

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 291 266

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1996 - 3125  
(22) Přihlášeno: 25.04.1995  
(30) Právo přednosti:  
25.04.1994 US 1994/234987  
(40) Zveřejněno: 12.03.1997  
(Věstník č. 3/1997)  
(47) Uděleno: 21.11.2002  
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 15.01.2003  
(Věstník č. 1/2003)  
(86) PCT číslo: PCT/US95/04832  
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 95/028957

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

A 61 K 39/00  
A 61 K 39/395  
A 61 P 37/06  
A 61 P 3/10

(73) Majitel patentu:

TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE, Hanover,  
NH, US;  
UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL  
CENTER, Worcester, MA, US;

buňky vůči transplantátům, jako jsou játra, ledvina, srdce,  
plíce, kůže, sval, nervová tkáň, žaludek a střevo. Popisuje se  
rovněž kombinace allogenní nebo xenogenní buňky, která  
exprimuje alespoň jeden donorův antigen, antagonisty gp39, a  
donorových buněk pankreatických ostrůvků, k ošetření  
cukrovky.

(72) Původce vynálezu:

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

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název vynálezu:

**Kombinace k indukci tolerance T-buňky vůči  
donorově tkáni nebo orgánu v recipientovi**

(57) Anotace:

Popisuje se kombinace a) allogenní nebo xenogenní buňky,  
která exprimuje alespoň jeden donorův antigen a která má na  
povrchu buňky ligand vstupující do interakce s receptorem na  
povrchu recipientovy T-buňky, který zprostředkovává  
helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu, a b)  
antagonisty tohoto receptoru na povrchu T-buňky, který  
inhibuje interakci ligandu s receptorem, k indukci tolerance T-  
buňky vůči donorově tkáni nebo orgánu v recipientovi této  
tkáně nebo orgánu. Podle výhodného provedení je allogenní  
nebo xenogenní buňkou B-buňka, výhodně klidová B-buňka,  
a molekulou na povrchu T-buňky, která zprostředkovává  
helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu, gp39.  
Výhodným antagonistou gp39 je protilátka proti gp39. Složky  
a) a b) kombinace se typicky podávají recipientovi  
transplantátu před transplantací tkáně nebo orgánu.  
Kombinaci podle vynálezu lze použít pro indukci tolerance T-

CZ 291266 B6

## Kombinace k indukci tolerance T–buňky vůči donorově tkáni nebo orgánu v recipientovi

### Oblast techniky

5

Vynález se týká kombinace k indukci tolerance u cytotoxických T–lymfocytů. Navození tolerance T–buněk vůči alloantigenům kombinací podle vynálezu může být použito jako přípravy na transplantaci tkáni nebo orgánů.

10

### Dosavadní stav techniky

K indukci antigen–specifické aktivace a klonální expanze klidového T–lymfocytu jsou nezbytné dva signály zprostředkované prostřednictvím povrchových molekul antigen–prezentujících buněk (APC) (Jenkins, M. a Schwartz, R. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 302 až 319; Mueller, D. L., a další (1990) *J. Immunol.* 144, 3 701 až 3 709; Williams, I. R. a Unanue, E. R. (1990) *J. Immunol.* 145, 85 až 93). U prvního signálu, jenž zajišťuje antigenní specifickost imunitní odpovědi, je cizorodý antigenní peptid prezentovaný prostřednictvím hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) rozpoznáván prostřednictvím TCR (receptoru T–buněk). Druhý signál, nazývaný též 20 kostimulační signál, indukuje proliferaci T–buněk a umožňuje tak T–buňkám přechod do funkčního stavu (Schwartz, R. H. (1990) *Science* 248, 1 349 až 1 356). Konstimulace není antigen–specifická ani není závislá na přítomnosti MHC. Předpokládá se, že konstimulace je zprostředkována jednou či více molekulami exprimovanými na povrchu APC, jež jsou odlišné od 25 molekul, které zprostředkovávají přenos „prvního“ signálu (Jenkins, M. K., a další (1988) *J. Immunol.* 140, 3 324 až 3 330; Linsley, P. S., a další (1991) *J. Exp. Med.* 173, 721 až 730; Gimmi, C. D., a další (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 6 575 až 6 579; Young, J. W., a další (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 229 až 237; Koulova, L., a další (1991) *J. Exp. Med.* 173, 759 až 762; Reiser H. , a další (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 271 až 275; van–Seventer, G. A., a další (1990) *J. Immunol.* 144, 4 579 až 4 586; LaSalle, J. M., a další (1991) *J. Immunol.* 30 147, 774 až 780; Dustin, M. I., a další (1989) *J. Exp. Med.* 169, 503; Armitage, R. J., a další (1992) *Nature* 357, 80 až 82; Liu, Y., a další (1992) *J. Exp. Med.* 175, 437 až 445). Jedna kostimulační dráha umožňující aktivaci T–buněk je zprostředkována přes molekuly CD28 přítomné na povrchu T–buněk. Tato molekula může zmíněný kostimulační signál přijmout prostřednictvím interakce s ligandem na povrchu B–buněk nebo APC. Mezi ligandy pro CD28 35 patří zástupci rodiny aktivačních antigenů B–lymfocytů B7, jako například B7–1 a/nebo B7–2 (Freedman, A. S., a další (1987) *J. Immunol.* 137, 3 260 až 3 267; Freeman, G. J., a další (1989) *J. Immunol.* 143, 2 714 až 2 722; Freeman, G. J., a další (1991) *J. Exp. Med.* 174, 625 až 631; Freeman, G. J., a další (1993) *Science* 262, 909 až 911; Azuma, M., a další (1993) *Nature* 366, 76 až 79; Freeman, G. J., a další (1993) *J. Exp. Med.* 178, 2 185 až 2 192). B7– a B7–2 jsou rovněž 40 ligandy pro jinou molekulu (CTLA4) přítomnou na povrchu aktivovaných T–buněk, nicméně úloha CTLA4 v procesu kostimulace je nejasná.

