

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1751-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18. 11. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.11.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/746883**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 11. 99**
(Věstník č. 11/99)

(86) PCT číslo: **PCT/CA97/00880**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/22580**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 12 N	5/10
A 61 K	38/17
C 07 K	19/00
C 07 K	14/705
G 01 N	33/60

(71) Přihlášovatel:

THE WELLESLEY HOSPITAL FOUNDATION,
Toronto, CA;

(72) Původce:

Julius Michael H., Toronto, CA;
Filipp Dominik, Woodbridge, CA;
Alizadeh-Khiavi Kamel, London, CA;

(74) Zástupce:

Herman Václav Ing., Hlavní 43, Průhonice,
25243;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Imunotropní protein (CD 14) související s
hovězí laktací, kodující gen a aplikace při
aktivaci B buněk**

(57) Anotace:

Je identifikován nový protein vyčištěný z hovězí mlezivové syrovátky, nazvaný imunotropní protein související s hovězí laktací /Bo-LAIT/ a izolované nukleotidové sekvence kodující tento protein. Je popsán také lidský homolog Bo-LAIT proteinu, Hu-LAIT protein. Je popsán způsob aktivování B buněk a zvláště aktivování B buněk u savce, jako je člověk, který takovou aktivaci potřebuje, podáváním LAIT proteinu. LAIT protein může být zahrnut do přípravku pro děti, který je dětem podáván potravou nebo protein může být zahrnut jako část očkování. LAIT protein může být podáván pacientům, kteří jsou imunodeficitní na T buňky, například mají disfunkci T buněk, při které je u nich podexprimován gp39 /CD40L/ nebo je naprosto nepřítomen na buněčném povrchu T buněk pacienta. Je popsána příprava léčiv obsahujících LAIT protein pro aktivování B buněk u savce, který takovou aktivaci potřebuje. Může se použít přírodní nebo rekombinantní LAIT protein.

CZ 1751-99 A3

Imunotropní protein (CD 14) související s hovězí laktací, kodující gen a aplikace při aktivaci B buněk

Oblast techniky

Tento vynález v oblasti imunologie, biochemie a buněčné a molekulární biologie se týká proteinů nebo proteinů, které jsou ko- a/nebo po-translačně modifikovány, označovaných LAIT proteiny, které aktivují B buňky. Tento vynález se týká také použití tohoto proteinu ve farmaceutických přípravcích a farmaceutických prostředcích, které obsahují LAIT protein nebo jeho funkční deriváty. Tento vynález se týká také molekul nukleových kyselin kodujících hovězí LAIT protein nebo jeho funkční deriváty a způsobů čištění přírodních a rekombinantních forem uvedených proteinů, které aktivují B buňky.

Dosavadní stav techniky

"B" lymfocyty odvozené od kostní dřeně, obvykle nazývané B buňky, jsou typem bílých krvinek přítomných v lymfatických žlázách, krvi a sekundárních lymfatických orgánech imunitního systému. B buňky jsou prekursory buněk sekretujících protilátky, buněk plasmy a jako takové jsou centrem pro indukování humorálních imunitních odpovědí.

Indukce většiny humorálních imunitních odpovědí u dospělých zahrnuje četné buněčné interakce mezi T lymfocyty odvozenými od brzlíku, obvykle nazývanými T buňky, antigen prezentujícími buňkami (APC) a B buňkami [*J. Exp. Med.* 1978, 147, 1159; *PNAS* 1982, 77, 1612, *PNAS* 1982, 79, 1989, *Immunol. Rev.* 1987, 95, 914.].

Jak je tomu dnes rozuměno, aktivace B buněk závislých na T buňkách zahrnuje aktivaci T buněk po jejich rozpoznání antigenem, jak je ukázáno APC ve spojení s proteiny kodovanými v komplexu hlavní histokompatibility (MHC), které jsou exprimovány na buněčném povrchu APC. Tato antigenově specifická a MHC



omezená interakce T-buňka-APC vede k reciproké aktivaci dvou typů buněk a změn fyziologie T buňky, takže se projevuje "pomocná funkce" (helper).

Helper T buňky mohou aktivovat antigenově specifické B buňky. Antigenová specifická interakce T buňka-B buňka je uchována jako důsledek základní schopnosti B buňky fungovat jako APC. Tedy zatímco odpočívají, klidné B buňky nejsou účinnými APC [PNAS 1982, 79, 1989.], specificky interagují s antigenem imunoglobulinem asociovaným s membránou, jehož specifická odráží specifická imunoglobulinu, který bude sekretován jejich dceřinými buňkami (*J. Exp. Med.* 1974, 140, 904.).

Imunoglobulinem zprostředkovaná internalizace antigenu specifickou B buňkou, která může zahrnovat presentaci ještě jiným druhem APC, folikulární dendriticky buňkou, vede k iniciaci opracování antigenu B buňkou, regulaci MHC skupiny II a expresi B7 a k presentaci peptidů odvozených od antigenu v souvislosti s MHC (*J. Exp. Med.* 1993, 178, 2055.). B buňka aktivovaná tímto způsobem je cílem aktivované helper T buňky.

Funkce helper T buňky zahrnuje signály dodávané jak kontaktem T buňka-B buňka tak interakcí rozpustných mediátorů odvozených od T buněk, nazývaných cytokiny, s jejich příbuznými ligandy exprimovanými na membráně plasmy B buněk. Kontakt T buňka-B buňka je také MHC omezen, analogicky k interakci T buňka-APC (*Eur. J. Immunol.* 1982, 12, 627; *Eur. J. Immunol.* 1982, 12, 1982.). Specifické interakce molekul, které zprostředkují MHC omezenou interakci mezi dvěma vazbami lymfocytů, konkrétně receptorem T buňky pro antigen (TcR) a komplexem MHC/antigen exprimovaným B buňkami, nepředpovídají indukci růstu a diferenciace B buněk (*Eur. J. Immunol.* 1988, 18, 375.).

Podstatná molekulární interakce, reflektovaná požadavkem na kontakt T buňka-B buňka, je zprostředkována CD40 exprimovaným na plasmové membráně B buňky a jejím příbuzným ligandem, gp39 (nebo CD40L), exprimovaným na plasmové membráně T buňky

(*PNAS* 1992, 89, 6550; *Nature* 1992, 357, 80.). Konsistentní s tímto příkladem je pozorování, že membránová exprese druhého stoupá v interakci T buňka-APC stejně jako následná interakce T buňka-B buňka (*PNAS* 1992, 89, 6550.). Dále pak membránovým imunoglobulinem vyvolaná interakce B buňky s antigenem vede ke zvýšené membránové expresi CD40 (*Sem. in Immunol.* 1994, 6, 303.). Interakce mezi CD40 a CD40L předvídá indukci růstu B buňky, diferenciaci B buněk na buňky sekretující imunoglobulin a zapnutí isotypu imunoglobulinu (*J. Exp. Med.* 1993, 178, 1567.).

S tímto modelem je v souladu zjištění, že rozpustný CD40L nebo monoklonální protilátka (mAb) specifická pro CD40 může indukovat růst B buněk a diferenciaci na sekreci imunoglobulinu (*Sem. in Immunol.* 1994, 6, 267; *PNAS* 1986, 83, 4494; *J. Immunol.* 1988, 140, 1425.).

Vedle obligátního požadavku na kontakt T buňka-B buňka, četné cytokiny odvozené od T buněk, IL-2, IL-4 a IL-5, jsou centrem růstu a diferenciaci B buněk. Citlivost těchto B buněk na tyto cytokiny je z největší části omezena předchozím kontaktem s T buňkami. Po kontaktu T buněk tedy B buňky zvyšují expresi membránových receptorů specifických na cytokin (*PNAS* 1983, 80, 6628; *J. Immunol.* 1990, 145, 2025; *J. Immunol.* 1991, 146, 1118.). Bylo ukázáno, že IL-2 a IL-5 vykazují podporu růstu aktivovaných B buněk (*PNAS* 1980, 77, 1612; *Immunol. Rev.* 1980, 52, 115.). Dále pak bylo ukázáno, že IL-4 a anti-imunoglobulin jsou synergické při podpoře růstu B buněk (*J. Exp. Med.* 1982, 155, 914.).

Pozoruhodnými v této souvislosti jsou odpovědi klidových B buněk na IL-4 a IL-5. IL-4 indukuje de novo transkripci a translaci proteinů MHC Class II (*J. Exp. Med.* 1982, 155, 914; *PNAS* 1984, 81, 6149; *J. Exp. Med.* 1984, 160, 679.) a IL-5 je schopen podporovat diferenciaci klidových B buněk na buňky sekretující vysoká množství imunoglobulinu v nepřítomnosti růstu buněk (*Eur. J. Immunol.* 1992, 22, 2323.).

V každém případě signály odvozené z molekulárních interakcí mezi membránovými molekulami na T buňkách a B buňkách a cytokinů odvozených od T buněk interagujících s jejich příbuznými receptory na B buňkách jsou částmi komplexního signálního systému. Každý signál směřuje B buňku do jiného stadia aktivace, což způsobuje, že je citlivá na následující signály progresu. Tyto signály jsou navzájem doplňkové, spíše než že by měly schopnost jednotlivě řídit úplný proces růstu a diferenciaci B buněk (*Immunol. Rev.* 1987, 95, 177.).

V roce 1988 byla objevena jedinečná aktivita v ovčím mlezivu (*J. Immunol.* 1988, 140, 1366.). Protein bohatý na prolin (PRP) byl částečně vyčištěn použitím klasických způsobů čištění proteinů. Bylo ukázáno, že tento materiál podporuje indukci klidových B buněk do buněčného cyklu a podporuje jejich diferenciaci na buňky sekretující imunoglobulin vysokou rychlostí. Toto byl zřejmě první popis proteinu savčího původu, který zprostředkovává tyto funkce.

Následně byla připravena monoklonální protilátka specifická pro ovčí PRP. Když byly PRP přípravky nechány projít afinitní kolonou připravenou použitím protilátky, veškerý PRP byl zachycen na koloně, jak bylo zjištěno Westernovou blotovací analýzou eluátu a eluentu. Všechna stimulační aktivita B buněk však byla nalezena v eluentu. Publikovaná charakterizace tropní bioaktivity B buněk přítomné v ovčím mlezivu nebyla připsána PRP (nepublikovaná informace).

Podstata vynálezu

Tento vynález se týká nového hovězího proteinu a izolovaných nukleotidových sekvencí kodujících tento protein, při němž uvedený protein je schopen aktivovat B-buňky savčího původu. V podstatě čistý LAIT protein nebo ko- a/nebo po-translačně modifikovaná forma tohoto proteinu mohou být produkovány biochemickým čištěním nebo rekombinantními prostředky v prokaryotickém nebo eukaryotickém hostiteli v podstatě bez jiných protei-

nů, s nimiž je přirozeně asociován. V tomto vynálezu je zahrnut také způsob čištění LAIT proteinu nebo ko- a/nebo po-translačně modifikované formy LAIT proteinu podle tohoto vynálezu z hovězí mlezivové syrovátky, vyznačující se tím, že zahrnuje:

- i) vysolení proteinů obsažených v uvedených vzorcích a
- ii) obohacení a konečné vyčištění LAIT proteinu z proteinů vysolených ve stupni i) použitím klasických způsobů frakcionace proteinů.

Ve všech případech má uvedený protein žádanou biologickou aktivitu.

Tento vynález se týká také molekuly nukleové kyseliny, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kodující LAIT protein. Molekulovou nukleové kyseliny může být cDNA nebo genomová DNA.

Isolovaný hovězí protein je homologní s lidským CD 14 a myším CD 14 a tak je někdy označován také jako hovězí CD 14. Tento vynález zahrnuje způsob aktivování B buněk a zvláště aktivování B buněk u savců, kteří takovou aktivaci potřebují, podáváním CD 14, rekombinantní formy jeho proteinu nebo jeho funkčního derivátů.

Ve výhodném provedení savec znamená lidského pacienta.

Podle jednoho aspektu tento vynález zahrnuje inkorporaci CD 14 do prostředku pro děti. Tento vynález zahrnuje podávání CD 14 dětem, výhodným způsobem podávání je podávání tohoto přípravku dětem ve formě jídla.

V jiném aspektu tento vynález zahrnuje inkorporaci CD 14 jako části vakcíny. Tento vynález se týká podávání CD 14 a antigenu pacientovi, který potřebuje imunizaci. Výhodný způsob podávání zahrnuje podávání jediného přípravku, který obsahuje jak CD 14 tak antigen.

V jiném aspektu tento vynález zahrnuje podávání CD 14 pa-

cientovi, který má imunitní deficit T buněk. Ve výhodném aspektu tento vynález zahrnuje podávání CD 14 pacientovi, který trpí disfunkcí příslušných T buněk, u nichž je gp39 (CD40L) podexpresován nebo zcela nepřítomen na buněčném povrchu T buněk pacienta.

V jiném aspektu se tento vynález týká podávání protilátek proti CD 14 pacientovi, který trpí disfunkcí, při níž pacientovi B buňky jsou hyperaktivovány jako výsledek vyšších než normálních hladin sera CD 14. Ve výhodném aspektu tento vynález zahrnuje podávání protilátek proti CD 14 pacientovi, který trpí revmatickou artritidou, při níž B buňky sekretují revmatický faktor jako výsledek aktivace serovým CD 14.

Tento vynález se týká nového způsobu produkce hybridomy sekretujících mAb žádané specifičnosti kultivací B buněk se suboptimálními mitogenními koncentracemi CD 14 v souladu s antigenem, proti němuž mají být protilátky připraveny. Populace B buněk aktivovaných tímto způsobem je vysoce obohacena na aktivované B buňky specifické na antigen, které se pak používají pro produkci hybridomy sekretujících mAb žádané specifičnosti.

Tento vynález zahrnuje použití CD 14 při přípravě léčiv pro aktivování B buněk u savců, kteří takovou aktivaci potřebují.

V tomto vynálezu se může používat přírodní nebo rekombinantní CD 14.

V souvislosti s tímto vynálezem pojem "CD 14" znamená myší, hovězí nebo lidský CD 14.

Definice pojmů

"Funkční derivát" si zachovává alespoň část funkce CD 14, jako je navázání na specifickou protilátku nebo navázání na jeho příbuzný receptor na buňkách, která mají uvedený receptor,

který umožňuje jeho využití podle předloženého vynálezu. Pojem "funkční derivát", jak je zde používán, zahrnuje "fragment" nebo "variantu" CD 14, při čemž tyto pojmy jsou definovány níže.

"Fragment" CD 14 označuje jakoukoliv podřadu polypeptidu, to znamená kratší peptid. Pojem "fragment" se používá k označení takového polypeptidu, který je odvozen od CD 14, který má přirozeně se vyskytující proteinovou sekvenci obsahující delecí jedné nebo více aminokyselin na jednom nebo více místech C-konce, N-konce a v sekvenci. Tyto fragmenty by si měly zachovat jednu nebo více biologických aktivit nebo funkcí, které jsou charakteristické pro neporušený CD 14 polypeptid a ko- a/nebo po-translačně modifikované formy CD 14.

"Varianta" CD 14 označuje polypeptid, který má primární sekvenci podobnou sekvenci přírodního CD 14 nebo jeho fragmentu tak, že přírodní aktivita je alespoň částečně zachována. Variantní peptidy se mohou připravovat syntetickými způsoby nebo mutacemi cDNA kodující uvedený polypeptid tak, že si zachovává biologickou aktivitu uvedeného polypeptodu zahrnující delece, inserce nebo substituce konzervativními aminokyselinami v polypeptidu.

Pojem "protilátka", jak je zde používán, znamená imunoglobulinový protein, který má schopnost vázat různý epitop v nezachované oblasti uvedeného proteinu, což umožní, že protilátka rozlišuje jeden protein od jiného. Pojem "epitop" je zde míněn tak, že označuje tu část jakékoliv molekuly, která je schopna být navázána protilátkou. Pojem "protilátka" zahrnuje polyklonální protilátky, monoklonální protilátky (mAbs) nebo chimerní protilátky.

Polyklonální protilátky jsou heterogenní populace molekul protilátek odvozené od sera živočichů imunizovaných antigenem.

Monoklonální protilátky jsou homogenní populace protilátek schopné navázat zřetelný epitop antigenu. Mabs se mohou získá-

vat způsoby známými zručným odborníkům z oblasti techniky. Tyto protilátky mohou být imunoglobuliny jakékoliv skupiny včetně IgG, IgM, IgE, IgA a IgD a jakékoliv jejich podskupiny. Pojem "protilátka" je zde míněn také tak, že zahrnuje jak neporušené molekuly tak jejich fragmenty, jako například Fab a $F(ab')_2$, které jsou schopny vázat antigen. Fab a $F(ab')_2$ chybí Fc fragment neporušené protilátky, jasně rychlejší v oběhu, a může mít méně nespecifické navázání na tkáň než neporušená protilátka (Wahl a spol.: *J. Nucl. Med.* 1983, 24, 316 až 325.).

Chimerní protilátky jsou takové molekuly, jejichž různé části jsou odvozeny od různých živočišných druhů, jako jsou ty, které mají proměnnou oblast odvozenou od myši mAb a stabilní oblast pocházející z lidského imunoglobulinu.

"Antigen" znamená molekulu nebo část molekuly, která je schopna být navázána protilátkou, která je dále schopna indukovat u živočicha produkci protilátky schopné navázání na epitop tohoto antigenu. Antigen může mít jeden nebo více než jeden epitop. Jestliže se o protilátce uvádí, že je "specifická na" polypeptid, fragment nebo jeho variantu. Nebo se o ní uvádí, že "je schopna navázání" na polypeptid, fragment nebo jeho variantu, znamená to, že antigen bude reagovat vysoce selektivním způsobem s odpovídající protilátkou a ne s více jinými protilátkami, které mohou být vyvolány jinými antigeny.

Stručný popis výkresů

Obrázky 1A až 1C ukazují čištění přírodního hovězího LAIT (nBo-LAIT) proteinu. Obrázek 1A ukazuje eluční profil z kolony anexu (FPLC-Mono-Q, Pharmacia), na kterou bylo nanášeno 50 mg 62% (obj./obj.) sraženiny síranem amonným. Navázané proteiny byly eluovány gradientem 50 až 400mM NaCl v 10mM Bis-tris propanu se současným gradientem pH 7,5 až 9,5. Tabulka 1 ukazuje biologickou aktivitu frakce s maximem aktivity, frakce č. 57. Myší slezinné B buňky s vysokou hustotou byly izolovány jak dříve popsáno (*J. Immunol.* 1983, 131, 581.) a kultivovány v

množství $5 \cdot 10^4$ buněk v 0,2 ml media bez sera v klastru s 96 jamkami, desce pro tkáňovou kulturu s plochým dnem (Costar). Každá frakce byla přidána na konečnou koncentraci 10 % (obj./obj.) v přítomnosti nebo bez přítomnosti 0,25 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Po 40 hodinách bylo ke kulturám přidáno 1 μCi $^3\text{H-TdR}$, po 6 hodinách byly izolovány na filtračních discích a příjem thymidinu byl vyhodnocen scintilační spektroskopii. Čísla představují cpm (počet impulsů za minutu) krát 10^3 . Obrázek 1B ukazuje profil z kolony s molekulovým sítem [FPLC-Superdex 75, Pharmacia], na kterou bylo nanášeno 20 mg frakce č. 57 (obrázek 1A). Kolona byla ekvilibrována ve 20mM tris-HCl pufru (pH 8,0) obsahujícím 0,45M NaCl. Tabulka 1B ukazuje biologickou aktivitu frakce maxima, frakce č. 38, vyhodnocenou jak je popsáno u obrázku 1A. Obrázek 1C ukazuje eluční profil na koloně s hydroxyapatitem [HPLC-hydroxyapatit, Pharmacia], na kterou byl nanášen 1 mg frakce č. 38 (obrázek 1B). Navázané proteiny byly eluovány gradientem 1 až 500mM pufru hydrogenfosforečnanu draselného, pH 6,8, který obsahuje 1mM NaCl. Tabulka 1C ukazuje biologickou aktivitu maximální frakce, frakce č. 25, vyhodnocenou tak, jak je popsáno u popisu obrázku 1A. Vložka na obrázku ukazuje SDS-PAGE gel zhruba 5 μg proteinu z frakce č. 25, který byl obarven stříbrem. Levý pás: frakce č. 25, pravý pás: markery molekulových hmotností, zleva: 97 000, 66 000, 45 000, 31 000, 21 000 a 14 000.

Obrázek 2 ukazuje známou sekvenci lidského CD 14 (sekv. id. č. 5) a seřazené fragmenty nBo-LAIT. Bo-LAIT fragmenty byly získány z mlezivového nBo-LAIT vyčištěného na afinitní koloně (viz obrázek 3). Fragmenty, které odpovídají zbytkům 235 až 264 a 344 až 365 lidského CD 14, byly hlavními a minoritními peptidy, každý přibližně o velikosti 18 000, generované štěpením bromkyanem a rozdělené HPLC na obrácených fázích (kolona C8, Pharmacia). Fragment odpovídající zbytkům 53 až 67 lidského CD 14 je částečná sekvence fragmentu o molekulové hmotnosti 24 000 generovaná štěpením bromkyanem, rozdělená SDS-PAGE a elektroblotovaná na PVDF membráně. Fragmenty, které odpovídají zbytkům 19 až 36 a 151 až 165 lidského CD 14, byly generovány štěpením

trypsinem a rozděleny HPLC (C8 kolona, Pharmacia) na obrácených fázích. Délka překrývající hovězí sekvence s předpovězenou sekvencí lidského CD 14 je u každého z těchto fragmentů podtržena. Pomlčky označují stejné aminokyseliny, zatímco aminokyseliny, které se liší od lidské sekvence, jsou vyznačeny.

Obrázek 3 ukazuje SDS-PAGE a vybarvení stříbrem mlezivového LAIT-proteinu z hovězího dobytka a od člověka vyčištěné afinitní chromatografií. Pás 1: markery molekulové hmotnosti jak jsou uvedeny u popisu obrázku 1C, pás 2: sraženina hovězí mlezivové syrovátky 62,5% (obj./obj.) síranem amonným, pás 3: pH 2,5 eluát z afinitní kolony se Sepharosou # 842, pás 4: pH 2,5 eluát z CD 14 specifické mAb 63D3 afinitní kolony se Sepharosou (PNAS 1980, 77, 6764.), naplněné materiálem reprezentovaným pásem 5, pás 5: lidská mlezivová syrovátka frakcionovaná na nosiči Sephacryl S100 HR. Každý z pásů 1 až 5 obsahuje 5 mg proteinu. Tabulka 2 ukazuje výsledky získané tak, že se $5 \cdot 10^4$ myších slezinných B buněk s vysokou hustotou kultivuje v mediu bez sera v přítomnosti uvedených stimulů po dobu 40 hodin, přidá se $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-TdR}$, izoluje se po 6 hodinách na filtračních discích a příjem thymidinu se vyhodnotí kapalinovou scintilační spektroskopií. Čísla uvádějí počet impulsů za minutu ($\text{cpm} \cdot 10^{-3}$). Podrobnosti tohoto biotestu jsou stejné jak bylo popsáno na obrázku 1A. Kontrolní $\text{cpm} \cdot 10^{-3}$: bez stimulu 0,3, 50 $\mu\text{g/ml}$ LPS 75,0, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ LPS [LPS↓] 0,8 a 1 $\mu\text{g/ml}$ mIgM specifické mAb b-7-6 (Eur. J. Immunol. 1984, 14, 753.) 0,7.

