

P01 04785

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

04 11 85

D2

Immunszuppresszió

K I V O N A T

A találmány tárgya az immunszuppresszióval, közelebbről xenotranszplantációval kapcsolatos immunszuppresszióval kapcsolatos. A találmány tárgya közelebbről egy T-sejt epitópot és egy B-sejt epitópot tartalmazó immunogént magában foglaló immunogén készítmény, melyben a B-sejt epitóp a xenograft kilökődésben szerepet játszó sertés polipeptid, amely egy sertés polipeptidnek a vele egyenértékű emberi polipeptid megfelelő régiójához képest kevesebb, mint 75%-os szekvencia-azonossággal rendelkező régiójából származik.

A találmány szerinti megoldás alkalmas xenograft kilökődést okozó immunreakciók gátlására.

jellemezés ábrája

TH

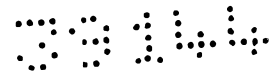
Immunszuppresszió

A találmány tárgya az immunszuppresszióval, közelebb-ről xenotranszplantációval kapcsolatos immunszuppresszióval kapcsolatos. A találmány tárgya közelebbről egy T-sejt epitópot és egy B-sejt epitópot tartalmazó immunogént magában foglaló immunogén készítmény, melyben a B-sejt epitóp a xenograft kilökődésben szerepet játszó sertés polipeptid, amely egy sertés polipeptidnek a vele egyenértékű emberi polipeptid megfelelő régiójához képest kevesebb, mint 75%-os szekvencia-azonossággal rendelkező régiójából származik.

A találmány szerinti megoldás alkalmas xenograft kilökődést okozó immunreakciók gátlására.

Az allogén szervátültetések sikeres alkalmazása ellenére a szervek iránti igény és a felhasználható szervek mennyisége közötti egyenlőtlenség áthidalására van szükség. Az allogén szervek mennyiségének növelése nem jelent kielégítő megoldást, mivel számuk még akkor sem lenne elegendő a meglévő igények kielégítésére, ha az összes felhasználható szerv transzplantációra kerülne (1, 2). Ez a tény vezetett a vonzó és működőképes alternatívát jelentő xenotranszplantációval (a különböző fajú állatok közötti szervátültetéssel) kapcsolatos érdeklődés feltámadásához.

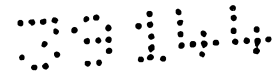
A xenotranszplantációs kutatások napjainkban a sertésre koncentrálnak, amely méretét, élettani kompatibilitását és tenyésztési jellemzőit tekintve megfelelő állati donor-



nak tekinthető (3, 4). A diszkordáns xenotranszplantáció sikerét a legutóbbi időkig gátolta azonban a humorális eredetű túlheveny kilökődés ("humorally-mediated hyperacute rejection", HAR) elkerülhetetlen jelentkezése, amely a revaszkularizációt követően rövid időn belül a szerv kilökődéséhez vezet. A diszkordáns fajok között átültetett szervek legtöbbször áldozatul esik a HAR-reakciónak. A közelmúltban jelentős előrehaladás történt a HAR immunológiai alapjainak megértésében és kiküszöbölésére számos eljárást dolgoztak ki. Ezek közül a lényegesebbek közé tartozik a jelenleg alkalmazott számos transzgénikus eljárás, ilyen pl. a sertés endothelsejteken megfigyelhető komplementaktivitás szabályozóanyagainak expressziója (5). Megjósolható, hogy hamarosan megvalósul a rövid idejű xenograft-túlélés (6). A HAR leküzdése érdekében végzett kutatások eredményei olyan további immunológiai akadályokra derítettek fényt, amelyek legyőzése elengedhetetlen a hosszú távú xenograft-túlélés eléréséhez. Az immunológiai kilökődés végső folyamataiban az immunválasz humorális és sejtes ágai feltehetően egyaránt szerepet játszanak. Mindezek közül egyértelműen a legfontosabb a HAR domináns szerepéhez képest korábban háttérbe szorult, súlyos következményekkel járó, T-sejt közvetített kilökődési válaszreakció (7-11). Korábban kimutatták, hogy [az allo-felismerés és az allograft kilökődés folyamatából jól ismert (13)] közvetlen és közvetett T-sejt aktivációs reakcióutakon történt szenzitizációjukat követően a humán T-sejtek *in vitro* központi szerepet játszanak a xenogén sejtek felismerésében (7, 8, 12). Az allo-kilökődés

háttérben álló sejtes mechanizmusok ismerete alapvető fontosságú volt a T-sejt közvetített xenograft elleni válaszreakció vizsgálata során.

Az átültetett szervek sejtes kilökődésének megelőzését szolgáló főbb terápiás beavatkozások jelenleg szisztémás immunszuppresszív hatóanyagok valamint pl. CD3, CD4, CD25 elleni monoklonális ellenanyag-terápia (14) alkalmazásán alapulnak. A xenograftok elleni erőteljes *in vitro* T-sejtes válaszreakciók kiváltásáról szóló beszámolók (7, 8, 12) alapján elképzelhető, hogy a xenograft kilökődés meggátlása a jelenlegi standard adagokkal elérhetőnél jóval nagyobb mértékű immunszuppressziót igényel. Xenograftok esetében azonban ez a stratégia nem követhető. Az (immunszuppresszív) hatóanyagok szedésére a beteg egész életén át szükség van, azok a teljes immunrendszert elnyomják, ami fertőzésekkel és daganatképződéssel szembeni fokozott fogékonyságot eredményez (14). A xenotranszplantáció klinikai gyakorlatban történő alkalmazása szempontjából a tolerancia / immunszuppresszió kialakításának graftspecifikus stratégiái egyértelműen előnyösek lennének. Míg mindez az allotranszplantációval kapcsolatban nehezen volt elérhető, a xenotranszplantáció esetében erre több lehetőség nyílhat: a fajok közötti különbségek lehetőséget kínálnak a valóban graftspecifikus hatóanyagok előállítására. Mindemellett lehetőség van mind a sertésdonor szervének, mind a humán recipiens immunrendszerének transzplantáció előtti módosítására (1).



T-sejt aktiválás és proliferáció

Bár a T sejtek proliferációját az antigén-specifikus CD3/TCR komplex (1. jel) megkötése indítja be, ahhoz további kostimulációs jelek szükségesek (2. jel) (15, 16, 17), amelyeket általában az antigénbemutató sejt ("antigen presenting cell", APC) szolgáltatja. Míg a T-sejtek 2. jel jelenlétében történő antigén általi stimulációja a T-sejtek aktiválását és proliferációját idézi elő (18), hiányukban a T-sejtek MHC-komplexekkel történő érintkezése tökéletlen T-sejt proliferációt és ún. klonális anergiát idéz elő (19, 20). Kimutatták, hogy APC-k aldehiddel történő fixálása (20, 21) vagy hőkezelése (19) az MHC-II felületi expresszió mértékének változatlanul hagyása mellett megszünteti ezen sejtek alloreaktív T-sejteket aktiváló képességét. Ez alapján a T-sejt receptorok lekötése önmagában nem elegendő a T-sejt teljeskörű aktiválásához (17). Az anergiás T-sejteket leginkább IL-2 termelésük hiánya jellemzi, valamint az, hogy antigénnel történő későbbi találkozást követően sem képesek IL-2 termelésre (22). Ez a Lafferty és mtsai. által javasolt két jelen alapuló aktiváció meglétét támasztja alá (23). A T-sejtek esetében egy adott antigénstimulációra történő válaszreakcióhoz az APC-től származó többszörös aktivációs jelre van szükség (23).

A másodlagos jel hiányában történő *in vitro* T-sejt anergia kialakításáról először Jenkins és Schwartz számolt be 1984-ben (24), ők egy meghatározott peptid CD4 T-helper klónoknak történő bemutatására kémiaailag fixált APC-t alkalmaztak. Azóta már nagyszámú *in vitro* és *in vivo* adat áll

rendelkezésre annak a hipotézisek az alátámasztására, hogy az 1. jel önmagában nem aktiválja a T-sejteket (22) és a kostimulációs jelhatás elsősorban más sejtekkel és nem oldható faktorokkal történő érintkezés eredménye. A humán MHC-II osztályú molekulákkal transzfektált, de a megfelelő CS-jelet nem expresszáló (2. jel hiányos) fibroblasztok hatékony antigénbemutatásra képesek II. osztályra korlátozott CD4 T-sejt klónok részére, de nem idéznek elő antigénspecifikus T-sejt proliferációt, aminek következtében a sejtek anergiássá válnak. Mindezek alapján az antigénnel történő első találkozásuk körülményei nagy hatással vannak a T-sejtek későbbi immunválasz-képességére.

Ennek megfelelően a T-sejtek aktiválásához és proliferációjához elengedhetetlen kostimuláló molekulák jelenléte, amelyek a T-sejtek felszínén található receptorok és az APC-n expresszált ligandumaik kölcsönhatásából származnak. A kostimulációs jel azonban önmagában sem nem antigénspecifikus, sem nem MHC-korlátozott (25). Az utóbbi években részletesen ismertették a kostimulációt közvetítő molekuláris kölcsönhatásokat. A két fő reakcióútban egyrészt az APC-n expresszált (i) B7-1 és B7-2 (a B7-család tagjai), valamint (ii) CD40, továbbá a T-sejteken expresszált ellenreceptoruk, a CD28 és a CD40 ligandum (CD40L) vesznek részt. Nagyszámú *in vivo* és *in vitro* kísérletes bizonyíték támasztja alá a B7-1, B7-2 és CD40 T-sejt kostimulációban betöltött döntő fontosságú szerepét (26-36). A CD28-B7 és CD40-CD40L jelátadás egyidejű blokkolása allotranszplantáció során meggátolta az allograft kilökődési reakció bein-

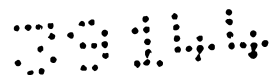


dulását (37, 38). A B7/CD28 reakció *in vivo* gátlása megakadályozta a T-sejtek graft antigénnel szembeni szenzitizálódását, meghosszabbítva ezáltal a graft-túlélés idejét (38,39).

A T-sejtek egy közvetlen és egy közvetett reakcióúton keresztül szenzitizálhatók xenoantigénekkal szemben, ezek a jól ismert, alloantigénekkal szembeni T-sejt aktivációs reakcióutaknak felelnek meg (1. ábra). A közvetlen felismerés során a recipiens T-sejtjeinek fel kell ismerniük a donor stimulátor sejtjein peptiddel komplexet képzett ép idegen MHC-molekulákat. Ezzel szemben a közvetett felismerési folyamat alkalmával a recipiens T-sejteknek recipiens MHC-II-vel összefüggésben történő bemutatás előtt a recipiens APC-knek fel kell dolgozniuk a xenoantigént. A xenoantigénre specifikus saját MHC-II korlátozott T-sejtek felismerik a peptidet és válaszreakciót indítanak el. Míg a legtöbb beszámoló a közvetett xenofelismerési válaszreakcióról született, a közvetlen reakcióúton keresztül megvalósuló sejt-es kilökődési reakcióról is rendelkezésre állnak adatok (7, 8, 9, 11, 12, 40, 41, 42). Sertésszövetek ellen irányuló erőteljes *in vitro* humán T-sejtes proliferatív válaszreakcióról többek között mi is beszámoltunk már.

Kostimulátor molekulák

A kostimulátor molekuláknak a TCR-CD3 receptor MHC-vel és peptidekkel történő reakciójának kimenetelét alapvetően befolyásoló szerepét számos *in vivo* és *in vitro* kísérletes adat támasztja alá. Az immunválasz módosítását célzó egyes gyógyászati eljárásokban a receptorok vagy a ligandumok el-



leni anti-kostimulátor molekulákat alkalmaznak. Ilyen, sejt-tes válaszreakciók graft kilökődés megakadályozása érdekében történő módosítását alkalmazó eljárásokat már számos transzplantációs modell-rendszerben vizsgáltak (14, 37, 38, 43-47).

A B7-1 (B7-BB1, CD80) és a B7-2 (CD86) egyaránt nagymértékben glikozilált transzmembrán proteinek, amelyek az immunglobulinok szupercsaládjába tartoznak (25). A B-sejt aktiváló B7-1 molekulát először 1989-ben azonosították (27), a B7-2-t 1993-ban írták le (49). Napjainkra már mind a humán B7-1 és B7-2 molekulák, mind egérbeli homológjaik klónozására és funkcionális jellemzőik meghatározására sor került (25). A B7-1 és B7-2 a lépbeli és vérbeli dendritikus sejteken konstitutívan expresszáltak, aktiválás hatására pedig B-sejteken és monocitákon is megjelennek (34, 50). A nagymértékű homológiát mutató B7-1 és 2 a CD28 jelű T-sejt antigén természetes ligandumai (50). A B7 molekulacsalád tagjainak egy másik receptora a citotoxikus T-limfocita antigén 4 ("cytotoxic T lymphocyte antigen-4", CTLA-4) nevű sejtfelszíni glikoprotein (51), amely homológ a CD28-cal és azzal 31%-os szekvencia-azonosságot mutat. Mindkét B7 izoalak nagyobb affinitással kötődik a CTLA-4-hez, mint a CD28-hoz (30, 50, 52). Míg a CD28-B7 receptor aktiválódás *in vivo* és *in vitro* egyaránt az antigénspecifikus IL-2 termelésben szerepet játszó, APC-eredetű kostimulációs jelet eredményez (53 54), a CTLA-4 a T-sejt aktiválódás negatív szabályozómolekulájának tűnik (55, 56, 57). A CTLA-4 elleni ellenanyagok okozta keresztkötés gátolja a CD28 kötődését

(58), emellett a CTLA-4-törölt egerek életük első néhány hetében szabályozatlan limfocita-proliferáció következtében elpusztulnak (59). Mindezek alapján a CTLA-4 kötődés az immunválasz-reakciók fenntartása és szabályozása szempontjából alapvető jelentőségűnek tekinthető. Az ennek alapját képező mechanizmusok pontos tisztázására azonban még nem került sor.

A kostimulátor molekulák között a B7-család egyedinek számít abból a szempontból, hogy a CD28 B7-1-gyel vagy B7-2-vel történő kötődése az anergia megelőzésének egyaránt szükséges és elegendő feltétele (34). Ismereteink szerint a CD28-B7 kölcsönhatás az aktivált T-sejtek proliferációjának fenntartásához alapvető fontosságú jeleket biztosít. Ezt a megfigyelést támasztják alá azok az *in vitro* kísérletek, amelyek szerint míg a B7 hiányos sejtek nem képesek elsődleges MLR stimulálására, a nagy mennyiségű B7-et expresszáló transzfektánsok képessé váltak alloreaktív T-sejtek IL-2 termelésének stimulálására valamint az immobilizált CD3-ellenes monoklonális ellenanyaggal együtt tenyésztett poliklonális T-sejt populáció kostimulálására (31). NIH-3T3 sejtek HLA-DR7-tel, B7-tel vagy mindkettővel történt stabil transzfekciójával kapott mesterséges APC-vel végzett kísérletekben egyértelműen bebizonyosodott, hogy tetanusz toxoid (TT) bemutatását követően csak akkor alakul ki optimális mértékű T-sejt proliferáció és IL-2 termelés, ha mindkét molekula jelen van. A B7 hiánya klonális anergiát eredményez (58).

A sertés B7-2 (PoB7-2) klónozására aortából származó endothelsejtekből került sor (60). A sertés B7-2-vel végzett átmeneti transzfekció hatására a humán köldökszínór eredetű endothelsejtek erőteljesen kostimulálták a humán T-sejtek IL-2 termelését. A humán T-sejtek poB7-2-vel történő kostimulálása megegyező hatékonyságúnak bizonyult a humán B7-1 vagy B7-2 hatására kialakulóval és huCTLA4Ig-vel specifikusan gátolható volt. Mindezek alapján a poB7-2 jelentős mértékben hozzájárul a sertés endothelium immunogén hatásához (60).

Bár a B7-1 és B7-2 közvetítette kölcsönhatások központi jelentőségű helyet foglalnak el a T-sejt specifikus immunitás kialakulásában, léteznek egyéb lényeges kostimulációs reakcióutak is. Ezek közül a legfontosabb a CD40 és CD40 ligandum (CD40L) kölcsönhatáson alapul (34).

A CD40 a TNF-receptor szupercsaládba tartozó, 50 kDa tömegű felületi glikoprotein. A CD40 különféle APC-ken, többek között monocitákon, dendritikus sejteken és aktivált makrofágokon expresszálódik. További sejttípusok, így pl. az endothelium is expresszálja a CD40-et (34). Ellenreceptora, a CD40L (CD154, gp39, TRAP) egy 33 kDa-os, II. típusú integrált membránprotein (34, 36), amely átmenetileg expresszálódik az aktivált CD4 T-sejteken. Kimutatták, hogy a CD40-CD40L kölcsönhatás egyaránt lényeges feladatot tölt be a sejtes és humorális immunválasz kialakításában, a B-sejt aktiválásban pedig domináns szerepe van. A CD40 B-sejtek felszínén történő keresztkötése alapvető fontosságú a B-sejtek növekedéséhez és izotípus-váltásához, de emellett a

B7-expresszió fokozását is előidézi (50). A CD40 jelátadást követően a monociták és dendritikus sejtek B7-expressziójának (így APC-kapacitásának) mértéke egyértelműen fokozódik. A CD40-törölt egerekkel kapcsolatos kísérleti adatok alapján a CD40 megkötését követő CD40L jelátadás lényeges szerepet tölt be a T-sejt aktiválásban (61). Az egér eredetű, P815 jelű mastocytoma sejtek CD40-nel (vagy B7-1-gyel) történő transzfekciója képessé tette a korábban stimulációra képtelen P185-ös sejteket a poliklonális T-sejt aktiváláshoz és citokinek előállításához szükséges kostimuláció közvetítésére (34). A CD40-CD40L kölcsönhatás lényeges szerepet tölt be az allograft kilökődésben is (62, 63).

A nyugalmi állapotban lévő B-sejtek aktivációjukig általában nem expresszálnak nagy mennyiségben B7-1-et / B7-2-t (50). Az MHC-peptid/TCR és CD40-CD40L egyidejű hatására bekövetkező B-sejt aktiválódás a B-sejteken található B7-család tagjai expressziójának fokozódásához vezet, ami elősegíti a T-sejtek stimulációját és következményes aktiválását (34, 36). Ennek megfelelően a CD40-CD40L kölcsönhatás a B7-molekulacsalád és feltehetően egyéb kostimulátor molekulák expressziójának indukálásán keresztül befolyásolja a kostimulátor aktivitást, központi szerepet játszva ezzel a T-sejt aktiválásban. A CD40 és B7 egyértelműen szinergista kapcsolata mindkét kostimulációs reakcióút T-sejt függő immunválasz kialakításában és felerősítésében betöltött szerepét támasztja alá (38). Kimutatták továbbá, hogy a CD40-CD40L kölcsönhatás a dendritikus sejtek funkcionális állapotának módosításán keresztül lényeges szerepet tölt be a

citotoxikus T-limfocita (CTL) válaszreakciókban is (64, 65, 66).

Kiterjedt kutatások eredményei bizonyítják a B7-CD28 és/vagy CD40-CD40L kölcsönhatás gátlásának fontosságát az allo- és xenotranszplantáció során. Ezt egyértelműen alátámasztó adatokat nyertek pl. CTLA4Ig CD28-B7 jelátadás gátlása történő alkalmazásával, ami patkány szív allograft (44, 45) és egér aorta allograft (43) modellben meghosszabbodott graft túlélést eredményezett és megakadályozta az idült kilökődési reakciót. Ezekben a modellekben a CTLA4Ig beadására bekövetkező T-sejt anergia a graft antigénnel szembeni részleges (44) vagy teljes (46) toleranciát eredményezett. Allogén hasnyálmirigysziget-transzplantátumok B7-2 és B7-1 elleni ellenanyaggal történt kezelése is megátolta a transzplantátum kilökődését (14). Egér szív allotranszplantátum modellben a CD40 jelátadás gátlásával hasonló eredményeket kaptak (37, 47, 62). A CD28-B7 és CD40-CD40L jelátadás egyidejű gátlását megvalósító két kísérletben sikeresen előzték meg az allogén kilökődést. Mindkét reakcióút párhuzamos, hosszú távú gátlása egér valamint bőr és szív allograft modellekben teljes mértékben megakadályozta az idült kilökődési reakció kialakulását (38).

Xenotranszplantációs kísérleteikben Lenschow és mtsai. egérbe transzplantált humán hasnyálmirigyszigetekkel szemben egyidejű CTLA4Ig-kezelés mellett hosszú távú donorspecifikus toleranciát értek el (46). A graftspecifikus tolerancia a B7-et expresszáló APC-k általi felismerés gátlásának közvetlen következménye volt. Tran és mtsai. CTLA4-Fc-

kezeléssel rövid távú szuppressziót értek el (67). Mindkét reakcióút xenotranszplantáció során történő egyidejű gátlásával kapcsolatban csupán kisszámú kísérleti adat áll rendelkezésre, egyes kutatók egér recipiensbe transzplantált patkány- és sertésbőr meghosszabbodott túléléséről számoltak be (63).

