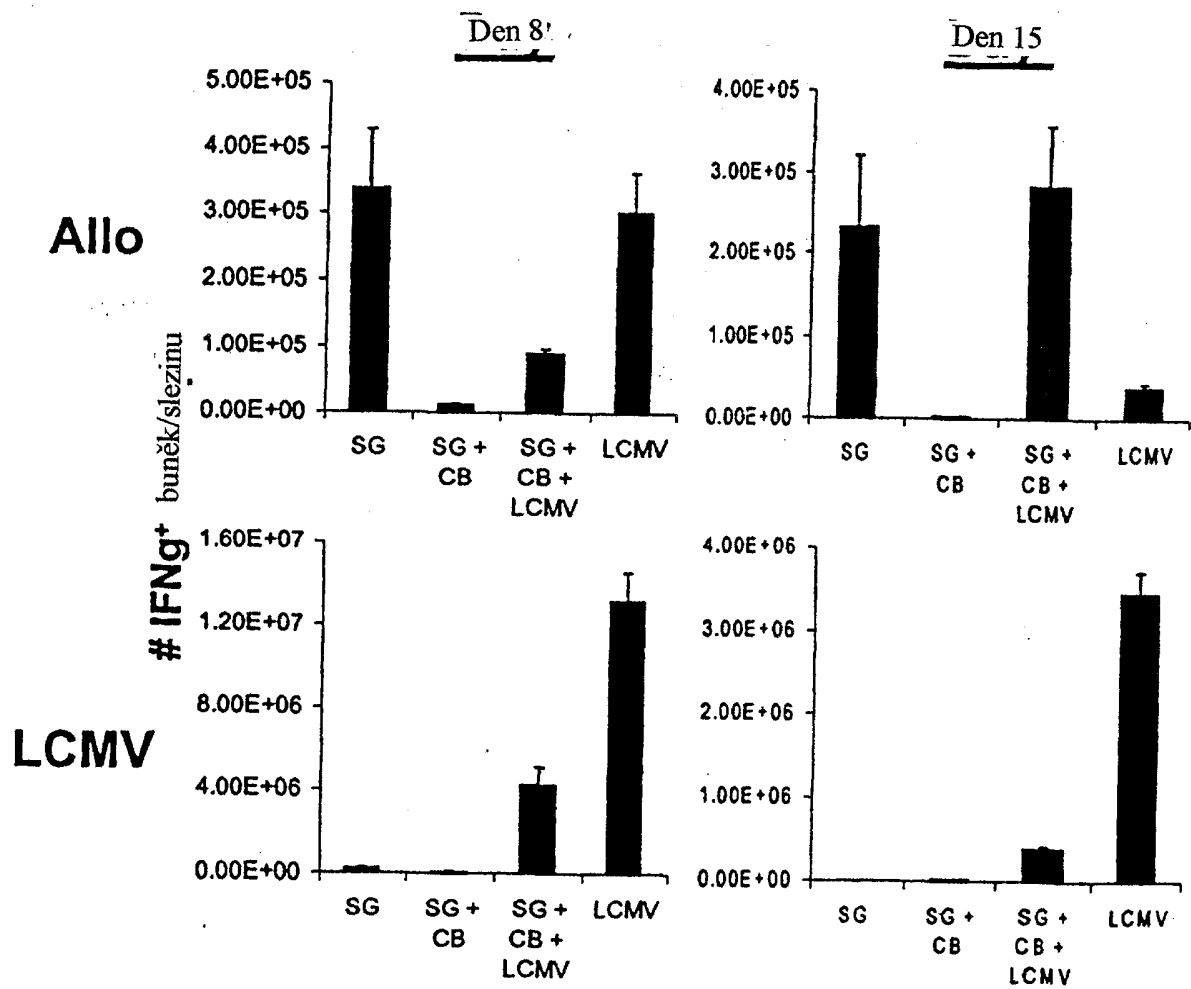
Obr. 32



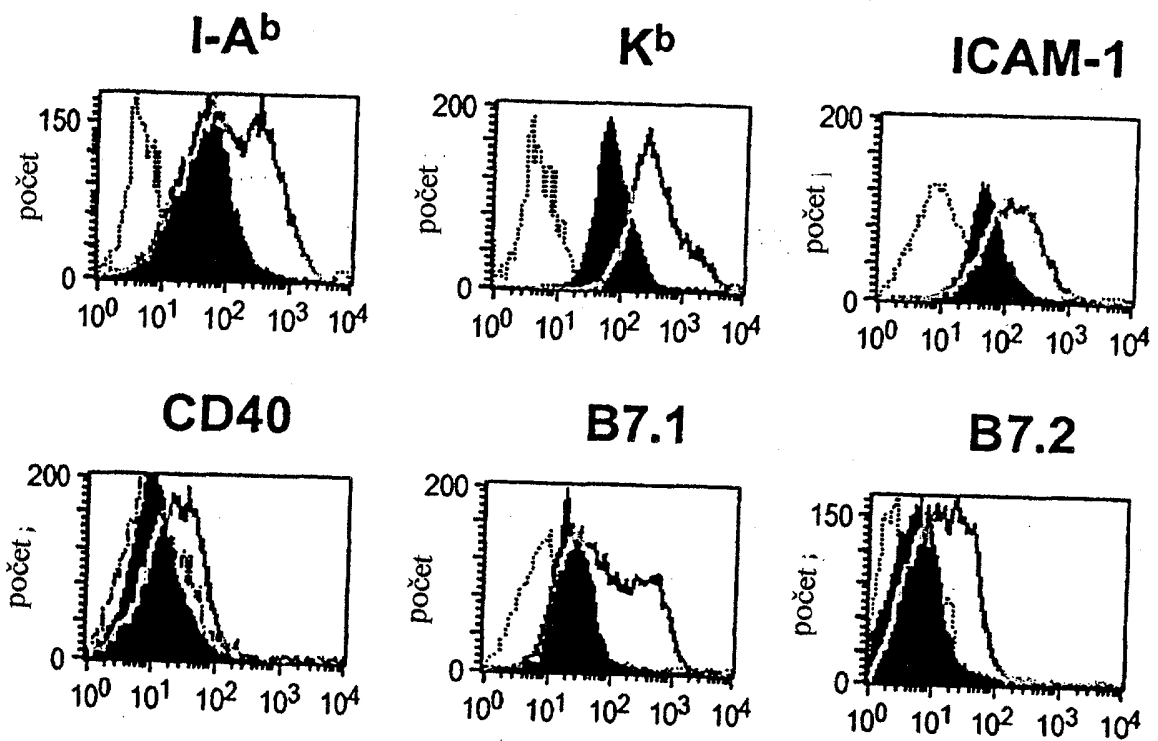
Obr. 33



Obr. 34



Obr. 35



Obr. 36