Obrázky 4A a 4B ukazují tepelnou labilitu a protilátkou zprostředkovanou inhibici nBo-LAIT aktivity. Obrázek 4A ukazuje příjem thymidinu $5 \cdot 10^4$ myších slezinných B buněk o vysoké hustotě kultivovaných tak, jak je popsáno na obrázku 1A v přítomnosti uvedené koncentrace afinitně vyčištěného nBo-LAIT, který byl tepelně zpracováván 10 minut při 90 °C (•) a nBo-LAIT, který nebyl tepelně zpracován (○). Ke kulturám byl přidán po 40 hodinách $^3\text{H-TdR}$, po 6 hodinách bylo provedeno zpracování a příjem thymidinu byl vyhodnocen kapalinovou scintilační spektroskopií. Vložka ukazuje odpovědi kultur obsahujících uvedené

koncentrace LPS, které byly tepelně zpracovány (nebo nebyly zpracovány) jako u nBo-LAIT. Obrázek 4B ukazuje příjem thymidinu v kulturách, které byly získány, jak je popsáno na obrázku 4A v přítomnosti buď 0,25 $\mu\text{g/ml}$ afinitně vyčištěného nBo-LAIT nebo 50 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Každý z těchto stimulů byl kultivován v přítomnosti uvedené koncentrace buď polyklonálního králičího IgG anti-Bo-LAIT, #842, nebo normálního králičího IgG. Procento inhibice příjmu thymidinu zprostředkované #842 IgG jak pro nBo-LAIT tak pro LPS zprostředkovanou stimulaci je uvedeno v závorkách. Úroveň inhibice zprostředkovaná normálním králičím IgG je v rozmezí od 9 do 20 % a od 12 do 31 % pro nBo-LAIT, respektive LPS stimulaci. CPM přímo indukovaná #842 IgG v izolaci je v rozmezí od 454 \pm 53 do 764 \pm 69 při 0,4 a 50 $\mu\text{g/ml}$ a pro normální králičí IgG od 297 \pm 34 do 420 \pm 31 při 0,4 a 50 $\mu\text{g/ml}$. Nestimulované kontroly poskytly zvýšení 195 \pm 29 cpm u obou řad pokusů.

Obrázek 5A ukazuje restriční mapu EcoRI-XhoI fragmentu o 7100 nukleotidů obsahujících gen hovězího CD 14. Zkratky pro restriční místa jsou: X, XhoI; P, PstI; O, NcoI; B, BamHI; N, NotI; D, BssHI; T, BstEII; M, SmaI; S, SacII; C, HpaI, R; EcoRV; A, SphI; G, BglII; H, HindIII; E, EcoRI. Obrázek 5B je schematickým diagramem místa hovězího CD 14. Stínovaná plocha představuje kodující oblast genu, otevřený box je sekvence intronu. Čárkovaná plocha v čele ATG start kodonu je 5' nepřekládaná oblast a čárkovaná plocha za TAA stop kodonem je 3' nepřekládaná oblast. Obrázek 5C je schematický diagram ukazující sekvenční strategii. Šipky ukazují směr sekvenování. Číslo fragmentu je uvedeno vpravo (pro podrobnosti viz text).

Obrázek 6 ukazuje srovnání sekvencí nukleových kyselin kodujících oblasti hovězího (sekv. id. č. 1), lidského (sekv. id. č. 2) a myšího (sekv. id. č. 3) CD 14. Poloha prvního nukleotidu odpovídá prvnímu nukleotidu kodonu ATG, poslední nukleotid odpovídá třetímu nukleotidu stop kodonu TAA. Seřazení bylo provedeno programem DNA STAR-Megalign, aplikováním způsobu Clustal s tabulkou vážených zbytků. Lidská cDNA sekvence (přístupové

číslo P08571) a myší cDNA sekvence (přístupové číslo P08571), používané při tomto seřazování, pocházely z databáze Swiss-Protein.

Obrázek 7 ukazuje srovnání aminokyselinových sekvencí hovězího (sekv. id. č. 4), lidského (sekv. id. č. 5) a myšího (sekv. id. č. 6) CD 14 proteinu. Aminokyselinové sekvence byly odvozeny od odpovídajících cDNA sekvencí uvedených na obrázku 6. Pro generaci tohoto seřazení byl použit program DNA Star-Megalign s použitím způsobu popsaného J. Heinem (*Methods in Enzymology* 1990, 183, 626.) s tabulkou vážených zbytků PAM 250.

Obrázek 8 ukazuje primery používané pro amplifikaci hovězí CD 14 cDNA kodující oblasti. Obrázek 8A ukazuje přímé (sekv. id. č. 7) a reversní (sekv. id. č. 8) primery používané pro expresní systém baculovirus. Obrázek 8B ukazuje přímé (sekv. id. č. 9) a reversní (sekv. id. č. 10) primery používané pro savčí expresní systém.

Obrázek 9 ukazuje imunoblotování přírodního a rekombinantního hovězí CD 14. Pro vyhodnocení a srovnání velikostí nBo-LAIT proteinu s rekombinantními CD 14 proteiny byla použita Westernova blotová analýza. 250 ng CD 14 proteinů bylo elektroforesováno na 12,5% SDS-polyakrylamidovém gelu a elektroforeticky přeneseno na PVDF membránu (Millipore) při 180 mA během 30 minut. Membrána byla blokována 1 hodinu v 5% sbíraném mléku v TBST (20mM Tris.HCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 0,025% Tween 20), následovala inkubace 1 hodinu s králičím anti-Bo-LAIT #842 Ab při koncentraci 2,5 µg/ml v TBST doplněném 5% sbíraného mléka. Blot byl promýván třikrát 10 minut/promytí v TBST. Pro detekci králičí protilátky byl použit kozí protikráličí IgG konjugovaný s křenovou peroxidasou (BioRad). Membrána byla pak třikrát promyta (10 minut/jedno promytí) TBST. Pro zviditelnění proteinů byla použita sestava ECL (Amersham). Pás 1: markery molekulové hmotnosti, pás 2: nBo-LAIT-842-Sepharosou afinitně vyčištěný protein nBo-LAIT, pás 3: rBo-Sf9-12CA5 afinitně vyčištěný, od Sf9 hmyzích buněk odvozený rekombinantní hovězí CD 14, pás 4:

rBo-C127ⁿ842-Sepharosou afinitně vyčištěný rekombinantní hovězí CD 14 odvozený od C127 myší buněčného linie nádoru prsu.

Obrázek 10 ukazuje srovnání aktivity podporující růst nBo-LAIT a LPS. Jak je popsáno u obrázku 1A byly připraveny, kultivovány a izolovány odpočívající myší slezinné B buňky o vysoké hustotě. Na počátku kultivace byly přidány uvedené koncentrace buď afinitně vyčištěného nBo-LAIT (afinitně vyčištěného jak je popsáno pro obrázek 1) nebo LPS odvozeného od *S. typhosa* (Difco).

Obrázek 11 ukazuje srovnání aktivity nBo-LAIT a LPS podporující diferenciaci. Jak je popsáno u obrázku 1A byly připraveny a kultivovány odpočívající myší slezinné B buňky o vysoké hustotě. Replikační kultury byly iniciovány použitím 10 µg/ml LPS [*S. typhosa* (Difco)] nebo 500 ng/ml afinitně vyčištěného nBo-LAIT. V uvedených časech byly zpracovány. Komerčně dostupnou sestavou ELISA byla kvantitativním stanovením IgM přítomného v supernatantech vyhodnocena kumulativní produkce IgG.

Obrázek 12 ukazuje srovnání aktivity podporující růst nBo- a rBo-LAIT proteinů s LPS. Odpočívající, myší slezinné B buňky s vysokou hustotou byly připraveny, kultivovány a získány tak, jak je popsáno u obrázku 1A. Na počátku kultivace byly přidány uvedené koncentrace nBo-LAIT (vyčištěný jak je popsáno u obrázku 1A), rBo-LAIT generovaný buď v jakýchkoliv hmyzích buňkách nebo v savčích buňkách a LPS [*S. typhosa* (Difco)]. Rekombinantní Bo-LAIT odvozený od hmyzích buněk byl afinitně vyčištěn ze supernatantů kultury Sf9 buněk transfektovaných Bo-LAIT cDNA. Expresní vektor obsahoval 3' 27mer kodující nonapeptid odvozený od chřipkového hemaglutininu (HA tag). Afinitní vyčištění bylo provedeno tak, že se Sf9 supernatanty nechají projít Sepharosou konjugovanou s mAb 12CA5 (*Cell* 184, 57, 787.), která rozpoznává HA tag. Afinitní vyčištění rekombinantního Bo-LAIT odvozeného od savčího expresního systému, C127, bylo provedeno jako pro nBo-LAIT použitím Sepharosy konjugované s IgG izolovaným z polyklonálního antisera odvozeného od králičího 842.

Obrázek 13 ukazuje srovnávací analýzu aktivity podporující růst nBo-LAIT na populacích vyčištěných primárních B a T buněk. Odpočívající myší slezinné buňky o vysoké hustotě byly připraveny jako je popsáno pro obrázek 1A. Primární T buňky byly izolovány z lymfatických žláz stejných živočichů, z nichž byly izolovány slezinné B buňky. Konkrétně - suspenze lymfatických žláz byla nechána projít přes anti-Ig kolony (Biotex Labora) podle pokynů výrobce a jak bylo dříve popsáno (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 967.). Populace T buněk byly $> 95\%$ CD3⁺ a $< 0,5\%$ mIg⁺, jak byly vyhodnoceno imunofluorescenčním obarvením a FACS analýzou. Levý panel ukazuje proliferaci odpovědi kultur obsahujících $1,5 \cdot 10^5$ vyčištěných T nebo B buněk v odpovědi na uvedené koncentrace afinitně vyčištěného nBo-LAIT. Pravý panel ukazuje proliferaci odpovědi stejného počtu B nebo T buněk buď na 50 $\mu\text{g/ml}$ LPS [*S. Typhosa* (Difco)] nebo 1 $\mu\text{g/ml}$ konkanavalinu A (Sigma). Byly použity podmínky bez sera a všechny stimulace byly přidány na počátku kultivace. Po 40 hodinách bylo ke všem kulturám přidáno 1 μCi ³H-TdR, po 6 hodinách byla provedena izolace filtračními disky a příjem thymidinu byl vyhodnocen scintilační spektroskopií. Uvedená čísla znamenají průměrný počet cpm duplikátních kultur.

Obrázek 14 ukazuje nBo-LAIT zprostředkovaný růst myších buněk nezávislý na plodovém telecím seru. Odpočívající myší slezinné buňky o vysoké hustotě byly připraveny, kultivovány a izolovány tak, jak je popsáno pro obrázek 1A. Kultivační medium bez sera bylo doplněno uvedenou koncentrací teplem deaktivovaného (1 hodina při 56 °C) plodového telecího sera (Gibco BRL) a buď bez stimulace (■), s 0,5 $\mu\text{g/ml}$ afinitního nBo-LAIT (○) nebo 50 $\mu\text{g/ml}$ LPS [*S. typhosa* (Difco)] (·). Po 40 hodinách byl ke kulturám přidán 1 μCi ³H-TdR, po 6 hodinách byla provedena izolace filtračními disky a příjem thymidinu byl vyhodnocen scintilační spektroskopií. Uvedená čísla znamenají průměrný počet cpm duplikátních kultur.

Obrázek 15 ukazuje Northern blotovací analýzu CD14 obsaženého v: 1) ultrafrakcionovaných splenocytech, 2) odpočívající-

cích myších slezinných buňkách o vysoké hustotě připravených jako je popsáno pro obrázek 1A a 3) FACS sortovaných mIg^+ B buňkách odvozených od druhé odpočívající populace s vysokou hustotou. Pro FACS sortování byly buňky s vysokou hustotou inkubovány s FITC-konjugovanou mAb 187.1, specifickou pro myší $Ig\kappa$ (Hybridoma 1981, 1, 5.). Je uveden podíl mIg^+ buněk v každé ze tří populací. Celková RNA byla izolována z 10^7 buněk každé ze tří populací použitím metody Trizol (Gibco BRL Life Technologies) podle pokynů výrobce a rozštěpena na 1,2% formaldehydovém gelu. RNA byla přenesena na nylonovou membránu (Gene Screen) vakuovým blotovacím systéme (Pharmacia). Zesíťování, předhybridizace a hybridizace byly provedeny podle doporučení výrobce membrán. Myší CD 14 specifická sonda byla odvozena od genomového myšího CD 14 fragmentu generovaného PCR použitím přímého primeru 5'-CTA GAA TTC TCT CCC GCC CCA CCA GAG CCC TGC G-3' (sekv. id. č. 11) a obráceného primeru 5'-CTA GAA TTC TTA AAC AAA GAG GCG ATC TCC TAG G-3' (sekv. id. č. 12). Amplifikovaný fragment byl vyčištěn elektroforesou na agarosovém gelu, vyštěpen a vyčištěn. L32 cDNA sonda (Nucl. Acid Res. 1988, 16, 10751.), specifická pro konstitutivně exprimovanou mRNA velkého ribosomálního podjednotkového proteinu, byla použita pro normalizace RNA náplně. Sondy (každá 100 ng) byly označeny použitím sestavy pro označování oligomerů (Pharmacia) na specifickou aktivitu 0,2 až $1 \cdot 10^9$ cpm/ μg DNA. Membrána byla pak promývána 0,2xSSC, 1% SDS 2 hodiny při 65 °C a exponována na rentgenový film (Kodak, Biomax MS) 1 až pět dnů.

Obrázek 16 ukazuje odpověď odpočívajících myších slezinných buněk o vysoké hustotě, které nebyly nebo byly dále vyčištěny na mIg^+ buňky, jak je popsáno pro obrázek 15, na 50 mg/ml LPS [*S. typhosa* (Difco)] a 0,5 $\mu g/ml$ afinitně vyčištěného nBo-LAIT. Byly získány kultury, přidán k nim triciovaný thymidin, kultury byly izolovány a příjem thymidinu byl vyhodnocen jak je popsáno pro obrázek 1A. Uvedená čísla představují průměrný počet cpm duplikovaných kultur.

Obrázek 17 ukazuje nezávislost CD40 rekombinantním Bo-LAIT

zprostředkované aktivace B buněk. Odpočívající myši slezinné buňky o vysoké hustotě byly izolovány buď z konvenčních C57BL/6 myši nebo z CD40 deficitních zvířat získaných cíleným prasknutím místa CD40 (*Immunity* 1994, 1, 167.). Buňky ($1,5 \cdot 10^5$) byly kultivovány v přítomnosti 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS nebo uvedených koncentrací rBO-LAIT odvozených v expresním systému hmyzích buněk. Ke kulturám byl přidán označený thymidin a produkt izolován jak je uvedeno u obrázku 1A. Uvedená čísla znamenají průměrný počet cpm duplikátních kultur.

Obrázek 18 ukazuje srovnávací stříbrem obarvenou (levý panel) a imunoblotovanou (pravý panel) analýzu přírodního CD 14 odvozeného od člověka (nHU), krávy (nBo) a myši (nMo). nHu byl izolován z moče nefrotických pacientů, jak bylo dříve popsáno (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 1779.). nBo byl afinitně vyčištěn z hovězího mleziva, jak je popsáno v příkladu 3. nMo byl izolován ze supernatantu myšího hybridomu OKT3 (*PNAS USA* 1980, 77, 4914.) afinitní chromatografií použitím CD 14 specifické mAb 3C10 imobilizované na Sepharose 4B (*J. Exp. Med.* 1983, 15, 126.). Pro obarvení stříbrem se 1 μg každého vzorku dělí na 10% SDS-PAGE 45 minut při 200 V. Protein se pak zviditelní obarvením stříbrem (Biorad) podle pokynů výrobce. Pro imunoblotování se dělí 250 ng každého vzorku 10% SDS-Page 45 minut při 180 mA, a elektroforeticky se přenáší na PVDF membránu (Millipore) při 180 mA 30 minut. Membrána se 1 hodinu blokuje v 5% sbíraném mléku v TBST (20mM Tris.HCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 0,025% Tween 20), následuje jednogodinová inkubace s mAb 3C10 (*J. Exp. Med.* 1983, 15, 126.) při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v TBST doplněném 5% sbíraného mléka. Blot se promývá třikrát 10 minut /mytí v TBST. Pro detekci myší protilátky se použije kozí protimyší IgG konjugovaný s křenovou peroxidasou (BioRad). Membrána se pak třikrát promyje (10 minut/promytí) TBST. Pro zviditelnění proteinů se použije sestava ECL (Amersham).

Obrázek 19 ukazuje srovnávací analýzu přírodního CD 14 po-
cázející od člověka (nHU), krávy (nBo) a myši (nMo) pro stimu-
laci růstu myších B buněk. Tyto tři proteiny byly vyčištěny

tak, jak je to popsáno u obrázku 18. Odpověď odpočívajících myších slezinných buněk s vysokou hustotou, izolovaných jak je popsáno u obrázku 1A, byla vyhodnocována na tři uvedené koncentrace těchto tří proteinů. Ke kulturám bylo přidáno 1 μCi ^3H -Tdr po 40 hodinách a izolovány byly po 46 hodinách. Uvedená čísla znamenají index stimulace odvozený podělením středního počtu cpm stimulovaných duplikátních kultur uvedených koncentrací nHu, nBo a nMo středním počtem cpm duplikátních kultur, které neobsahovaly žádnou stimulaci.

Obrázek 20 A a B ukazuje aktivitu nBo-LAIT podporující růst u lidských B buněk izolovaných z krve chordy a tonzil. Obrázek 20A ukazuje příjem thymidinu B buňkami krve chordy izolovanými pozitivní selekcí. Suspenze leukocytů krve chordy byly obarveny fluoresceinem označenou mAb specifickou na pan-B buněčný marker CD72. Potom byly na sorteru buněk aktivovaném fluorescencí (FACStar Plus, Becton Dickenson) izolovány leukocyty chordy pozitivní na CD72 v čistotě vyšší než 98 %. B buňky ($1,5 \cdot 10^5$) byly kultivovány jak popsáno u obrázku 1A, bez stimulace nebo v přítomnosti 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nBo-LAIT. B buňky byly kultivovány také v jamkách, které byly předem potahovány 9 hodin kombinací dvou mAbs, jedné specifické pro lidský Igk [LO-HK3, (v "*Rat Hybridomas and Rat Monoclonal Antibodies*", H. Bazin (red.), CRC Press, Boca Raton, Fl., USA)] a jedné specifické na lidský Ig λ [LO-HL2, (v "*Rat Hybridomas and Rat Monoclonal Antibodies*", H. Bazin (red.), CRC Press, Boca Raton, Fl., USA)], každá v potahovací koncentraci 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bez další stimulace nebo v přítomnosti 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nBo-LAIT. Ke kulturám byl přidán po 60 hodinách 1 μCi ^3H -TDR, o 12 hodin později byly izolovány na filtračních discích a příjem thymidinu byl vyhodnocen scintilační spektroskopií. Obrázek 20B ukazuje výsledky získané použitím B buněk tonzily připravených negativní selekcí. Podrobně - suspenze leukocytů byly označeny biotinylovanou mAb specifickou na CD3 ϵ (Becton Dickenson) a následně avidinem konjugovaným s mikroperličkami obsahujícími železo (Becton Dickenson). Označená populace byla nechána projít MACS (Becton Dickenson) a eluent byl izolován. Tato populace obsahovala méně

než 1 % T buněk a více než 97 % B buněk, jak bylo vyhodnoceno imunofluorescenčním obarvením linií specifických pro mAbs. B buňky ($1,5 \cdot 10^5$) byly kultivovány tak, jak popsáno u obrázku 1A. Stejně jako pro B buňky krve chordy, B buňky tonzily byly kultivovány v přítomnosti a nepřítomnosti mAbs navázaných na destičky specifických pro lidský Ig κ a λ , ale v tomto případě byly jamky předem potaženy koncentrací 0,5 μ g/ml každé mAbs. Ke kulturám byl přidán 3 H-TdR, kultury byly izolovány a příjem thymidinu byl vyhodnocen tak, jak je popsáno u obrázku 20A.

Obrázek 21 ukazuje koncentraci CD 14 v mléku z prsu v době po porodu. Toto mléko bylo získáno od dvou dárců (A.D. a S.B.) po porodu v uvedených dobách. Byla připravena vyčeřená syrovátka. Množství CD 14 bylo stanoveno použitím sestavy ELISA specifické pro CD 14 (IBL, Hamburg) podle pokynů výrobce.

Popis výhodných provedení

Pokusy, které jsou popsány níže, ukazují čištění přírodního hovězího LAIT proteinu (nBo-LAIT), zde také označovaného jako hovězí CD 14, z mlezivové syrovátky. Je uvedena analýza aminokyselinové sekvence vyčištěného nBo-LAIT a je uvedena homologie s lidským CD 14. Je uveden způsob čištění od lidského CD 14. Je uveden způsob čištění myšího CD 14 ze supernatantu hybridomu.

Jsou popsány testy in vitro stimulace B buněk pro afinitně vyčištěný mlezivový Bo-LAIT, lidský mlezivový CD 14, lidský CD 14 pocházející z moče a myší CD 14 pocházející ze supernatantu hybridomu. Jsou uvedeny klidové slezinné B buňky s vysokou hustotou pocházející z myší při vstupu a průchodu buněčným cyklem v odpovědi na LAIT protein ze tří druhů a pro diferenciaci na buňky sekretující ve vysokém množství imunoglobulin jako odpověď na vystavení působení LAIT-proteinu z hovězího dobytka. K těmto aktivacím dochází v definovaném mediu bez sera. Je také uvedeno, že přítomnost plodového telecího sera v kulturačním mediu neovlivňuje LAIT proteinem zprostředkovanou aktivaci B

buněk. Jsou uvedeny pokusy ukazující, že nBo-LAIT specificky aktivuje myší B buňky a nikoliv myší T buňky a že LAIT protein aktivuje populace B buněk, v nichž je mRNA CD 14 nedetegovatelná. Jsou uvedeny také pokusy demonstrující, že hovězí CD 14 indukuje růst B buněk, v nichž není exprimován CD 40.