In vitro és *in vivo* kísérletes adatok egyaránt egyértelműen bizonyítják, hogy a CD28-B7 vagy a CD40-CD40L vagy mindkét reakcióút által közvetített kölcsönhatások gátlása megakadályozta a T-sejtek beültetett szövetbeli xeno- vagy alloantigénekkal szembeni szenzitizálódását, így meghosszabbította a graft túlélését.

Amint azt korábban említettük, a T-sejtek közvetítette graft-kilökődés jól ismert jelenség. Az immunrendszer emellett azonban más vagy további sejt-közvetítette kilökődési reakciók megindítására is képes. Ezek a mechanizmusok a többek között az endothelsejtek által expresszált különféle molekulák funkcióin keresztül ismerhetők meg közelebbről. Ilyen, endothelsejtek által expresszált sejtadhéziós molekula pl. a VCAM, amely feltételezhetően a gyulladás helyére történő leukocita-toborzásban játszik szerepet. A VCAM indukálható transzmembrán glikoprotein, amely nyugalomban lévő endothelsejtekben csupán kis mennyiségben expresszálódik, de gyulladásokeltő citokinek (pl. IL-1, TNF α) hatására expressziója gyorsan fokozódik. A VCAM és a leukociták közötti kölcsönhatás az utóbbiak sejtfelszínén expresszált ún. 4-es nagyon késői antigénen keresztül ("very late antigen 4", VLA-4) jön létre. Az endothelsejtek VCAM-ex-

pressziója a VLA-4-gyel rendelkező leukociták gyulladás helyszínére történő beáramlását idézi elő, ami erősíti az allo- vagy xenograftokkal szembeni kilökődési válaszreakciót.

Feltételezik, hogy a sertés VCAM lényeges szerepet játszik a humán leukociták egyrétegű sertés endothelsejtenyészeteken keresztül történő vándorlásának lehetővé tételében. Ésszerűnek tűnik az elképzelés, hogy ennek a kölcsönhatásnak a gátlása előnyös hatású lehet a xenograftok túlélésére. Az először 1994-ben klónozott sertés VCAM lényeges mértékű azonosságot mutat a humán VCAM-mel (1). Az előbb említett referencia mellett számos egyéb *in vitro* kísérlet eredményei is arra utalnak, hogy a sertés VCAM hatékony kölcsönhatásba lép a humán leukocita-expressziós ellenreceptorral, a VLA-4-gyel. Például statikus adhézión vizsgálati eljárásokban a VCAM-ellenes ellenanyagok jelentős mértékben gátolják a humán NK- és T-sejtek sertés endotheliumhoz kötődését. NK-sejtek esetében ez meggátolja az egyrétegű sertés endothelsejtenyészetekhez történő adhézión következtében általában bekövetkező sejtlízist.

A VCAM-ellenes ellenanyagok T-sejt közvetített xenograft-kilökődési folyamatokra gyakorolt hatását nehezebb feladat megjósolni. Rágcsálókat alkalmazó allotranszplantációs modellkísérletekben az allograft-túlélés meghosszabbítása céljából VCAM-elleni ellenanyagokat vettek igénybe. Bizonyos esetekben hosszú távú túlélésről és specifikus toleranciáról számoltak be (2, 3), bár ezen kísérletek pontos hatásmechanizmusát nem tisztázták.



Peptid-immunizációs stratégia

Korábbi, immunogénként hordozómolekulákkal konjugált szintetikus peptideket alkalmazó *in vivo* kísérletekben sikeresen állítottak elő biológiailag aktív ellenanyagokat (68). Ma már a különféle peptid-immunizációs stratégiáknak kiterjedt szakirodalma van, amely alapján jól ismert a hordozómolekulához kötött antigén-bemutató ellenanyag-termelést fokozó hatása (68-72). Ez alapján megfelelő T-sejt epitópokkal B-sejteket segítő T-sejtek indukálhatók. Nemrégiben közzétett kutatási adatok hordozómolekulához kovalens kötéssel kapcsolt saját antigénnel történt immunizálás hatására saját anyagokkal szemben reagáló B-sejtek IgG-termeléséről számoltak be (70). Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a saját proteinekkel szembeni B-sejt tolerancia megszüntethető.

Amint azt korábban említettük, a T-sejtek antigénfelismeréséhez a (saját vagy idegen) antigének APC-k általi feldolgozása és bemutatása szükséges. Az antigén IgG-receptorokon keresztül történő endocitózist követően a B-sejtek kifejezetten hatékony APC-ként működhetnek. Komplet aktivációs jelsorozat (TCR-aktiválás plusz kostimuláció) meglétekor T-sejt aktiválódás következik be, ami végül ellenanyag-képződéshez vezet.

A saját proteinekből származó peptidek feldolgozására és T-sejteknek történő bemutatására az idegen proteinekéhez hasonló módon kerül sor, a T-sejt tolerancia miatt azonban a saját peptidek rendszerint nem váltanak ki T-sejt aktiválódást (70). A T-sejtes felismerés hiánya részben magyará-



zattal szolgálhat tehát a potenciálisan reakcióképes B-sejtek reagálásának elmaradására.

A B-sejtek saját peptidekkel szembeni reagálóképességének hiánya megszüntethető, ezt Dalum és munkatársainak közelmúltban elvégzett kísérletei igazolták (69). Az említett kutatók hordozóanyag és erőteljes idegen T-sejt epitóp segítségével kialakított kiegészítő T-sejtes segítő hatást előidézve autoellenanyagok képződésével járó válaszreakciót váltottak ki. További kísérletek bebizonyították, hogy a T-sejtes hordozómolekulákhoz konjugált szintetikus peptidek képesek leküzdeni a B-sejtek válaszreakció-képtelenségét ha jelentős számú, saját anyagokkal szemben reagáló B-sejt van jelen a gazdaszervezetben (69, 70). Az ubikvitin szekvenciájába inszertált egyetlen erős idegen T-sejt epitóp az eredeti molekulával szembeni kifejezett autoellenanyag-képződést idézett elő (69). Sad egy kitűnő vizsgálatában saját proteinként GnRH-t és hozzá kémiai úton kapcsolt szintetikus T-sejt epitópként diftéria toxoidot (DT) alkalmazva a természetes GnRH elleni specifitással rendelkező autoellenanyagok képződését váltotta ki (71, 72). A kezdeti vakcinázást követően a természetes GnRH *in vivo* jelenléte fenntartotta az ellenanyag-termelést. Az immunizált egerek természetlenné váltak, mivel a jelenlévő természetes GnRH molekula ellen a specifikus B-sejtek folyamatosan anti-GnRH-ellenanyagokat termeltek. A vizsgálatban a DT hordozó által kiprovokált, GnRH-specifikus B-sejteket segítő T-sejtes válaszreakció a B-sejtes tolerancia áttöréséhez vezetett.

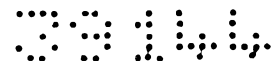


A legtágabban értelmezve a találmány tárgyát egy emlős, előnyösen egy ember xenograft szövet vagy szerv elleni immunreakció okozta kilökődés közvetítésében szerepet játszó, jellemzően, de nem kizárólagosan sertés endothelsejtek által expresszált sertés epitópokkal szemben specifikus ellenanyagok termelődését eredményező immunogénnel történő immunizálása képezi.

Immunogén alatt értünk itt bármely, immunválasz kiváltására képes epitópot vagy epitóp-kombinációt. Az epitóp T- vagy B-sejt specifikus egyaránt lehet. A találmány szerinti megoldásban epitóp lehet bármely polipeptid, peptid, módosított polipeptid vagy módosított peptid (a módosítás jellemzően az epitóp glikozilálását vagy foszforilálását jelentheti).

A találmány tárgyát képező epitópok jellemzően a CD40, a B7-1, a B7-2 és a VCAM elnevezésű, sertés eredetű molekulák közül kerülnek kiválasztásra.

Szakember számára kézenfekvő, hogy a találmány egy egyén, ideális esetben xenotranszplantációt megelőzően végzett, a homológ emlős eredetű polipeptidben nem szereplő B-sejt epitópot tartalmazó sertés molekula egy részletével szembeni, immunogén anyaggal történő immunizálását teszi lehetővé, ami a beteg saját, funkcionálisan megegyező molekulái elleni ellenanyagok képződése és CD4 T-sejtes válaszreakció, vagyis sejtes kilökődési reakció kialakulása nélkül biztosítja a sertés polipeptid elleni ellenanyagok szelektív képződését. Emellett az immunogén hatására a recipiensben blokkoló ellenanyagok képződnek, amelyek meggátol-



ják a kilöködési válaszreakciót közvetítő sertés polipeptidek működését.

Szakember számára az is nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti megoldás lényeges előnyöket biztosít a recipiens immunrendszere sertés sejtekkel vagy szövetekkel szembeni válaszreakciójának elnyomására tett korábbi kísérletekkel szemben. A 97119971 számú nemzetközi szabadalmi irat például a B7-2 vagy VCAM polipeptidek a transzplantációs kilökődés ellenőrzését és a xenotranszplantációs kilöködési reakció meggátlását szolgáló diagnosztikai és terápiás célú ellenanyagok előállítására történő alkalmazását tette közzé. Az előbbi megoldás számos hátránnyal jár. Az ellenanyag blokkoló tulajdonságának megtartása érdekében a VCAM vagy B7-2 elleni ellenanyagokkal egész élete során kezelni kell a transzplantáción átesett beteget. Mindezeken túl az immunrendszer végül (anti-idiotípusos) ellenanyagokat termel a gyógyászati célból alkalmazott ellenanyagokkal szemben, ami azoknak a beteg vérkeringéséből történő eltávolításához vezet.

A találmány szerinti megoldás nem igényel időszakonkénti ismételt beadást, mivel a beteg saját immunrendszere felel a sertés polipeptidekkel szembeni blokkoló ellenanyagok termeléséért. Az immunrendszer ezeket az ellenanyagokat nem ismeri fel idegenként, ennek megfelelően anti-idiotípusos ellenanyagok képződésére sem kerül sor.

A találmány szerinti megoldásban egy idegen T-sejt epitóp alkalmazására kerül sor, ami jelentős mértékben befolyásolja a hordozóanyaghoz kötött molekulákkal szembeni



válaszreakciókat. Ilyen módon a xenotranszplantáció során autoellenanyagok képződésével járó válaszreakció váltható ki sertés polipeptidekkel szemben.

A találmány tárgyát képezi egy T-sejtes immunitással rendelkező állat, ideértve az embert is, xenografttal szembeni toleranciájának fokozására szolgáló eljárás, amely során az állatban a benne kialakuló kilökődési reakció kialakításában szerepet játszó xenomolekula elleni ellenanyag termeltetésére kerül sor az említett xenomolekula egy B-sejt epitópja és egy olyan T-sejt epitóp, amelyre az állat immunis alkotta kiméra peptiddel történő immunizálással.

Ennek megfelelően a közvetlen T-sejtes válaszreakció befolyásolásán keresztül xenograft specifikus tolerancia indukálható transzplantátum recipiensekben a transzplantációt megelőzően a beültetett szövettel szembeni toleranciát fokozó specifikus ellenanyagok képzésének kiméra peptidszerkezetekkel történő stimulálásával.

A kiméra peptidek pl. B7-1, B7-2, CD40 vagy VCAM jelű sertés peptidek szekvenciáihoz konjugáltan egy T-sejt epitópot tartalmaznak. A beültetett szövet jelenléte biztosítja a recipiens B-sejtjei ellenanyag-termelésének folyamatos fenntartását.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy állatfajból (ideértve az embert is) származó T-sejt epitópot és egy második állatfajból származó B-sejt epitópot tartalmazó kiméra peptid, amennyiben az említett állatfajok esetében megvalósítható a második állatfajból az első állatfajba történő xenotranszplantáció.

A találmány tárgyát képezi továbbá az előzőekben ismertetett, egy állat (ideértve az embert is) xenografttal szembeni toleranciáját fokozó kiméra peptid alkalmazása is.

A találmány tárgyát képező immunogén vegyület legalább egy T-sejt epitópot és legalább egy B-sejt epitópot tartalmaz, ahol a B-sejt epitóp a xenograft kilökődésben szerepet játszó sertés polipeptidből, a T-sejt epitóp pedig olyan molekulából származik, amellyel szemben a recipiens már immunitással rendelkezik.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módjában az immunogén vegyület a sertés eredetű CD40, VCAM, CD86 és CD80 molekulák egyikéből származó legalább egy peptidantigént tartalmaz.

A peptidantigén előnyösen sertés CD40-ből származik. Ideális esetben a peptid a sertés CD40 amino-terminális doménjából, vagy legalább az amino-terminális domén azon részéből származik, amely a CD40-et bemutató sertéssejt felületén található. Még inkább ideális esetben a peptidantigén a 22. ábrán bemutatott peptidszekvenciák egyike.

A peptidantigén előnyösen sertés VCAM-ből származik. Ideális esetben a peptid a sertés VCAM amino-terminális doménjából, vagy legalább az amino-terminális domén azon részéből származik, amely a VCAM-et bemutató sertéssejt felületén található. Méginkább ideális esetben a peptidantigén a 24. ábrán bemutatott peptidszekvenciák egyike.

A peptidantigén előnyösen sertés CD86-ből származik. Ideális esetben a peptid a sertés CD86 amino-terminális doménjából, vagy legalább az amino-terminális domén azon

részből származik, amely a CD86-ot bemutató sertéssejt felületén található. Méginkább ideális esetben a peptidantigén a 26. ábrán bemutatott peptidszekvenciák egyike.

A peptidantigén előnyösen 9 aminosavból áll. Méginkább ideális esetben a peptidantigén 10-30 aminosavat tartalmaz.

A találmány tárgyát képezi továbbá bármely, az előzőekben ismertetett találmány szerinti megoldásnak megfelelő immunogén vegyület, amely legalább egy, az immunogén vegyületre adott válaszreakciót fokozó hatóanyagot is tartalmaz.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában ez az említett hatóanyag egy hordozó vagy egy adjuváns.

Szakember számára jól ismert, hogy a hordozóanyagok vagy adjuvánsok hatékonyan vehetők igénybe meghatározott antigének elleni immunválasz fokozására. Az adjuvánsokat vagy az antigénnel keresztkötésben vagy azzal összekapcsolva alkalmazzák, vagy az antigén beadásával egyidejűleg juttatják az állatba. Az immunválasz fokozására alkalmas adjuvánsokat ismertet részletesen a következő munka: Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, 7. fejezet, pp. 141-228, kiad.: Plenum Press, New York (1995). Az immunogén vegyületek tárolására és/vagy beadására számos hordozóanyag, kötőanyag vagy hígítószer áll rendelkezésre. Az immunogén vegyületek liposzómákba zárása például megszokott (de nem kizárólagos) gyakorlat. A liposzómák immunogén és hasonló vegyületek szállítására alkalmas, foszfolipid-alapú hólyagocskák (vesiculumok).

A találmány tárgyát képezi továbbá legalább egy találmány szerinti sertés polipeptid legalább egy szakasza ellen irányuló ellenanyag vagy legalább annak hatékony része.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában az ellenanyag monoklonális ellenanyag vagy legalább annak hatékony része. Ideális esetben az ellenanyag jelzett.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti ellenanyagok igénybevehetők a sertés szövetekben vagy szervekben megtalálható sertés polipeptidek expressziójának ellenőrzésére.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy xenograft recipiens emlős immunállapotának ellenőrzésére szolgáló eljárás. Az ellenőrzés előnyösen *in vitro* történik.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy állat egy xenografttal szembeni toleranciájának fokozására szolgáló, a következő lépésekből álló eljárás:

- (i) a találmány előzőekben ismertetett bármely megvalósítási módja vagy tárgya szerinti legalább egy immunogén vegyület beadása egy állatnak, igény szerint
- (ii) az állat immunogén vegyülettel szembeni immunállapotának ellenőrzése;
- (iii) legalább egy sertésszövet vagy -szerv beültetése az állatba, majd igény szerint
- (iv) az állat sertésszövettel vagy -szervvel szembeni kilökődési válaszreakciójának ellenőrzése.

Egy találmány szerinti előnyös eljárásban az állat ember.

Egy további, találmány szerinti előnyös eljárásban xenograft lehet bármely, erekkel ellátott graft és/vagy immunogén sertéssejt vagy -szövet.

Egy további, találmány szerinti előnyös eljárásban a xenograft sertés hasnyálmirigy-szigetekből áll.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a fenti (ii) pontbeliek megvalósíthatók a kostimulátor molekulák elleni ellenanyagok szérumbeli jelenlétének ellenőrzésével (pl. ELISA-val vagy az említett kostimulátor molekulákat expresszáló sejtek FACS-elemzésével) vagy ehelyett vagy emellett a citolitikus T-sejtek kezelt állat vérében való jelenlétét kimutató hagyományos T-sejtes lízisvizsgálatokkal.

A találmány szerinti kiméra peptid alkalmazásának előnyei abból származnak, hogy szükségtelenné teszi a blokkoló ellenanyagok vagy fúziós proteinek beadását. Emellett a recipiens ellenanyagválaszának kiváltásával elkerülhető a xenogén ellenanyagok vagy fúziós proteinek alkalmazásakor leggyakrabban fellépő probléma, vagyis a beadott reagenssel szembeni immunválasz kialakulása.

Az alábbiakban a következő táblázatokra és ábrákra hivatkozva egy példát ismertetünk a találmány megvalósítási módjai közül.

Az 1. táblázat a humán CD40-ben a homológ sertés CD40-hez képest megfigyelhető nem-homológ régiókat ismerteti.

A 2. táblázat a humán VCAM-ben a homológ sertés VCAM-hez képest megfigyelhető nem-homológ régiókat ismerteti.

A 3. táblázat a humán CD86-ban a homológ sertés CD86-hoz képest megfigyelhető nem-homológ régiókat ismerteti.

Az 1a ábra a közvetlen, az 1b ábra pedig a közvetett xenofelismerés grafikus bemutatását tartalmazza.

A 2. ábra a sertés CD86 nukleinsav-szekvenciáját tartalmazza.

A 3. ábra a sertés mRNS reverz transzkripciójával majd PCR-amplifikációjával nyert sertés CD86 cDNS-szekvenciáját mutatja be.

A 4. ábra a 2. ábrán szereplő cDNS nukleotid-szekvenciája és a közölt sertés CD86 szekvencia összehasonlítását tartalmazza.

Az 5. ábra a 2. ábrán szereplő cDNS nukleotid-szekvenciája és a közölt egér valamint emberi CD86 szekvenciák összehasonlítását tartalmazza.

A 6. ábra a 2. ábrán szereplő cDNS-nek megfelelő transzlált aminosav-szekvencia és a sertés-, az emberi valamint az egér eredetű aminosav-szekvenciák összehasonlítását tartalmazza.

A 7. ábra a sertés B7-1 oligonukleotid láncindítók humán és egér eredetű B7-1 nukleinsav-szekvenciákhoz viszonyított helyzetét mutatja be.

A 8a ábra az emberi, az egér- valamint a szarvasmarha-eredetű CD40 nukleinsav-szekvenciák összehasonlítását tartalmazza, míg a 8b ábra az emberi, az egér- valamint a szarvasmarha-eredetű CD40 aminosav-szekvenciák összehasonlítását mutatja be.

A 9. ábra a sertés CD86-ot (B7-2-t) kódoló vektorral végzett transzfekciót követően a CD86 (B7-2) expresszió FACS-elemzésének eredményét mutatja be.



A 10. ábra a sertés CD86-ot (B7-2-t) kódoló vektorral átmenetileg transzfektált sejtek CD86 (B7-2) expressziója FACS-elemzésének eredményét mutatja be.

A 11. ábra sertés CD86-tal (B7-2-vel) transzfektált sejtek áramlás-citometriai elemzésének eredményét tartalmazza.

A 12. ábra kilenc CD86 (B7-2) eredetű peptid sertés CD86 (B7-2) szekvenciában való elhelyezkedését szemlélteti.

A 13. ábra a teljes ovalbuminnal és az Ova₃₂₃₋₃₃₉ jelű ovalbumin-peptiddel szembeni T-sejt proliferációs válaszreakció összehasonlítását tartalmazza.

A 14a ábra a specifikus B7-2 peptid-elleni és a kontroll ovalbumin-elleni szérum ELISA-val kimutatott differenciált kötődését szemlélteti.

A 14b ábra a B7-2 eredetű 4. és 6. peptidek 4. vagy 6. peptiddel immunizált egerekből származó szérum általi *in vitro* felismerését mutatja be.

A 15a ábra a B7-2 peptid elleni szérum és a kontroll OVA-peptid elleni szérum peptid ELISA-val történő *in vitro* felismerését mutatja be.

A 15b ábra az egérben kialakuló sertés elleni T-sejtes közvetlen válaszreakció 4. és 6. peptidek ellen termelt szérummal történő gátlását, valamint az egér eredetű CD86 általi kostimuláció gátlásának hiányát szemlélteti.

A 16. ábra a B7-2 eredetű 4. peptid elleni szérum és a kontroll OVA-peptid elleni szérum peptid ELISA-val kimutatott differenciált kötődését mutatja be.

A 17a ábra sertés CD86-tal transzfektált P815-ös sejtek 4. peptiddel vagy kontroll OVA-peptiddel szembeni szérummal történt jelzését követően végzett ármalás-citometriai vizsgálatának eredményét szemlélteti.