45

Jestliže T–buňky obdrží spolu s antigen–specifickým signálem i kostimulační signál, dojde k jejich aktivaci, což znamená jednak jejich proliferaci a jednak sekreci cytokinů. Naopak, obdrží–li T–buňky pouze antigen–specifický signál (bez kostimulačního signálu) předpokládá se, že tento proces indukuje u T–buněk stav funkčního „umlčení“ nebo anergie, a tudíž vlastně indukuje antigen–specifickou toleranci T–buněk.

50

Interakce mezi T–buňkami a B–buňkami hraje při imunitní odpovědi klíčovou úlohu. K indukci humorální imunity vůči antigenům závislým na thymu je zapotřebí „pomoc“ poskytovaná pomocnými T–buňkami (T helper cells, Th–buňky). Pomoc poskytovaná B–lymfocytům je z části zprostředkována prostřednictvím rozpustných molekul produkovaných Th–buňkami (například lymfokiny jako IL–4 a IL–5), nicméně k aktivaci B–buněk je rovněž nezbytná 55 interakce mezi B–buňkami a Th–buňkami, která je závislá na jejich vzájemném kontaktu (dotyku) (Hirohata a další, *J. Immunol.*, 140 : 3 736 až 3 744 (1988); Barlett a další, *J. Immunol.*

143 : 1 745 až 1 754 (1989). Tato data naznačují, že k aktivaci B–buněk je nezbytný kontakt mezi povrchovými molekulami B–buněk a Th–buněk. Molekula nebo molekuly přítomné na povrchu T–buňky tudíž zprostředkovávají helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu. Idea interakce mezi B–buňkami a T–buňkami závislé na kontaktu je dále podporována pozorováním, že izolované plazmatické membrány aktivovaných T–buněk mohou poskytovat helperové efektorové funkce nezbytné k aktivaci B–buňky. Brian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 564 až 568 (1988); Hodgkin a další, J. Immunol., 145 : 2 025 až 2 034 (1990); Noelle a další, J. Immunol., 146 : 1 118 až 1 124 (1991).