Je popsána izolace, klonování a sekvenování jak genomové DNA tak cDNA kodující hovězí CD 14. Srovnání sekvence s myším a lidským CD 14, známých z literatury, ukazuje vzájemný vztah mezi Bo-LAIT a těmi CD 14, které již byly dříve známy. Jsou uvedeny aktivity růstu a diferenciaci B buněk související s hovězím CD 14.

Jsou popsány způsoby exprese rekombinantního hovězího CD 14 jak v hmyzím tak v savčím systému. Konkrétně - baculovirus expresní vektor byl používán jako pomoc při exprimování rekombinantních proteinů ve hmyzích buňkách. Srovnání růstových a diferenciacních vlastností B buněk přírodního Bo-LAIT (nBo-LAIT) a rekombinantního Bo-CD 14 (rBo-LAIT) odvozeného od baculovirus expresního systému odhalilo, že druhý z nich byl funkční a že měl specifickou aktivitu zhruba 50 % aktivity nBo-LAIT.

Myší buněčná linie prsního karcinomu, C127, byla použita jako příjemce cDNA kodující CD14 pocházející z hovězího dobytka. cDNA byla klonována do hovězího expresního vektoru papilloma viru. Byly zjištěny stabilní transfektanty C127. Rekombinantní protein CD 14 byl izolován ze supernatantů konfluentních C127 kultur afinitní chromatografií. Westernova blotová analýza hmyzích buněk a od C127 odvozených rekombinantních LAIT proteinů odhalila, že ve dvou expresních systémech byly generovány co- a/nebo po-translační modifikace. Specifická aktivita rekombinantního hovězího CD 14 pocházejícího ze savčích buněk byla stejná jako aktivita rekombinantního materiálu pocházejícího z hmyzích buněk.

Je uvedeno srovnání aktivity podporující růst B buněk pod-

porované přírodním Bo-LAIT a rekombinantním hovězím CD 14 pocházejícím z hmyzích buněk a ze savčích buněk. Dále je uvedena aktivita podporující růst přírodního Bo-LAIT na lidské B buňky izolované buď z tonzil nebo z krve chordy. Výsledky ukazují, že pokud jde o myší B buňky, lidské B buňky, izolované buď z novorozenců nebo dospělých, jsou citlivé na růst zprostředkovaný Bo-LAIT.

Je uvedeno, že koncentrace CD 14 přítomného v lidském mlezu a v mléku z prsu až do 78 dnů po porodu je troj- až dvacetinásobně vyšší než jaká byla pozorována v seru dospělých dárců.

ZPŮSOBY

Čištění hovězího LAIT-proteinu

Z první sekrece mléčné žlázy krav právě po porodu bylo získáno více než pět litrů mleziva.

i) Vyčeřená mlezivová syrovátka byla připravena odstředováním mleziva nejdříve při 4420xg po dobu 30 minut, aby se odstranily buňky a zbytky buněk. Supernatant z tohoto odstředování byl pak odstředován dvě hodiny při 250 000xg. Plovoucí tuky a peletovaný kasein byly odstraněny. Vyčeřená mlezivová syrovátka byla podrobena další frakcionaci.

Každá frakce odvozená od každé frakcionační techniky byla vyhodnocována na aktivitu in vitro podporující růst B buněk. Každá frakce byla vyhodnocována v širokém rozmezí koncentrací na svoji schopnost stimulovat růst odpočívajících B buněk pocházejících z myší sleziny o vysoké hustotě, jak bylo dříve popsáno (*J. Immunol.* 1983, 131, 581.). Pro tyto analýzy bylo použito definované medium bez sera [IMDM (Gibco), které bylo doplněno $5 \cdot 10^{-5}$ 2β-merkapt ethanol, 5 μg/ml železem nasyceného transferinu (Boehringer, Lewes, Anglie), 0,5 mg/ml odtučněného BSA (Boehringer), 100 jednotkami/ml penicilinu (Gibco), 100 μg/

/ml streptomycinu (Gibco) a esenciálními aminokyselinami]. Frakce, které jsou odvozeny z isolačního schematu popsaného níže, byly testovány přímo stejně jako v kombinaci s submitogenní koncentrací LPS (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Jak bude popsáno, pokud jde o dosaženou čistotu LAIT proteinu, byly odhaleny jeho přímé mitogenní vlastnosti.

ii) Vysolování proteinů obsažených v prostředcích mlezivové syrovátky bylo prováděno sekvenčním srážením v síranu amonném. Byla používána sekvence zvyšujících se koncentrací soli: 42 %, 50 %, 62 %, 65 % (obj./obj.) síranu amonného (AS). Koncentrace AS v supernatantu materiálu vysráženého při 42 % byla zvýšena na 50 %, materiál vysrážený při 50 % byl izolován a koncentrace AS ve zbývajícím supernatantu byla zvýšena na 62 % atd. Každá peleta vysrážená AS byla solubilizována v 10mM Tris-HCl, pH 8,0, obsahujícím 0,15M NaCl a 1mM AEBSF (TNAEBSF). Tyto frakce byly odsoleny a pufr byl zaměněn za TNAEBSF použitím 10DG kolon a testovány na bioaktivitu. Většina aktivity podporující růst B buněk byla izolována jako sraženina působením 62 % AS podle shora uvedeného schematu (neuvedeno).

iii) Aktivita byla pak obohacena a nakonec vyčištěna použitím tří postupných technik frakcionace proteinů. Padesát miligramů 62% AS obohacené frakce bylo aplikováno na kolonu s anexem, materiál byl dělen použitím gradientem soli od 50mM do 400mM NaCl v 10mM Bis-tris propanu se simultánním pH gradientem 7,5 až 9,5. Obrázek 1A ukazuje eluční profil z této kolony. Tabulka 1A uvádí frakci obsahující maximum aktivity, frakci č. 57. Dvaacet miligramů frakce č. 57 bylo pak nanášeno na kolonu s molekulovým sítem ekvilibrovanou v 20mM Tris-HCl, pH 8,0, obsahujícím 0,45M NaCl. Eluční profil této frakcionace je uveden na obrázku 1B a aktivita frakce maxima č. 38 je uvedena v tabulce 1B.

Tabulka 1A

	cpm.10 ⁻³
bez stimulace	0,8
LPS, 50 µg/ml	152,5
LPS, 0,25 µg/ml	3,9
frakce 57 + 0,25 µg/ml LPS	108,7

Tabulka 1B

	cpm.10 ⁻³
bez stimulace	0,4
LPS, 50 µg/ml	102,1
LPS, 0,25 µg/ml	1,3
frakce 36 + 0,25 µg/ml LPS	76,0

Tabulka 1C

	cpm.10 ⁻³
bez stimulace	0,7
LPS, 50 µg/ml	135,2
LPS, 0,25 µg/ml	3,5
frakce 36 + 0,25 µg/ml LPS	112,0

Jeden miligram frakce č. 38 se pak nanese na hydroxyapatitovou kolonu v 1mM NaCl a eluuje se gradientem 1 až 500mM pufru fosforečnanu draselného, pH 6,8. Eluční profil je uveden na obrázku 1C s doprovázející aktivitou uvedenou v tabulce 1C.

Vložka na obrázku 1C představuje SDS-PAGE analýzu frakce s maximální aktivitou s následujícím vybarvením stříbrem a ilu-

struje jediný hlavní pás s relativní molekulovou hmotností 46 000 až 50 000.

Sekvenační analýza hovězího LAIT-proteinu

Vyčištěný nBo-LAIT byl podroben sekvenační analýze. Bylo zjištěno, že N-konec je blokován. Tento materiál byl podroben hydrolýze buď bromkyanem nebo trypsinem. Bylo generováno pět fragmentů a ty byly před sekvenováním vyčištěny buď HPLC na obrácené fázi nebo SDS-PAGE s následujícím elektroblotováním na PVDF membráně.

Jak je ilustrováno na obrázku 2, všech pět fragmentů bylo seřazeno s významnou homologií s lidským CD 14.

Afinitní čištění LAIT proteinu z hovězího a lidského mleziva

nBo-LAIT izolovaný použitím technik klasické frakcionace proteinů byl použit pro přípravu králičí (č. 842) polyklonální protilátky. IgG frakce tohoto antisera byla vyčištěna na Sepharose s proteinem A a následně navázána na Sepharosu 4B.

Sekvenční homologie nBo-LAIT a lidského CD 14 (HuCD 14) ukazuje, že Bo-LAIT může být hovězím homologem CD14. To bylo dále zkoumáno přípravou afinitní kolony s použitím dostupné monoklonální protilátky (mAb) specifické pro HuCD 14. Tato protilátka, 63D3 (PNAS 1980, 77, 6764.), byla vyčištěna z odpovídajícího supernatantu hybridomu na afinitní koloně obsahující mAb 187.1 [kryší protimyšší kappa (Hybridoma 1981, 1, 5.)] konjugovanou na Sepharosu 4B, a vyčištěná mAb potom konjugována na Sepharosu 4B.

Hovězí vyčeřená mlezivová syrovátka byla postupně vysolena síranem amonným jak shora popsáno. Lidská mlezivová syrovátka byla frakcionována na HR koloně Sephacrylu S100. Frakce, které obsahují maximum aktivity podporující růst B buněk, byly pak afinitně vyčištěny použitím buď kolony s 842-Sepharosou pro ho-

vězí materiál nebo kolony se 63D3-Sepharosou pro lidský materiál.

SDS-PAGE analýza afinitně vyčištěného mlezivového Bo-LAIT a afinitně vyčištěného lidského mlezivového CD 14 je uvedena na obrázku 3 a související aktivita podporující růst B buněk je uvedena v tabulce 2. Jak je uvedeno na obrázku, převažující pás byl izolován z obou mlezivových přípravků, p46-50 hovězího materiálu (obrázek 3, pás 3) a p50-62 lidské molekuly (obrázek 3, pás 4).

Tabulka 2

	hovězí č. 842, pH 2,5 eluát	hovězí 6303, pH 2,5 eluát
100 ng/ml	20,00*	0,3
10 ng/ml	1,49	0,3
• + LPS↓	16,5	21,1
• + b-7-6	5,17	8,5

* Číslo znamená počet cpm.10³ po 40 hodinách kultivace.

Bioaktivita uvedená v tabulce 2 ukazuje, že afinitně vyčištěný Bo-LAIT v koncentraci 100 ng/ml stimuluje růst odpočívajících myších B buněk. Jestliže se přidá v množství 10 ng/ml, tento materiál již není mitogenní, ale po přidání buď submitogenní koncentrace LPS nebo mAb specifické pro myší IgM, b-7-6 (*Eur. J. Immunol.* 1984, 14, 753.), bylo dosaženo kostimulace. Nebylo zjištěno, že by afinitně vyčištěný lidský materiál byl při testovaných koncentracích sám mitogenní, ale při 10 ng/ml byl růst B buněk stimulován kostimulanty stejně účinně jak hovězím materiálem.

Bioaktivita nBo-LAIT je labilní vůči teple. Jak bylo ilustrováno na obrázku 4A, ošetření afinitně vyčištěného Bo-LAIT 10 minut při 95 °C ničí související aktivitu podporující růst

B buněk. Podobné ošetření LPS nemělo na jeho aktivitu žádný vliv (vločka obrázku 4A). Polyklonální anti-Bo-LAIT, č. 842, dále účinně blokoval aktivitu nBo-LAIT podporující růst B buněk, zatímco neovlivňoval aktivitu LPS. Viz obrázek 4B a vložku.

Molekulární klonování genomového hovězího CD 14

Hovězí genomová EMBL3 SP6/T7 lambda knihovna (Clontech) byla analyzována fragmentem lidské CD 14 cDNA o 1400 nukleotidech (získán od R. Ulevitch, Scripps Institute). Bylo získáno patnáct pozitivních signálů a nejsilnější signál, clon "B2", byl vybrán pro další analýzu a klonování hovězího CD 14.

Isolovaná a vyčištěná fágová DNA z klonu B2 měla velikost insertu zhruba 15 000 nukleotidů. Vyčištěná DNA byla rozštěpena a výsledný EcoRI-XhoI fragment o velikosti 7100 nukleotidů, který obsahuje homologní sekvenci k lidskému CD 14, byl subklonován do pBluescriptSK⁺ (Startagene). Restrikční mapování s použitím širokého rozsahu enzymů následované hybridizací lidskou CD 14 sondou umožnilo lokalizaci hovězího CD 14 genu v klonovaném fragmentu (obrázek 5A). Další restrikční mapování bylo použito pro subklonování čtyř kratších fragmentů (I až IV) do pBluescriptSK⁺ a následné sekvenování zhruba 5000 nukleotidů zahrnujících úplný gen hovězího CD 14 (obrázek 5C). Pro konstrukci skupin překrývajících se neřídících delecí byl použit fragment I (EcoRI-BamHI, 3200 nukleotidů), II (PstI-PstI, 1350 nukleotidů), III (PstI-PstI, 300 nukleotidů) a IV (PstI-XhoI, 950 nukleotidů). Tyto fragmenty poskytly přilehlou sekvenci místa hovězího CD 14. Obrázek 5B znázorňuje organizaci genomového fragmentu hovězího CD 14.

Molekulární klonování cDNA hovězího CD 14

Poly(A⁺)RNA byla izolována z hovězích periferních krevních monocytů. Pro pakážování rekombinantních lambda fágových DNA byl použit pakážovací extrakt Gigapack II Packaging Extract

(Stratagene). cDNA knihovna byla připravena použitím vektoru Excell EcoRI/CIP se sestavou "Time Saver cDNA Synthesis Kit" (Pharmacia).

Tato knihovna byla analyzována sondou odvozenou od kodující přeložené oblasti hovězího genomového CD14 fragmentu PCR (podrobnosti jsou uvedeny níže v části popisující přípravu baculovirus rekombinantního expresního vektoru s hovězím CD 14 fragmentem). Sonda byla označena ^{32}P náhodnou hexanukleotidem-
-naočkovanou syntézou druhého vlákna (Oligolabelling Kit, Pharmacia Biotech.). Analýza byla prováděna za podmínek vysoké selektivity (0,1xSSC, 1% SDS, 65 °C, 3 hodiny). Jeden ze získaných klonů (ExCell/BoCD 14-1) obsahoval insert o 1400 nukleotidech, který byl subklonován do pBluescript SK⁺ a sekvenován použitím subklonů pBS/BoCD 14 obsahujících progresivní přečnívající neřídící delece (Nested Deletion Kit, Pharmacia).

Tento hovězí CD 14 cDNA klon sestával z 1327 párů nukleotidů (bp). Po ATG iniciačním kodonu následuje otevřená čtecí fáze o 1116 nukleotidech a TAA stop kodon na nukleotidu 1202. Otevřená čtecí fáze je obklopena 82 páry nukleotidů 5' nepřeložené sekvence a 122 páry nukleotidů 3' nepřeložené sekvence. Polyadenylační signál 5'-ATTAAAA-3' je umístěn 105 párů nukleotidů od 3' koncového kodonu.

Seřazení hovězí CD 14 genomové a cDNA sekvence odhalilo, že jsou kolineární od počátku 5' cDNA až do prvního a jediného intronu (88 párů nukleotidů), který se nalézá bezprostředně za ATG iniciačním kodonem. Zbytek kodující sekvence je nepřerušen. Organizace intron-exon dříve popsána pro lidský a myší CD 14 je tedy v hovězím CD 14 přesně zachována. Srovnání přeložené nukleotidové sekvence hovězí CD 14 cDNA se sekvencemi lidské a myší cDNA odhalilo 74,2 % a 62,6 % nukleotidů identických v kodujících oblastech (obrázek 6).

Primární struktura hovězího CD 14 proteinu byla odvozena z cDNA sekvence a sestává ze 374 aminokyselin. Po prvním me-

thioninu následuje prodloužení 15 hydrofobních a/nebo neutrálních zbytků, typicky eukaryotických signálních peptidů. Srovnání aminokyselinových sekvencí hovězího CD 14 s lidským a myším CD 14 ukazuje na 73,1 % a 62,3 % identity (obrázek 7). Existují tři potenciální N-glykosylační místa (Asn-X-Thr/Ser), všechna jsou v lidském a myším CD 14 zachována. Navíc hovězí CD 14 obsahuje opakující se motify bohaté na 10 leucinů (LXXLXL), obvyklé jak pro lidský tak myší CD 14 (*J. Immunol.* 1990, 145, 331.).

Expresa rekombinantního hovězího CD 14 v hmyzích buňkách

Při přípravě fragmentů DNA pro výrobu rekombinantních CD 14 proteinů, byly PCR generovány CD 14 překládané oblasti o plných délkách fragmentů. Na základě informace o sekvenci získané z hovězí CD 14 cDNA byly navrženy specifické řady PCR primerů. PCR primer pro 5' konec obsahoval: dvě rozpoznávací sekvence pro NheI, Kozakovu sekvenci, ATG iniciační kodon a prvních 17 až 21 nukleotidů překládané kodující oblasti. PCR primer pro 3' konec obsahoval: dvě rozpoznávací sekvence pro NheI a posledních 21 až 24 nukleotidů překládané kodující oblasti až k a vyjma TAA stop kodonu (obrázek 8A).

Hovězí CD 14 překládaná oblast byla amplifikována použitím EcoRI-XhoI genomového CD 14 fragmentu o 7100 nukleotidů (viz shora) jako templát. PCR byla prováděna použitím Pwo DNA polymerasy (Boehringer). Amplifikace byla prováděna přidáním 5 ng templátu DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 25 mM KCl, 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 250 mM každého dNTP, 250 nM každého primeru a 5 jednotek Pwo DNA polymerasy v konečném objemu 100 μl . Vzorby byly amplifikovány 30 cyklů při anelující teplotě 70 °C použitím zařízení DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer).

Amplifikované fragmenty byly rozštěpeny působením NheI a jednotlivě subklonovány po směru vlákna polyhedrinového polymeru do baculovirus transferového vektoru pETL-HA (C. Richardson, OCI/Amgen). Tento vektor je odvozen od pETL (*Methods in Molecu-*

lar Biology 1995, 39, 161.) a obsahuje 3' NheI-BamHI DNA fragment o 30 párech nukleotidů kodující nonapeptid odvozený od chřipkového hemagglutininu (HA), následuje stop kodon TAG (5'-TAC CAA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TAG-3') (sekv. id. č. 13). Rekombinantní transferové vektory byly jednotlivě kotransfektovány divokým baculovirem *Autographa californica* jaderným polyhedrosis virem (AcMNPV, Linear Transfection Module, Invitrogen) do buněk SF9 (*Methods in Molecular Biology* 1995, 39, 161.). Byly vybrány rekombinantní baculovirus klony a tyto klony byly vyčištěny podle daných protokolů (*Methods in Molecular Biology* 1995, 39, 161.). Buňky SF9 byly infikovány rekombinantním baculovirem s multiplicitou 5 až 10:1.

Byla prováděna analýza doby, aby se stanovil optimální čas potřebný pro to, aby infikované SF9 buňky sekretovaly rekombinantní CD 14 proteiny. Imunoblotová analýza buněčného media provedená v různých časech použitím anti-HA monoklonální protilátky 12CA5 (*Cell*, 1984, 57, 787.) ukázala, že exprese rekombinantních CD 14 proteinů dosáhla maximální úrovně za 96 hodin. Tato doba byla zvolena v následujících pokusech pro produkci rekombinantních proteinů pro biotesty (viz níže). Westernova blotovací analýza rekombinantního hovězího CD 14 odvozeného od SF9 je ilustrována na obrázku 9.

Expresa rekombinantního hovězího CD 14 v savčích buňkách

Pro stabilní expresi rekombinantního hovězího CD 14 v savčích buňkách jsme používali modifikovanou verzi pBPV episomálního prsního expresního vektoru (Pharmacia). Aby byla umožněna přímá selekce transformovaných buněk, pBPV byl modifikován zavedením genu resistance na neomycin, který byl vložen 3400 nukleotidů proti proudu expresní kazety. Směrem k tomuto konci byl do pCRII (Invitrogen) subklonován HindIII-XbaI fragment z pBCMGsneo o velikosti 1950 nukleotidů (*Eur. J. Immunol.* 1988, 18, 98.). Rekombinantní konstrukce, pCRII-neo, byla vyčištěna a klonovaný fragment byl amplifikován PCR. PCR primery byly navrženy tak, aby rozpoznávací sekvence pro SalI byla zahrnuta

jak na 5' tak na 3' konci. Sekvence primeru byly doplňkové k oblasti polylinkeru vektoru pCRII, obklopujícímu klonujícímú místu HindIII (primer A) a XbaI (primer B).

primer A: 5'-GCA GTC GAC ACT ATA GAA TAC TCA AGC-3'
(sekv. id. č. 14)

primer B: 5'-TTC GTC GAC ATT GGG CCC TCT AGA-3'
(sekv. id. č. 15)

Konečný produkt byl rozštěpen působením Sal I, vyčištěn na gelu a subklonován do Sal I klonujícího místa plasmidu pBPV ve stejné orientaci transkripce jako je orientace obsažené expresní kazety. Byly generovány plasmidové přípravky modifikovaného expresního vektoru, pBPVneo-13 (Plasmid Maxi Kit, Quiagen).

DNA fragment kodující přeloženou oblast hovězího CD 14 byly připraveny PCR amplifikací genu do vektoru pETL-HA. 5' koncový PCR primer použitý pro amplifikační reakci zahrnoval: Xho I rozpoznávací sekvenci následovanou sekvencí pro rozpoznání Nhe I (přítomnou ve vektoru pETL-HA), Kozakovu sekvenci, ATG iniciační kodon a prvních 11 až 13 nukleotidů překládané oblasti. Jaderný PCR primer pro 3' konec obsahoval HA kodující sekvenci, která byla prodloužena jako pro 5' sekvence, se zahrnutím Xho I rozpoznávací sekvence. Primery jsou uvedeny na obrázku 8B.

PCR byla prováděna použitím Pwo DNA polymerasy (Boehringer Mannheim). Amplifikace byly prováděny přidáním 5 ng DNA templátu, 10 mM Tris-HCl, pH 8,85, 25 mM KCl, 5mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 250 mM každého dNTP, 250 nM každého primeru a 5 jednotek Pwo DNA polymerasy v konečném objemu 100 μl. Vzorby byly amplifikovány 30 cyklů při anelační teplotě 70 °C s použitím zařízení DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer).

Amplifikované primery byly rozštěpeny působením Xho I a gel byl vyčištěn. Tyto fragmenty pak byly subklonovány do

pBPVneo-13 po směru myšního promotoru metallothioneinu I. Před subklonováním byl pBPVneo-13 předzpracován s příslušným restriktivním enzymem a defosforylován telecí intestinální fosfatasou. Rekombinantní plasmidy byly připraveny použitím sestavy Plasmid Maxi Kit (Quiagen).