A 17b ábra sertés CD86-tal transzfektált P815-ös sejtek vagy egér eredetű CD86-tal transzfektált CHO-sejtek 4. vagy 6. peptid ellen egérben termelt szérummal történt jelzését követő FACS-elemzésének eredményét mutatja be.

A 18. ábra hasnyálmirigysziget-sejtek nagy fehér sertésből történő kinyerését mutatja be.

A 19. ábra a kiméra peptiddel történő immunizálás és transzplantációs protokoll vázlatos bemutatása.

A 20 ábra azt szemlélteti, hogy a sertés CD86-elleni antiszérum meghosszabbítja a transzplantált sertés hasnyálmirigysziget-sejtek túlélését.

A 21. ábra a sertés és emberi CD40 aminosav-szekvenciáinak összehasonlítását tartalmazza (az aláhúzott szekvenciák az 1. táblázatban azonosított peptideknek felelnek meg).

A 22. ábra a sertés CD40 transzlált aminosav-szekvenciája (az aláhúzott szekvenciák az 1. táblázatban azonosított peptideknek felelnek meg).

A 23. ábra a sertés és emberi VCAM aminosav-szekvenciáinak összehasonlítását tartalmazza (az aláhúzott szekvenciák a 2. táblázatban azonosított peptideknek felelnek meg).



A 24. ábra a sertés VCAM transzlált aminosav-szekvenciája (az aláhúzott szekvenciák a 2. táblázatban azonosított peptideknek felelnek meg).

A 25. ábra a sertés és emberi CD86 aminosav-szekvenciáinak összehasonlítását tartalmazza (az aláhúzott szekvenciák a 3. táblázatban azonosított peptideknek felelnek meg).

A 26. ábra az emberi CD86 transzlált aminosav-szekvenciája (az aláhúzott szekvenciák a 3. táblázatban azonosított peptideknek felelnek meg).

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány egy megvalósítási módját.

Sertés kostimulátor molekulák klónozása

Sertés B7-2 klónozása

Standard protokoll alkalmazásával primer és transzformált sertéssejtekből RNS-t vontunk ki. Az mRNS-t ezután reverz transzkripciónak vetettük alá, majd a cDNS-ből PCR-rel (35 ciklus 56°C-on 1,5 mM magnézium jelenléte mellett) sertés B7-2-t (poB7-2-t) amplifikáltunk. Az 5' és 3' láncindítókat (GCATGGATCCATGGGACTGAGTAACATTCTCTTTG valamint GCATGTCGACTTAAAAATCTGTAGTACTGTTGTC) a közzétett poB7-2 szekvencia (60) alapján úgy terveztük meg, hogy a kezdő és végkódot átfedjék (2. ábra). Az így kapott 956 bázispáros fragmenst "pbluescript" vektor *Bam*HI és *Sal*I restrikciós helyeibe klónoztuk. A nukleotidszekvenciát standard m13 5' és 3' láncindítók segítségével határoztuk meg. Egy egyedi klón, a CD86(i) szekvenciáját a 3. ábra tartalmazza, a sertés- (4. ábra) valamint az emberi és az egér eredetű B7-2



(5. ábra) közzétett szekvenciáival összehasonlítva. A saját klónunk [CD86(i)] és a közzétett szekvencia között a 3' végnél egy bázis eltérést állapítottunk meg. Ez azonban a poB7-2 expressziója vagy a ligandumához történő kötődés szempontjából valószínűleg nem lényeges különbség. A CD86(i) előjelzett aminosav-szekvenciájának a sertés-, az emberi és az egér eredetű B7-2-nek megfelelő szekvenciákkal történt összehasonlításának eredményét a 6. ábra tartalmazza.

Sertés B7-1 és CD40 klónozása

Fitohemagglutinin (PHA) vagy alkörmös mitogénnel ("poke-weed mitogen", PWM) stimulált sertés PBMC-ből és sertés endothelsejtekből kivont RNS-t alkalmazunk a B7-1 és CD40 kostimulátor molekulákat kódoló cDNS amplifikálására. A szükséges láncindítókat az egér és emberi eredetű szekvenciák (29, 49) összehasonlítása alapján azonosított konzervált régiók alapján terveztük meg. Külső (a kódoló régióon kívül helyeződő) AGACCGTCTTCCTTTAG (3' i), TTGGATCCTCCATGTTATCCC (3' ii), AGCATCTGAAGC (5'); és belső (a kódoló régióon belüli) ATGGATCCTCCATTTTCCAACC (3'), TTGTCGACATCTACTGGC (5') láncindítókat állítottuk elő (7. ábra). A két 3' láncindítóra az emberi és egér eredetű szekvenciák végső kódoló régiójában megfigyelhető lényeges mértékű eltérés miatt volt szükség. A kapott PCR-fragmenseket a korábban leírtak szerint a promoter szekvenciában található *Bam*HI és *Sal*I restriktációs helyek alkalmazásával szubklónozzuk. A szerkezeteket ezután a szekvencia igazolása céljából szekvenáltatjuk.



A CD40 láncindítókat hasonló módon, a közzétett emberi, egér- és szarvasmarha-eredetű CD40-szekvenciák (73, 74, 75) szekvencia homológia alapján történt egymás alá rendezésével terveztük meg (8a és 8b ábra). Az 5' (GGATCCTCACTGTCTCTCCTGCACTGAGATGCGACTCTCCTCTTTGCCGTCCGTCCTC) valamint a 3' (GAATTCATGGTTCTGTTGCCTCTGCAGTG) láncindító-szekvenciák a *Bam*HI és *Eco*RI restrikciós helyeket tartalmazták.

Sertés kostimulátor molekulát expresszáló sejt transzfektánsok előállítása

A poB7-2 [CD869(i)] molekulát a neomicin általi kiválasztást lehetővé tevő markert hordozó *pci.neo* eukarióta expressziós vektorba klónoztuk. Ezt használjuk fel M1 és M1.DR1 transzformált egérsejtek standard kalcium-foszfát precipitációs eljárással történő transzfektálására. A G418-rezisztens, *pci.neo*-t expresszáló sejteket "dynabead" tisztítással szelektáljuk, a nagymértékben expresszáló klónokat pedig korlátozó hígítás módszerével azonosítjuk.

Ezzel az eljárással a Maher és mtsai. által rendelkezésünkre bocsátott poB7-2 DNS-szerkezet (9. ábra) felhasználásával stabil poB7-2 M1 és P815 transzfektánsokat állítottunk elő. Saját CD86(i) szerkezetünk (10. ábra) alkalmazásával M1 és P815 sejteket transzfektáltunk átmenetileg.

A CD86(i)-transzfektált sejteket a következő három vizsgálati eljárásban alkalmaztuk:

(I) a poB7-2 és az emberi B7-1 MHC-korlátozással összefüggő kostimulátor funkciójának összehasonlítása;

(II) specifikus poB7-2 elleni ellenanyagok áramlás-citometriai vizsgálata immunizált egerek szérumban;

(III) poB7-2 ellenes specifikus monoklonális ellenanyagok előállítása.

(I) A poB7-2 vagy poB7-1 a HLA-DR1 emberi MHC-II. osztályú molekulával kapcsolatos, valamint az emberi B7-1 vagy B7-2 DR1-gyel kapcsolatos kostimulációs hatásának megállapítására emberi vagy sertés reszpondereket alkalmazó proliferációs vizsgálati eljárások alapján összehasonlító *in vitro* vizsgálatot végeztünk.

(II) A transzfektált P815-ös sejtek nélkülözhetetlenek a sertés B7-2 elleni ellenanyagok a kiméra peptiddel történő immunizáláson átesett egerek szérumból történő detektálásához. A kontroll vagy poB7-2-transzfektált P815-ös sejtekkel végzett áramlás-citometriai vizsgálat alapján meghatározható a szérumban B7-2-vel szembeni specifitása. A mind a kilenc különböző B7-2 peptid keverékével immunizált C57BL-6 típusú egerekkel végzett előzetes vizsgálatok kimutatták, hogy a B7-2 peptid elleni szérumban előszeretettel kötődik a sertés B7-2-vel transzfektált P815-ös sejtekhez (11a és 11b ábra).

(III) A poB7-2-re specifikus monoklonális ellenanyagot Balb/c egerek poB7-2-t expresszáló P815-ös sejtekkel történő immunizálásával nyerjük. Az immunizált egerek lépsejtjeit NS0 fúziós partnerrel fuzionáltatjuk, a sikeresen fuzionált sejteket HAT-szelekcióval választjuk ki. A poB7-2-vel transzfektált P815-ös sejtek áramlás-citometriai vizsgálatban a tenyészetek felülúszójával történő jelzésével azono-

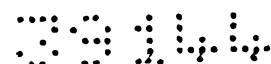


síthatók a monoklonális ellenanyagot termelő sejtek. A sejteket tenyésztjük, majd kinyerjük a tenyésztőközeget és azt G-proteinnel reagáltatva majd ammónium-szulfáttal precipitálva ellenanyag-tisztításnak vetjük alá. A monoklonális ellenanyagok előállítására szolgáló eljárások szakember számára jól ismertek, leírásuk megtalálható többek között a következő publikációban: Harlow és Lane: Antibodies: A Laboratory Manual, kiad.: Cold Spring Harbour Laboratories (1988).

A B7-1 és CD40 elleni monoklonális ellenanyagokat ugyanezen eljárás alkalmazásával állítjuk elő. Ezek a monoklonális ellenanyagok értékes reagenseket jelentenek a CS molekulák megfelelő sertés szövetekbeni expressziójának további vizsgálatai során.

A poB7-2/OVA kiméra peptidszerkezetek tervezése és előállítása

Szintézis céljából kezdetben kilenc különböző, a poB7-2 szekvenciájából származó peptidet jelöltünk ki. Egy B-sejt epitóp előjelzett méretét alapul véve 6-22 aminosavból álló sertés B7-2 peptideket választottunk. A peptideket az OVA₃₂₃₋₃₃₉ jelű T-sejt epitóppal kombináltan szintetizáltuk. A B7-2 peptidek kiválasztására (Paul Travers együttműködésével végzett) 3 dimenziós számítógépes modellezés és a SeqAid II számítógépes programcsomag által előjelzett antigenitási és hidrofilitási tulajdonságaik alapján került sor. Mind a kilenc peptid lineáris epitópot képvisel. A kilenc peptid klónozott poB7-2 szekvencián belüli elhelyezke-



dését a 12. ábrán jelöltük. A szintetikus peptidszekvenciákat az 1. táblázatban ismertetjük.

1. táblázat

Peptid elnevezés	Peptidszekvencia	Helyeződés
1. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRSFDQATWTLR	81-90
2. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRLPCHFTNSQ	32-40
3. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRKGPHGLVPIHQMS	109-121
4. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRGLVPIHQMS	113-121
5. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRVQIKDKGSYQC	94-104
6. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRCSTQGYPEPQR	151-162
8. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRKSQAYFNETGEL	21-32
9. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRASLKSQAYFNET	17-29
10. peptid	ISQAVHAAHAEINEAGRYMGRTSFDQATWT	76-88
OVA-peptid	ISQAVHAAHAEINEAGR	323-329

Az 1-10 jelű peptidek szekvenciái és aminosav-helyeződései a sertés B7-2-ön belüli B7-2 peptidszekvenciára vonatkoznak. Az ova-szekvencia aminosav-helyeződéséből csak az OVA-peptidre vonatkozó részt közöljük. A T-sejt epitóp céljára egy tyúktojás-albuminból (ovalbuminból) származó, 17 aminosavból álló peptidet választottunk ki (OVA₃₂₃₋₃₃₉; ISQAVHAAHAEINEAGR). Az említett epitóp kiválasztását a H-2^b korlátozott T-sejtes válaszreakció kiváltásáról beszámoló közleményekre alapoztuk (76, 77). Kimutattuk,

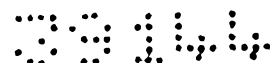
hogy a C57BL-6 (H-2^b haplotípusú) egerek teljes ovalbuminnal történő vakcinázásukat követően az eredeti molekulával és az OVA₃₂₃₋₃₂₉ peptiddel szemben egyaránt képesek proliferatív válaszreakciót indítani (13. ábra). A peptideket peptidszintetizáló berendezéssel (Genosys) állítottuk elő, a nyers peptideket HPLC-vel 70%-ot meghaladó tisztaságig tisztítottuk. Az OVA kontroll peptiddel immunizált egerekből származó szérum ideális esetben nem ismeri fel a 323-339-es szekvenciát, ami arra utal, hogy a T-sejt epitópról hiányzanak a B-sejt determinánsok.

Tolerancia indukció

In vivo tolerancia indukciós stratégia

C57BL-6 egereket CFA-ban ("complete Freund's adjuvant", komplett Freund-adjuváns) lévő teljes ovalbuminnal immunizáltunk, amelyet vagy a kontroll peptiddel (OVA-peptiddel) vagy CS-peptidekkel (OVA-B7-2 szerkezetekkel) három héten át, heti egyszer történő immunizálás követett. Az egerek kiirtásakor vért gyűjtöttünk, amiből standard eljárással szérumot nyertünk. A specifikus egér anti-sertés B7-2 IgG és/vagy IgM ellenanyagok kimutatására az alábbi két eljárás egyikét vettünk igénybe.

A peptidellenes ellenanyagok szérumbeli jelenlétének szkrínelésére peptid ELISA eljárást alkalmaztunk. A tálcák peptidekkel történő bevonását aldehidkötések kialakításával végeztük, lehetővé téve ezzel az ellenanyagok szabad hozzájuk kötődését (78). A tálcákat vagy külön-külön a vizsgált peptidekkel vagy az OVA kontroll peptiddel vontuk be, lehetővé téve az egyes peptidek azonosítását. A szérumminta



poB7-2-transzfektált P815-ös sejtek felszínén expresszált natív B7-2 molekulával szembeni reakcióképességének kimutatása céljából felületi festést követően áramlás-citometriai vizsgálatot végeztünk. A kérdéses (peptid ELISA pozitív és a természetes B7-2-t felismerő) CS peptid azonosítását követően a szérumot az *in vitro* T-sejtes proliferatív válaszreakció gátlására alkalmaztuk. Ezáltal eldönthető, hogy az ellenanyag blokkoló típusú-e vagy sem.

A hasnyálmirigysziget-transzplantációs rendszerrel *in vitro* vizsgálatokat folytatunk. A természetes molekulát felismerő, de a proliferatív válaszreakciót nem gátló ellenanyagok hasznos poliklonális ellenanyag reagensnek minősülnek.

Egy egércsoportot a kilenc B7-2-peptid összevonásával kialakított keverékkel, a másikat OVA kontroll peptiddel immunizáltunk. A begyűjtött szérumot peptid ELISA-val szkríneltük (14a vagy 14b ábra), ami lehetővé tette a kérdéses peptidek azonosítását. A 2., 4. és 6. peptiddel szembeni szérum egyértelműen nagyobb mértékben kötődött a B7 peptidhez, mint az OVA kontrollhoz. A szérum poB7-2-transzfektált sejtekhez is fokozott mértékben kötődött (11. ábra). Az immunizálási protokollban történő alkalmazásra a 4. és 6. peptidet választottuk ki. A 4. vagy 6. peptiddel történt immunizálás egyértelműen jelentős mennyiségű, 4. és 6. peptidre specifikus IgG megjelenését eredményezte a kezelt egerek szérumában (15a és 15b ábra). A 16. ábra a szérumnak az OVA kontrollal ellentétben a 4. peptiddel szemben meglévő specifikusságát szemlélteti. A 4. és 6. peptiddel immu-

nizált egerekből származó szérumnak a sertés B7-2-transzfektált P815-ös sejtek felszínén expresszáldó természetes sertés B7-2 molekulát specifikusan felismerő képességét a 17a és 17b ábrák szemléltetik. A nem transzfektált kontroll P815-ös sejteket nem jelöli meg a 4. vagy 6. peptid ellen termelt szérum, ugyanez figyelhető meg az OVA-peptid elleni szérummal inkubált kontroll vagy transzfektált sejtek esetében. A 2. peptid esetében hasonló protokollt fogunk követni. Az előbbi adatok egyértelműen bizonyítják az eljárás alkalmasságát egy aminosav-szekvencia elleni anti-peptid ellenanyag előállítására hordozó T-sejt epitóp jelenlétében.

Azonos megközelítési módot fogunk követni a sertés CD40 és B7-1 alapján megtervezett peptidekkel, amint az ezeket a molekulákat kódoló DNS-szekvencia ismertté válik.

Hasnyálmirigysziget-xenograft túlélésének meghosszabbítása: funkcionális értékelés

Az érellátással nem rendelkező hasnyálmirigysziget-xenograftok kilökődése kizárólag T-sejt közvetített módon történik (79, 80), ezért ez a beavatkozás ideális rendszert biztosít a T-sejt közvetítette reakciók módosításának tanulmányozásához (18. ábra). A sejtes reakció hasnyálmirigyszigetek kilökődésében játszott szerepét egyértelműen tisztázták, ez a hasonló, allograft-kilökődési válaszreakciónál erősebbnek bizonyult (80). A sertés hasnyálmirigyszigetek egérbe történő beültetése kiforrott, a szakirodalomban jól dokumentált eljárás (80-83). A laboratóriumunkban folytatott kísérletekkel nagy fehér sertésekből származó hasnyál-

mirigyszigetek C57BL-6 egerek veseburka alá ültetésével a streptozotocin intraperitonealis adagolásával előzőleg cukorbeteggé tett egerekben (19., 20. ábra) a hiperglikémia csökkenése volt megfigyelhető (18. ábra). A teljes mértékben működőképes szigetek tisztításához az izolációs eljárás (84, 85) további optimalizálására van szükség. Immunszuppresszió teljes hiányában az átültetett szigetek általában 6-10 napig élnek túl. A közvetlen T-sejtes xenokilőködési reakció módosításának sikere a megfelelő kontrollokkal történő összehasonlítás mellett a szigetek 10. napon túli túlélése alapján bírálható el.

A B7-2-vel mostanáig kapott eredmények alapján egy ismert T-helper epitóphoz konjugált szintetikus B7-2 peptiddekkel sertés B7-2 elleni ellenanyagok állíthatók elő *in vivo*. Ezen ellenanyagok a B7 izoalakok és a CD28 közötti kötőhely ellen alkalmazva, a CD40-CD40L elleni ellenanyagokkal együtt, blokkolhatják a közvetlen sertésszövet ellenes xenoreaktivitással rendelkező emberi T-sejtek kostimulációját, ezáltal a xenotranszplantáció során meghosszabbítják a hasnyálmirigyszigetek túlélését.

A fenti megközelítés alkalmasságának sertés hasnyálmirigysziget egérbe történő átültetésének *in vivo* modelljével történt bizonyítását követően a klinikai kísérletek előtt sertés-főemlős transzplantációs kísérletek végzésére van szükség.

A fenti stratégiák adaptálása klinikai alkalmazás céljára

A klinikai alkalmazáshoz a következő feltételek teljesítésére van szükség:

(i) az OVA-t helyettesítő megfelelő T-sejt epitóp kiválasztása. Erre alkalmas molekulának tűnik a tetanusz toxoid (TT), amelyet emberi immunizációs stratégiákban széles körben alkalmaznak (68, 86). A legtöbb felnőtt tetanusz toxoiddal történt korábbi vakcinázása e stratégia szempontjából további előnyt jelent, mivel vérkeringésükben már memória T-sejtek vannak jelen;

(ii) a recipiens által kialakított specifikus B7-2 elleni T-sejtes válaszreakció hiányában a graft kilökődést felgyorsító, donor (sertés) ellenes B7-2 ellenanyagok jelenlétének kimutatására szolgáló hatékony és gyors szkrínelési eljárás kidolgozása.

Összefoglalás

A fentiekben ismertetett példa a közvetlen sertés ellenes xenoreaktivitással rendelkező emberi T-sejtek sertés sejtek általi kostimulációja gátlásának egy új megközelítését tartalmazza. Tekintettel a kostimulátor molekulák sertés endothelsejteken valamint csontvelőeredetű antigénbemutató sejteken történő expressziójára, a sertésszervek xenotranszplantációja esetében ennek különösen nagy jelentősége van.

A recipienseket a CD80, CD86 és CD40 elnevezésű sertés kostimulátor molekulák szekvenciáihoz konjugált T-sejt epitópot tartalmazó szintetikus hibrid peptidekkel immunizál-

juk. A kostimulátor molekulák emberi sejteken található ellenreceptoraikhoz (CD28 és CD154) történő kötődésében szerepet játszó régiói ellen specifikus ellenanyagok képződését indukáló peptidek emiatt a kostimuláció kialakulásának gátlására alkalmazhatók. Az ellenanyagválasz indukálását követően az átültetett szerv a kostimulátor molekulák expressziójának köszönhetően újra kiváltja ezt a válaszreakciót, annak fenntartásával pedig a kostimuláció blokkolásának egy endogén mechanizmusát biztosítja.