Rekombinantní plasmid (pBPVneo-13-BoCD 14) byl transfektován do myší prsní nádorové buněčné linie C127 (*PNAS* 1981, 78, 2727.) použitím 20 μg DNA/ 10^7 buněk. Transfer DNA byl proveden elektroporací při 960 μF /280 V použitím zařízení Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories). Stabilní transformanty byly vybrány v přítomnosti 1,5 mg/ml G418 (Life Technologies).

Transfektanty exprimující vysoká množství membránového CD 14 (netransfektovaný C127 a negativní na CD 14) byly obohaceny imunofluorescenčním obarvením s následujícím sortováním fluorescenčně aktivovaných buněk použitím zařízení Becton Dickinson FACStar Plus. Úroveň membránové exprese exogenního proteinu dobře korelovala s množstvím sekretovaného CD 14 získaného ve 48-hodinovém supernatantu konfluentních kultur transfektovaných buněk C127. Na rozdíl od čištění rekombinantního materiálu generovaného ve hmyzích buňkách, nebylo zjištěno, že je možné afinitně vyčistit materiál odvozený od C127 použitím afinitních kolon s 12CA5-Sepharosou. Může tomu tak být kvůli ztrátě C-koncové HA čepičky na rekombinantních proteinech odvozených od C127 buněk. Důsledkem toho je, že rekombinantní hovězí CD 14 odvozený od C127 byl afinitně vyčištěn na 842-Sepharose. Imunoblotová analýza rekombinantního CD 14 odvozeného od C127 buněk je ilustrována na obrázku 9.

Srovnání aktivity nBo-LAIT a LPS podporující růst a diferenciaci

Výsledky uvedené na obrázku 10 ilustrují to, že přírodní nBo-LAIT podporuje růst odpočívajících myších slezinných B buněk s vysokou hustotou s účinnostmi zhruba 200krát vyššími než u LPS. nBo-LAIT v množství 50 ng/ml tedy vede k indukci DNA

syntézy srovnatelné s tou, která byla pozorována v přítomnosti 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS.

Schopnost nBo-LAIT indukovat růst B buněk se shoduje s jeho kapacitou indukovat diferenciaci odpočívajících myších slezinných B buněk s vysokou hustotou, na sekreci imunoglobulinu. Jak je ilustrováno na obrázku 11, množství kumulativního IgM indukovaného 500 ng/ml nBo-LAIT je srovnatelné s množstvím indukovaným 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Bylo vyhodnoceno množství sekrece IgM 24hodinové kultury. 500 ng nBo-LAIT indukovalo 956 ± 10 ng/ml, $754 \pm 8,7$ ng/ml a $25 \pm 1,4$ ng/ml IgM u 24hodinové kultury během 48 až 72 hodin, 72 až 96 hodin a 96 až 120 hodin. Odpovídající hodnoty odvozené od kultur stimulované 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS byly: 1442 ± 71 ng/ml, 874 ± 32 ng/ml a 183 ± 3 ng/ml. To tedy znamená, že nBo-LAIT má schopnost indukovat u odpočívajících myších slezinných B buněk s vysokou hustotou sekreci imunoglobulinu v rychlostech srovnatelných s těmi, které byly pozorovány v tom případě, jestliže B buňky jsou stimulovány nejúčinnějšími běžně známými stimulačními činidly. Dále má schopnost provádět tuto indukci při koncentracích 1 až 10 % koncentrace LPS.

Vyhodnocována byla také schopnost nBo-LAIT indukovat zapnutí isotypu myších odpočívajících B buněk. Supernatanty pocházející ze shora popsaných kultur byly vyhodnocovány také na přítomnost IgG isotypů. Bylo pozorováno, že 500 ng/ml nBo-LAIT a 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS indukovalo kumulativní množství (ng/ml pátý den) IgG1: $7,0 \pm 0,1$ a $5,6 \pm 0,6$, IgG2a: 358 ± 3 a 406 ± 8 , IgG2b: 8 ± 1 a 11 ± 2 , IgG3: 75 ± 5 a $75 \pm 0,5$, a IgA: $6,5 \pm 1,5$ a $5,0 \pm 0,3$. nBo-LAIT má tedy schopnost indukovat zapínání některých isotypů odpočívajícími myšími B buňkami v nepřítomnosti T buněk.

Srovnávání aktivit nBo- a rBo-LAIT proteinů podporujících růst

Rekombinantní formy hovězího CD 14, jak ty, které jsou odvozeny z hmyzích buněk tak ze savčích buněk, mají schopnost indukovat růst odpočívajících myších B buněk s vysokou hustotou.

Jak je ilustrováno na obrázku 12, rBoCD 14 odvozený od hmyzích buněk a afinitně vyčištěný na 12CA5-Sepharose indukuje silnou DNA syntézu v koncentracích 0,2 až 3 $\mu\text{g/ml}$. Srovnatelná aktivita byla podpořena rekombinantním materiálem odvozeným od savčího expresního systému. Obě rekombinantní formy podporují růst B buněk v koncentracích ng/ml srovnatelně s aktivitou pozorovanou pro nBo-LAIT odvozený od mleziva.

Ujištění, že biologická aktivita, zprostředkovaná nBo-LAIT izolovaným z hovězího mleziva buď klasickými způsoby frakcionace proteinů nebo afinitním vyčištěním, je zprostředkována pozorovaným proteinem, pochází ze stanovení biologické aktivity zprostředkované rekombinantním hovězím CD 14. Jak je ilustrováno na obrázku 9, zdánlivé molekulové hmotnosti žádné z rekombinantních forem hovězího CD 14 nejsou identické s molekulovou hmotností nBo-LAIT. Důvod pozorovaných rozdílů ve zdánlivé molekulové hmotnosti není jasný, ale může existovat díky buď rozdílným ko- a/nebo po-translačním modifikacím, různým velikostem jaderných proteinů nebo obojímu. Byl dokumentován od monocytů odvozený rozpustný CD 14 a může být generován v jednom ze tří běžně uznávaných mechanismů, z nichž každý by vedl k proteinům různých molekulových hmotností. Může být sekretován jako molekulou 33 kDa dlouhý; (*Eur. J. Immunol.* 1995, 25, 604.), membránou exprimovaná GPI navázaná forma může být rozštěpena fosfolipasami (*J. Immunol.* 1988, 141, 547; *EMBO J.* 1994, 13, 1741.) a membránou exprimovaná GPI navázaná forma může být štěpena serin/threoninovými proteasami, údajně exprimována na vnější plasmové membráně monocytu samotného a aktivována ještě necharakterizovanými způsoby (*J. Immunol.* 1991, 147, 1567.). Zbývá stanovit, jestli rozdílné zdánlivé molekulové hmotnosti rBo-LAIT a od mleziva odvozeného nBo-LAIT existují díky rozdílným ko- a/nebo po-translačním modifikacím rekombinantních materiálů podpořených jejich příslušnými expresními systémy nebo rozdílným velikostem jaderného proteinu nebo obojímu.

Aktivita nBo-LAIT podporující růst je specifická pro B buňky

Když byly pozorovány biologické aktivity nBo-LAIT na myších B buňkách, byly zkoumány účinky na fyziologii myších T buněk. Skutečnost, že izolované vyčištěné B buňky odpovídají na nBo-LAIT nepředvídá možnost, že Bo-LAIT může také aktivovat T buňky.

T buňky lymfatické žlázy byly izolovány negativní selekcí na anti-Ig kolonách (Biotex Labora), jak bylo dříve popsáno (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 967.). Výsledná eluovaná populace obsahovala více než 95 % CD3⁺ buněk a více než 0,5 % mIg⁺ buněk, jak bylo vyhodnoceno imunofluorescenčním vybarvením a FACS analýzou. Slezinné B buňky s vysokou hustotou byly izolovány ze stejných myší a jak T buňky z lymfatických žláz tak slezinné B buňky byly vyhodnoceny na jejich odpovědi na nBo-LAIT. Čistota těchto populací byla vyhodnocena funkčně analyzováním jejich odpovědi na mitogen LPS specifický pro B buňky a mitogen specifický pro T buňky, konkanavalin A (ConA). Jak je ilustrováno na pravém panelu obrázku 13, B buňky, ale nikoliv T buňky, odpověděly silnou DNA syntézou na LPS, zatímco T buňky, ale nikoliv B buňky, odpověděly na ConA. Jak je ilustrováno na levém panelu, T buňky neodpověděly na nBo-LAIT v rozmezí testovaných dávek, zatímco B buňky odpověděly na nBo-LAIT v koncentracích 10 ng/ml a vyšších.

LAIT-proteinem indukovaný růst B buněk a plodové hovězí serum

Nedávno bylo ukázáno, že monocyty odpovídají na rozpustný CD 14 (sCD 14) izolovaný z moči nefrotických pacientů s produkcí pro-zánětlivých cytokinů (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 17790.) v nepřítomnosti proteinu vázajícího lipopolysacharid pocházejícího ze sera (LBP). Naproti tomu schopnost nízkých koncentrací LPS stimulovat produkci stejných cytokinů monocyty exprimujícími CD 14 je závislé na seru (*J. Exp. Med.* 1992, 176, 719.). Tato závislost na seru je překonána při vysokých koncentracích LPS. Produkce cytokinu monocyty indukovanými 10 ng/ml LPS je

tedy striktně závislá na serum/LBP, ale ta, která je indukována 50 mg/ml LPS, není.

Pro stanovení toho, jestli přítomnost plodového hovězího serového LPS by ovlivňovala schopnost nízkých koncentrací nBo-LAIT indukovat růst myších B buněk s vysokou hustotou, byla v širokém rozmezí FBS koncentrací testována odpověď vyvolaná 500 ng/ml nBo-LAIT a srovnána s odpovědí indukovanou 50 μ g/ml LPS. Jak je ilustrováno na obrázku 14, odpovědi B buněk na obě tyto stimulace nebyly ovlivněny přítomností až 9 % FBS přítomného v kultivačním mediu.

LAIT-proteinem indukovaný růst B buněk a mCD 14

Různá citlivost B buněk a monocytů na LPS zprostředkovanou aktivací by mohla souviset s expresí membránového CD 14 (mCD 14) druhými z nich. Bylo přímo ukázáno, že citlivost LPS zprostředkované aktivity může být dramaticky zvýšena přítomností mCD 14 na odpovídajících buňkách. Konkrétně bylo demonstrováno, že citlivost mCD 14 negativní pre-B buněčné linie na LPS je zvýšena zhruba tisícinásobně násilnou expresí exogenně GPI navázaného mCD 14 (*J. Exp. Med.* 1992, 175, 1697.). Sporné zůstává to, jestli primární B buňky exprimují mCD 14. Vysoká specifická aktivita Bo-LAIT při srovnání s LPS při aktivaci B buněk je v souladu s jejím způsobem aktivity, který není závislý na expresi mCD 14.

Aby se vyhodnotilo zahrnutí exprese mCD 14 do aktivity B buněk zprostředkované Bo-LAIT, byla přítomnost CD 14 specifické mRNA hodnocena v populacích myších B buněk s vysokou hustotou použitých jako odpovědi. Celková RNA z 10^7 buněk každé ze tří populací odvozených od sleziny: ultrafrakcionovaných splenocytů; T-depletovaných, Percollem frakcionovaných buněk s vysokou hustotou, těch, které jsou rutinně používány při testech růstu zprostředkovaného LAIT-proteinem; a membránových Ig exprimujících buněk, které byly izolovány z T-depletované populace s

vysokou hustotou imunofluorescenčním označením kryší mAb konjugovanou s FITC specifickou pro myší Igκ [187,1 (*Hybridoma* 1981, 1, 5.)] a následujícím vyčištěním sorterem buněk Becton Dickinson FACStar plus. Jak je ilustrováno na obrázku 15, tyto tři populace obsahovaly 59,2 %, 83,5 % a 99,8 % mIg⁺ buněk. Isolovaná RNA z těchto populací byla dělena na 1,2% formaldehydovém gelu a postupně přesena na nylonovou membránu (Gene-Screen), zesíťována, předhybridizována a hybridizována dvěma sondami.

Myší CD 14 sonda byla odvozena PCT z genomové DNA. Konkrétně - amplifikace byla dělána přidáním Pwo DNA polymerasy (Boehringer Mannheim) k 0,4 μg Balb/c genomové DNA s přímým primerem: 5'-CTA GAA TTC TCT CCC GCC CCA CCA GAG CCC TGC G-3' (sekv. id. č. 11) a reversním primerem 5'-CTA GAA TTC TTA AAC AAA GAG GCG ATC TCC TAG G-3' (sekv. id. č. 12). Vzorek byl amplifikován 30 cyklů v zařízení DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) použitím anelační teploty 55 °C. Amplifikovaný fragment byl izolován elektroforesou na agarosovém gelu, vyštěpen z gelu a vyčištěn. Pro normalizování RNA náplně byla použita L32 sonda (*Nucl. Acid Res.* 1988, 16, 10751.). Každá sonda (100 ng) byla označena použitím oligoznačící sestavy (Pharamcia) na specifickou aktivitu 0,2 až 1.10⁹ cpm/μg DNA. Membrány byly sondovány a promývány v 0,2xSSC, 1% SDS při 65 °C dvě hodiny a exponovány.

Jak je ilustrováno na obrázku 15, RNA odvozená jak od nefrakcionovaných splenocytů tak T-depletovaných splenocytů s vysokou hustotou obsahovala CD 14 specifickou mRNA, zatímco FACS vyčištěné B buňky nikoliv. CD 14 signál v T-depletovaných splenocytech s vysokou hustotou, zde shora označovaných jako odpočívající B buňky, existuje pravděpodobně díky znečišťujícím monocytům, jelikož tyto populace jsou 85 až 90% mIg⁺, ale > 98% MHC skupina II⁺, jak bylo vyhodnoceno imunofluorescenčním obarvením a FACS analýzou. Je tedy možné, že růst B buněk v této populaci zprostředkovaný Bo-LAIT je nepřímý a je zprostředkován aktivací obsažených monocytů.

Byla srovnávána odpověď T-depletovaných, Percollem frakcionovaných splenocytů a FACS vyčištěných mIg⁺ buněk odvozených z této populace na nBo-LAIT s růstem indukovaným LPS. Jak je ilustrováno na obrázku 16, obě populace intenzivně odpovídaly na obě stimulační. Desetinásobná vyšší stimulace u populace B buněk o čistotě 99,8 % existovala díky sníženému nestimulovanému pozadí pozorovanému u těchto kultur (obrázek 16).

Růst B buněk indukovaný LAIT-proteinem a CD40

Jak bylo shora popsáno, bylo pozorováno, že mAbs specifické pro CD40, který je exprimován na membráně B buněk, indukují růst myších B buněk (*Sem. in Immunol.* 1994, 6, 267; *PNAS* 1986, 83, 4494; *J. Immunol.* 1988, 140, 1425.).

Pro zjištění toho, jestli existuje nějaký vzájemný vztah mezi anti-CD40 a LAIT-proteinem indukovanou aktivací B buněk, byla zkoumána schopnost rBo-LAIT stimulovat růst slezinných B buněk s vysokou hustotou izolovaných buň z konvenčních myší C57BL/6 nebo z myší C57BL/6, kterým byla odejmuta exprese CD40 cíleným rozštěpením genu (*Immunity* 1994, 1, 167.). Jak je ilustrováno na obrázku 17, nebyl pozorován žádný rozdíl v odpovědích těchto B buněk v testovaném rozmezí koncentrací rBo-LAIT.

Tyto výsledky ukazují, že CD40 sám o sobě nemusí být zahrnut v signalizaci LAIT-proteinu, ale nemůže být vyloučena možnost, že dochází ke sdílení systémů generujících druhý messenger využitím CD40 a domnělého membránového receptoru LAIT-proteinu.

Srovnávací analýza přírodního lidského, hovězí a myšího CD 14

Při pozorování aktivit nBo-LAIT a rBoCD 14 na myší B buňky byly sledovány aktivity myšího CD 14 (Mo) a lidského CD 14 (Hu) izolovaných z jiných kapalin než z mleziva. Bylo ukázáno, že Hu-CD 14 je přítomen v moči nefrotických pacientů (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 1779.). Hu-CD 14 byl izolován použitím modifi-

kovaného protokolu. Moč byla vysrážena přidáním nasyceného síranu amonného na konečnou koncentraci 45 % (obj./obj.). Vysrážený materiál byl vyčereň odštěďováním 30 minut při 14 000xg. Koncentrace síranu amonného v supernatantu tohoto odštěďování byla pak zvýšena na 75 % (obj./obj.). Sraženina byla 30 minut peletována při 14 000xg a solubilizována v TN pufru, pH 8,0, obsahujícím 10mM Tris, 150 mM NaCl a "kompletní" koktejl inhibitorů proteas (Boehringer Mannheim). Nerozpustný materiál byl vyčereň odštěďováním 15 minut při 13 000xg. Supernatant tohoto odštěďování byl odsolen na kolonách G-10 (Bio Rad) ekvilibrovaných v TN pufru, pH 8,0. Tento materiál byl pak nechán projít přes Sepharosu 4B, na které byla konjugována lidská CD 14 specifická mAb, 3C10 (*J. Exp. Med.* 1983, 15, 126.). Navázaný materiál byl eluován ve 100mM acetátu, 150mM NaCl, pH 2,8, a bezprostředně zneutralizován přidáním desetiny objemu 1M Tris, pH 8,0. Eluát byl zahuštěn ve vakuu (speed-vac) a koncentrace proteinu byla stanovena kolorimetricky.

Myší CD 14 byl izolován ze supernatantu myšího hybridomu OKT3 (*PNAS USA* 1980, 77, 4914.). Během vyhledávací analýzy buněčných populací na expresi CD 14 specifické mRNA bylo pozorováno, že každý testovaný hybridom obsahoval message. Z toho vyplývá, že jestliže donor a napojovací partner byly oba myšího původu, produkovaný CD 14 by také měl být myšího původu. Hybridom OKT3 vyhovuje těmto kritériím. Pro vyhodnocení toho, jestli CD 14 protein je produkován OKT3 a v dostatečných množstvích, aby byla umožněna izolace, materiál obsažený v 1 litru supernatantu kultury OKT3 byl afinitně vyčištěn na 3C10-Sepharose, jak shora popsáno u CD 14 odvozeného z lidské moče. Specifičnost 3C10 byla zmapována na zbytcích 7 až 10 lidského CD 14 (*J. Biol. Chem.* 1995, 270, 361.). Tyto zbytky jsou ve vysokém stupni zachovány v hovězím a myším CD 14.

Levý panel obrázku 18 ilustruje srovnávací stříbrem vybarvenou analýzu 1 μ g každého z afinitně vyčištěných lidského močového CD 14 (nHu), mlezivového hovězího CD 14 (nBo) a od OKT3 odvozeného myšího CD 14 (nMo). Pravý panel obrázku 18 ilustruje

sronávací imunoblotovou analýzu 250 ng každého ze stejných tří druhů CD 14, sondovaných mAb 3C10. Jak je ilustrováno, čistota všech těchto tří prostředků byla srovnatelná, stejně jako jejich reaktivita s mAb 3C10.

Zdánlivé nesrovnalosti v molekulových hmotnostech CD 14 těchto tří vzorků s rozdíly v počtu aminokyselin kodovaných jejich příslušnými cDNA by mohly existovat díky ko- a/nebo po-translační modifikaci. V této souvislosti je zřejmé, že myší, lidský a hovězí CD 14 obsahují pět, čtyři a tři místa potenciální N-glykosylace.

Byla vyhodnocována schopnost těchto tří CD 14 přípravků stimulovat růst myších B buněk. Jak je ilustrováno na obrázku 19, CD 14 izolovaný z těchto tří druhů měl srovnatelnou specifickou aktivitu a byl aktivní v koncentračním rozmezí ng/ml. Tyto výsledky také ukazují, že isogenní materiál je funkční, konkrétně, že myší CD 14 může stimulovat myší B buňky. Tyto výsledky také ukazují, že mlezivový CD 14 není zvláštní svojí schopností stimulovat B buňky a je tedy nepravděpodobná specifická forma této molekuly, která je generována za specifických podmínek laktace.

Aktivita nBo-LAIT podporující růst na lidské B buňky z krve chordy

Když byly pozorovány rozmanitosti biologických aktivit nBo-LAIT na myší B buňky, byly sledovány účinky na fyziologii lidských B buněk. Byly použity dva zdroje B buněk. Jelikož jednou možnou rolí LAIT-proteinu je zahrnutí v potenciaci vývoje neonatálního imunitního systému, byla vyhodnocována jeho schopnost stimulovat růst B buněk odvozených od novorozenců, specificky těch, které byly izolovány z krve chordy.

Krev chordy byla zředěna 1:1 fosforečnanovým pufovaným solným roztokem (PBS) a převrstvena na Percoll (Pharmacia), $\rho = 1,077$. Gradient byl odstřeďován tak, jak je popsáno u obrázku

1A. Mezifází $p = 1,077/1,000$ bylo izolováno a promyto dvakrát v PBS doplněném 5 % plodového hovězího sera (FBS). Výsledný leukocytový přípravek byl pak obarven fluoresceinem konjugovanou mAb specifickou na marker CD72 B buněčné membrány. CD72 pozitivní leukocyty chordy byly pak pozitivně vybrány FACS, což vedlo k čistotám větším než 98 %. Tyto pozitivně vybrané B buňky pak byly kultivovány v definovaném mediu bez sera, jako pro myší B buňky. Jediným rozdílem při testech růstu u myších a lidských B buněk bylo to, že u druhých z nich byl přidán thymidin v době 60 hodin a analyzovány po 12 hodinách spíše než po době 40 hodin a po 6 hodinách.

Jak je ilustrováno na obrázku 20A, nBo-LAIT působí s mAbs specifickými na Igk A Igλ svojí schopností indukovat růst neonatálních B buněk. I když jak immobilizované (na desku navázané) mAbs s anti-lehkým řetězcem tak 2 $\mu\text{g/ml}$ nBo-LAIT jednotlivě indukují zvýšení příjmu thymidinu proti pozadí, kombinace těchto dvou podporuje další pětinasobné zvýšení.

Tyto výsledky ukazují, že může být možné, že LAIT protein spotřebovávaný novorozencem krmeným z prsu funguje jako náhrada T buněk při napomáhání stimulace B buněk, které jsou obklopeny antigenem, takže rostou a diferencují se na Ig sekretující buňky v nepřítomnosti plně vyvinutých T buněčných celků (*J. Exp. Med.* 1989, 169, 2149; *Science* 1989, 249, 749; *Intl. Immunol.* 1990, 2, 859; *Intl. Immunol.* 1990, 2, 869.).

CD 14 v lidském mlezivu a v normálním seru

Pro stanovení koncentrace CD 14 v lidském mlezivu a v normálním seru byly hodnoceny mlezivové vzorky od dvou dárců a vzorky sera od pěti zdravých dárců na přítomnost CD 14 použitím specifické ELISA (IBL-Hamburg). Jak je uvedeno v tabulce 3, serum z tohoto vzorku zdravých jedinců obsahovalo CD 14 v rozmezí koncentrací od 1,7 do 3,2 $\mu\text{g/ml}$ a nebylo závislé na pohlaví. Tyto hodnoty dobře odpovídají hodnotám, které popisují Grunwald a spol. (*J. Immunol. Method* 1992, 155, 255.).

Tabulka 3

dárce	rod	$\mu\text{g/ml}^*$
A.M.	ž	2,8
N.J.	ž	2,7
M.J.	m	1,7
E.K.	m	2,9
A.D.	m	3,2

* 2,6 až 3,4 $\mu\text{g/ml}$ podle ELISA sestavy
(výrobce IBL, Hamburg)

Jak je ilustrováno na obrázku 21, obsah CD 14 v mlezivu odebraném 22 hodin po porodu (A.D.) a v časném mléku z prsu odebraném čtyři dny po porodu (S.B.) byl zhruba dvacetkrát vyšší, pokud jde koncentraci CD 14, než v normálním seru. Více vzorků až do 78 dnů po porodu bylo získáno od jednoho dárce (S.B.) a zatímco koncentrace CD 14 značně poklesly při srovnání s koncentracemi pozorovanými 4. den, zůstaly zhruba 3 až 5krát vyšší než hodnoty pozorované v normálním seru po dobu testování (obrázek 21).

Dosud není dostupna žádná informace týkající se koncentrace serového CD 14 v mléku kojících žen. Zbývá tedy určit, jestli vysoké koncentrace CD 14 pozorované v mlezivu a v prsním mléku jsou omezeny na tyto kapaliny nebo zda odrážejí obecné zvýšení koncentrace CD 14 ve všech tělesných tekutinách žen, které kojí.

Může být, že přechodné vystavení novorozeneckého imunitního systému aktivitě tropického růstu B buněk a diferenciací aktivitě mlezivového CD 14 hraje svoji část ve vývoji systému novorozeneckých imunitních odpovědí. Psychologická důležitost přítomnosti této aktivity v mlezivu je v souladu s pozorováním, že, jak shora uvedeno, funkce T buněk u novorozence je kompromisem, možná díky přítomnosti vysokých koncentrací TGF β 1 a

TGF β 2 v mlezivu a v časném prsním mléku (*J. Cell. Biol.* 1987, 105, 1039; *Cell* 1987, 49, 437; *EMBO J.* 1987, 6, 1633.). Jak je uvedeno v tabulce 2, submitogenní koncentrace CD 14 v kombinaci se submitogenními koncentracemi mAb specifické pro membránový imunoglobulin, podporuje aktivaci B buněk. CD 14 může fungovat jako náhrada T buněk ve vyvíjecím se novorozeneckém imunitním systému. Jako takový může mít novorozenec prospěch z použití CD 14 jako přísady děckého přípravku vystavením působení na jeho imunitu stimulující účinky, které nejsou přítomny v syntetickém přípravku.

Aktivita nBo-LAIT podporující růst u B buněk lidské tonzily

Byla vyhodnocována biologická aktivita nBo-LAIT u B buněk izolovaných z dospělých lidí, a to samostatně nebo v kombinaci s imobilizovanými (vázanými na desku) mAbs s anti-lehkým řetězcem, na stimulaci B buněk izolovaných z lidských tonzil.

B buňky z tonzil byly připraveny negativní selekcí. Leukocyty tonzil byly připraveny jako leukocyty z krve chordy. Výsledná populace byla označena biotinylovanou mAb specifickou na CD3 ϵ (Becton Dickenson), následuje označení "mikroperličkami" obsahujícími železo (Becton Dickenson). Po jednom promytí byla označená populace nechána projít MACC (Becton Dickenson) a eluent byl izolován. Tato populace obsahovala méně než 1 % T buněk a více než 97 % B buněk podle vyhodnocení imunofluorescenčním obarvením s vazbou specifických mAbs. Tyto B buňky pak byly podrobeny další frakcionaci na Percollově gradientech s diskontinuální hustotou, identických s těmi, které byly použity pro izolaci myších B buněk s vysokou hustotou. Popsané testy používaly ty buněčné pásy, které měly ρ mezifází = 1,085/1,079. Tyto negativně vybrané, odpočívající B buňky s vysokou hustotou byly kultivovány jak shora popsáno, byl k nim přidán threonin a byly izolovány jako B buňky z krve chordy.

Jak je ilustrováno na obrázku 20B a na rozdíl od výsledků získaných s B buňkami izolovanými z novorozenců, nBo-LAIT, při

isolování přítomný v tak nízkých koncentracích jako je 300 ng/ml, stimuluje intenzivní růst těchto odpočívajících B buněk tonzily. Dále byla podstatně zvýšena odpověď na některé koncentrace nBo-LAIT, jestliže byl hodnocen v kombinaci s imobilizovanými mAbs s anti-lehkým řetězcem (obrázek 20B).

Maturované lidské B buňky jsou citlivé na aktivity nBo-LAIT podporující růst, které jsou amplifikovány v kombinaci se simultánním navázáním receptoru antigenu B buňky. Tyto výsledky charakterizují potenciální použití LAIT-proteinu v ředidlech vakcíny, při napomáhání zvýšení jejich adjuventicity nebo možném snížení potřeby adjuvans.

Omezením technologie vakcinace je imunogenicitu příslušného antigenového přípravku. O některých adjuvans se uvažuje, že fungují obnovením a aktivací antigenově specifických T buněk. CD 14 stejně jako T buňky nahrazují antigenově specifické odpovědi B buněk, mohou poskytovat zlepšené prostředky pro aktivaci antigenově specifických B buněk tak, že nebudou jenom expandovat a diferencovat na buňky sekretující protilátky, ale měly by, jakmile jsou jednou aktivovány, fungovat jako účinné APC pro doplnění T buněk. To by mělo zvýšit jak propagaci specifické imunitní odpovědi tak zapnutí isotypu zprostředkovaného T buňkami.

Jsou známy imunitní deficity T buněk. Stavy nedostatečné imunity související s disfunkcí T buněk díky nedostatku exprese gp39 (CD40L) (který mapuje na X chromosom) jsou charakterizovány: i) X-navázaným hyper IgM syndromem (HIM), ii) obvyklou proměnlivou nedostatečností imunity (CVI) a iii) X-navázanou gamoglobulinemií (XLA). V některých z těchto chorobných stavů (HIM) bylo ukázáno, že T buňky, izolované z pacientů, jsou neschopny aktivovat B buňky (*Science* 1993, 259, 990.). Tento typ koreluje s nepřítomností funkčního gp39 (CD40L). Za těchto okolností by CD 14, ať cílený pro indukci specifických humorálních odpovědí nebo podávaný jako polyklonální aktivátor B buněk, mohl fungovat při indukování/udržování hladin isogenního Ig konsistentní-

ho s ochranou proti denní překradě potenciálních pathognů z prostředí.

Přítomnost CD 14 v mlezivu je konsistentní s jeho rolí při stimulaci B buněk u kojícího novorozeněte. Účinnost CD 14 při napomáhání vývoji novorozeneckých imunitních systémů může být vyhodnocena na zvířecím modelu.

Samičky deficitní na CD 14, vytvořené cíleným prasknutím místa CD 14, budou spářeny s buď heterozygotními nebo s CD 14 deficitními samečkami. To umožní vyhodnotit účinky nepřítomnosti mlezivového CD 14 na vývoj B buněk u mláďat, která exprimují nebo neexprimují CD 14. Konkrétně budou srovnávány B buněčný ontogen a akumulovaný vývoj hladin serového IgM a IgG stejně jako schopnost těchto mláďat vykazovat specifické imunitní odpovědi.

Dále pak lze vyhodnotit roli, kterou hraje serový CD 14 (sCD 14) při zachování cirkulujících hladin "přírodního" IgM. Hladiny cirkulujících IgG a IgM jsou pod rozdílnou kontrolou. Serový IgG je virtuálně nepřítomen u myši chovaných v prostředí bez antigenu, zatímco IgM hladiny nejsou změněny. Pokud jde o potenciální úlohu sCD 14 při regulaci hladin serového IgM, myši s dostatkem CD 14 a myši deficitní na CD 124 pocházející ze shora uvedeného spáření, budou chovány gnotobioticky.

Deregulovaná exprese sCD 14 souvisí s patologií specifických stavů onemocnění. Hladina sCD 14 v seru pacientů s revmatickou artritidou (RA) je zvýšena (*Clin. Exp. Immunol.* 1993, 91(2), 207.). Bylo také popsáno, že v synoviu RA pacientů dochází ke zvýšení počtu aktivovaných CD 14⁺ monocytů (*Br. J. Rheumatol.* 1990, 29(2), 84; *J. Rheumatol.* 1995, 22(4), 600.). I když zbývá stanovit, jestli hladina sCD 14 v synoviální kapalině RA pacientů je zvýšena, CD 14⁺ monocyty po aktivaci exprimují proteázu související s membránou, která může štěpit membránový CD 14, což vede k produkci sCD 14 (*Eur. J. Immunol.* 1995, 25, 604.). Se zde popsanou schopností sCD 14 aktivovat

lidské B buňky je konsistentní to, že synoviální kapalina RA pacientů obsahuje vysoké podíly aktivovaných B buněk, z nichž alespoň některé mohou produkovat revmatický faktor (*Clin. Immunol. Immunopathol.* 1984, 31(2), 272; *Clin. Exp. Immunol.* 1984, 55(1), 91.). Dochází tak ke zvýšení produkce sCD 14 u RA pacientů a jeho možnému zahrnutí do aktivace B buněk vedoucím k produkci revmatického faktoru. Protilátkou vyvolané vymizení sCD 14 může tedy vést ke zlepšení příznaků vyvolaných deregulací aktivace B buněk a k produkci revmatického faktoru u RA pacientů. Protilátkou vyvolané vymizení sCD 14 by dále mohlo zlepšit zánět podporovaný sCD 14 indukci protizánětlivých cytokinů monocytu (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 1779.).

Rutiní produkce lidských monoklonálních protilátek (mAbs) je z četných důvodů obtížná, nikoliv nejmenší z nich je neschopnost obohatit aktivované lidské B buňky žádanou antigenovou specifičností. Schopnost sCD 14 indukovat lidské B buňky žádané antigenové specifičností. Schopnost sCD 14 indukovat růst a diferenciaci lidských B buněk *in vitro* poskytuje možné využití při produkci antigenově specifických mAbs. Ukázali jsme zde, že sCD 14 při vysokých koncentracích (0,5 až 1 $\mu\text{g/ml}$) aktivuje lidské B buňky polyklonálním způsobem. Je však ukázáno, že suboptimální koncentrace sCD 14 působí synergicky s mAb specifickou pro receptor B buňky na antigen (BcR). Suboptimální koncentrace sCD 14 tedy preferenčně aktivují ty B buňky, které dostávají doplňkový signál prostřednictvím BcR. V těchto případech funguje BcR specifická mAb jako náhrada antigenu. Jestliže je dodávání BcR signálu specifické, následující odpověď B buněk by také byla specifická. Jestliže se tedy anti-BcR nahradí specifickým antigenem, synergický stimul poskytnutý současnou přítomností sCD 14 by se výlučně soustředil na antigenově specifické B buňky. Následující produkce protilátky by tedy byla antigenově specifická. Populace B buněk aktivovaných tímto způsobem by byla vysoce obohacena aktivovanými, antigenově specifickými B buňkami a měla by tedy usnadňovat produkci lidských hybridomů sekretujících mAb žádané specifičností.

Účinnost CD 14 jako adjuvans v technologii vakcinace může být vyhodnocována použitím zvířecího modelu. Bo- a Hu-CD 14 budou modifikovány haptenem TNP. Haptenový materiál bude vyhodnocen, pokud jde o jeho schopnost indukovat polyklonální aktivaci B buněk in vitro, aby se zajistilo, že haptence nemění biologickou aktivitu CD 14. Konjugáty budou podány injekčně subkutánně nebo intramuskulárně a po čase se vyhodnotí serum na obsah specifické protilátky. Použitím jiné serie myší budou izolovány odvodné lymfatické žlázy a spočteny buňky sekretující protilátku. Dále budou někteří příjemci imunizováni směsmi různých množství CD 14 a buď proteinu nebo buněčného antigenu. Budou spočteny titry serové protilátky a rovněž antigenově specifické buňky sekretující celkový Ig.

Toxicita CD 14 se může vyhodnocovat akutními intravenózními studiemi u myší, krys a opic. Lze provádět studie akutního subkutánního podráždění u krys a také v dlouhém období studie zahrnující násobné subkutánní a intravenózní injekce u těchto tří druhů. Provede se patologické a histopatologické vyhodnocení stejně jako chemie sera a hematologická analýza. Genotoxický potenciál lze vyhodnotit v savčích buňkách in vitro a v myším mikrojaderném testu. Teratogenní potenciál lze vyhodnotit u oplodněných myší, krys a opic.

Při podávání CD 14 lidskému subjektu lze použít konvenční farmaceutickou praxi. Jako přísada k přípravku pro děti se může přidat během jeho výroby. Může se vyrábět jako tableta nebo tobolka nebo prášek pro míchání právě před podáním. V případě očkovacího přípravku může být zahrnut jako část vakcíny připravené podle jinak standardních postupů. Podávání se může provádět jakýmkoliv konvenčními prostředky, například intravenózním, subkutánním, intramuskulárním, intraventikulárním, intrakraniálním, intrakapsulárním, intraspinálním, intracisternálním, intraperitoneálním nebo orálním podáváním.

Parenterální podávání může být ve formě kapalných roztoků nebo suspenzí.

Způsoby známé v oblasti techniky výroby prostředků lze nalézt například v "*Remington's Pharmaceutical Sciences*". Prostředky pro parenterální podávání mohou například obsahovat jako excipients sterilní vodu nebo solný roztok, polyalkylenglykoly, jako je polyethylenglykol, rostlinné oleje, hydrogenované naftaleny atd.

Koncentrace CD 14 pro podávání se bude měnit podle například dávky, která má být podávána, a podle způsobu podávání.

Pokud jde o variace od přírodní aminokyselinové sekvence CD 14, lze provádět alespoň konzervativní substituce. Konzervativní substituce jsou popsány v patentové literatuře, jako například v USA patentu č. 5 2264 558. Je tedy očekáváno, že by byla možná například výměna mezi nepolárními alifatickými neutrálními aminokyselinami, glycinem, alaninem, prolinem, valinem a isoleucinem. Podobně by bylo možné provést substituce mezi polárními alifatickými neutrálními aminokyselinami, serinem, threoninem, methioninem, asparaginem a glutaminem. Mohly by být možné substituce mezi nabitými kyselými aminokyselinami, kyselinou asparagovou a kyselinou glutamovou stejně jako substituce mezi nabitými bazickými aminokyselinami, lysinem a argininem. Pravděpodobně by byly možné substituce mezi aromatickými aminokyselinami, mezi něž patří fenylalanin, histidin, tryptofan a tyrosin. Tyto druhy substitucí a vzájemných záměn jsou dobře známy odborníkům z oblasti techniky. Dobře možné jsou i další substituce. Lze ovšem očekávat, že čím existuje větší procento homologie mezi variantou proteinu a přirozeně se vyskytujícím proteinem, tím větší bude zachování metabolické aktivity.

47/02

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Rekombinantní polypeptid schopný aktivovat savčí B buňky, který má aminokyselinovou sekvenci identifikovanou jako sekv. id. č. 4, konzervativně substituované varianty uvedeného polypeptidu, které aktivují B buňky, polypeptidové fragmenty uvedeného polypeptidu, které aktivují savčí B buňky, a konzervativně substituované varianty uvedených polypeptidových fragmentů.
2. Polypeptid podle nároku 1, který má aminokyselinovou sekvenci identifikovanou jako sek. id. č. 4, a fragmenty uvedeného polypeptidu, který aktivuje savčí B buňky, s výhodou s aminokyselinovou sekvencí identifikovanou jako sekv. id. č. 4.
3. Molekula nukleové kyseliny, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kodující polypeptid podle nároku 1 nebo 2, při čemž molekula nukleové kyseliny může znamenat sekvenci cDNA nebo genomové DNA, při čemž jestliže molekula znamená molekulu cDNA, tato molekula může obsahovat nukleotidovou sekvenci identifikovanou jako sekv. id. č. 1, a sekvence, které se od ní odlišují díky degeneraci genetického kodu.
4. Způsob výroby hovězího CD 14 z hovězí mlezivové syrovátky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje izolaci polypeptidu ze syrovátky, při čemž tento způsob popřípadě zahrnuje izolování polypeptidu, který má aminokyselinovou sekvenci identifikovanou jako sekv. id. č. 4, nebo ko- a/ nebo po-translačně modifikovanou formu uvedeného proteinu, a izolace polypeptidu popřípadě zahrnuje vysolení proteinů z vyčiřené hovězí mlezivové syrovátky, popřípadě zahrnuje chromatografii na anexu, popřípadě chromatografii na koloně molekulového síta a popřípadě chromatografii na koloně hydroxyapatitu.
5. Způsob přímého aktivování B buněk, v y z n a č u j í c í

s e t í m, že se používá rozpustný polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci identifikovanou jako sekv. id. č. 4, sekv. id. č. 5 nebo sekv. id. č. 6, polypeptidový fragment polypeptidu, který aktivuje B buňky, polypeptidová varianta polypeptidu, která aktivuje B buňky, nebo polypeptidový fragment, který aktivuje B buňky, konzervativně substituovaná varianta polypeptidu, která aktivuje B buňky, nebo polypeptidový fragment, který aktivuje B buňky, nebo konjugát obsahující polypeptid nebo jeho fragment nebo varianta, při čemž konjugát aktivuje B buňky.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že používá analog polypeptidu sekv. id. č. 4, sekv. id. č. 5 nebo sekv. id. č. 6, který aktivuje B buňky, odvozený substitucí (substitucemi), delecí (delecemi) nebo adicí (adicemi) aminokyselin uvedených polypeptidů za předpokladu, že je zachována trojrozměrná konformace uvedeného polypeptidu,
při čemž tento polypeptid s výhodou obsahuje sekv. id. č. 4, sekv. id. č. 5 nebo sekv. id. č. 6, fragment sekv. id. č. 4, sekv. id. č. 5 nebo sekv. id. č. 6, který aktivuje B buňky, nebo konzervativně substituovanou variantu uvedeného polypeptidu nebo fragmentu, který aktivuje B buňky,
při čemž polypeptid nebo jeho fragment je ko- a/nebo po-translačně modifikován.
7. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že polypeptid nebo jeho fragment je alespoň z 62 procent homologní se sekv. id. č. 5.
8. Způsob aktivování B buněk savce, který takovou aktivaci potřebuje, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává polypeptid podle nároku 5, 6 nebo 7, při čemž savcem je popřípadě lidský subjekt a člověkem je popřípadě dítě.
9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e

t í m, že savec, který takovou aktivaci potřebuje, má CD40 negativní nebo CD40 deficitní B buňky, při čemž savcem je popřípadě lidský subjekt a člověkem je popřípadě dítě.

10. Způsob podle nároku 5, 6, 7 nebo 8, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že savec trpí imunodeficitem T buněk nebo alergií.
11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že savec má CD40L negativní nebo CD40L deficitní T buňky.
12. Způsob přímého indukování růstu a diferenciaci B buněk na buňky sekretující vysoké množství imunoglobulinu, v y - z n a č u j í c í s e t í m, že se používá polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci identifikovanou jako sekv. id. č. 4, sekv. id. č. 5 nebo sekv. id. č. 6, nebo jeho polypeptidový fragment, který indukuje růst a diferenciaci B buněk, polypeptidová varianta polypeptidu, která indukuje růst a diferenciaci B buněk, nebo polypeptidový fragment, který indukuje růst a diferenciaci B buněk, konzervativně substituovaná varianta polypeptidu, která indukuje růst a diferenciaci B buněk, polypeptidový fragment, který indukuje růst a diferenciaci B buněk, nebo konjugát polypeptidu nebo jeho polypeptidového fragmentu nebo varianty, při čemž tento konjugát indukuje růst a diferenciaci B buněk.
13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že používá analogy polypeptidu sekv. id. č. 4, sekv. id. č. 5 nebo sekv. id. č. 6, které indukují růst a diferenciaci B buněk na buňky sekretující ve vysokém množství imunoglobulin, odvozené substitucí (substitucemi), delecí (delecemi) nebo adicí (adicemi) aminokyselin uvedených polypeptidů za předpokladu,

že je zachována trojrozměrná konformace uvedených polypeptidů, při čemž polypeptid s výhodou obsahuje sekv.