Felhasznált szakirodalom

1. Dorling, A. *et al.* Clinical Xenotransplantation. *Lancet.* (1997). 349:867-71.
2. Cooper, D.K.C. Xenografting: how great is the clinical need. *Xeno.* (1995). 1: 25-26
3. Advisory Group on the Ethics of Xenotransplantation. *Animal Tissue into Humans.* London: Stationery Office, 1997.
4. Nuffield Council on Bioethics. *Animal-to-human transplants.* London: Nuffield Foundation, 1996.
5. van Denderen, B.J. *et al.* Combination of decay-accelerating factor expression and alpha 1,3-galactosyltransferase knockout affords added protection from human complement-mediated injury. *Transplantation.* (1997). 64. 882-888.
6. Thompson, C. Humanised pigs hearts boost xenotransplantation. *Lancet* (1995): 346: 766.
7. Dorling, A. *et al.* Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population. *European Journal of Immunology* (1996): 26: 1378.
8. Dorling, A. *et al.* Cellular xenoresponses: Observation of significant primary indirect human T cell anti-pig xenoresponses using co-stimulator-deficient or SLA class II-negative porcine stimulators. *Xenotransplantation* (1996): 3: 112.
9. Kirk, AD. *et al.* In-vitro analysis of the human anti-porcine T-cell repertoire. *Transplantation Proceedings.* (1992): 24: 602.
10. Murray, AG. *et al.* Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: Direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* (1994): 1: 57.



11. Yamada, K. *et al* . Human anti-porcine xenogeneic T cell response. *The Journal of Immunology*. (1995). 155: 5249-5256.
12. Kumagai-Braesch, M. *et al* . Characteristics of direct and indirect activation of human T cells against allogeneic and porcine xenogeneic cells/peptides. *Xenotransplantation*. (1997). 4 : 85-94.
13. Dorling, A. and Lechler, R.I. The passenger leukocyte, dendritic cell and antigen-presenting cells (APC), In *Transplantation Biology; Cellular and Molecular Aspects*. Eds N. L. Tilney, T. B. Strom and L. C. Paul. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
14. Lenschow, D.J. *et al*. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7.1 antibodies. *Transplantation*. (1995). 60 : 1171-1178.
15. Bretscher, P. and Cohen, M. A theory of self-nonself discrimination. *Science* (1970): 169: 1042.
16. Bretscher, P. The two signal theory of lymphocyte activation twenty one years later. *Immunology Today*. (1992). 13 : 74-76.
17. Mueller, D.L. *et al*. Clonal expansion versus functional clonal inactivation : A costimulatory pathway determines the outcome of T cell receptor occupancy. *Annual Reviews of Immunology*. (1989). 7 : 445-480.
18. Mueller, D.L. *et al*. An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness. *The Journal of Immunology*. 142: 2617-2628.
19. Baird, M.A. Evidence that heat-treated antigen-presenting cells induce hyporesponsiveness in allogeneic T cells. *Transplantation*. (1994): 57: 763.
20. Jenkins, M.K. *et al*. Molecular Events in the induction of a non-responsive state in interleukin 2 producing helper T- Lymphocyte clones. *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1987): 84: 5409.



21. Inaba, K. and Steinman, RM. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *Journal of Experimental Medicine* (1984): 160: 1717.
22. Schwartz, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*. (1990). 248: 1349-1355.
23. Lafferty, K.J. *et al.* Immunobiology of tissue transplantation: A return to the passenger leukocyte concept. *Annual Reviews of Immunology*. (1983): 1: 143.
24. Jenkins, M.K. and Schwartz, R.H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Experimental Medicine*. (1986). 165: 302-319.
25. Schultze, J. *et al.* B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Reviews*. (1996). 10 : 111-127.
26. June, C.H. *et al.* The B7 and CD28 receptor families. *Immunology Today* (1994): 15: 321.
27. Freeman, G.J. *et al.* B7, A new member of the Ig Superfamily with unique expression on activation and neoplastic B cells. *Journal of Immunology*. (1989): 143: 2714.
28. Freeman, G.J. *et al.* Cloning of B7-2: A CTLA-4 counter receptor that co-stimulates human T cell proliferation. *Science* (1993): 262: 909.
29. Azuma, M. *et al.* B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* (1993): 366: 76.
30. Linsley, P.S. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB1. *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1990): 87: 5031.
31. Norton, S.D. *et al.* The CD28 Ligand B7, Enhances IL-2 Production by Providing a Costimulatory Signal to T Cells. *Journal of Immunology* (1992): 149: 1556.



32. Galvin, F. *et al.* Murine B7 antigen provides a sufficient costimulatory signal for antigen-specific and MHC-restricted T cell activation. *Journal of Immunology* (1992): 149: 3802.
33. Boussiotis, V.A. *et al.* Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Science. U S A* (1993): 90: 11059.
34. vanGool, S.W. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple step T cell activation model. (1996). 153: 47-83.
35. Tang, A. *et al.* Blockade of CD40-CD40 ligand pathway induces tolerance in murine contact hypersensitivity. *European Journal of Immunology*. (1997). 27: 3143-3150.
36. Grewal, I.S. and Flavell, R.A. The role of CD40 ligand in costimulation and T cell activation. *Immunological Reviews*. (1996). 153: 86-106.
37. Sun, H. *et al.* Prevention of chronic rejection in mouse aortic allografts by combined treatment with CTLA4Ig and anti-CD40 ligand monoclonal antibody. *Transplantation*. (1997). 64: 1838-1856.
38. Larsen, C.P. *et al.* Longterm acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*. (1996). 381: 434-441.
39. Wecker, H. and Auchincloss, H. Cellular mechanisms of rejection. *Current Opinion in Immunology*. (1992). 4: 561-566.
40. Satake, M. *et al.* Direct activation of human responder T cells by porcine stimulator cells leads to T cell proliferation and cytotoxic T cell development. *Xenotransplantation*. (1996). 3: 198-206.



41. Kirk, A.D. *et al.* The human anti-porcine T cell repertoire. In vitro studies of acquired and innate cellular responsiveness. *Transplantation*. (1993). 55 : 924-931.
42. Alter, B. and Bach, F.H. Cellular basis of the proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens. *Journal of Experimental Medicine*. (1990). 171: 333-338.
43. Baliga, P. *et al.* CTLA4Ig prolongs allograft survival while suppressing cell mediated immunity. *Transplantation* (1994): 58: 1082.
44. Turka, L.A. T cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* (1992): 89: 11102.
45. Lin, H. *et al.* Long term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allograft induced by CTLA4-Ig plus donor specific transfusion. *Journal of Experimental Medicine* (1993). 178: 1801.
46. Lenschow, D.J. *et al.* Long term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4-Ig. *Science*. (1992): 257: 789.
47. Lu, L. *et al.* Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation*. (1997). 64: 1808-1815
48. Fallarino, F. *et al.* B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *Journal of Experimental Medicine*. (1988). 188 : 205-210.
49. Freeman, G.J. *et al.* Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and IL-2 production. *Journal of Experimental Medicine*. (1993). 178: 2185-2192.



50. Jenkins, K.M. and Johnson, J.G. Molecules involved in T-cell costimulation. *Current Opinion in Immunology*. (1993) 5 : 361-367.
51. Brunet, J.F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* (1987). 328: 267.
52. Lenschow, D.J. *et al.* B7 system of T cell costimulation. *Annual Reviews of Immunology*. (1996). 14 : 233-258.
53. Norton, S.D. The CD28 ligand, B7, enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. *The Journal of Immunology*. (1992). 149 : 1556-1561.
54. Linsley, P.S. *et al.* T cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB1. *Proceedings of the National Academy of Science*. (1990). 87 : 5031-5035.
55. Krummel, M.F. *et al.* CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *Journal of Experimental Medicine* (1995): 182: 459.
56. Krummel, M.F. and Allison, J.P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *Journal of Experimental Medicine* (1996): 183: 2533.
57. Walunas, T.L. *et al.* CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* (1996). 183: 2541.
58. Gimmi, C.D. *et al.* Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proceedings of the National Academy Science. U S A* (1993): 90: 6586.
59. Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA4. *Science* (1995): 270: 985.



60. Maher, S.E. *et al.* Porcine endothelial CD86 is a major costimulator of xenogeneic human T cells. *The Journal of Immunology.* (1996). 157: 3838-3844.
61. vanEssen, D. *et al.* CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature.* (1995) 378. 620-623.
62. Larsen, C.P. *et al.* CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. *Transplantation.* (1996). 61: 4-9.
63. Larsen, C.P. and Pearson, T.C. The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance and tolerance. *Current Opinion in Immunology.* (1997). 9: 641-647.
64. Bennet, S.R.M. *et al.* Help for cytotoxic -T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature.* (1998). 393: 478-480.
65. Schoenberger. S.P. *et al.* T cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* (1998) 393: 480-483.
66. Ridge, J. P. *et al.* A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4 T helper and a T-killer cell. *Nature.* (1998) 393: 474-478.
67. Tran, H.M. *et al.* Short-term xeno-suppression of the xeno-immune response with mCTLA4-Fc treatment. *Transplantation.* (1997). 4: 222-227
68. Lise, L.D. *et al.* Enhanced epitopic responses to a synthetic human malarial peptide by preimmunisation with tetanus toxoid carrier. *Infection and Immunity.* (1987). 55: 2658-2661.



69. Dalum, I. *et al.* Breaking of B cell tolerance toward a highly conserved self protein. *The Journal of Immunology*. (1996). 157: 4796-4804.
70. Dalum, I. *et al.* Induction of cross-reactive antibodies against a self-protein by immunisation with a modified self protein containing a foreign T helper epitope. *Molecular Immunology*. (1997). 34: 1113-1120.
71. Sad, S. *et al.* Bypass of carrier induced epitope-specific suppression using a T helper epitope. *Immunology*. (1992). 76: 599-603.
72. Sad, S. *et al.* Carrier induced suppression of the antibody response to a "self"-hapten. *Immunology*. (1991). 74: 223-227.
73. Grimaldi, J.C. *et al.* Genomic structure and chromosomal mapping of the murine CD40 gene. *The Journal of Immunology*. (1992). 149: 3921-3926.
74. Stamenkovic, I. *et al.* A B lymphocyte activation molecule related to the nerve growth receptor and induced by cytokines in carcinomas. *The EMBO Journal*. (1989).8: 1403-1410.
75. Ramesh, N. *et al.* Chromosomal localisation of the gene for human B-cell antigen CD40. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. (1993). 19: 295-298.
76. Shimonkevitz, R. *et al.* Antigen recognition by H-2-restricted T cells. *The Journal of Immunology*. (1984). 133: 2067-2074.
77. Robinson, J. H. *et al.* Palmitic acid conjugation of a protein antigen enhances major histocompatibility complex class II restricted presentation to T cells. *Immunology*. (1992) 76 : 593-598.



78. Elma, E.M.G. *et al.* Direct coating of poly(lys) or acetyl-thio-acetyl peptides to polystyrene: The effects in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical Biochemistry*. (1997). 248: 117-129.
79. Wennberg, L. *et al.* Allogeneic and xenogeneic islets are rejected by different and specific mechanisms: A study in rodents using a mixed allogeneic-xenogeneic islet transplantation model. *Xenotransplantation*. (1997). 4 : 228-234.
80. Mandel, T.E. *et al.* Cellular rejection of fetal pancreas grafts: differences between allo and xenograft rejection. *Xenotransplantation*. (1997) 4: 2-10.
81. Mandel, T. E. *et al.* Transplantation of organ cultured fetal pig pancreas in non-obese diabetic (NOD) mice and primates (*Macaca fascicularis*). *Xenotransplantation*. (1995) 2: 128-132.
82. Lu, X. *et al.* Long-term survival of hamster islet xenografts in mice under short course treatment with non depleting versus depleting anti-CD4 monoclonal antibodies. *Xenotransplantation*. (1998). 5 : 154-163.
83. Marchetti, P. *et al.* Automated large-scale isolation, *in vitro* function and xenotransplantation of porcine islets of langerhans. *Transplantation*. (1991). 52: 209-213.
84. Ricordi, C. *et al.* A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. *Diabetes*. (1986) 35: 649-653.
85. Ricordi, C. *et al.* Isolation of the eulsive pig islet. *Sugery*. (1990). 107: 688-694.
86. Tsang *et al.* . Cloning and expression kinetics of porcine vascular cell adhesion molecule. *BBRC* (1994): 201: 805.

87. Orosz *et al* Treatment with anti vascular cell adhesion molecule -1 monoclonal antibody induces long-term murine cardiac allograft acceptance. Transplantation (1993): 53: 453.
88. Isobe *et al*. Immunosuppression to cardiac allografts and soluble antigens by anti-vascular cellular adhesion molecule -1 and anti-very late antigen -monoclonal antibodies. J. Immunology (1994) 153: 5810.
86. Etlinger, H.M. *et al*. Use of prior vaccinations for the development of new vaccines. Science. (1990). 249: 423-425.

CD86 (B7-2)

Emberi és sertés eredetű CD86 protein-szekvenciákat szekvencia homológia alapján egymás alá rendeztünk és azonosítottuk nem homológ régióikat. Úgy véljük, hogy a peptidszekvenciák az alábbiakban felsorolt régiókból, vagy azok bármely átfedő régiójából fognak származni.

A potenciális ellenanyag-epitópokat tartalmazó, feltehetően érdeklődésre számot tartó peptideket a 75%-osnál kisebb szekvencia-azonosság alapján választottuk ki.

Régió	Helyeződés	Százalékos szekvencia-azonosság
i	18-42	72%
ii	55-73	55%
iii	101-127	63%
iv	136-165	56%

A (iii) és (iv) jelű régiók az egérben azonosított 4. és 6. peptidszekvenciát tartalmazó régiókat foglalják magukba.

CD40

Emberi és sertés eredetű CD40 protein-szekvenciákat szekvencia homológia alapján egymás alá rendeztünk és azonosítottuk nem homológ régióikat. Úgy véljük, hogy a peptidszekvenciák az alábbiakban felsorolt régiókból, vagy azok bármely átfedő régiójából fognak származni.

A potenciális ellenanyag-epitópokat tartalmazó, feltehetően érdeklődésre számot tartó peptideket a 75%-osnál kisebb szekvencia-azonosság alapján választottuk ki.

Régió	Helyeződés	Százalékos szekvencia-azonosság
i	25-48	63%
ii	49-75	74%
iii	93-114	59%
iv	123-139	63%
v	158-176	68%
vi	208-227	45%
vii	231-248	21%

VCAM-1

Emberi és sertés eredetű VCAM-1 protein-szekvenciákat szekvencia homológia alapján egymás alá rendeztünk és azonosítottuk nem homológ régióikat. Úgy véljük, hogy a peptidszekvenciák az alábbiakban felsorolt régiókból, vagy azok bármely átfedő régiójából fognak származni.

A potenciális ellenanyag-epitópokat tartalmazó, feltehetően érdeklődésre számot tartó peptideket a 75%-osnál kisebb szekvencia-azonosság alapján választottuk ki.

Régió	Helyeződés	Százalékos szekvencia-azonosság
i	1-15	44%
ii	16-33	63%
iii	49-65	58%
iv	74-85	42%
v	100-117	50%
vi	122-140	56%
vii	144-157	64%
viii	162-191	47%
ix	209-221	62%
x	290-301	67%
xi	322-342	62%
xii	362-379	67%
xiii	448-465	67%

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. T-sejt epitópot és B-sejt epitópot tartalmazó immunogént magában foglaló immunogén készítmény, amelyben a B-sejt epitóp a xenograft kilökődésben szerepet játszó sertés polipeptid, amely egy sertés polipeptidnek a vele egyenértékű emberi polipeptid megfelelő régiójához képest kevesebb, mint 75%-os szekvencia-azonossággal rendelkező régiójából származik.

2. Az 1. igénypont szerinti immunogén készítmény, amelyben a sertés polipeptid CD40, CD80, CD86 vagy VCAM.

3. A 2. igénypont szerinti immunogén készítmény, amelyben a B-sejt epitóp a 22. ábrán bemutatott peptidek legalább egyike.

4. A 2. igénypont szerinti immunogén készítmény, amelyben a B-sejt epitóp a 24. ábrán bemutatott peptidek legalább egyike.

5. A 2. igénypont szerinti immunogén készítmény, amelyben a B-sejt epitóp a 26. ábrán bemutatott peptidek legalább egyike.

6. A 2. vagy 5. igénypont szerinti immunogén készítmény, amelyben a B-sejt epitóp a CD86 extracelluláris doménjából származik.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény, amelyben a T-sejt epitóp tetanusz toxoidból származik.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény, emlős xenograft recipiens kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására történő alkalmazásra.

9. Sertés polipeptidnek a vele egyenértékű emberi polipeptid megfelelő régiójához képest kevesebb, mint 75%-os szekvencia-azonossággal rendelkező régiójához kapcsolódni képes ellenanyag, emlős xenograft recipiens immunállapotának ellenőrzésére történő alkalmazásra.

10. A 9. igénypont szerinti ellenanyag, amely monoklonális ellenanyag.

11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti ellenanyag, amely legalább egy kimutatást elősegítő jelzőanyaggal módosítva van.

2. oldal leírás
36 oldal rejz

88 oldal



A meghatalmazott:

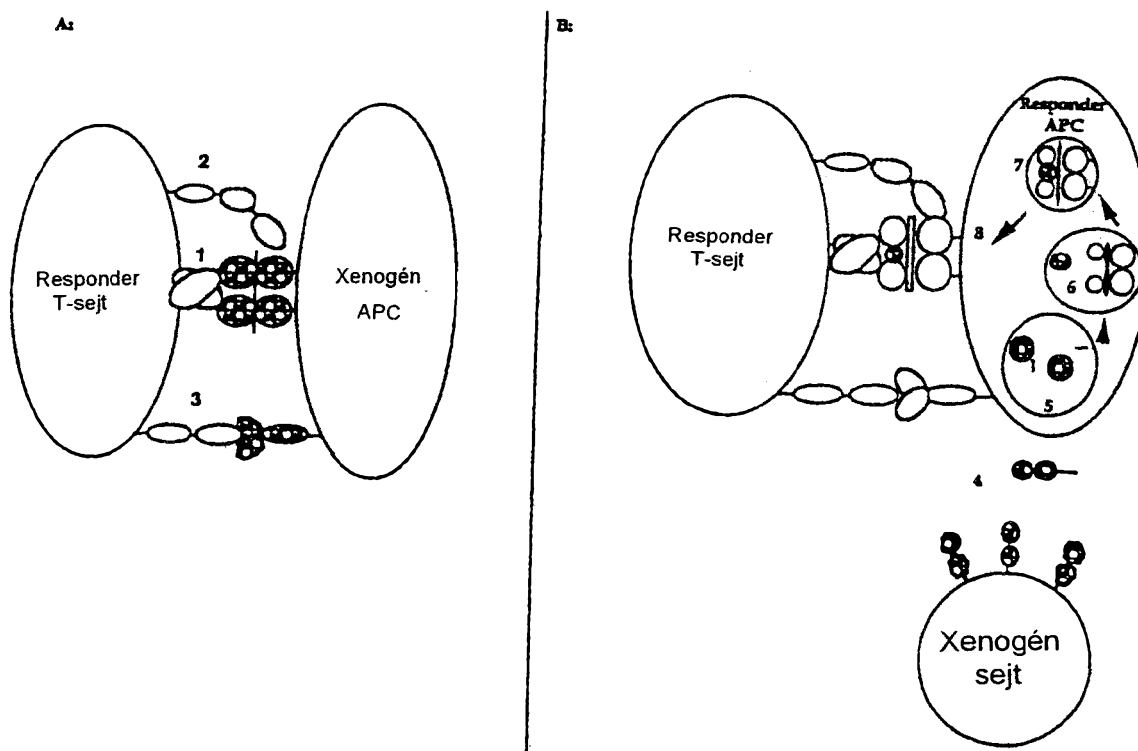
DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő



1. ábra

2. ábra

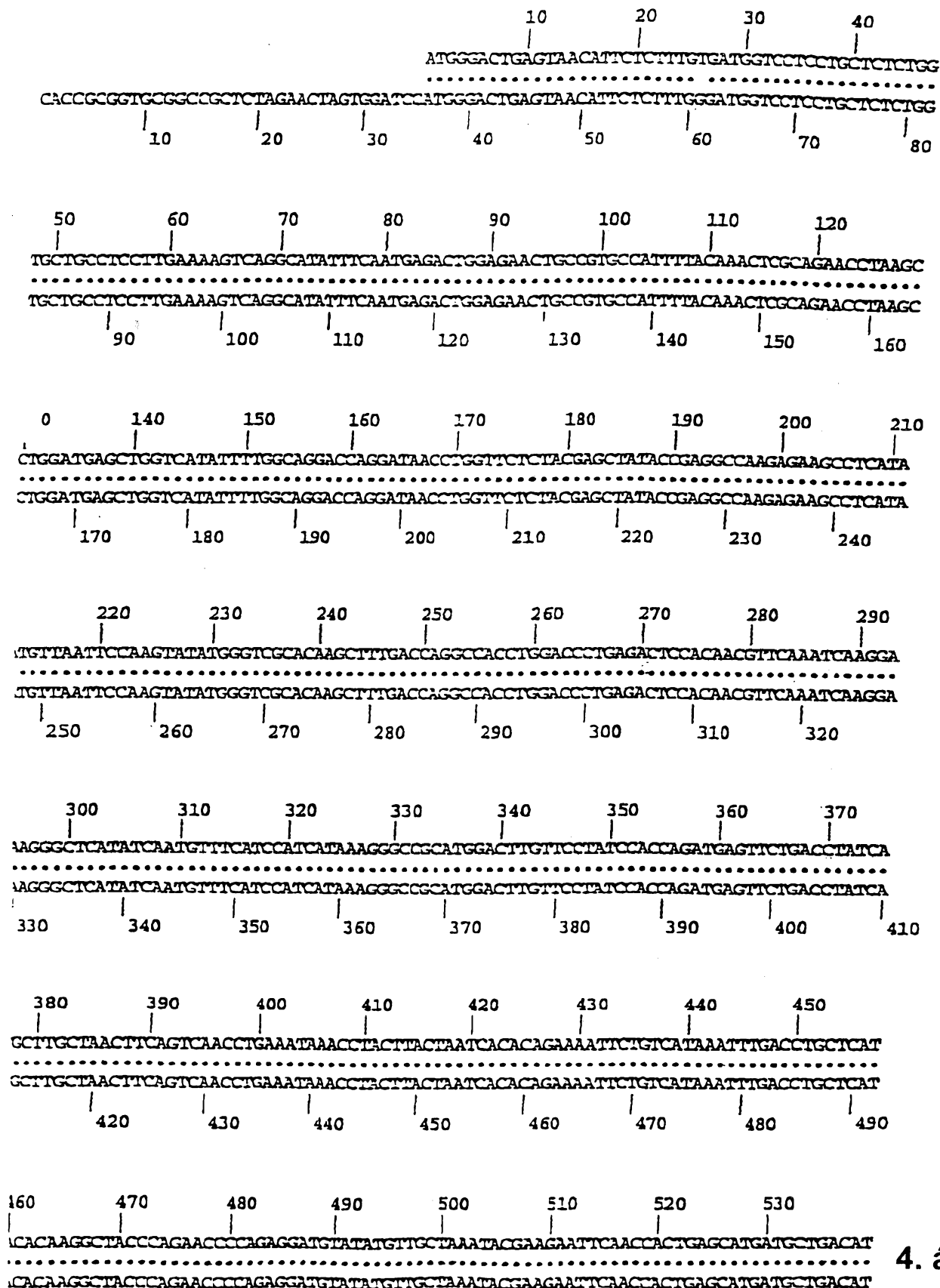
```

1  CACCGCGGTG CGGCCGCTCT AGAACTAGTG GATCCATGGG ACTGAGTAAC
51 ATTCTCTTTG GGATGGTCCT CCTGCTCTCT GGTGCTGCCT CCTTGAAAAG
101 TCAGGCATAT TTCAATGAGA CTGGAGAACT GCCGTGCCAT TTTACAAACT
151 CGCAGAACCT AAGCCTGGAT GAGCTGGTCA TATTTTGGCA GGACCAGGAT
201 AACCTGGTTC TCTACGAGCT ATACCGAGGC CAAGAGAAGC CTCATAATGT
251 TAATTCCAAG TATATGGGTC GCACAAGCTT TGACCAGGCC ACCTGGACCC
301 TGAGACTCCA CAACGTTCAA ATCAAGGACA AGGGCTCATA TCAATGTTTC
351 ATCCATCATA AAGGGCCGCA TGGACTTGTT CCTATCCACC AGATGAGTTC
401 TGACCTATCA GTGCTTGCTA ACTTCAGTCA ACCTGAAATA AACCTACTTA
451 CTAATCACAC AGAAAATTCT GTCATAAATT TGACCTGCTC ATCTACACAA
501 GGCTACCCAG AACCCAGAG GATGTATATG TTGCTAAATA CGAAGAATTC
551 AACCCTGAG CATGATGCTG ACATGAAGAA ATCTCAAAAT AACATCACGG
601 AACTCTACAA TGTATCAATC AGGGTGTCTC TTCCCATCCC TCCCGAGACA
651 AATGTGAGCA TCGTCTGTGT CCTGCAACTT GAGCCAAGCA AGACACTGCT
701 TTTCTCCCTA CCTGTGAATA TAGATGCAAA GCCACCTGTG CAACCCCTG
751 TCCCAGACCA CATCCTCTGG ATTGCAGCTC TACTTGTAAC AGTGGTCGTT
801 GTGTGTGGGA TGGTGTCTT TGTAACACTA AGGAAAAGGA AGAAGAAGCA
851 GCCTGGCCCC TCTAATGAAT GTGGTGAAAC CATCAAAATG AACAGGAAGG
901 CGAGTGAACA AACTAAGAAC AGAGCAGAAG TCCATGAACG ATCTGATGAT
951 GCCCAGTGTG ATGTTAATAT TTTAAAGACA GCCTCAGATG ACAACAGTAC
1001 TACAGATTTT TAAGTCGACC TCGAGGGGGG GCCCGGTACC AGCTTTTGTT

```

3. ábra

A CD86(i) és a sertés CD86 közötti nukleotid-szekvenciájának
összeállítása



4. ábra

540 550 560 570 580 590 600 610 620
GAAGAAATCTCAAATAACATCAGGAACTCTACAATGTATCAATCAGGGTGTCTCTCCCATCCCTCCCGAGACAAATGTG
.....
GAAGAAATCTCAAATAACATCAGGAACTCTACAATGTATCAATCAGGGTGTCTCTCCCATCCCTCCCGAGACAAATGTG
580 590 600 610 620 630 640 650

630 640 650 660 670 680 690 700
AGCATCGTCTGTGTCTGCAACTTGAGCCAAGCAAGACACTGCTTTTCTCCCTACCTTGTAATATAGATGCAAAGCCACCTG
.....
AGCATCGTCTGTGTCTGCAACTTGAGCCAAGCAAGACACTGCTTTTCTCCCTACCTTGTAATATAGATGCAAAGCCACCTG
660 670 680 690 700 710 720 730

710 720 730 740 750 760 770 780
TGCAACCCCTGTCCCAGACCACATCCTCTGGATTGCGCTCTACTTGTAAACAGTGGTGGTGTGTGGGATGGTGTCTCT
.....
TGCAACCCCTGTCCCAGACCACATCCTCTGGATTGCGCTCTACTTGTAAACAGTGGTGGTGTGTGGGATGGTGTCTCT
740 750 760 770 780 790 800 810 820

790 800 810 820 830 840 850 860
TGTAACACTAAGGAAAAGGAAGAAGCAGCCTGGCCCCCTCTAATGAATGTGGTGAACCATCAAAATGAACAGGAAGCG
.....
TGTAACACTAAGGAAAAGGAAGAAGCAGCCTGGCCCCCTCTAATGAATGTGGTGAACCATCAAAATGAACAGGAAGCG
830 840 850 860 870 880 890 900

970 880 890 900 910 920 930 940
GTGAACAACTAAGAACAGAGCAGAAGTCCATGAACGATCTGATGATGCCCAGTGTGATGTTAATATTTTAAAGACAGCCT
.....
GTGAACAACTAAGAACAGAGCAGAAGTCCATGAACGATCTGATGATGCCCAGTGTGATGTTAATATTTTAAAGACAGCCT
910 920 930 940 950 960 970 980

50 960 970 980 990
AGATGCAACAGTACTACAGATTTTAAATTAAGAGTAACTCC
.....
AGATGCAACAGTACTACAGATTTTAAAGTGGACCTCGAGGGGGGGGGTACCAGCTTTTGT
990 1000 1010 1020 1030 1040 1050



Contig
egér B7-2
sertés CD68(j)
emberi B7.2

ACCATGGGACTGAGTAACATTCTCTTTGTGATGGTCTTCCTGCTCTCT
-CCATGGGACTGAGTAACATTCTCTTTGGGATGGTCCCTCCTGCTCTCT
ACCATGGGCTTGGCAATCCTTATCTTTGTGACAGTCTTGCTGATCTCA
ACTATGGGACTGAGTAACATTCTCTTTGTGATGGCCTTCCTGCTCTCT

GGTGCTGCTTCCBTGAAGABTCAAGCTTATTTCAATGAGACTGCAGAHCTGCCGTGCCAATTTA
GGTGCTGCCCTCCTTGAAAAGTCAGGCATATTTCAATGAGACTGGAGAACTGCCGTGCCATTTTA
GATGCTGTTTCCGTGGAGACGCAAGCTTATTTCAATGGGACTGCATATCTGCCGTGCCATTTA
GGTGCTGCTCCTCTGAAGATTCAAGCTTATTTCAATGAGACTGCAGACCTGCCATGCCAATTTG

CAAACCTCTCAAAACCTAAGCCTGAGTGAGCTGGTAGTATTTTGGCAGGACCAGGAAAACCTTGGT
CAAACCTCGCAGAACCTAAGCCTGGATGAGCTGGTCATATTTTGGCAGGACCAGGATAACCTGGT
CAAAGGCTCAAAACATAAGCCTGAGTGAGCTGGTAGTATTTTGGCAGGACCAGCAAAGTTGGT
CAAACCTCTCAAAACCAAGCCTGAGTGAGCTAGTAGTATTTTGGCAGGACCAGGAAAACCTTGGT

TCTGTACGAGCTATACTTAGGCCAAGAGAACTTGATAGTGTAAATCCAAGTATATGGGCCGC
TCTCTACGAGCTATACCGAGGCCAAGAGAACCTCATAATGTTAATTCCAAGTATATGGGTGCG
TCTGTACGAGCACTATTTGGGCCACAGAGAACTTGATAGTGTGAATGCCAAGTACCTGGGCCGC
TCTGAATGAGGTATACTTAGGCCAAGAGAAATTTGACAGTGTTCATTCCAAGTATATGGGCCGC

ACAAGCTTTGACHVGGACAVCTGGACCTGAGACTTCACAATGTTTCAGATCAAGGACAAGGGCT
ACAAGCTTTGACCAGGCCACCTGGACCTGAGACTCCACAACGTTCAATCAAGGACAAGGGCT
ACGAGCTTTGACAGGAACAACCTGGACTCTACGACTTCACAATGTTTCAGATCAAGGACATGGGGCT
ACAAGTTTGTATTGCGACAGTTGGACCTGAGACTTCACAATCTTCAGATCAAGGACAAGGGCT

CGTATCAATGTTTCATCCATCAHAAAVVGCCACAGGAHTDATTBCATCCACCAGATGADTTC
CATATCAATGTTTCATCCATCATAAAGGGCCGCTGGACTTGTTCCTATCCACCAGATGAGTTC
CGTATGATTGTTTTATACAAAAAAGCCACCCACAGGATCAATTATCCTCCAACAGACATTAC
TGTATCAATGTATCATCCATCACAAAAGCCACAGGAATGATTGCGATCCACCAGATGAATTC

TGAAGTGTCAAGTCTTGCTAACTTCAGTCAACCTGAAATAAAACTAVTTHCTAATVTAACAGAA
TGACCTATCAGTCTTGCTAACTTCAGTCAACCTGAAATAAACCTACTTACTAATCACACAGAA
AGAAGTGTCAAGTATGCCAACTTCAGTGAACCTGAAATAAAACTGGCTCAGAATGTAAACAGGA
TGAAGTGTCAAGTCTTGCTAACTTCAGTCAACCTGAAATAGTACCAATTTCTAATATAACAGAA

5. ábra

10 20 30 40 50 60 70 80
CCAAAGAAAAAGTGATTGTGTCATTGCTTTATAGACTGTAAGAAGAGAACATCTCAGAAGTGGAGTCTTACCCCTGAAATCAAA
GAGTTTATACCTCAATAGACT
10 20

90 100 110 120 130 140 150 160
GGATTTAAAGAAAAAGTGGAAATTTTCTTCAGCAAGCTGTGAAACTAAATCCACAACCTTTGGAGACCCAGGAACACCCCTCC
CTTACTAGTTTCTCTTTTTCAGGTTGTGAAACTCAACCTTCAAAGACACTCTGTTCATTCTGTGGACTAATAGGATCATC
30 40 50 60 70 80 90 100

170 180 190 200 210 220 230 240
AATCTCTGTGTGTTTGTAAACATCACTGGAGGGTCTTCTACGTGAGCAATTGGATTGTTCATCAGCCCTGCCTGTTTTCAC
TTTAGCATCTGCCGGGTGGATGCCATCCAGGCTTCTTTTCTACATCTCTGTTTCTCGATTMTTGTGAGCCTAGGAGGTGCC
110 120 130 140 150 160 170 180

250 260 270 280 290 300 310 320
CTGGGAAGTGCCCTGGTCTTACTTGGGTCCAAATGTGTGGCTTTCACTTTTGACCCCTAAGCATCTGAAGCCATGGGCCACAC
TAAGCTCCATTTGGCTCTAGATTCCCTGGCTTTCCCATCATGTTCTCTCAAAGCATCTGAAGCTATGGCTTGCAATTGTCAGTT
190 200 210 220 230 240 250 260

330 340 350 360 370 380 390 400 410
ACGGAGGCAGGGAAACATCACCATCCAAGTGTCATACCTCAATTTCTTTTCAGCTCTTGGTCTGGCTGGTCTTCTCCTCCTC
GATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTCCAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTCTGCTCTTCACAAGTG
270 280 290 300 310 320 330 340 350

420 430 440 450 460 470 480 490
TGTTTCAGGTGTTATCCACGTGACCAAGGAAGTGAAGAAGTGGCAACGCTGTCTGTGGTCACAATGTTTCTGTTGAAGAGC
TCTTCAGATGTTGATGAACAACCTGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCGTTACAACCTCTCCTCATGAAG
360 370 380 390 400 410 420 430

500 510 520 530 540 550 560 570
TGGCACAACCTCGCATCTTACTGGCAAAAGGAGAAGAAATGGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGA
ATGAGTCTGAAGACCGAATCTTACTGGCAAAACATGACAAAGTGGTGCTGTCTGTCTATTGCTGGGAAACTAAAAGTGTGGCC
440 450 460 470 480 490 500 510

Contig
egér B7-2
sertés CD68(i)
emberi B7.2

AATTCTGDCATAAATTTGACCTGCTCATCTAHACAAGGTTACCCAGAACCTAAGAAGATGTATD
AATTCTGTCATAAATTTGACCTGCTCATCTACACAAGGCTACCCAGAACCCAGAGGATGTATA
AATTCTGGCATAAATTTGACCTGCACGTCTAAGCAAGGTCACCCGAAACCTAAGAAGATGTATT
AATGTGTACATAAATTTGACCTGCTCATCTATACACGGTTACCCAGAACCTAAGAAGATGAGTG

TTTTGCTAAVTACNAAGAATTCAACTAHTGAGTATGATGVTAAACATGCAGAAATCTCAAGATAA
TGTTGCTAAATACGAAGAATTCAACCACTGAGCATGATGCTGACATGAAGAAATCTCAAAATAA
TTCTGATACT-----AATTCAACTAATGAGTATGGTGATAACATGCAGATATCACAAGATAA
TTTTGCTAAGAACCAAGAATTCAACTATCGAGTATGATGGTATTATGCAGAAATCTCAAGATAA

TGTCACAGAACTGTACAATGTHTCCATCAGCBTGTCTCTTTCATTCCCTGATGDTACGAGNNAT
CATCAGGAACTCTACAATGTATCAATCAGGGTGTCTCTTCCCATCCCTCCCGAGACAA---AT
TGTCACAGAACTGTTCACTATCTCCAACAGCCTCTCTCTTTCATTCCCGGATGGTGTGTGGCAT
TGTCACAGAACTGTACGACGTTTCCATCAGCTGTCTGTCTTTCATTCCCTGATGTTACGAGCAAT

ATGACCATCGTCTGTGTTCTGGAACTGAGNCAANCAAGACNCGCTTTTCTCCHACCTTTCA
GTGAGCATCGTCTGTGTTCTGCAACTTGAGCCAAGCAAGACACTGCTTTTCTCCCTACCTTGTA
ATGACCGTTGTGTGTTCTGGAAACGGAGTCAATGAAGA-----TTTCTTCAAACCTCTCA
ATGACCATCTTCTGTATTCTGGAACTGA-----CAAGACGCGGCTTTTATCTTCACCTTTCT

ATATAGATCHAGAGBHHCCCTNNNCAACCTCCTNNCCAGACCACATBCNNTGGATTACAGCTBT
ATATAGATGCAAAGCCACCTGTGCAACCCCTGTCCAGACCACATCCTCTGGATTGCAGCTCT
ATTTCACTCAAGAGTTTCC-----ATCTCTCAAACGTATTGGAAG---GAGATTACAGCTTC
CTATAGAGCTTGAGGACCCT---CAGCCTCC---CCAGACCACATTCCTTGGATTACAGCTGT

ACTTNNACAGTGGTCTVTVTVTGTGTGATGGTGTCTNTVTAATTCTATGGAAANNNAAGAAG
ACTGTAAACAGTGGTCTGTGTGTGGGATGGTGTCTTTGTAACTAAGGAAA---AGGAAG
AGTT---ACTGTGGCCCTCCTCTGTGATGCTGCTC---ATCATTGTATG---TCACAAGAAG
ACTTCCAACAG---TTATTATATGTGTGATGGTCTTCTGTCTAATTCTATGGAAATGGAAGAAG

AAGAAGCAGCCTVGCATCTCTAATAAATGTGGNNNAACCAHCAAAATGGAGGGGANGVAGTG
AAGAAGCAGCCTGGCCCCCTCTAATGAATGTGGTGAACCATCAAAATGAACAGGAAGCGGAGTG
CCGAATCAGCCTAGCAGGCCCCAGCAA-----CACAGCCTCTAAGTTAGAGCGGGA---TAGT-
AAGAAGCGGCCCTCGCAACTCTTATAAATGTGG---AACCAACACAATGGAGAGGGAAGAGAGTG

AACANACTAAGAACAGAGAAAAANTCCATNNACCTGAAVGATCTGATGAAGCCCAGNGTGNINT
AACAACTAAGAACAGAGCAGAAGTCCAT-----GAACGATCTGATGATGCCAGTGTGATGT
AACG---CTG---ACAGAGAGA---CTATCAACCTGAAGGAACT--TGAACCCCA-----
AACAGACCAAGAAAAGAGAAAAATCCATATACCTGAAAGATCTGATGAAGCCCAGCGTGTITT

TAANADTTNNAAGACAGCTTCANNNGACAAAAGTNNTACANNTTTTTAADTNNAGAGTNAAGNN
TAATATTTTTAAGACAGCCTCAGATGACAACAGTACTACAGATTTTTTAAGT-----
---AATT-----GCTTCA-----GCAAAA-----CCAAATGCAGAGTGAAG---
TAAAGTTTGAAGACATCTTCATGCGACAAAAGTGATACATGTTTTTAATTAAAGAGTAAAGCC

6. ábra

PCT/GB99/04200

10/36

580 590 600 610 620 630 640 650
 GTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGGGCCCCTCTGACGAGGGCACA

 CGAGTATAAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCTGGGCTGGTCCCTTCAGACCGGGGCACA
 520 530 540 550 560 570 580 590

660 670 680 690 700 710 720 730
 TACGAGTGTGTGTTCTGAAATATGAAAAAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTG

 TACAGCTGTGTGTTCAAAGAAGGAAAGAGGAACGATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTG
 600 610 620 630 640 650 660 670

740 750 760 770 780 790 800 810 820
 ACTTCCCTACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCACCTTCTAATATTAGAAGGATAATTGCTCAACCTCTGGAGGTTT

 ACTTCTCTACCCCAACATACTGAGTCTGGAACCCATCTGCAGACACTAAAGGATTACCTGCTTTGCTTCCGGGGGTTT
 680 690 700 710 720 730 740 750 760

830 840 850 860 870 880 890 900
 TCCAGAGCCTACCTCTCTGGTGGAAAAATGGAGAAGAATTAAATGCCATCAACACAACAGTTCCCAAGATCCTGAAACT

 CCCAAGCCTCGCTCTCTTGGTGGAAAAATGGAAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTCCCAAGGATCCTGAATCT
 770 780 790 800 810 820 830 840

910 920 930 940 950 960 970 980
 GAGCTCTATGCTGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCATATGACAACCAACACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTATGGACATT

 GAATTGTACACCATTAGTAGCCAACCTAGATTTCATATGAGTCTGCAACCAACCATTAAGTGTCTCATTAATATGGAGATG
 850 860 870 880 890 900 910 920

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060
 TAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCAAGCAAGAGCATTTTCTGATAACCTGCTCCCATCCTGGGCCATTAC

 CTCACGTGTCAGAGGACTTCACCTGGGAAAAACCCCAAGACCTCTGATAGCAAGAACAACCTGTGCTCTTTGGGGC
 930 940 950 960 970 980 990 1000

1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CTTAATCTCAGTAAATGGAATTTTGTGATATGCTGCTGACCTACTGCTTTGCCCAAGATGCAGAGAGAGAAGGAGGAAT

 AGGATTCGGCCAGTAATAACAGTCGTGTCATCGTTGTCATCATCAATGCTTCTGTAAGCAAGAAGCTGTTTCAGAAGA
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080