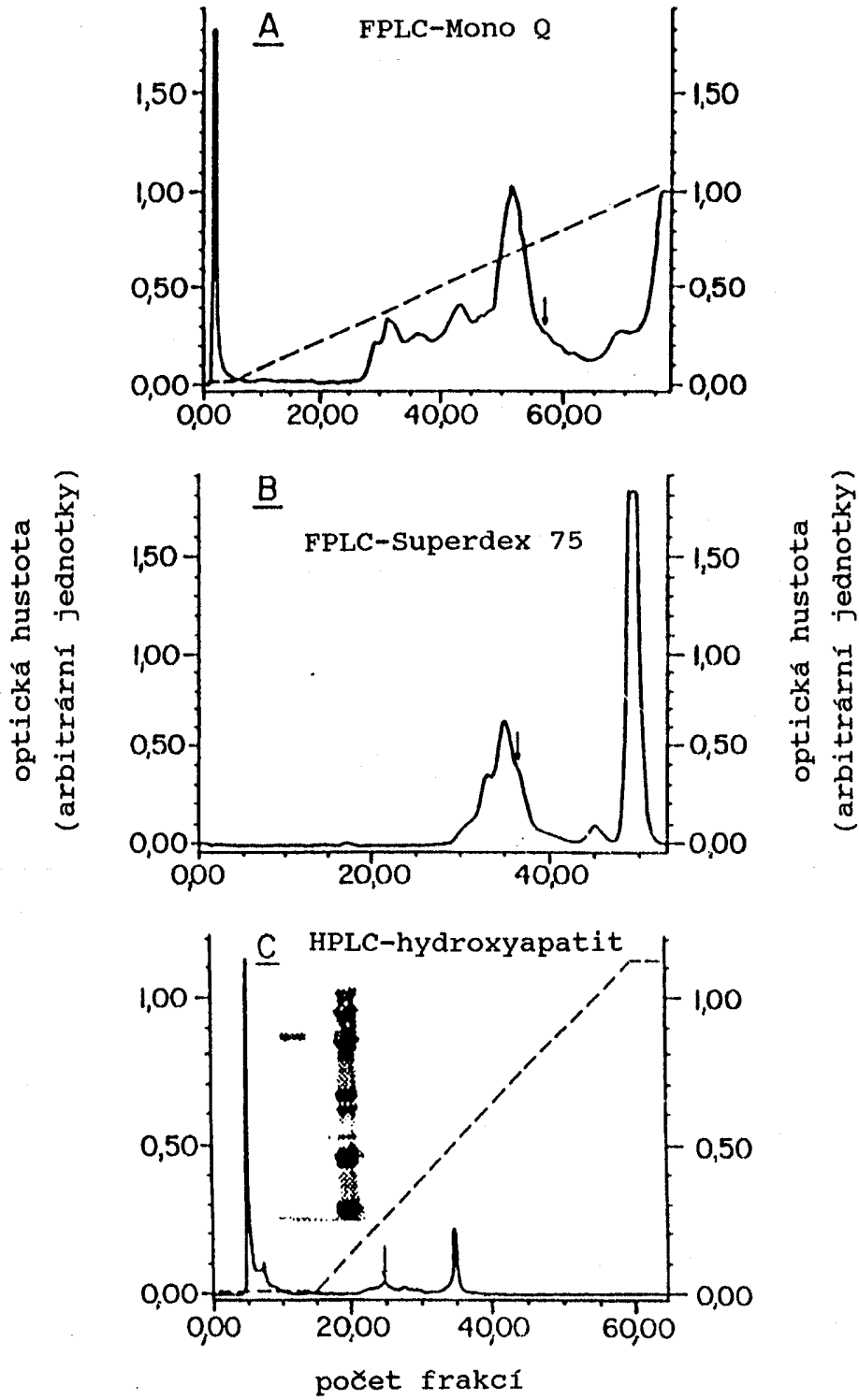
- id. č. 4, sekv. id. č. 5 nebo sekv. id. č. 6, fragment sekv. id. č. 4, sekv. id. č. 5 nebo sekv. id. č. 6, který indukuje růst a diferenciaci B buněk, nebo konzervativně substituovanou variantu uvedeného polypeptidu nebo fragmentu, která indukuje růst a diferenciaci B buněk a v níž je polypeptid popřípadě ko- a/nebo po-translačně modifikován.
14. Způsob přímého indukování růstu a diferenciaci B buněk u savce, který takovou aktivaci potřebuje, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že se podává polypeptid podle nároku 12 nebo 13, při čemž savcem je popřípadě lidský subjekt a člověkem je popřípadě dítě.
15. Způsob přípravy vyčištěného rekombinantního proteinu nebo ko- a/nebo po-translačně modifikované formy tohoto proteinu, který má aminokyselinovou sekvenci definovanou podle nároku 1, 2 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sestává ze stupňů:
- i) kultivování prokaryotického nebo eukaryotického hostitele obsahujícího molekulu heterologní nukleové kyseliny kodující uvedený protein a schopného exprimovat uvedený protein nebo ko- a/nebo po-translačně modifikovanou formu uvedeného proteinu za kultivačních podmínek,
 - ii) exprimování uvedeného proteinu nebo ko- a/nebo po-translačně modifikované formy uvedeného proteinu a
 - iii) izolování uvedeného proteinu z kultury.
16. Použití polypeptidu podle nároku 1, 2, 5, 6 nebo 7 pro výrobu léčiva pro aktivování B buněk u savce, který takovou aktivaci potřebuje.
17. Způsob výroby přípravku pro děti, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje zahrnutí polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1, 2, 5, 6 nebo 7 do přípravku.

18. Přípravek pro děti, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je vyroben podle nároku 17.
19. Způsob výroby vakcíny obsahující jiný antigen než CD 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje zahrnutí polypeptidu podle nároku 1, 2, 5, 6 nebo 7 do přípravku vakcíny.
20. Způsob výroby podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje stupeň konjugování uvedeného antigenu a uvedeného polypeptidu do přípravku vakcíny.
21. Způsob výroby podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje stupeň vmíchání antigenu a polypeptidu do přípravku vakcíny.
22. Způsob očkování pacienta, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tomuto pacientovi podává jiný antigen než CD 14 a polypeptid podle nároku 1, 2, 5, 6 nebo 7.
23. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen a polypeptid se podávají v jediném stupni.
24. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen a polypeptid se podávají v oddělených stupních.
25. Sestava pro přípravu očkování, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje předem stanovené množství antigenu jiného než CD 14 a předem stanovené množství polypeptidu podle nároku 1, 2, 5, 6 nebo 7.
26. Způsob podávání savci protilátky proti polypeptidu, který má aminokyselinovou sekvenci sekv. id. č. 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tím snižuje nebo inhibuje aktivita lidských B buněk, které jsou jinak hyperaktivová-

ny jako výsledek vysokých hladin CD 14 v seru, při čemž savcem je popřípadě člověk.

27. Způsob použití protilátky podle nároku 26 pro výrobu léčiva, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tím sníží nebo inhibuje aktivita lidský B buněk.
28. Způsob obohacení savčích B buněk sekretujícími monoklonální protilátkou žadané antigenové specifičnosti, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se aktivují uvedené B buňky podle nároku 1, 2, 5, 6 nebo 7 na suboptimální hladiny ve shodě s uvedeným antigenem, na který byly protilátky připraveny, při čemž savčí B buňky jsou popřípadě lidského původu nebo jsou savčí B buňky popřípadě myšího původu.

Zastupuje:



Obr. 1

1
 MERASCLLLL LLPLVHVSAT TPECELDDE DFRCVCNFSE POPDWSEAFQ
 D -?--?--NN? ??-?-?

51
 CVSAVEVEIH AGGENCEPFL KRVDADADPR QYADTVKALR VRRLTVGAAQ
 V-----?-S ---LSL?

101
 VPAQLLVGAL RVLAYSRLKE LTLEDLKITG TMPPLPLEAT GLALSSLRLR

151
NVSWATGRSW LAELOQWLKP GLKVLSIAQA HSPAFSYEQV RAFFALTSLD
 ?---T--GA? -G---

201
 LSDNPGLGER GLMAALCPHK FPAIQNLALR NTGMETPTGV CAALAAAGVO
 ---S-P A-----LR--

251
PHSLDLSHNS LRATVNPSAP ROMWSSALNS LNLSFAGLEQ VPKGLPAKLR
 -Q-----? -?V?

301
 VLDLSCNRLN RAPQDELPE VDNLTLDGPN FLVPGTALPH EGSMNSGVVP
 L-----V

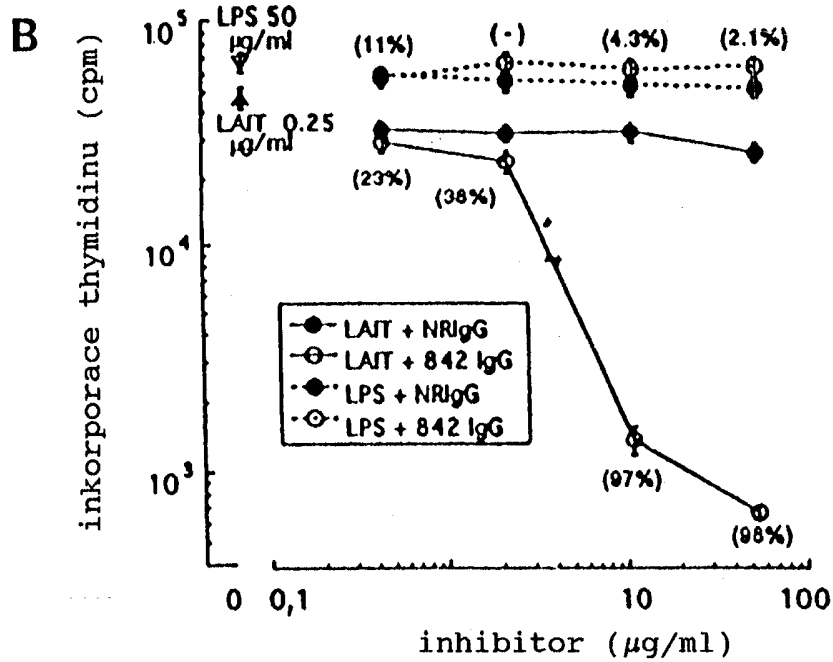
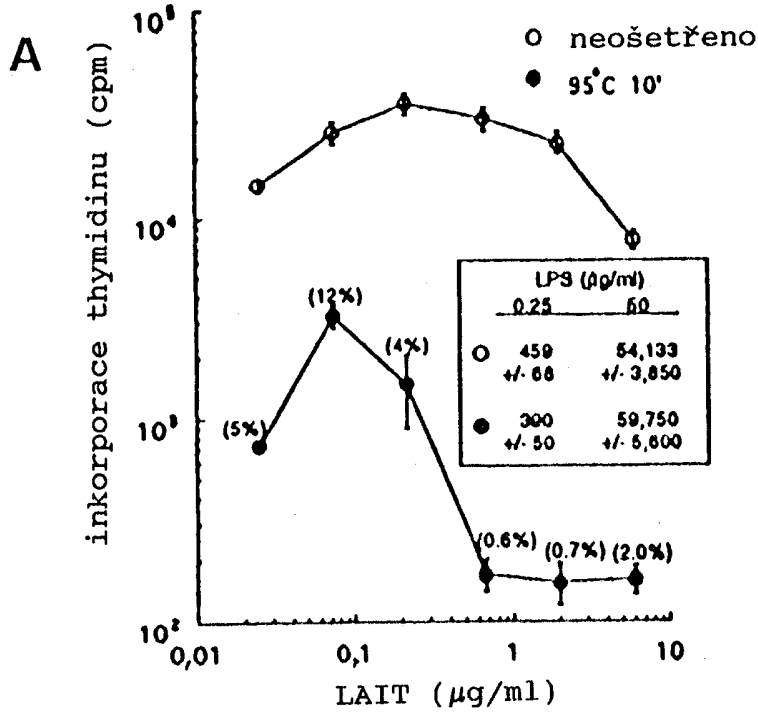
351
ACARSTLSVG VSGTLVLLQG ARGFA
 ???--

Obr. 2



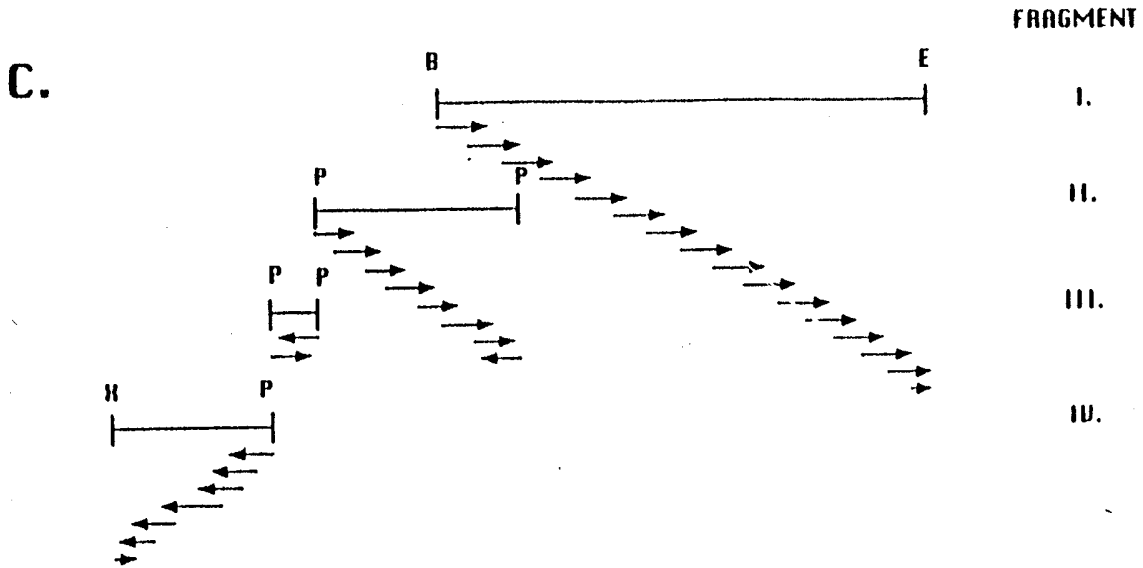
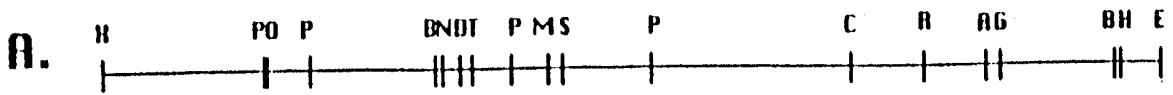
Obr. 3

4/26



Obr. 4

5/26



Obr. 5

		A T G G A G C G C G T G C C C T G C T T G T T G C T G C T G C T G	
		10 20 30	
převažující			
hovězí	CD14 cDNA	A T G G T G T G C G T G C C C T A C C T G C T G C T G C T G C T G	33
lidská	CD14 cDNA	A T G G A G C G C G C G T C C T G C T T G T T G C T G C T G C T G	33
myší	CD14 cDNA	A T G G A G C G T G T G C T T G G C T T G T T G C T G T T G C T T	33
		C T G C C G - - - C T G G T G C A C G T C T C T G C G G C C A C A	
		40 50 60	
převažující			
hovězí	CD14 cDNA	C T G C C G T C A C T G C T G C G T G T G T C T G C G G A C A C A	66
lidská	CD14 cDNA	C T G C C G - - - C T G G T G C A C G T C T C T G C G A C C A C G	63
myší	CD14 cDNA	C T G - - - - - - - - - G T G C A C G C C T C T C C C G C C C C A	57
		C C A G A A C C C T G C G A G C T G G A C G A X G A A G A T T T C	
		70 80 90	
převažující			
hovězí	CD14 cDNA	A C A G A A C C C T G C G A G C T G G A C G A C G A C G A T T T C	99
lidská	CD14 cDNA	C C A G A A C C C T G T G T G A G C T G G A C G A T G A A G A T T T C	96
myší	CD14 cDNA	C C A G A G C C C T G C G A G C T A G A C G A G G A A A - - - -	86
		C G T T G T G T C T G C A A C T T C T C X G A T C C G A A G C C X	
		100 110 120 130	
převažující			
hovězí	CD14 cDNA	C G T T G T G T C T G C A A C T T C A C G G A T C C G A A G C C T	132
lidská	CD14 cDNA	C G C T G C G T C T G C A A C T T C T C C G A A C C T C A G C C C	129
myší	CD14 cDNA	- G T T G T T C C T G C A A C T T C T C A G A T C C G A A G C C A	117
		G A C T G G T C C A G C G C C T T C C A G T G T X T G G X T G C X	
		140 150 160	
převažující			
hovězí	CD14 cDNA	G A C T G G T C T A G C G C C G T T C A G T G T A T G G T T G C C	165
lidská	CD14 cDNA	G A C T G G T C C G A A G C C T T C C A G T G T G T G T C T G C A	162
myší	CD14 cDNA	G A T T G G T C C A G C G C T T T C A A T T G T T T G G G G G C G	150
		G T A G A G G T G G A G A T C X A T G C C G G C G G C C G C A G C	
		170 180 190	
převažující			
hovězí	CD14 cDNA	G T C G A G G T G G A G A T C A G T G C C G G C G G C C G C A G C	198
lidská	CD14 cDNA	G T A G A G G T G G A G A T C C A T G C C G G C G G T C T C A A C	195
myší	CD14 cDNA	G C A G A T G T G G A A T T G T A C G G C G G C G G C C G C A G C	183
		C T G G A A C A G T T T C T A A A G C G X G T C G A X X C G G A C	
		200 210 220 230	
převažující			
hovězí	CD14 cDNA	C T G G A A C A G T T T C T C A A G G G A G C C G A - - - - C	225
lidská	CD14 cDNA	C T A G A G C C G T T T C T A A A G C G C G T C G A T G C G G A C	228
myší	CD14 cDNA	C T G G A A T A C C T T C T A A A G C G T G T G G A C A C G G A A	216

Obr. 6A

	G C C G A C C C G X G G C A G T A T G C T G A C A C X A T C A A G				
		240	250	260	
převažující					
hovězí CD14 cDNA	A C C A A C C C G A A G C A G T A T G C T G A C A C A A T C A A G			258	
lidská CD14 cDNA	G C C G A C C C G C G G C A G T A T G C T G A C A C G G T C A A G			261	
myší CD14 cDNA	G C A G A T C T G G G G C A G T T C A C T G A T A T T A T C A A G			249	
	G C T C T G C G C G T X C G G C G G C T C A C G G T G G G X G C C				
		270	280	290	
převažující					
hovězí CD14 cDNA	G C T C T G C G C G T T C G G C G A C T C A A G C T G G G C G C T			291	
lidská CD14 cDNA	G C T C T C C G C G T G C G G C G G C T C A C A G T G G G A G C C			294	
myší CD14 cDNA	T C T C T G T C C T T A A A G C G G C T T A C G G T G C G G G C C			282	
	G C A C A G G T T C C T G C T C A G C T T C T G G T C G G C G C C				
		300	310	320	330
převažující					
hovězí CD14 cDNA	G C A C A G G T T C C T G C T C A G C T T C T G G T C G C C G T T			324	
lidská CD14 cDNA	G C A C A G G T T C C T G C T C A G C T A C T G G T A G G C G C C			327	
myší CD14 cDNA	G C G C G G A T T C C T A G T C G G A T T C T A T T C G G A G C C			315	
	C T G C G T G T G C T C G G G T A C T C C C G C C T C A A G G A A				
		340	350	360	
převažující					
hovězí CD14 cDNA	C T G C G C G C G C G C T C G G G T A C T C T C G T C T C A A G G A A			357	
lidská CD14 cDNA	C T G C G T G T G C T A G C G T A C T C C C G C C T C A A G G A A			360	
myší CD14 cDNA	C T G C G T G T G C T C G G G A T T T C C G G C C T C C A G G A A			348	
	C T G A C G C T T G A G G A C C T X G A G G T A A C C G G C A C C				
		370	380	390	
převažující					
hovězí CD14 cDNA	C T G A C G C T T G A G G A C C T G G A G G T A A C C G G C C C A			390	
lidská CD14 cDNA	C T G A C G C T C G A G G A C C T A A A G A T A A C C G G C A C C			393	
myší CD14 cDNA	C T G A C T C T T G A A A A T C T C G A G G T A A C C G G C A C C			381	
	A C G C C X C C G C C G C C T C T G G A A G C C A C X G G A C C T				
		400	410	420	
převažující					
hovězí CD14 cDNA	A C G C C C C C G A C G C C T C T G G A A G C C G C T G G G C C T			423	
lidská CD14 cDNA	A T G C C T C C G C T G C C T C T G G A A G C C A C A G G A C T T			426	
myší CD14 cDNA	G C G C C G C C A C C G C T T C T G G A A G C C A C C G G A C C C			414	
	G C X C T C A C C A X C T T G A G C C T X C G C A A C G T G T C G				
		430	440	450	460
převažující					
hovězí CD14 cDNA	G C G C T C A C C A C C C T C A G T C T G C G T A A C G T A T C G			456	
lidská CD14 cDNA	G C A C T T T C E A G C T T G C G C C T A C G C A A C G T G T C G			459	
myší CD14 cDNA	G A T C T C A A C A T C T T G A A C C T C C G C A A C G T G T C G			447	

Obr. 6B

převažující		TGGGCAACAGGGGGTGCCTGGCTCGCCGAACTG	
		470 480 490	
hovězí	CD14 cDNA	TGGACAACAGGAGGTGCCTGGCTCGGCGAACTG	489
lidská	CD14 cDNA	TGGGCGACAGGGCGTTCCTGGCTCGCCGAGCTG	492
myší	CD14 cDNA	TGGGCAACAAGGGATGCCTGGCTCGCAGAACTG	480
převažující		CAGCAGTGGCTCAAGCCTGGXCTCAAGGTA CTG	
		500 510 520	
hovězí	CD14 cDNA	CAGCAGTGGCTCAAGCCTGGGCTCAAGGGTGCTG	522
lidská	CD14 cDNA	CAGCAGTGGCTCAAGCCAGGCCTCAAGGTA CTG	525
myší	CD14 cDNA	CAGCAGTGGCTAAAGCCTGGACTCAAGGTA CTG	513
převažující		AGCATTGCCCAAGCACACTCGCTTGCCTTTTCC	
		530 540 550 560	
hovězí	CD14 cDNA	AACATTGCCCAAGCACACTCGCTTGCCTTTTCCG	555
lidská	CD14 cDNA	AGCATTGCCCAAGCACACTCGCTTGCCTTTTCC	558
myší	CD14 cDNA	AGTATTGCCCAAGCACACTCACTCAACTTTTCC	546
převažující		TGCGAACAGGTCCGCGCCTTCCCGGCCCTCACC	
		570 580 590	
hovězí	CD14 cDNA	TGCGCACAGGCTCTCCACCTTCGAGGGGCTCACC	588
lidská	CD14 cDNA	TGCGAACAGGTTCGCGCCTTCCCGGCCCTTACC	591
myší	CD14 cDNA	TGCGAACAGGTCCGCGTCTTCCCTTGCCTCTCC	579
převažující		ACCCTAGACCTGTCTGACAATCCTGGACTGGGC	
		600 610 620	
hovězí	CD14 cDNA	ACCCTAGACCTGTCTGACAATCCAGTCTCGGC	621
lidská	CD14 cDNA	AGCCTAGACCTGTCTGACAATCCTGGACTGGGC	624
myší	CD14 cDNA	ACCCTAGACCTGTCTGACAATCCTGAAATGGGC	612
převažující		GAXACGXGGACTGATGGCAGCTCTCTGTCCCA	
		630 640 650 660	
hovězí	CD14 cDNA	GACACG - GGGCTGATGGCAGCTCTCTGTCCGAA	653
lidská	CD14 cDNA	GA - ACGCGGACTGATGGCGGCTCTCTGTCCCA	656
myší	CD14 cDNA	GAGA - GAAGGACTGATCTCAGCCCTCTGTCCCT	644
převažující		CAAGTTC CCGGCCCTCCAAXATCTAGCGCTGCG	
		670 680 690	
hovězí	CD14 cDNA	CAAGTTC CCGGCCCTCCAATACTAGCGCTACG	686
lidská	CD14 cDNA	CAAGTTC CCGGCCCTCCAAGAACTAGCGCTGCG	689
myší	CD14 cDNA	CAAGTTC CCGGCCCTCCAAGITTTAGCGCTGCG	677

Obr. 6C

9/26

	převažující		C A A C G C G G G G A T G G A G A C G C C C A G C G G C G T G T G	
			700 710 720	
hovězí	CD14	cDNA	C A A C G C G G G G A T G G A G A C G C C C A G A G C G G C G T G T G	719
lidská	CD14	cDNA	C A A C A C A G G A A T G G A G A C G C C C A C A G G C G T G T G	722
myší	CD14	cDNA	T A A C G C G G G G A T G G A G A C G C C C A G C G G C G T G T G	710
	převažující		C G C X G C G C T G G C G G C A G C A A G G G T G C A G C C C C A	
			730 740 750	
hovězí	CD14	cDNA	C G C G G C G C T G G C G G C A G C G A G G G T G C A G C C C C A	752
lidská	CD14	cDNA	C G C C G C A C T G G C G G C G G C A G G T G T G C A G C C C C A	755
myší	CD14	cDNA	C T C T G C G C T G G C C G C A G C A A G G G T A C A G C T G C A	743
	převažující		A A G C C T A G A C C T C A G C C A C A A C T C G C T G C G C G X	
			760 770 780 790	
hovězí	CD14	cDNA	A A G C C T G G A C C T C A G C C A C A A C T C G C T G C G C G T	785
lidská	CD14	cDNA	C A G C C T A G A C C T C A G C C A C A A C T C G C T G C G C G C	788
myší	CD14	cDNA	A G G A C T A G A C C T T A G T C A C A A T T C A C T G C G G G A	776
	převažující		C A C C G C A - - C C C X G G C G C T C C G A G A T G T G T C T G	
			800 810 820	
hovězí	CD14	cDNA	C A C C G C - - - C C C G G G T G C T A C C C G A T G T G T C T G	815
lidská	CD14	cDNA	C A C C G T A A A C C C T A G G C T C C G A G A T G C A T G T G	821
myší	CD14	cDNA	T G C T G C A - - - - - G G C G C T C C G A G T T G T G A C T G	803
	převažující		G C C C A G T G C X C T A A A C T C X C T C A A T C T G T C G T T	
			830 840 850	
hovězí	CD14	cDNA	G C C C A G T G C A C T A A G G T C T C T C A A T T T G T C G T T	848
lidská	CD14	cDNA	G T C C A G C G C C C T G A A C T C C C T C A A T C T G T C G T T	854
myší	CD14	cDNA	G C C C A G T C A G C T A A A C T C G C T C A A T C T G T C T T T	836
	převažující		C G C T G G G C T G G A G C A G G T G C C T A A A G G A C T G C C	
			860 870 880 890	
hovězí	CD14	cDNA	C G C T G G G C T G G A G C A A G T G C C T A A G G G A C T G C C	881
lidská	CD14	cDNA	C G C T G G G C T G G A A C A G G T G C C T A A A G G A C T G C C	887
myší	CD14	cDNA	C A C T G G G C T G A A G C A G G T A C C T A A A G G G C T G C C	869
	převažující		A G C C A A G C T C A G C G T G C T X G A T C T C A G C T G C A A	
			900 910 920	
hovězí	CD14	cDNA	C C C T A A G C T C A G C G T G C T T G A T C T C A G C T G C A A	914
lidská	CD14	cDNA	A G C C A A G C T C A G A G T G C T C G A T C T C A G C T G C A A	920
myší	CD14	cDNA	A G C C A A G C T C A G C G T G C T G G A T C T C A G T T A C A A	902

Obr. 6D

10/26

převažující		C A G G C T G A A C A G G G A G C C G C G G C C A G A C G A G C T	
		930 940 950	
hovězí	CD14 cDNA	C A A G C T A A G C A G G G A G C C G C G G C G A G A C G A G C T	947
lidská	CD14 cDNA	C A G A C T G A A C A G G G C G C C G C A G C C T G A C G A G C T	953
myší	CD14 cDNA	C A G G C T G G A T A G G A A C C C T A G C C C A G A T G A G C T	935
převažující		G C C C G A G G T G G A T A A C C T G A C A C T G G A C G G A A A	
		960 970 980 990	
hovězí	CD14 cDNA	G C C C G A G G T A A A T G A C C T G A C C T G G A C G G A A A	980
lidská	CD14 cDNA	G C C C G A G G T G G A T A A C C T G A C A C T G G A C G G A A A	986
myší	CD14 cDNA	G C C C C A A G T G G G G A A C C T G T C A C T T A A A G G A A A	968
převažující		T C C C T T T C T G G A C C C T G G A X C X X T C C X X C X C C A	
		1000 1010 1020	
hovězí	CD14 cDNA	T C C C T T T C T G G A C C C T G G A G C C C T C C A G C A C C A	1013
lidská	CD14 cDNA	T C C C T T C C T G G T C C C T G G A A C T G C C C T C C C C A	1019
myší	CD14 cDNA	T C C C T T T T T G G A C T C T G A A - - - T C C C A C - T C G	996
převažující		X A A X G G C T C A A T G A X C T C C G G C G T G G T C C C A G C	
		1030 1040 1050	
hovězí	CD14 cDNA	A A A T G A C C C G A T G A T C T C C G G C G T G G T C C C A G C	1046
lidská	CD14 cDNA	C G A G G G C T C A A T G A A C T C C G G C G T G G T C C C A G C	1052
myší	CD14 cDNA	G A G A A G T T T A A - - - C T C T G G C G T A G T C A C C G C	1025
převažující		C T G T G C X C G T T C X X C C C T G X C X G T G G G G G T G T C	
		1060 1070 1080	
hovězí	CD14 cDNA	C T G T G C G C G T T C T G C C T T G A C C A T G G G G G T G T C	1079
lidská	CD14 cDNA	C T G T G C A C G T T C G A C C C T G T C G G T G G G G G T G T C	1085
myší	CD14 cDNA	C G G A G C T C A T C A T C C C A A G C A G T G G C C T T G T C	1058
převažující		A G G A A C C C T G G C G C T G C T C C A A G G A G C C C G X G G	
		1090 1100 1110 1120	
hovězí	CD14 cDNA	A G G A G C C C T G G C G C T G C T T C A A G G A G C C C G A G G	1112
lidská	CD14 cDNA	G G G A A C C C T G G T G C T G C T C C A A G G G G C C C G G G G	1118
myší	CD14 cDNA	A G G A A C T C T G G C T T T G C T C C T A G G A G A T C G C C T	1091
převažující		C T T T G C X T A A	
		1130	
hovězí	CD14 cDNA	C T T C G C G T A A	1122
lidská	CD14 cDNA	C T T T G C T A A	1128
myší	CD14 cDNA	C T T T G T T A A	1101

Obr. 6E

převažující M E R V X L L L L L L P - L V H V S A X T P E P C E L D D E D F R C

		10	20	30																																
hovězí CD14	M	V	C	V	P	Y	L	L	L	L	L	L	P	S	L	L	R	V	S	A	D	T	T	E	P	C	E	L	D	D	D	D	F	R	C	35
lidská CD14	M	E	R	A	S	C	L	L	L	L	L	L	P	-	L	V	H	V	S	A	T	T	P	E	P	C	E	L	D	D	E	D	F	R	C	34
myší CD14	M	E	R	V	L	G	L	L	L	L	L	L	-	-	-	V	H	A	S	P	A	P	P	E	P	C	E	L	D	E	E	S	-	-	C	30

převažující V C N F S D P K P D W S S A F Q C X X A V E V E I X A G G R S L E X F

		40	50	60	70																															
hovězí CD14	V	C	N	F	T	D	P	K	P	D	W	S	S	A	V	Q	C	M	V	A	V	E	V	E	I	S	A	G	G	R	S	L	E	Q	F	70
lidská CD14	V	C	N	F	S	E	P	O	P	D	W	S	E	A	F	Q	C	V	S	A	V	E	V	E	I	H	A	G	G	L	N	L	E	P	F	69
myší CD14	S	C	N	F	S	D	P	K	P	D	W	S	S	A	F	N	C	L	G	A	A	D	V	E	L	Y	G	G	G	R	S	L	E	Y	L	65

převažující L K R V D A D A D P X Q Y A D T I K A L R V R R L T V G A A Q V P A Q

		80	90	100																																
hovězí CD14	L	K	-	-	G	A	D	T	N	P	K	Q	Y	A	D	T	I	K	A	L	R	V	R	R	L	T	V	G	A	A	Q	V	P	A	Q	103
lidská CD14	L	K	R	V	D	A	D	A	D	P	R	Q	Y	A	D	T	V	K	A	L	R	V	R	R	L	T	V	G	A	A	Q	V	P	A	Q	104
myší CD14	L	K	R	V	D	T	E	A	D	L	G	O	F	T	D	I	T	K	S	L	S	L	K	R	L	T	V	R	A	A	R	I	P	S	R	100

převažující L L V G A L R V L G Y S R L K E L T L E D I E V T G T X P P X P L E A

		110	120	130	140																															
hovězí CD14	L	L	V	A	V	L	R	A	L	G	Y	S	R	L	K	F	T	L	E	D	I	E	V	T	G	T	P	P	T	P	L	E	A	138		
lidská CD14	L	L	V	G	A	L	R	V	L	A	Y	S	R	L	K	E	L	T	L	E	D	I	K	I	T	G	T	M	P	P	L	P	L	E	A	139
myší CD14	I	L	F	G	A	L	R	V	L	G	I	S	G	L	Q	E	L	T	L	E	N	L	E	V	T	G	T	A	P	P	L	L	E	A	135	

převažující T G P A L X X L X L R N V S W A T G X A W L A E L Q Q W L K P G L K V

		150	160	170																																
hovězí CD14	A	Q	P	A	L	T	T	L	S	L	R	N	V	S	W	T	G	G	A	W	L	G	E	L	Q	Q	W	L	K	P	G	L	R	V	173	
lidská CD14	T	G	L	A	L	S	S	L	R	L	R	N	V	S	W	A	T	G	R	S	W	L	A	E	L	Q	Q	W	L	K	P	G	L	K	V	174
myší CD14	T	G	P	D	L	N	I	L	N	L	R	N	V	S	W	A	T	R	D	A	W	L	A	E	L	Q	Q	W	L	K	P	G	L	K	V	170

převažující L S I A Q A H S L A F S C E Q V R X F P A L T T L D L S D N P X L G E

		180	190	200	210																															
hovězí CD14	L	N	I	A	Q	A	H	S	L	A	F	P	C	A	G	L	S	T	F	E	A	L	T	T	L	D	L	S	D	N	P	S	L	G	D	208
lidská CD14	L	S	I	A	Q	A	H	S	P	A	F	S	Y	E	Q	V	R	A	F	P	A	L	T	S	L	D	L	S	D	N	P	G	L	G	E	209
myší CD14	L	S	I	A	Q	A	H	S	L	N	F	S	C	E	Q	V	R	V	F	P	A	L	S	T	L	D	L	S	D	N	P	E	L	G	E	205

převažující R G L M A A L C P X K F P A L Q X L A L R N A G M E T P S G V C A A L

		220	230	240																																
hovězí CD14	T	G	L	M	A	A	L	C	P	X	K	F	P	A	L	Q	Y	L	A	L	R	N	A	G	M	E	T	P	S	G	V	C	A	A	L	243
lidská CD14	R	G	L	M	A	A	L	C	P	X	K	F	P	A	L	Q	N	L	A	L	R	N	T	G	M	E	T	P	T	G	V	C	A	A	L	244
myší CD14	R	G	L	I	S	A	L	C	P	L	K	F	P	T	L	Q	V	L	A	L	R	N	A	G	M	E	T	P	S	G	V	E	S	A	L	240

Obr. 7A

převažující	AAARVQPQSLDLSHNSLRXT-APGAPRCXWPSALN	
	250 260 270 280	
hovězí CD14	AAARVQPQSLDLSHNSLRVT-APGATRCVWPSALR	277
lidská CD14	AAAGVQPQLSLDLSHNSLRATVMPAPRCMWSSALN	279
myší CD14	AAARVQLQGLDLSHNSLRDA-A-GAPSCDWPSQLN	273
převažující	SLNLSFAGLEQVPKGLPAKLSVLDLSCNRLXRXPX	
	290 300 310	
hovězí CD14	SLNLSFAGLEQVPKGLPPKLSVLDLSCNKLSREPR	312
lidská CD14	SLNLSFAGLEQVPKGLPAKLRVLDLSCNRLNRA PQ	314
myší CD14	SLNLSFTGLKQVPKGLPAKLSVLDLSYNRLDRNPS	308
převažující	PDELPEVXNLTLDGNPFLDPGXHXHXMXNSGVV	
	320 330 340 350	
hovězí CD14	RDELPEVNDLTLDGNPFLDPKALQHNDPMISGVV	347
lidská CD14	PDELPEVDNLTLDGNPFLVPGTALPHEGSMNSGVV	349
myší CD14	PDELPQVGNLSLKGNPFLD---SESHSEKFNNSGVV	340
převažující	PACARSXLXVGVSGTLALLQGARGFA	
	360 370	
hovězí CD14	PACARSA LTMGVSGA LALLQGARGFA	373
lidská CD14	PACARSTLSVGVSGTLVLLQGARGFA	375
myší CD14	TAGAPSSQAVALSGLLALLGDRLEFV	366

Obr. 7B

13/26

A

Baculovirus expresní systém

přímá 5' - GCT AGC GCT AGC CAC CAT GGT GTG CGT GCC CTA CCT GCT - 3'

obrácená 5' - GCT AGC GCT AGC CGC GAA GCC TCG GGC TCC TTG AAG - 3'

B

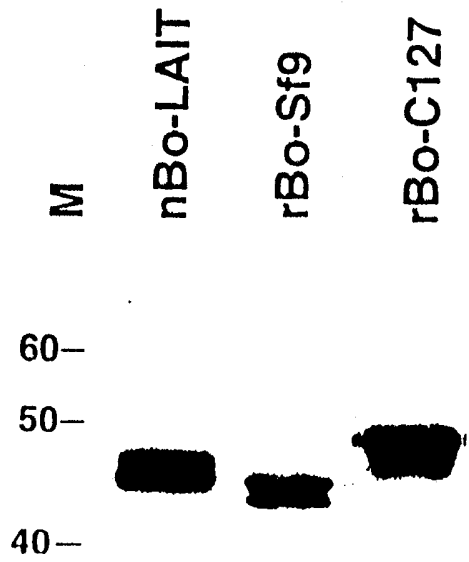
Savčí expresní systém

přímá 5' - CTC GAG CTC GAG GCT AGC CAC CAT GGT GTG CGT GCC - 3'

obrácená 5' - CTC GAGCTGAG GGA TCC CTA AGC GTA ATC TGG AAC - 3'