1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230
GAGAGATTGAGAAGGGAAAGTGTACGCCCTGTATAACAGTGTCCGCAGAGCAAGGGGCTGAAAAGATCTGAAGGTAGCCTC
AATGAGGCAAGCAGAGAAACAACAACAGCCTTACCTTCGGGCCTGAAGAAGCATTAGCTGAACAGACCGTCTTCCTTTAGT
1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170

1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310
CGTCATCTCTTCTGGGATACATGGATCGTGGGGATCATGAGGCATTCTCCCTTAACAAATTTAAGCTGTTTACCCACTAC
TCTTCCTCTGTCATGTGGGATACATGGTATTATGTGGCTCATGAGGTACAATCTTCTTTTCAGCACCGTGTAGCTGATCTT
1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250

1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390
CTCACCTTCTTAAAACTCTTTTCAGATTAAGCTGAACAGTTACAAGATGGCTGGCATCCCTCTCTTTCTCCCATATGCA
TCGGACAACCTTGACACAAGATAGAGTTAACTGGAAGAGAAAGCCTTGAATGAGGATTTCTTTCCATCAGGAAGCTACGGGC
1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330

1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
ATTGCTTAATGTAACCTCTTCTTTGCCATGTTCCATTCTGCCATCTTGAATTGCTTGTCTAGCCAATTCATTATCTATT
AAGTTTGCTGGGCCTTTGATTGCTTGATGACTGAAGTGGAAAGGCTGAGCCCACTGTGGGTGGTGTAGCCCTGGGCAGGGG
1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410

1480 1490
AAACACTAATTTGAG
CAGGTGACCCCTGGGTGGTATAAGAAAAAGAGCTGTCACTAAAGGAGAGGTGCCTAGTCTTACTGCAACTTGATATGTCATG
1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490

1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580
TTTGGTTGGTGTCTGTGGGAGGCCTGCCCTTTTCTGAAGAGAAGTGGTGGGAGAGTGGATGGGGTGGGGGAGAGGAAAAGT

1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660
GGGGGAGAGGGCCTGGGAGGAGAGGGAGGGGACGGGTGGGGTGGGGAAAATAATGGTTGGGATGTAAAAACGGATA

[illegible]

8a ábra

Contig ember CD40 szarvasmarha CD40 egér CD40	AGDVTCGGATGAGAGCCCTGGTGGTGATCCCCGTCATGATGGGVATCCTGTTTGCCATCCTCTTGGTG AGGATCGGCTGAGAGCCCTGGTGGTGATCCCCATCATCTTCCGGATCCTGTTTGCCATCCTCTTGGTG AGAGTCGGATGAGGACCCTGGTGGTGATCCCCGTCACGATGGGAGTCTTGTMTGCTGTCTGTGGTA AGTCCCGGATGCGAGCCCTGCTGGTCATTCTGTCTGTATGGGCATCTCATCACCATTTCGGGGTG
Contig ember CD40 szarvasmarha CD40 egér CD40	690 700 710 720 730 740 TTTGTCTDTATCAAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACVGATAANNNGGCCCTVCACCCCTANGGCTNNANG CTGGTCTTTATCAAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAA---GGCCCCCACCCCA-----A TCTGCCTGTATCAGGAACATAACCAAGAAGC-GGCAGCTAA---GGCCCTGCACCCCTATGGCTGAAAG TTTCTCTATATCAAAAAGGTGGTCAAGAAACCAAGGATAATGAGATGTTACCCCTGCGGCTCGACG
Contig ember CD40 szarvasmarha CD40 egér CD40	750 760 770 780 790 800 810 GCAGGATCCCCAGGAGATGANTNNNCCNGAVGATTTTCCCGGCCCCCAACACCGCTGCTCCAGTGCAGG GCAGGAACCCAGGAGATCAATTTTCCCGAGCATCTTCTTGGCTCCAACACTGCTGCTCCAGTGCAGG GCAGGATCCCGTGGAGACGATTGATCCGGAGGATTTTCCCGGCCCCCAAC-CCGCTCTCCGGTGCAG GCAAGATCCCCAGGAGATG-----GAAGATTATCCCGGTCAACACCGCTGCTCCAGTGCAGG
Contig ember CD40 szarvasmarha CD40 egér CD40	820 830 840 850 860 870 880 AGACHTTACACGGGTGTCAGCCGGTCAACCAGGAGGATGGCAAAGAGAGTTCGCATCTCAGTGCAGGAG AGACTTTACATGGATGCCAACCGGTCAACCAGGAGGATGGCAAAGAGAGTTCGCATCTCAGTGCAGGAG AGACCTTATGCTGGTGTGACCCGGTCCGCCAGGAGGACGGCAAAG AGACACTGCACGGGTGTCAGCCTGTACACAGGAGGATGGTAAAGAGAGTTCGCATCTCAGTGCAGGAG
Contig ember CD40 egér CD40	890 900 910 920 930 940 950 CGGCAGGTGACAGACAGCATAGCCTTGAGGCCCTGGTCTGMACCCTGGAACYGCTTTRGRRGYGATG -----AGACAG-----TGAGGC-----TGACCC-----ACC-----CAGGAGTG-TG CGGCAGGTGACAGACAGCATAGCCTTGAGGCCCTGGTCTGAAACCTGGAAGTCTTGGAGGCGATG
Contig ember CD40 egér CD40	960 970 980 990 1000 1010 1020 GCTGCTTGCTGACCTTTGAAGTTTGAGRTGRCGAARACAGAGCCCACTGCAGYTRRCYCTCATGCCT GCCAC-----GTGGGC--AAACAG-----GCAGTTGGCC----- GCTGCTTGCTGACCTTTGAAGTTTGAGATGAGCCAAGACAGAGCCCACTGCAGCTAACTCTCATGCCT

8a-1 ábra

Contig	10 20 30 40 50 60
szarvasmarha CD40 protein	MVRLPLQCLFWGFFLTAVHSEPATACGEKQYPVNSLCCDLCPGQKLVDCTEVSKTECQ
ember CD40 protein	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQVYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETECL
egér CD40 protein	MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVCSDKQYLHDGQCCDLCPGSR L TSHCTALEKTQCH
Contig	70 80 90 100 110 120
szarvasmarha CD40 protein	SCGKGEFLSTWNREKYCHEHRYCNPNLGLRIQSEGT LNTDTICVCVEGQHCTSHTCESCT
ember CD40 protein	PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEGWHCTSEACESCV
egér CD40 protein	PCDSGEFSAQWNRRETRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDTVCTCKEGQHCTSKDCEACA
Contig	130 140 150 160 170 180
szarvasmarha CD40 protein	PHSLCLPGFGVKQIATGLLDIVCEPCPLGFFSNVSSAFEKCHRWTS CERKGLVEQHVGIN
ember CD40 protein	LHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGIN
egér CD40 protein	QHTPCIPGFGVMEMATETTTDVCHPCPVGFFSNQSSLFKCYPWTSCEDIQNLVLQKGT S
Contig	190 200 210 220 230 240
szarvasmarha CD40 protein	KTDVVCQFQSRMRTL VVIPVTMGVLFAVLLVSACIRNITKK-----RQLRPCTL
ember CD40 protein	KTDVVCQPDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKQPTNKAPHP-----KQEPQEI
egér CD40 protein	QTNVICGLKSRMRALLVIPVVMGILITTFGVFLYIKKVVKPKDNEMLP PAARRQDPQEM
Contig	250 260 270 280
szarvasmarha CD40 protein	WLKGRIPWRRL---IRRIFPA---PTRLSGARDLMLVSAGRPGGRQ
ember CD40 protein	NFPDDLPGSNTA AFVQETLHGCQPV TQEDGKESRISVQERQ
egér CD40 protein	---EDYPGHNTA AFVQETLHGCQPV TQEDGKESRISVQERQV TDSIALRPLV

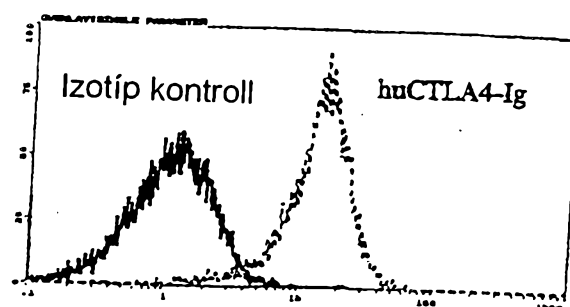
8b ábra

A

Nem transzfektált kontroll sejtek



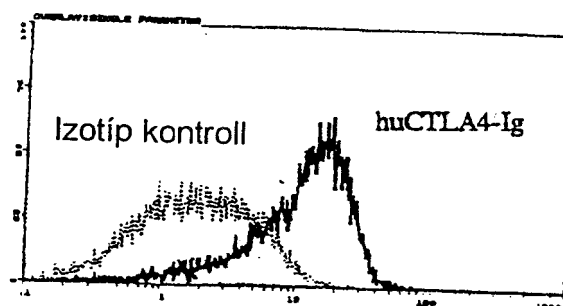
Transzfektált sejtek

**B**

Nem transzfektált kontroll sejtek

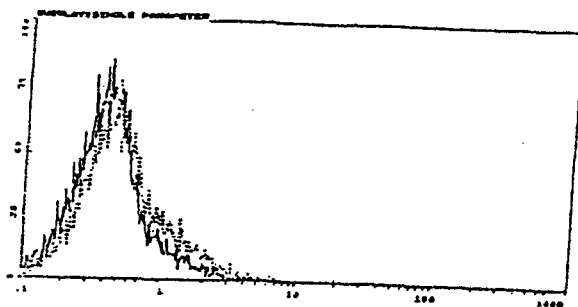


Transzfektált sejtek

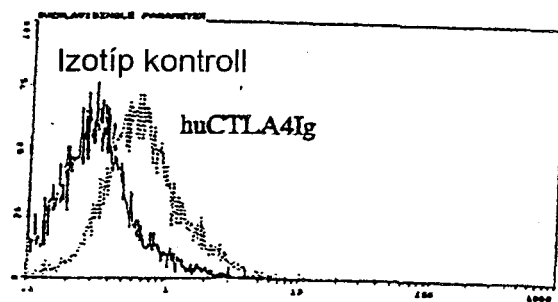


9. ábra

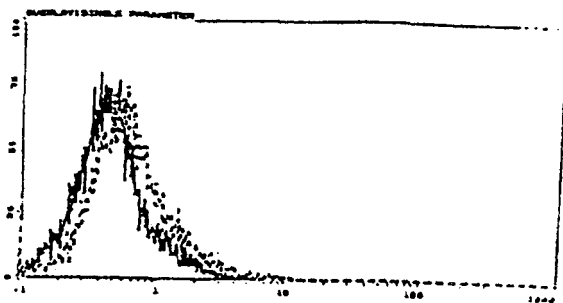
Nem transzfektált kontroll sejtek



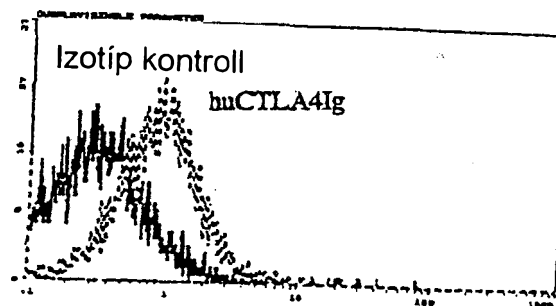
Transzfektált sejtek



Nem transzfektált kontroll sejtek

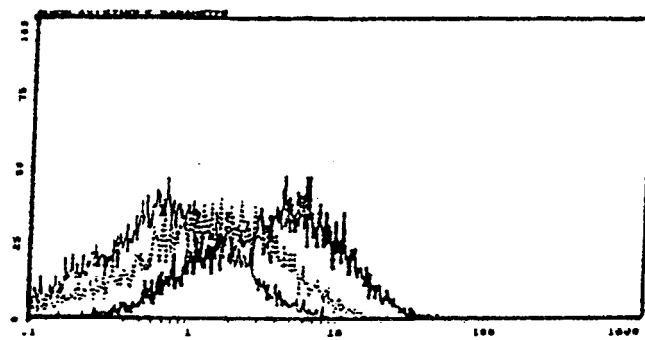


Transzfektált sejtek

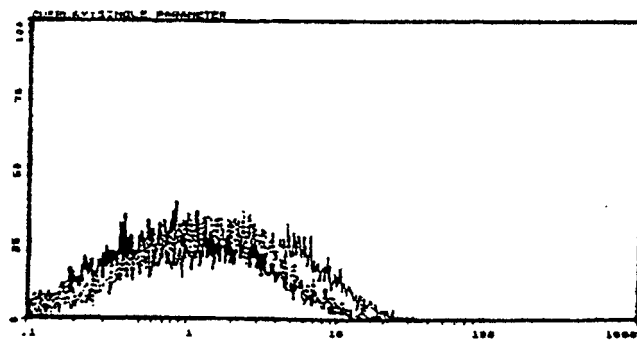


10. ábra

A



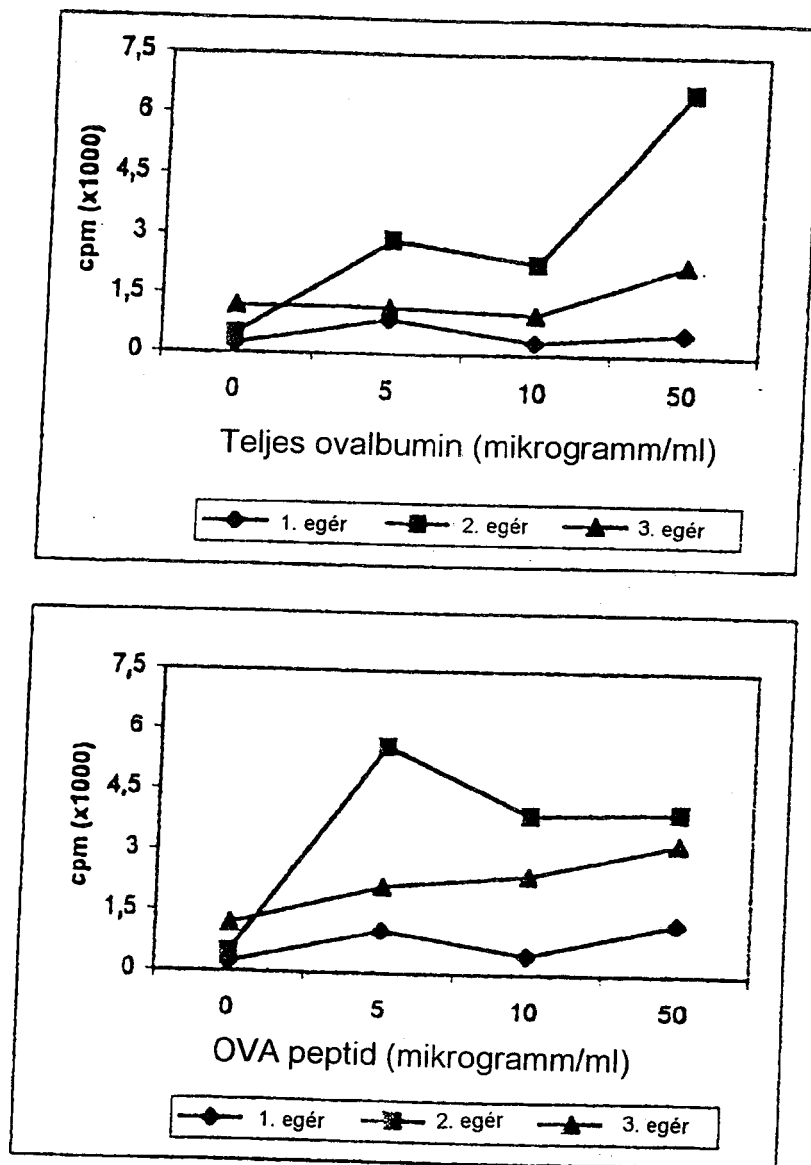
B



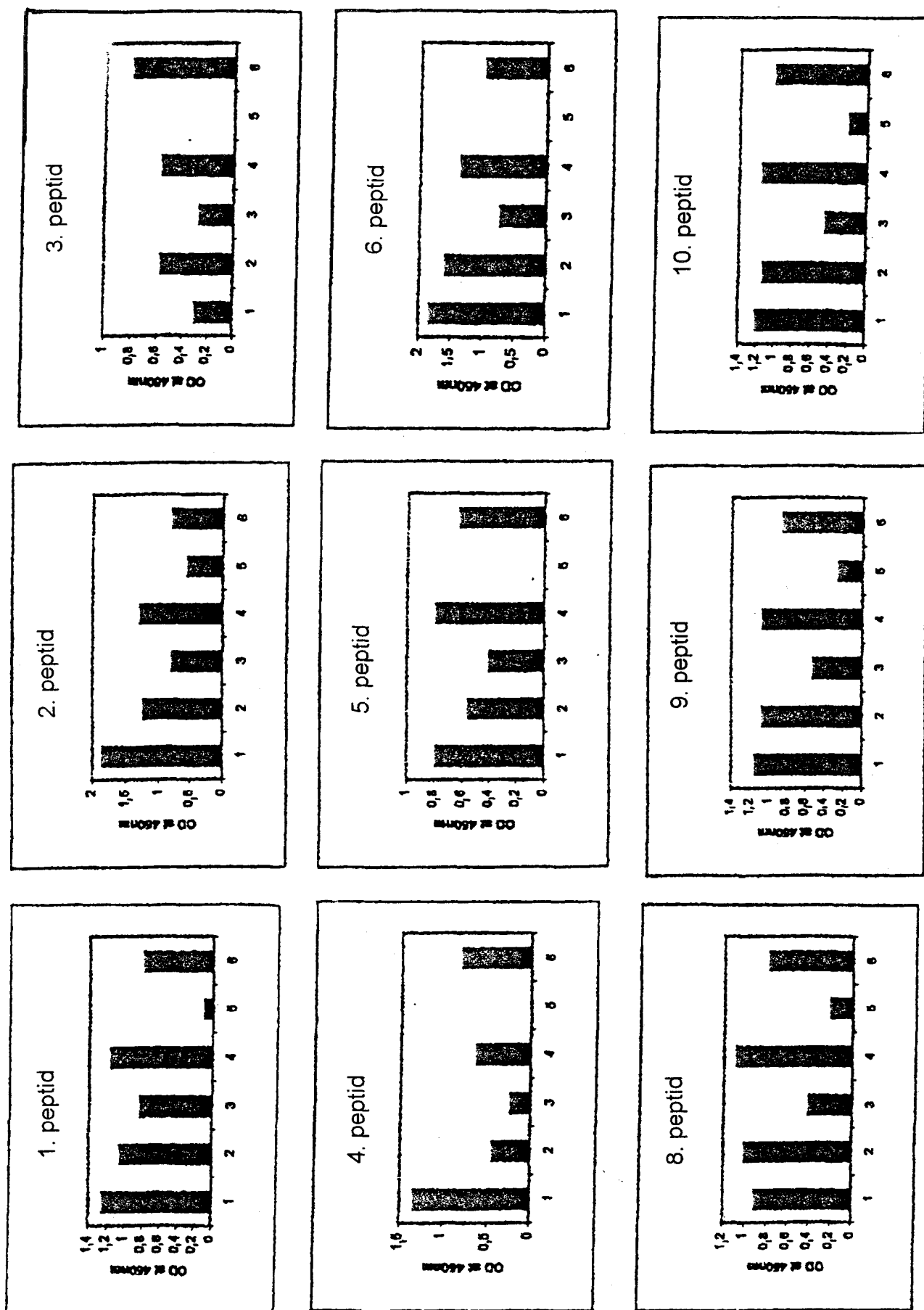
11. ábra

1 MGLSNILFVM VLLLSGAASL KSQAYFNETG ELPCHFTNSQ
 41 NLSLDELVIF WQDQDNLVLY ELYRGQEKPH NVNSKYMGR
 81 SFDQATWTLR LHNVQIKDKG SYQCFHHKG PHGLVPIHQM
 121 SSDLSLLANF SQPEINLLTN HTENSVINLT CSSTQGYPEP
 161 QRMYYMLLNTK NSTTEHDADM KKSQNNITEL YNVSIRVSLP
 201 IPPETNVSV CVLQLEPSKT LLFSLPCNID AKPPVQPPVP
 241 DHILWIAALL VTVVVVCGMV SFVTLRKRKK KQPGPSNECG
 281 ETIKMNRKAS EQTKNRAEVH ERSDDAQCDV NILKTASDDN
 321 STTDF•LKSK L