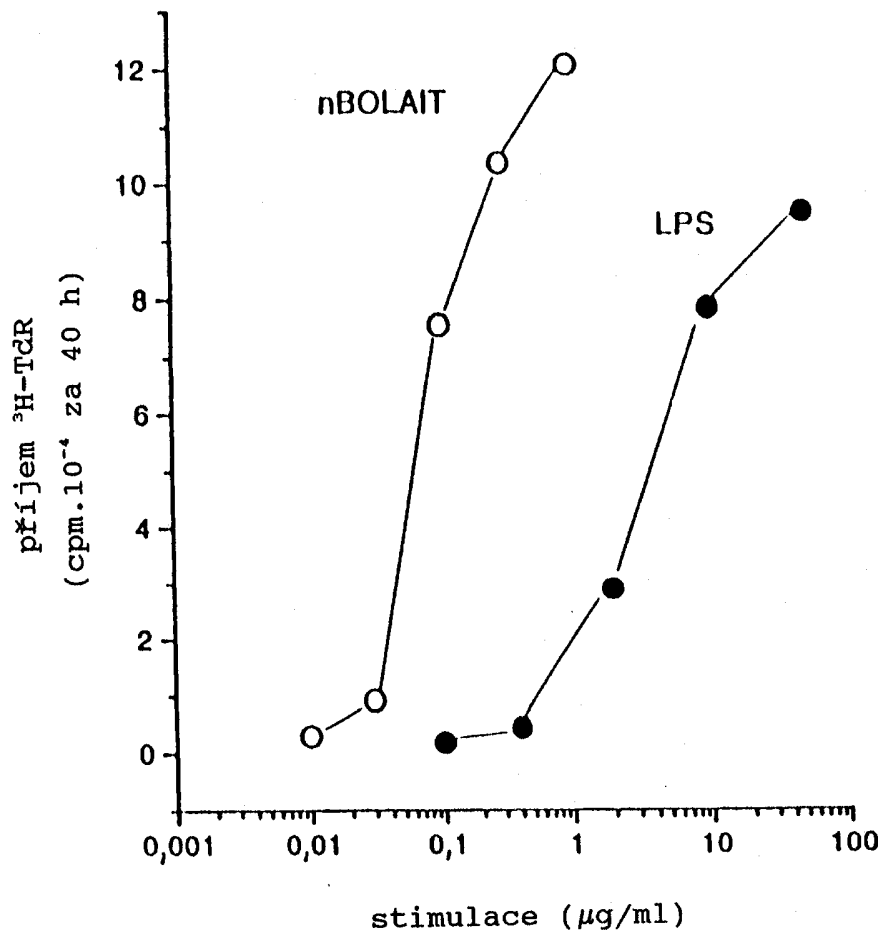
Obr. 8

14/26



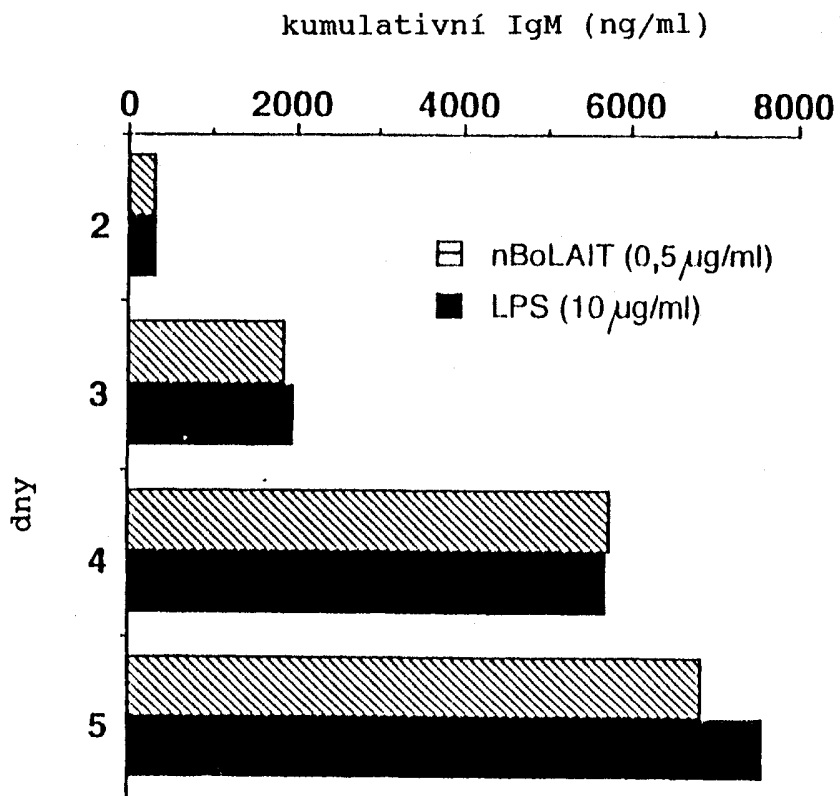
Obr. 9

15/26



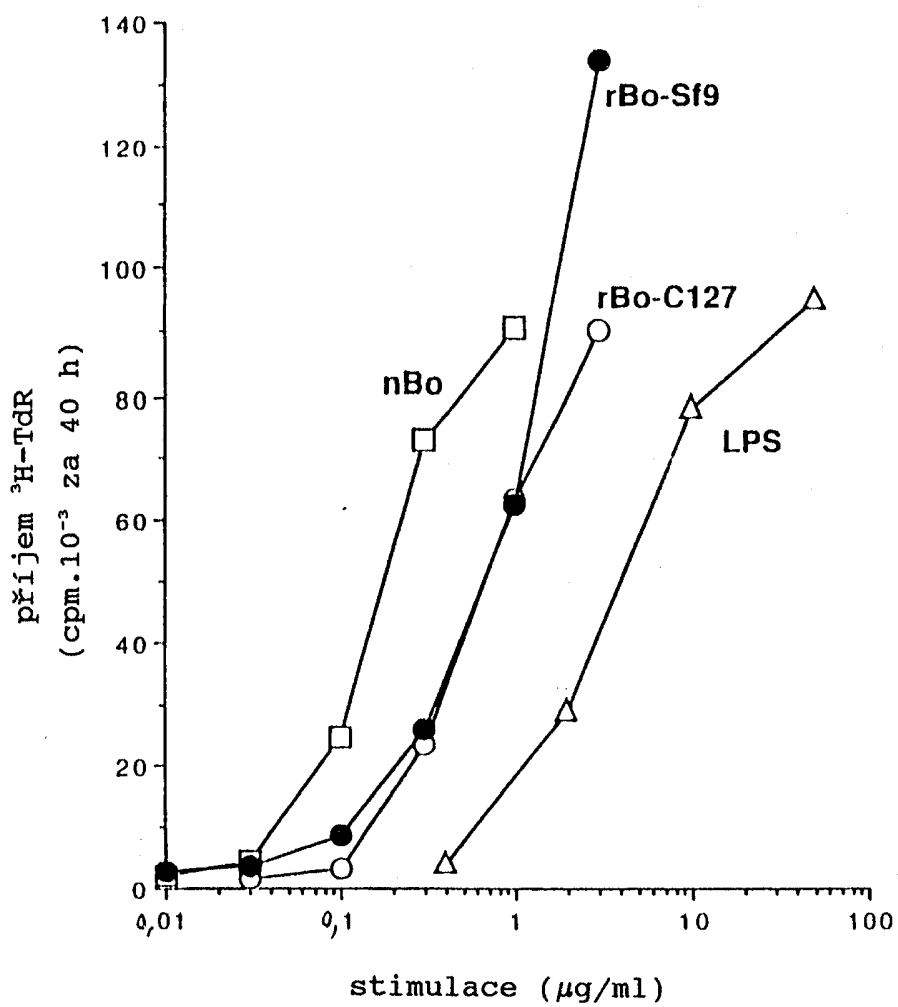
Obr. 10

16/26



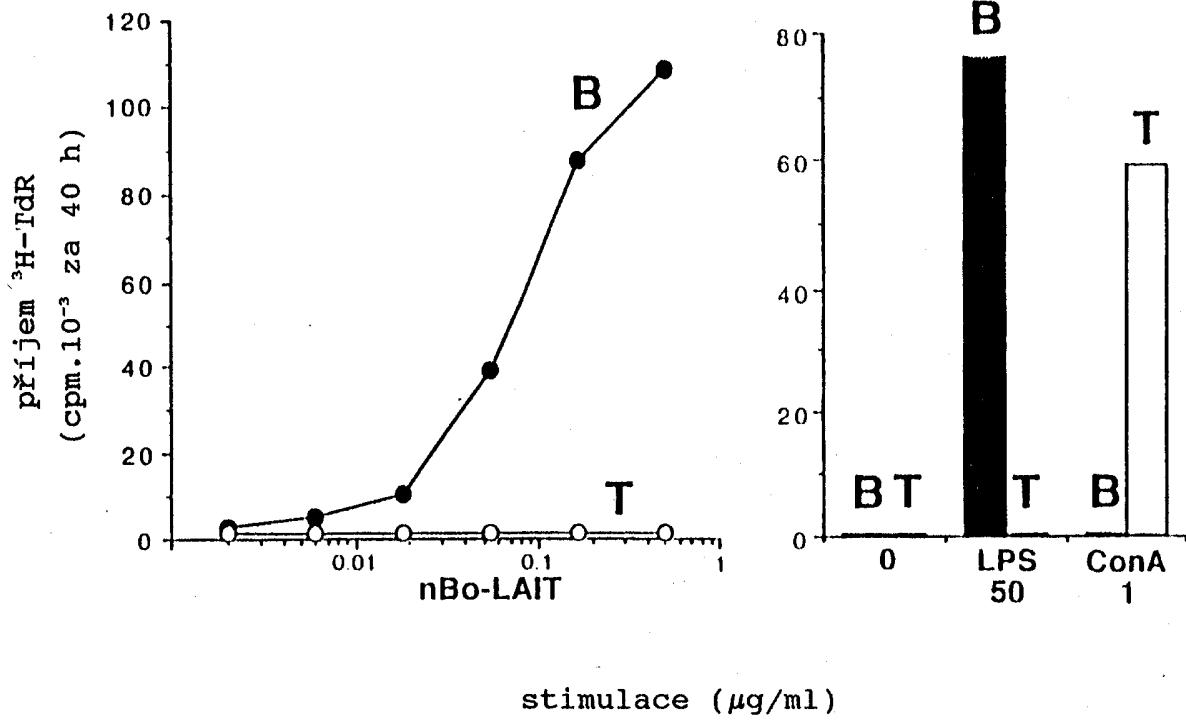
Obr. 11

17/26



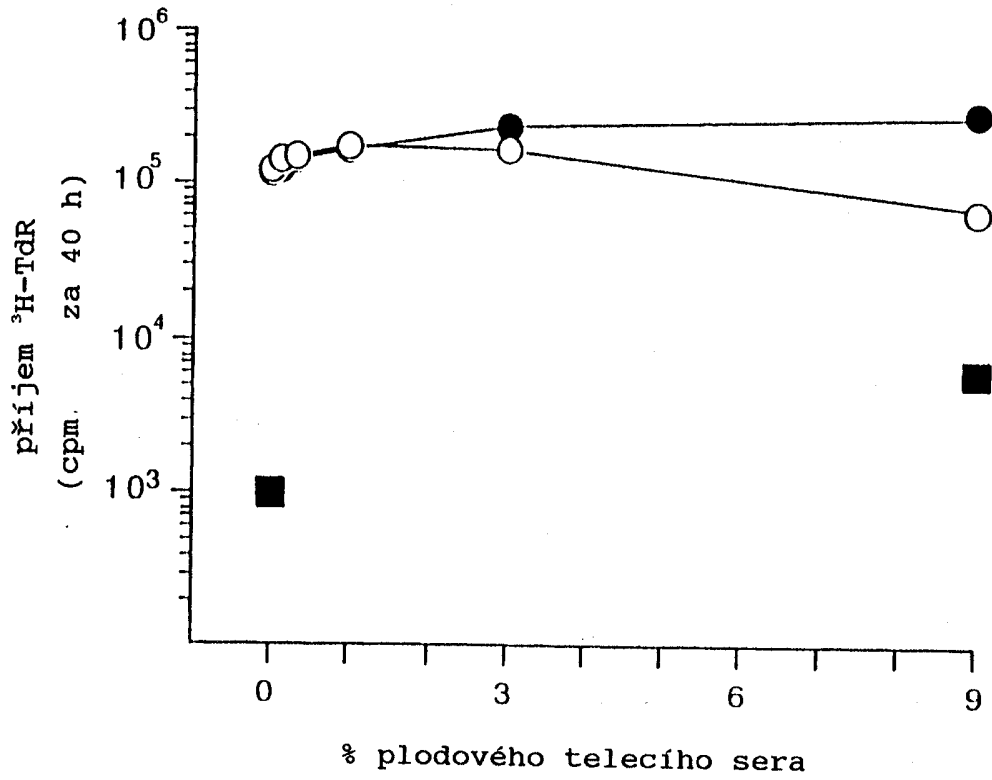
Obr. 12

18/26



Obr. 13

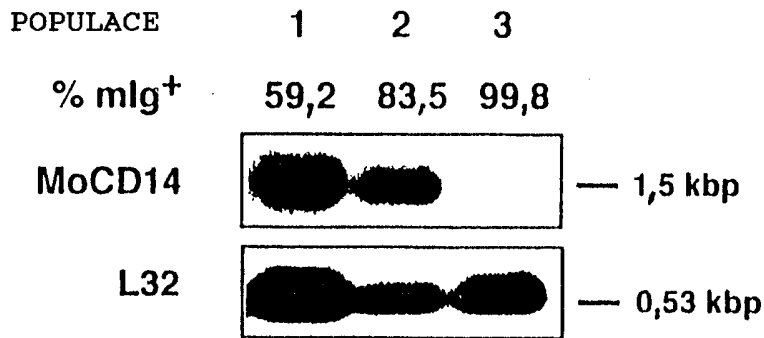
19/26



- nestimulováno
- nBo-LAIT 0,5 µg/ml
- LPS 50 µg/ml

Obr. 14

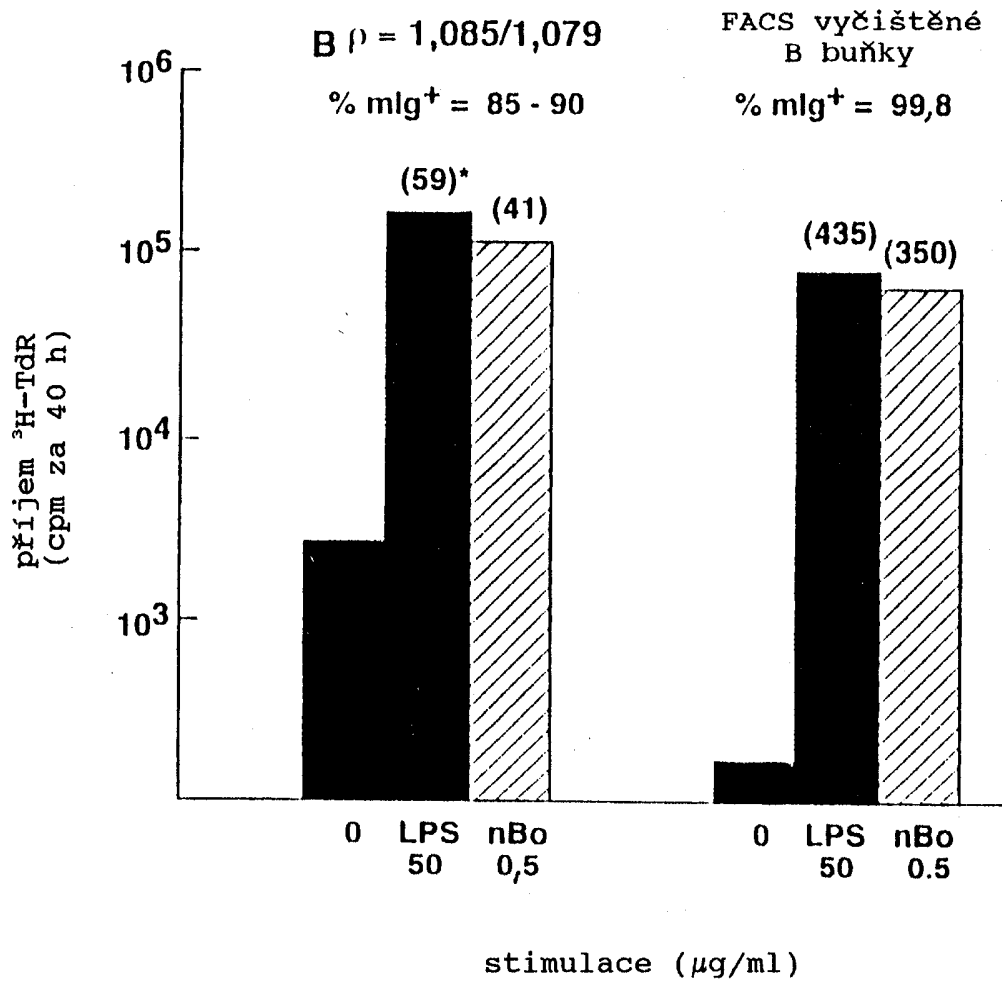
20/26



Populace: 1 - nefrakcionované splenocyty
 2 - T-ochuzené, $\rho = 1,085/1,079$ splenocytů
 3- FACS vyčištěné mlg⁺ B buňky z populace 2

Obr. 15

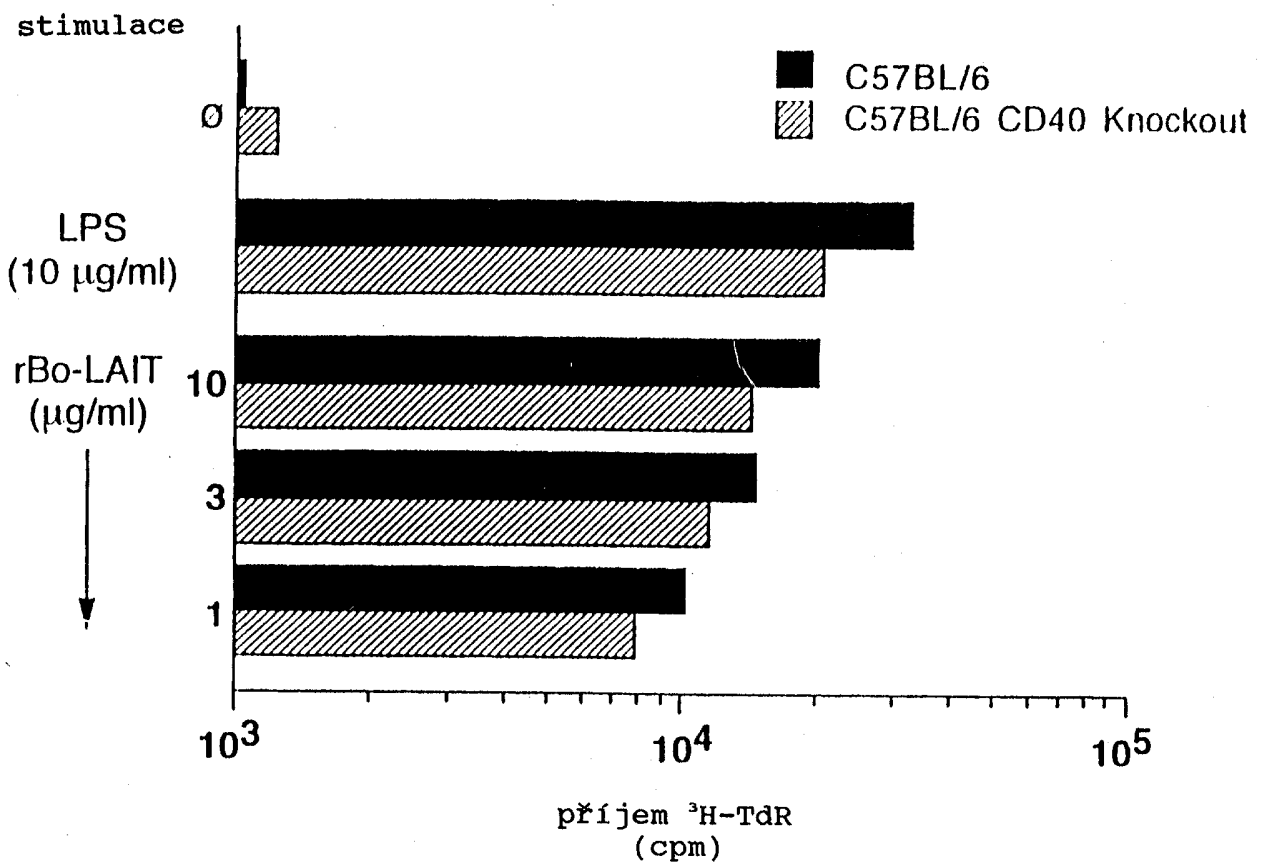
21/26



* () = index stimulace

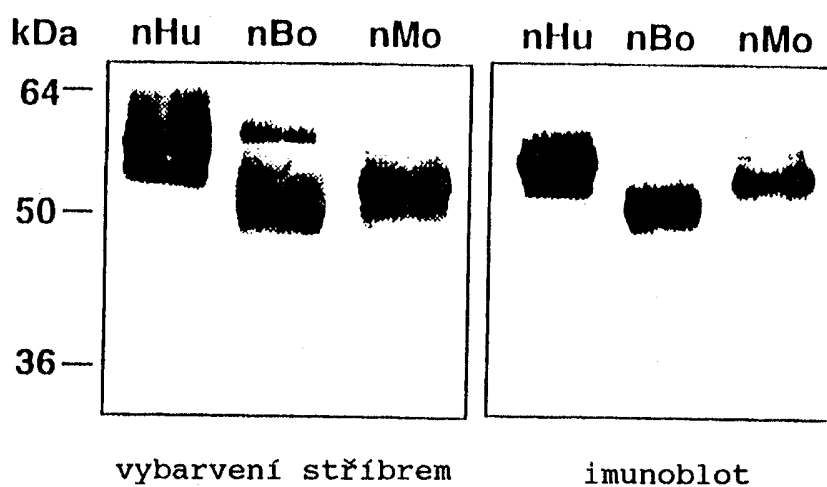
Obr. 16

22/26



Obr. 17

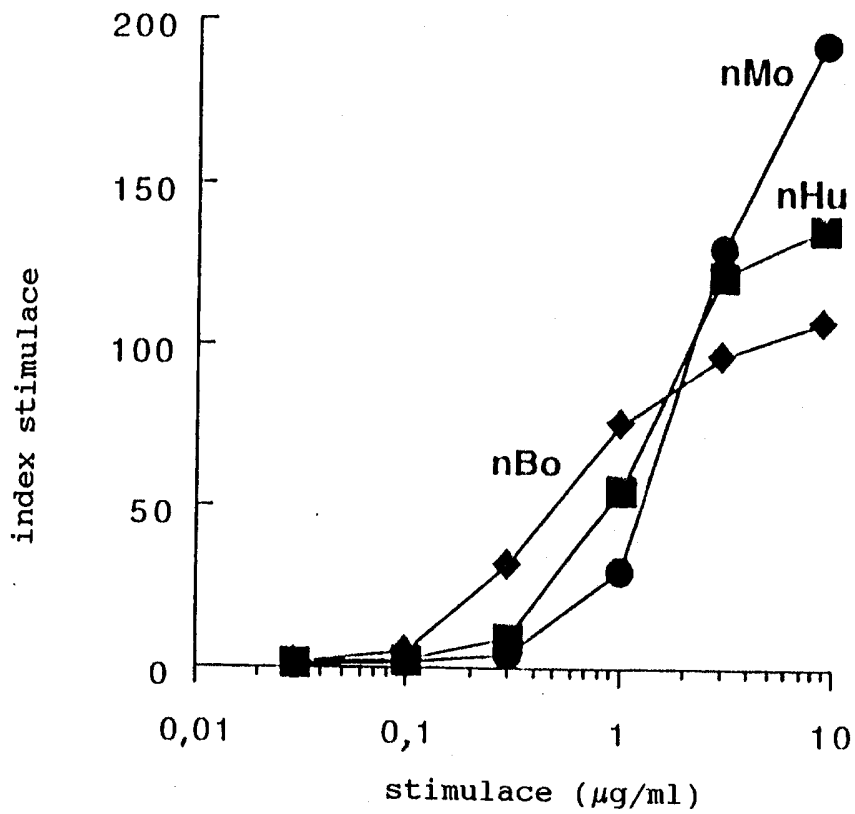
23/26



Odvozeno:

nHu - moč od nefrotického pacienta
nBo - mlezivo
nMo - supernatant OKT3-hybridomu

Obr. 18



Odvozeno:

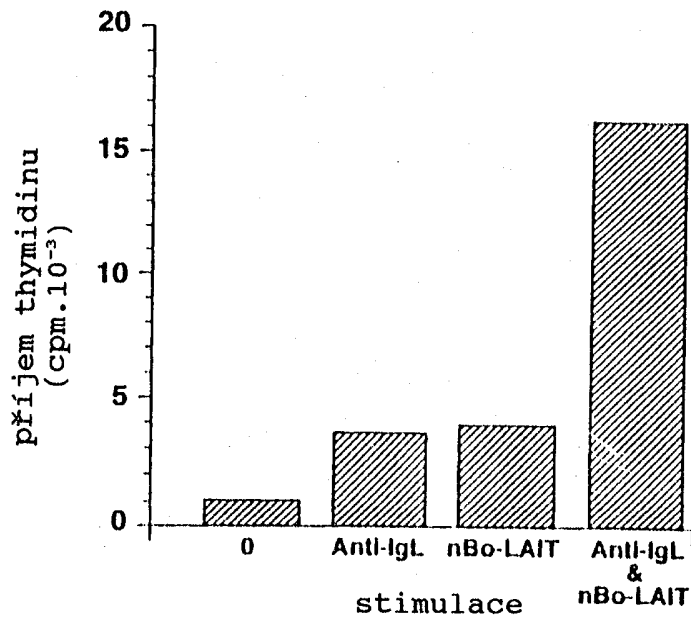
nBo - mlezivo

nHu - moč od nefrotického pacienta

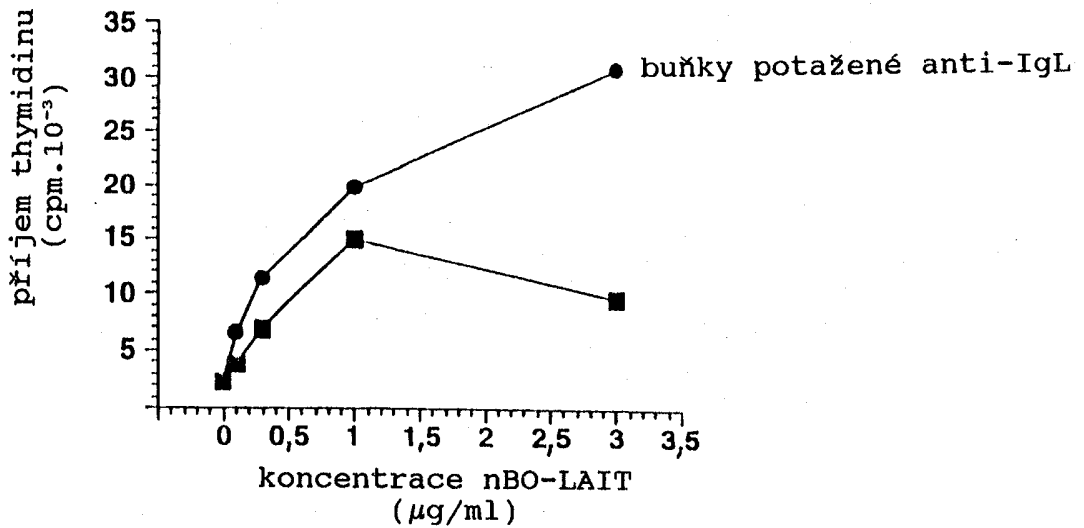
nMo - supernatant OKT3-hybridomu

Obr. 19

A. B buňky chordy

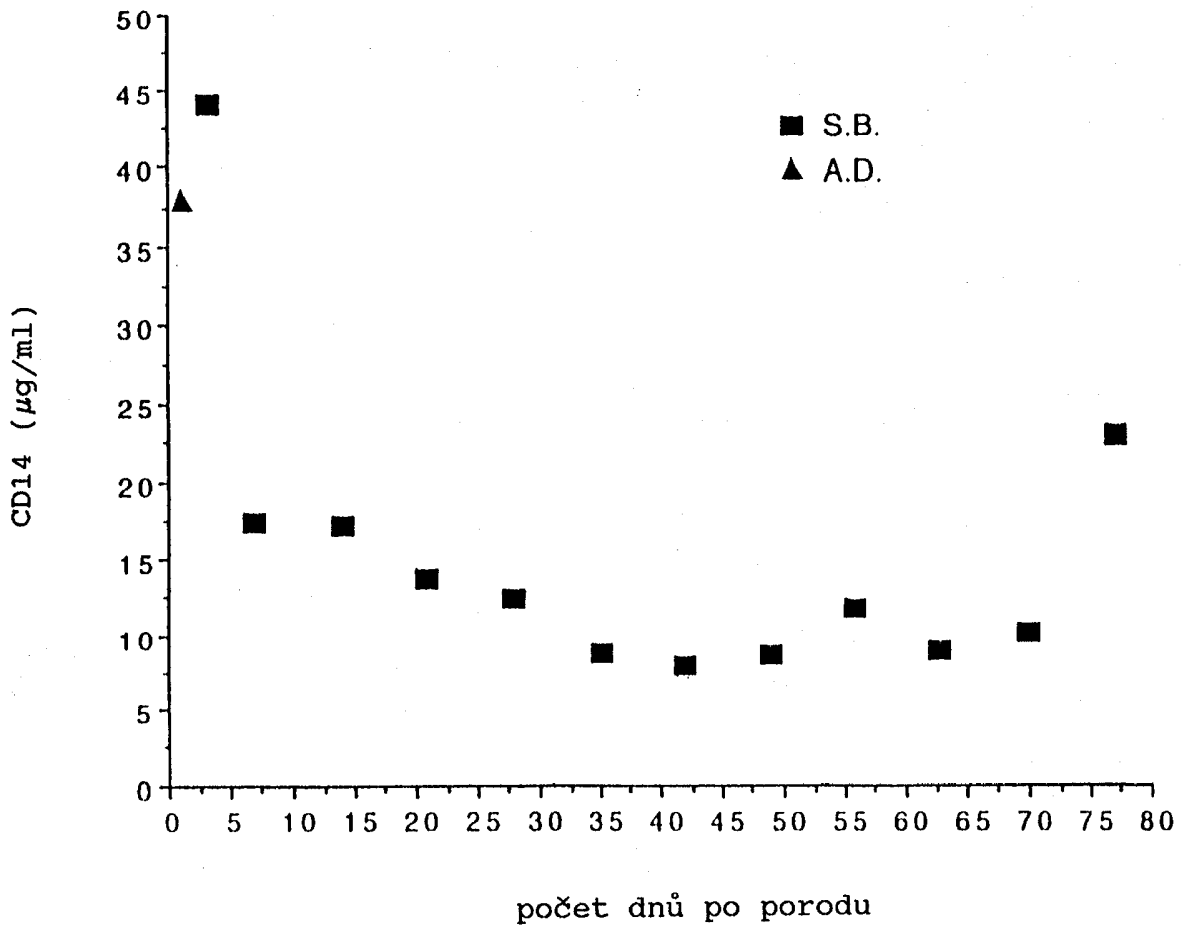


B. B buňky tonzily



Obr. 20

26/26



Obr. 21