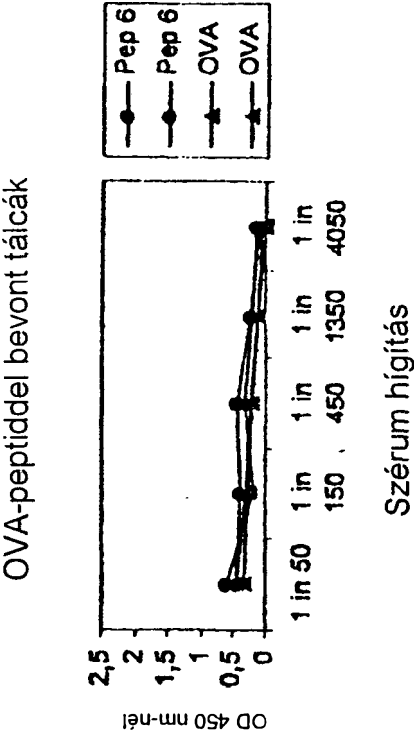
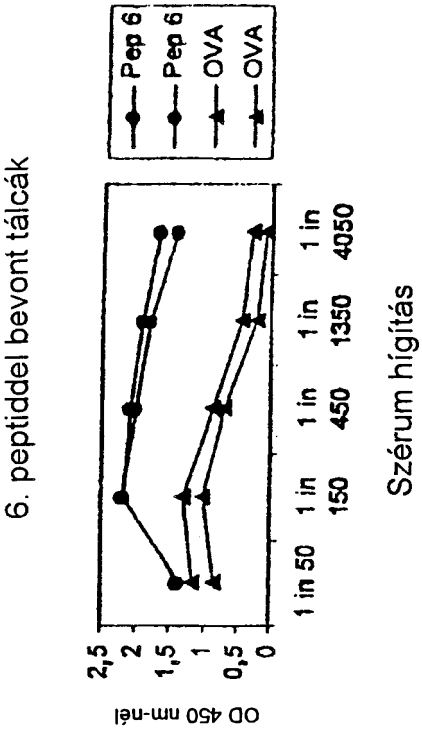
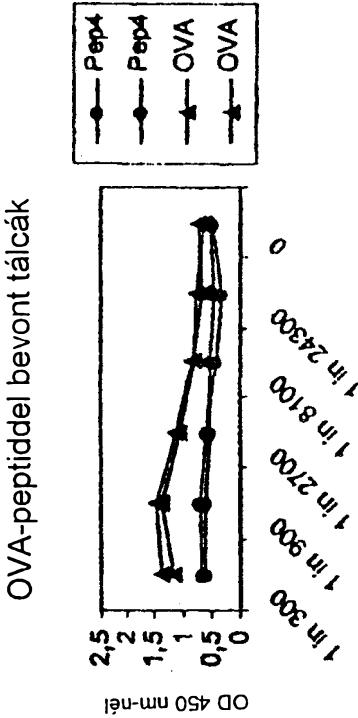
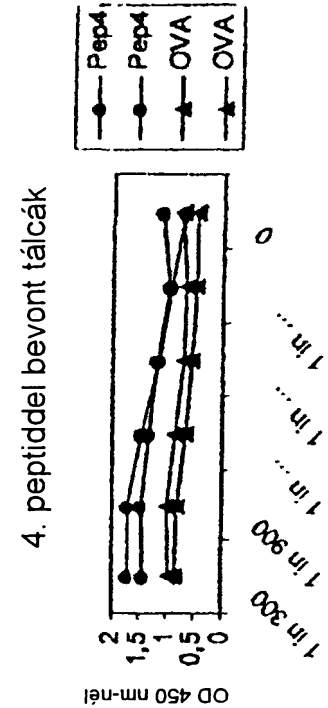
12. ábra



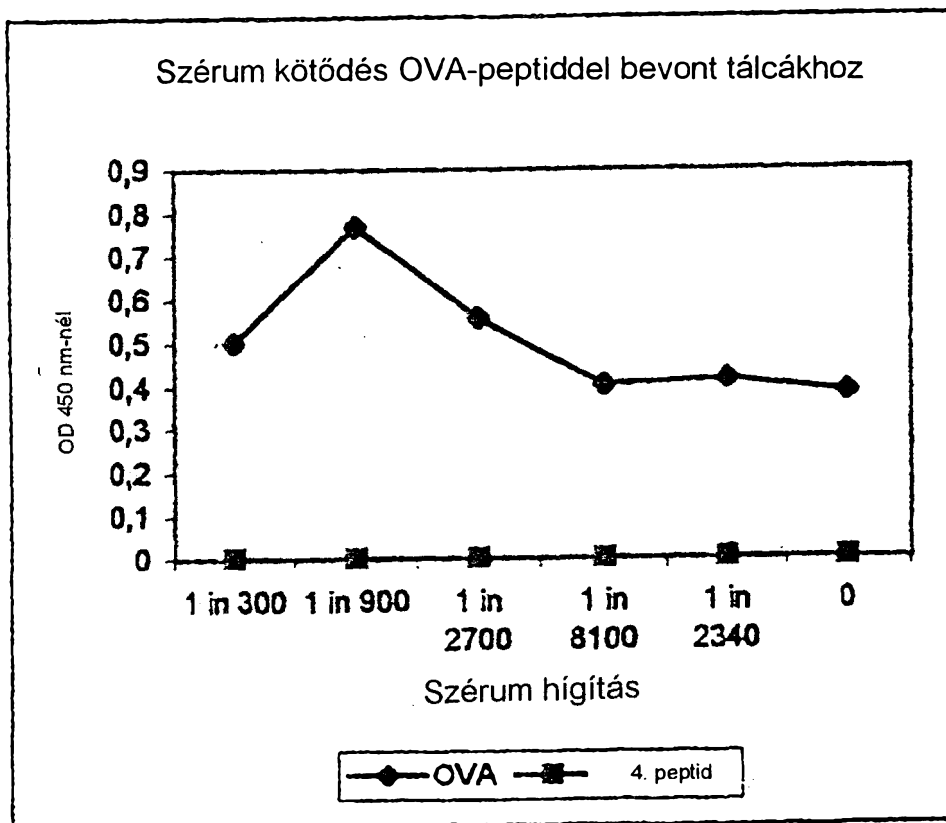
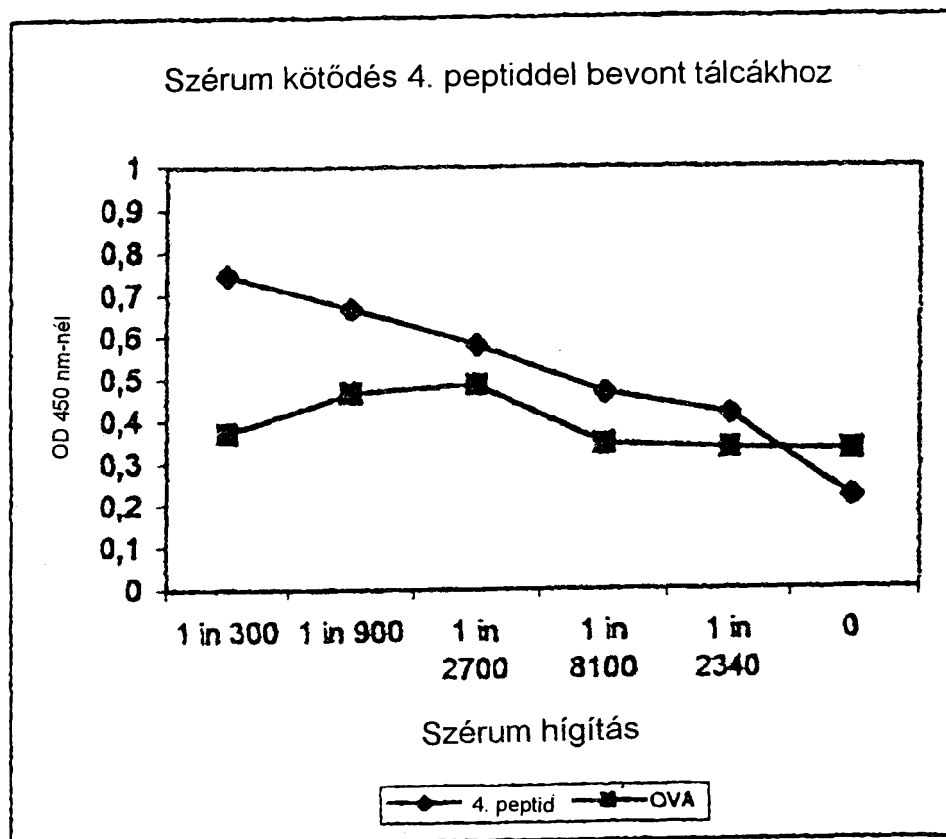
13. ábra



14a ábra

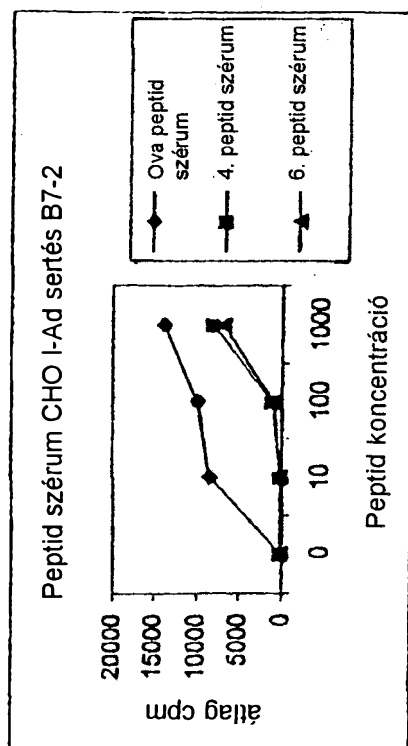


14b ábra

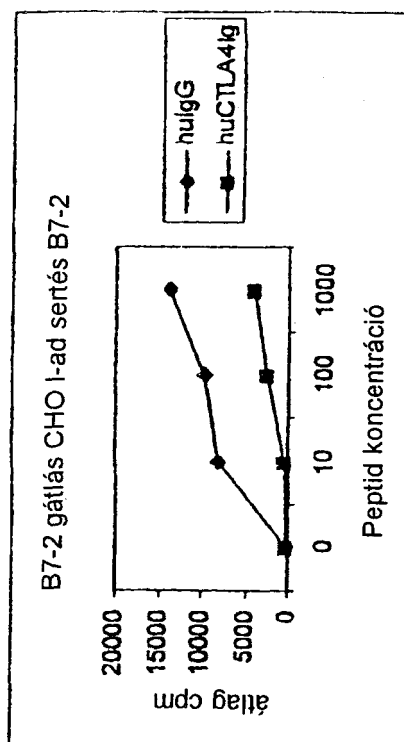


15a ábra

A

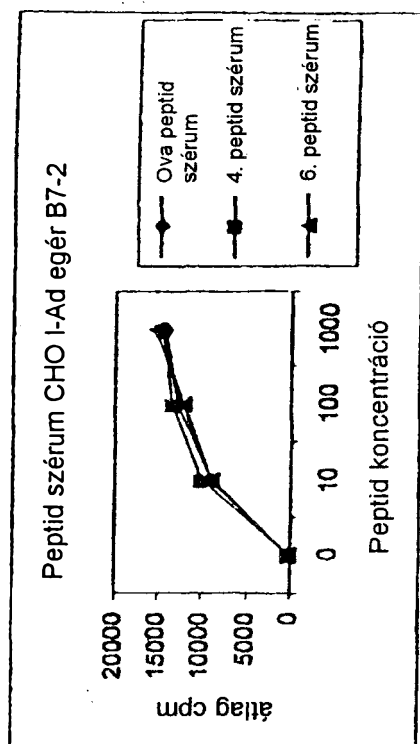


B

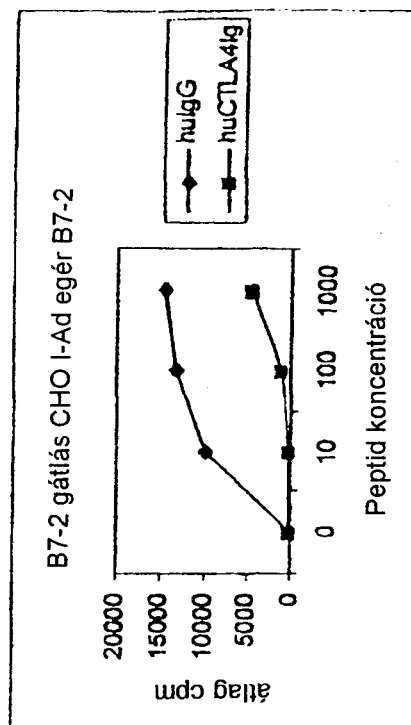


Sertés B7-2

C

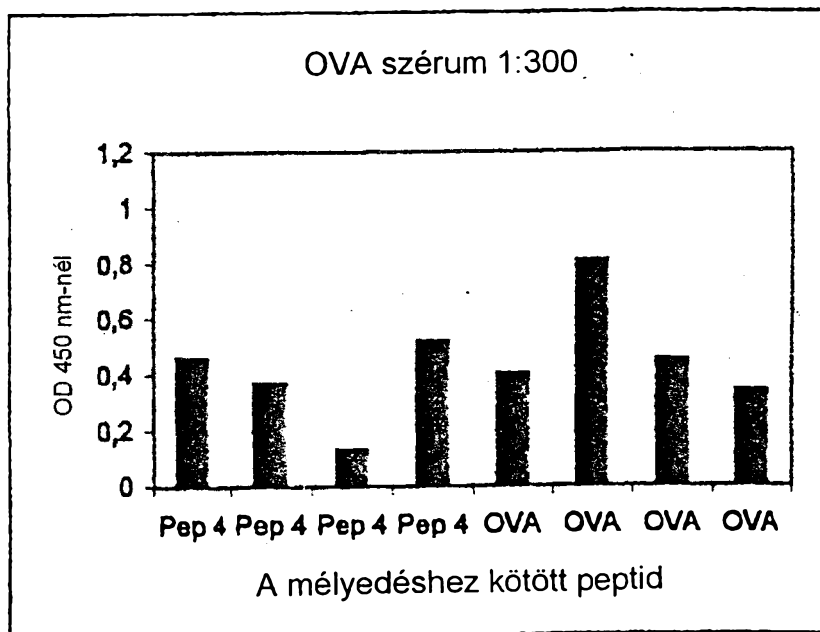
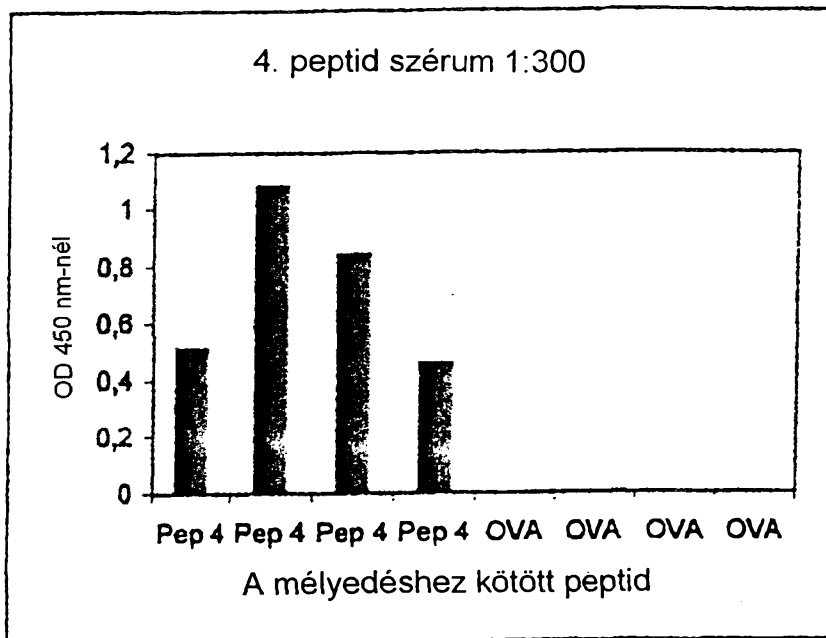


D

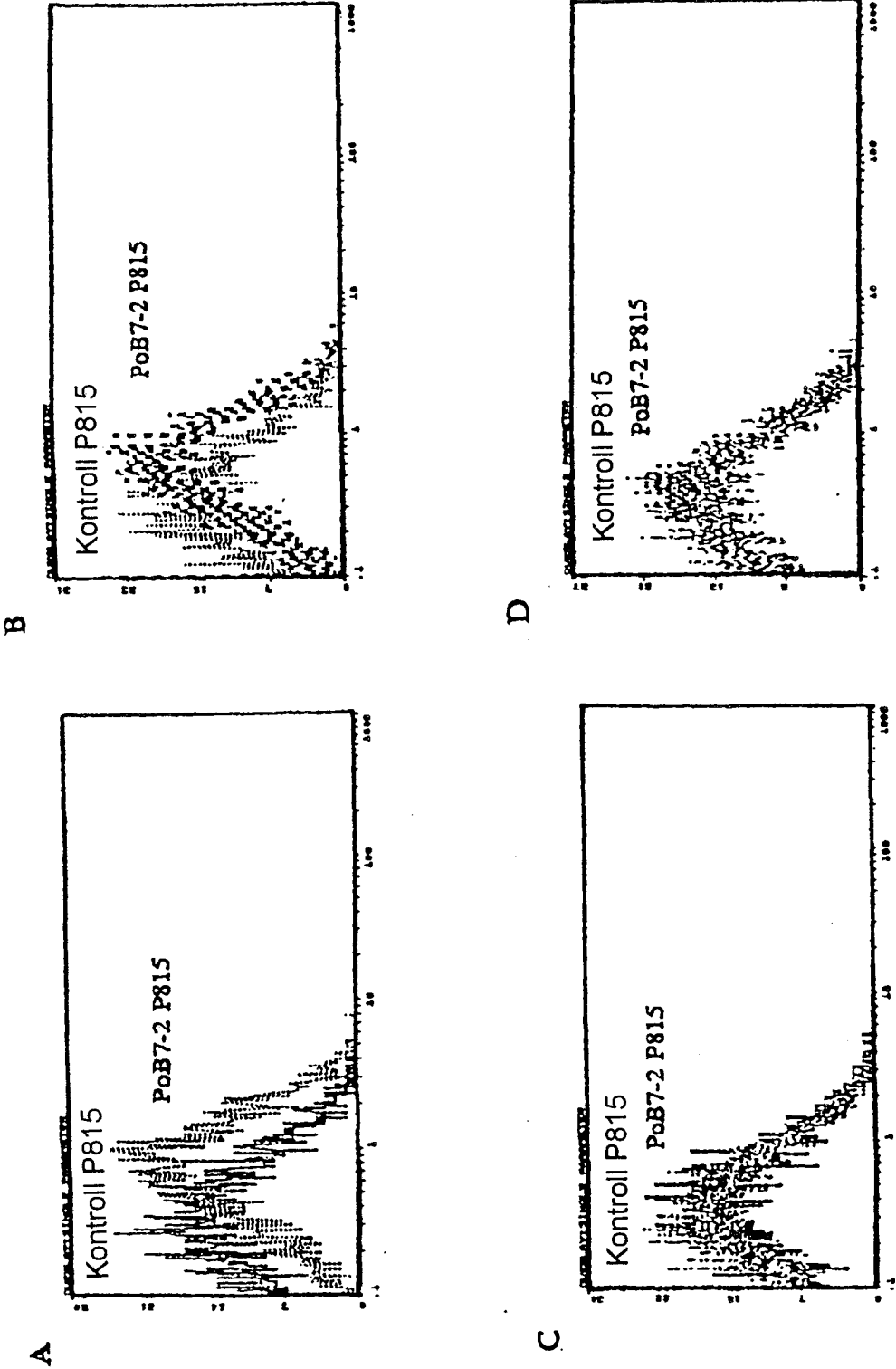


Egér B7-2

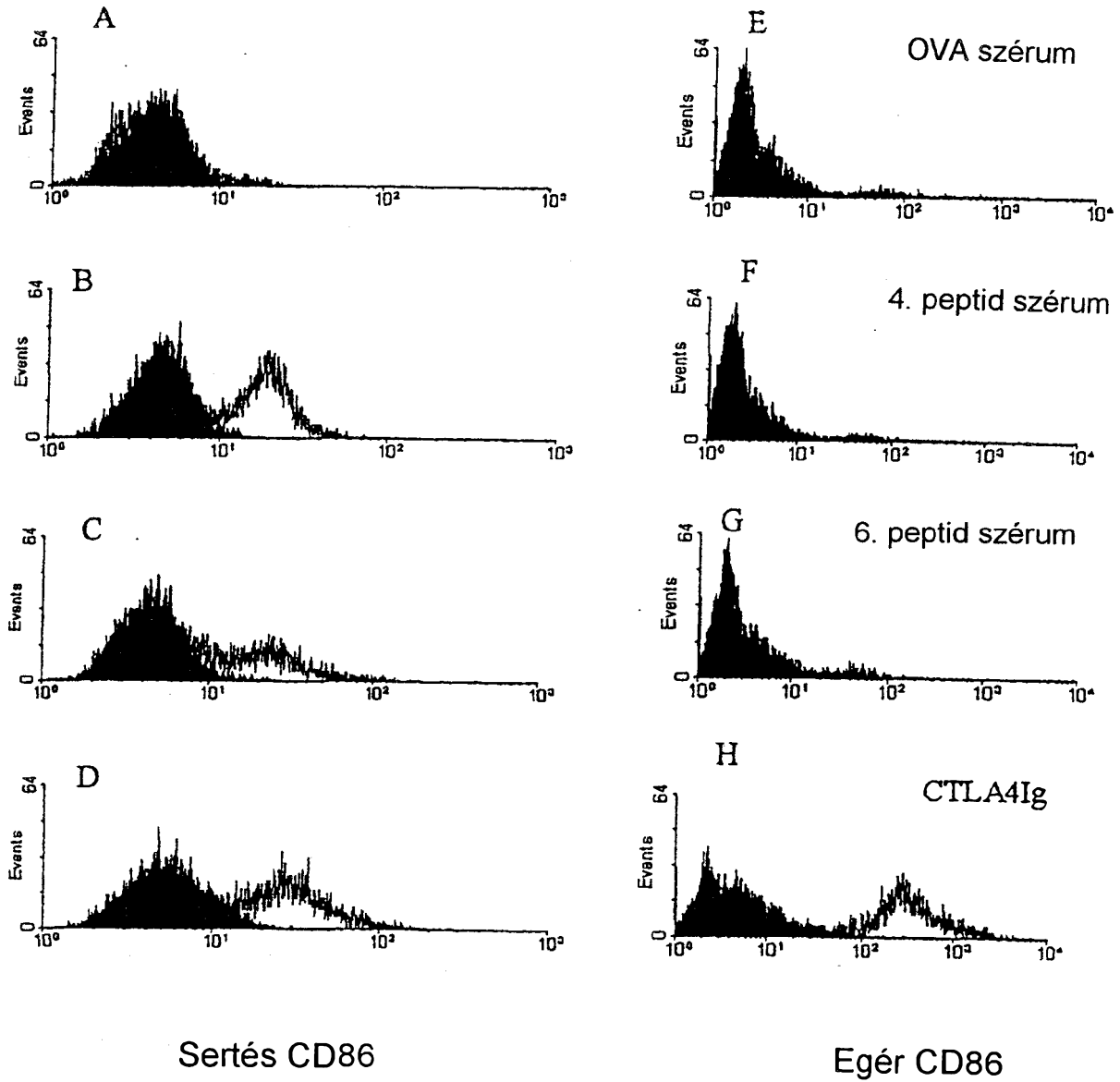
15b ábra



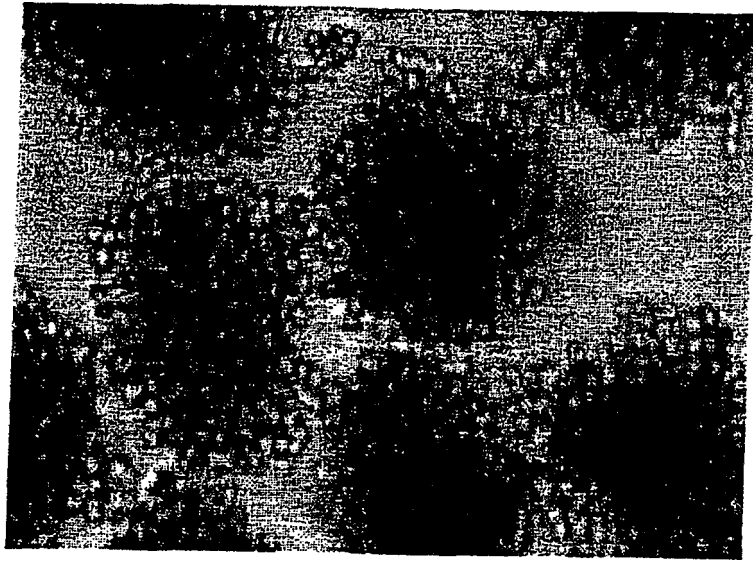
16. ábra



17a ábra



17b ábra



18. ábra

1. nap: C57BL-6 egerek immunizálása (50 μ g) teljes ovalbumint tartalmazó komplett Freund-adjuvánssal



14. nap: Első iv. immunizálás (100 μ g) kiméra peptiddel

21. nap: Második iv. immunizálás (100 μ g) kiméra peptiddel

28. nap: Harmadik iv. immunizálás (100 μ g) kiméra peptiddel



32. nap: Az egerek cukorbeteggé tétele streptozocin ip. injektálásával

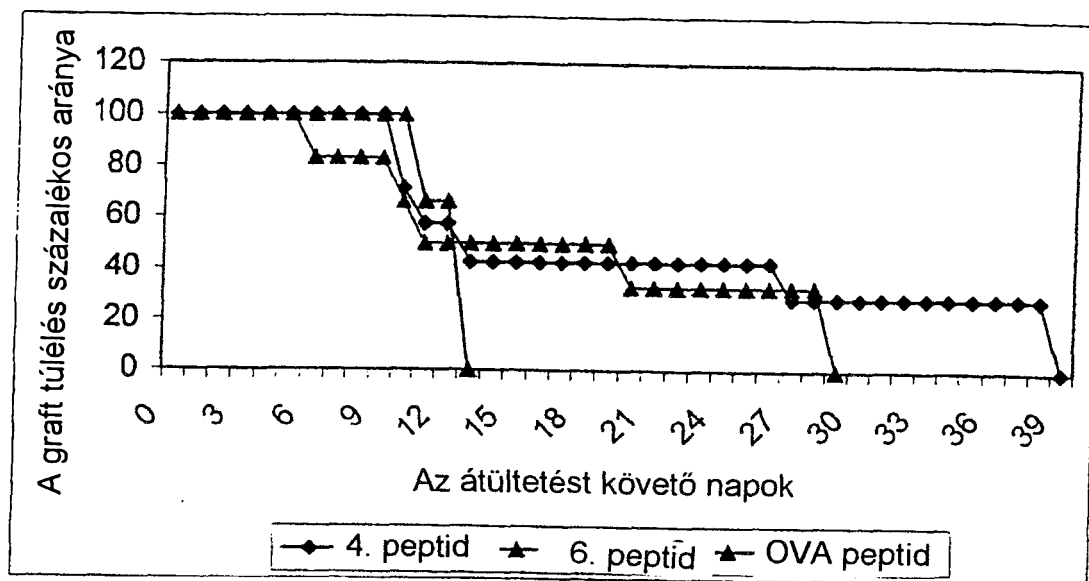


36. nap: 1000 sertés hasnyálmirigysziget átültetése a cukorbeteg egerek veseburka alá



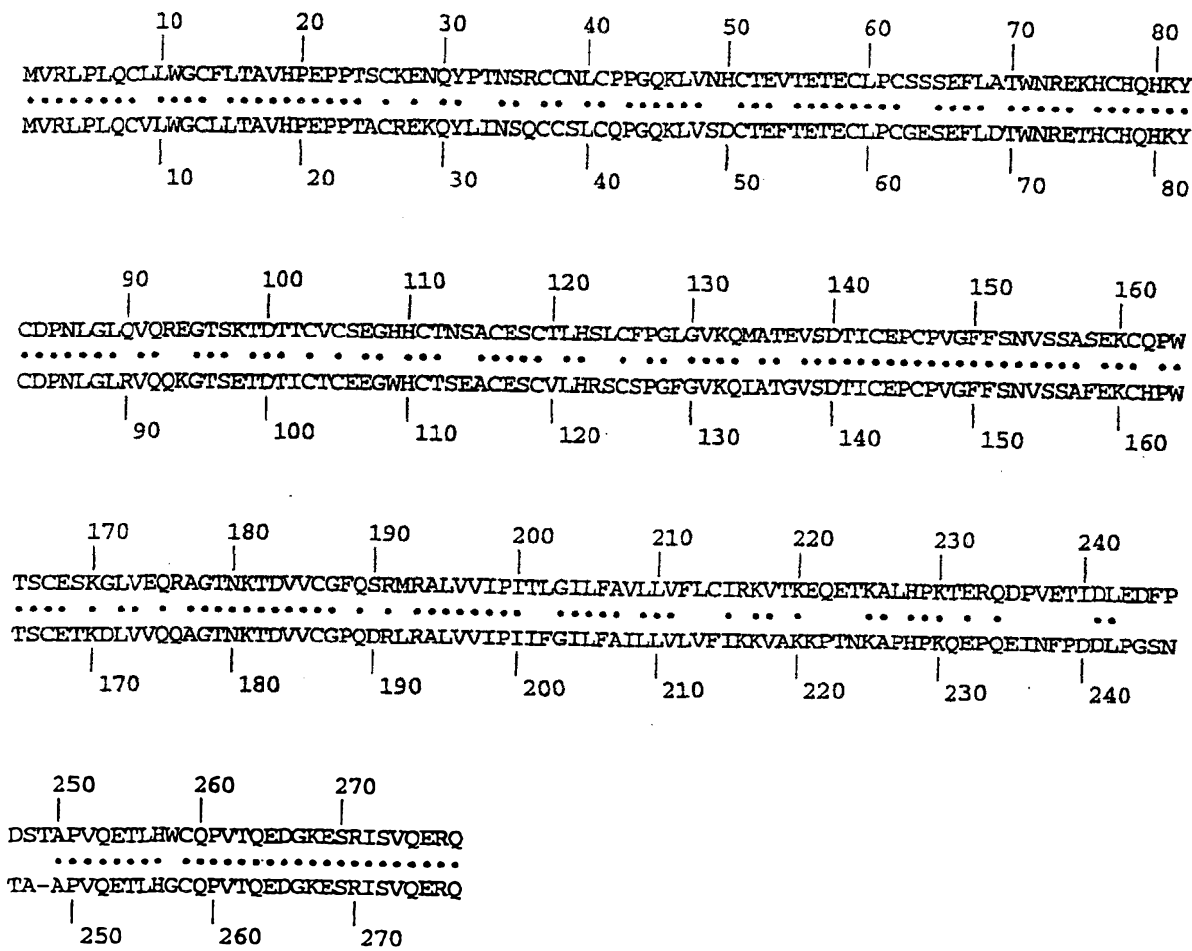
37. naptól kezdve: A szigetek túlélésének vizsgálata vércukorszint-mérések alapján

19. ábra



20. ábra

poCD40 protein (csúcs), ember CD40 protein (alja)

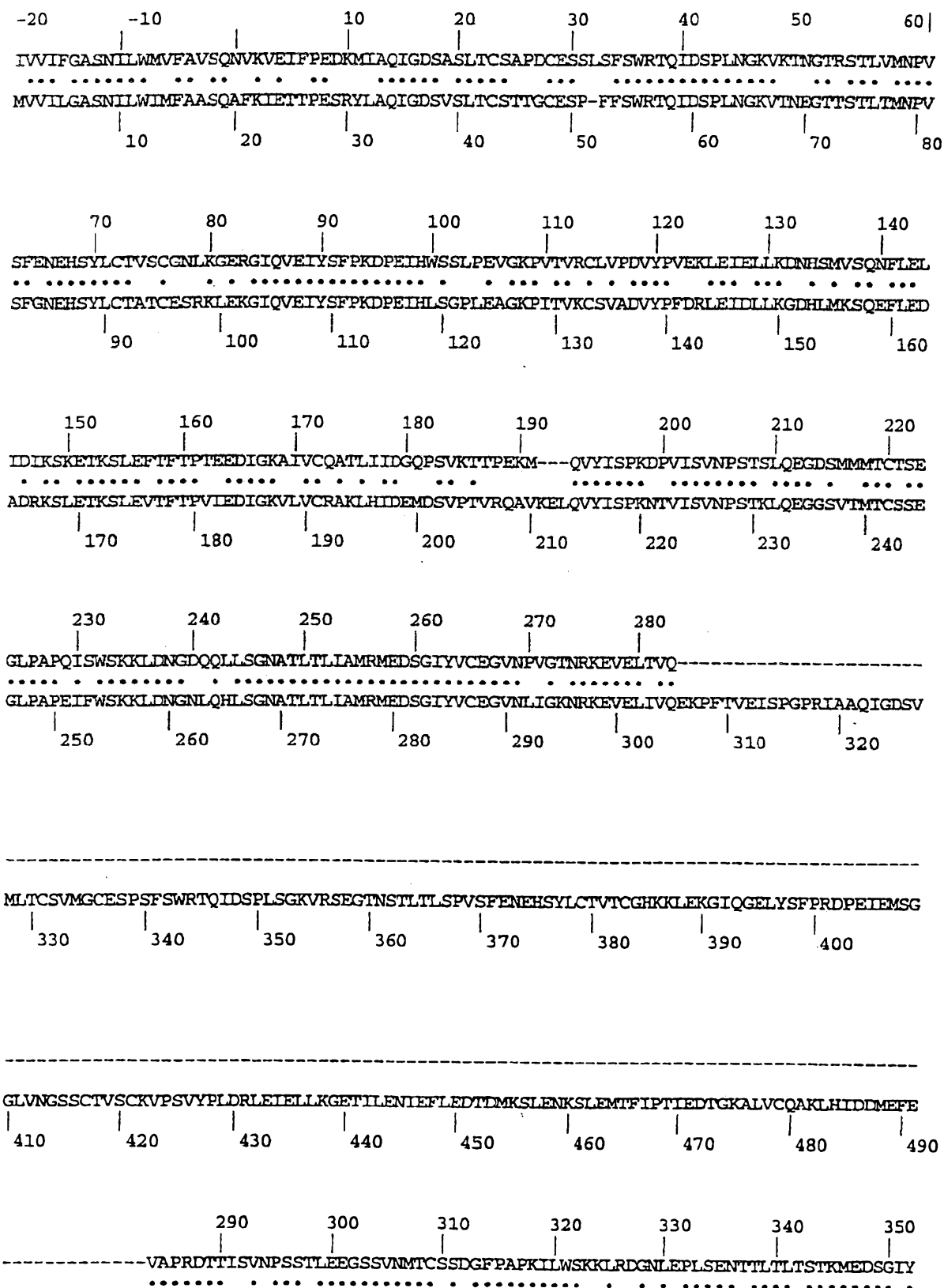


21. ábra

1 MVRLPLQCLL WGCFLTAVHP EPPTSCKENQ YPTNSRCCNL
41 CPPGQKLVNH CTEVTETECL PCSSEFLAT WNREKHCHQH
81 KYCDPNLGLQ VQREGTSKTD TTCVCSEGGH CTNSACESCT
121 LHSLCFPGLG VKQMATEVSD TICEPCPVGF FSNVSSASEK
161 CQPWTSCESK GLVEQRAGTN KTDVVCGFQS RMRALVVIPI
201 TLGILFAVLL VFLCIRKVTK EQETKALHPK TERQDPVETI
241 DLEDFPDSTA PVQETLHWCQ PVTQEDGKES RISVQERQ

22. ábra

sertés VCAM-peptid másolat (felül) humán VCAM-peptidmásolat (alul)



23. ábra

360 370 380 390 400 410 420 430
VCEGINQAGINRKEVELIIQAAPKDLQLTAFPSSESVKEGDTVIIISCTCGNVPPTLIILKKKAETGDTVLKSTDGAYTTIHRAR
.....
LCEGINQAGRSRKEVELIIQVTPKDIKLTAFPSSESVKEGDTVIIISCTCGNVPETWIIILKKKAETGDTVLKSIDGAYTTIRKAQ
580 590 600 610 620 630 640 650

440 450 460 470 480 490 500 510
LADAGVYECESKNEIGLQLRSLTLDVKGRESNKDYFSSELLVLYCASSLIIPAIGVIIYFARKANMRGYSYSLVDAQSKV
.....
LKDAGVYECESKNKVGSQLRSLTLDVQGRENNKDYFSPELLVLYFASSLIIPAIGMIIYFARKANMKGSYSLVEAQSKV
660 670 680 690 700 710 720 730

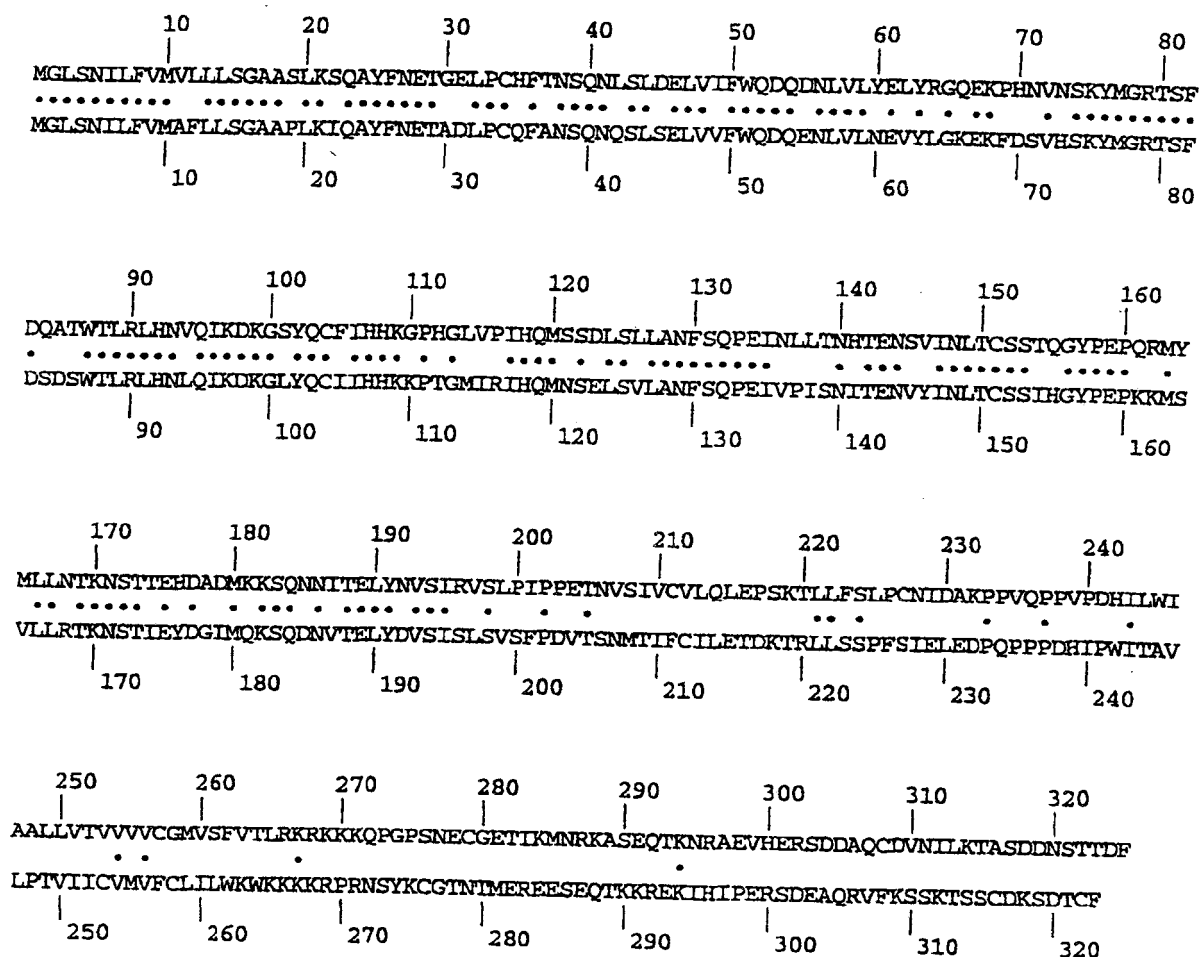
23-1. ábra

↓ (szignálszekvencia)

IVVIFGASNI LWMVFAVSQN VKVEIFPEDK MIAQIGDSAS
LTCSAPDCES SLSFSWRTQI DSPLNGKVKT NGTRSTLVMN
PVSFENEHSY LCTVSCGNLK GERGIQVEIY SFPKDPEIHW
SSLPEVGKPV TVRCLVPDVY PVEKLEIELL KDNHSMVSQN
FLELIDIKSK ETKSLEFTFT PTEEDIGKAI VCQATLIIDG
QPSVKTTPEK MQVYISPKDP VISVNPSTSL QEGDSMMMTTC
TSEGLPAPQI SWSKKLDNGD QQLLSGNATL TLIAMRMEDS
GIYVCEGVNP VGTNRKEVEL TVQVAPRDTT ISVNPSTLE
EGSSVNMTCs SDGFPAPKIL WSKKLRDGNL EPLSENTTLT
LTSTKMEDSG IYVCEGINQA GINRKEVELI IQAAPKDLQL
TAFPSESVKE GDTVIIISCTC GNVPPTLIIL KKKAETGDTV
LKSTDGAYTI HRARLADAGV YECESKNEIG LQLRSITLDV
KGRESNKDYF SSELLVLYCA SSLIIPAIGV IIYFARKANM
RGSYSLVDAQ KSKV•

24. ábra

transzlált poB7-2 Mabex (felül) humán B7-2 transzlált (alul)



25. ábra

1 MGLSNILFVM VLLLSGAASL KSQAYFNETG ELPCHFTNSQ
41 NLSLDELVIF WQDQDNLVLY ELYRGQEKPH NVNSKYMGR
81 SFDQATWTLR LHNVOIKDKG SYQCFIHHKG PHGLVPIHQM
121 SSDLSLLANF SQPEINLLTN HTENSVINLT CSSTQGYPEP
161 QRMVLLNTK NSTTEHDADM KKSQNNITEL YNVSIRVSLP
201 IPPETNVSIV CVLQLEPSKT LLFSLPCNID AKPPVQPPVP
241 DHILWIAALL VTVVVVCGMV SEVTLRKRKK KQGPSNECG
281 ETIKMNRKAS EQTKNRAEVH ERSDDAQCDV NILKTASDDN
321 STTDF

26. ábra