10 Na povrchu zralých i nezralých B–lymfocytů byla identifikována molekula CD40, jenž je schopna po zesíťování prostřednictvím protilátek indukovat proliferaci B–buněk. Valle a další, Eur. J. Immunol., 19 : 1 463 až 1 467 (1989); Gordon a další, J. Immunol., 140 : 1 425 až 1 430 (1988); Gruber a další, J. Immunol., 142 : 4 144 až 4 152 (1989). CD40 byla molekulárně klonována a charakterizována. Stamenkovic a další, EMBO J., 8 : 1 403 až 1 410 (1989). Protein gp39 (rovněž je nazýván CD40L), jenž je ligandem pro CD40, byl rovněž molekulárně klonován a charakterizován. Armitage a další, Nature, 357 : 80 až 82 (1992); Lederman a další, J. Exp. Med., 175 : 1 091 až 1 101 (1992); Hollebaugh a další, EMBO J., 11 : 4 313 až 4 319 (1992). Protein gp39 je exprimován na povrchu aktivovaných CD4<sup>+</sup> Th–buněk, ale není exprimován na povrchu klidových CD4<sup>+</sup> Th–buněk. Spriggs a další, J. Exp. Med., 176 : 1 543 až 1 550 (1992); Lane a další, Eur. J. Immunol., 22 : 2 573 . 2 578 (1992); Roy a další, J. Immunol., 151 : 1 až 14 (1993). Buňky transfikované genem gp39 a exprimující na svém povrchu protein gp39, jsou schopny „spustit“ proliferaci B–buněk, a při dostupnosti dalších stimulačních signálů, mohou indukovat produkci protilátek, viz Armitage a další, Nature, 357 : 80 až 82 (1992); Hollebaugh a další, EMBO J., 11 : 4 313 až 4 319 (1992).

25

#### Podstata vynálezu

30 Pro indukci imunitní odpovědi, pro niž je nezbytná pomoc Th–buňky, jsou velmi důležité povrchové molekuly T–buněk, které zprostředkovávají helperové efektorové funkce závislé na kontaktu. Například interakce molekuly gp39 na povrchu T–buněk s receptorem CD40 na povrchu B–buněk hraje klíčovou úlohu při aktivaci imunitní odpovědi B–buněk vůči určitému antigenu. Vynález je mimo jiné založen na objevu, že povrchové molekuly, které u T–buněk zprostředkovávají na kontaktu závislé helperové efektorové funkce, hrají rovněž rozhodující úlohu při odpovědi T–buněk vůči alloantigenům. Bylo zjištěno, že za vhodných podmínek může mít rušivý zásah do interakce mezi proteinem gp39 a ligandem na povrchu allogenní buňky prezentující alloantigeny T–buňce za následek navození tolerance u T–buňky. Výhodné je, jestliže je allogenní buňka prezentující alloantigeny T–buňce schopna poskytnout signály nezbytné k aktivaci T–buňky pouze prostřednictvím interakce mezi ligandem proteinu gp39 na svém povrchu a proteinem gp39 na povrchu T–buňky. Inhibicí interakce mezi ligandem proteinu gp39 na povrchu allogenní buňky a proteinem gp39 na povrchu T–buňky se zamezí aktivaci T–buňky a navíc dojde k navození tolerance T–buňky vůči příslušnému alloantigenu. Navození tolerance T–buňky vůči alloantigenům kombinací podle vynálezu může být použito jako přípravy na transplantaci tkání nebo orgánů.

45

Předmětem vynálezu je kombinace zvláště vhodná k indukci (navození) tolerance T–buňky vůči donorově tkáni nebo orgánu v recipientovi této tkáně nebo orgánu. Jedná se o kombinaci 1) určité allogenní nebo xenogenní buňky, která exprimuje na svém povrchu alespoň jeden donorův antigen a která nese na svém buněčném povrchu ligand, jenž vstupuje do interakcí s receptorem na povrchu recipientovy T–buňky, který zprostředkovává helperové efektorové funkce závislé na kontaktu; a 2) antagonisty této molekuly (receptoru) exprimované na povrchu recipientivy T–buňky, která zprostředkovává helperové efektorové funkce závislé na kontaktu. Zmíněný antagonist inhibuje interakci mezi touto molekulou na povrchu T–buňky a jejím ligandem na povrchu allogenní nebo xenogenní buňky.

55

Ve výhodném provedení vynálezu je povrchovým T-buněčným receptorem v recipientním organismu, zprostředkovávajícím helperové efektorové funkce závislé na kontaktu, molekula gp39. V popsáném provedení vynálezu je daným antagonistou molekula, která inhibuje interakci mezi proteinem gp39 na povrchu T-buňky a ligandem pro protein gp39 na povrchu allogenní nebo xenogenní buňky. Zvláště výhodným antagonistou molekuly gp39 je protilátka proti proteinu gp39. V jiném provedení vynálezu je antagonistou molekuly gp39 rozpustná forma ligandu pro protein gp39, například rozpustný protein CD40. Jako allogenní nebo xenogenní buňka, která je podána recipientovi, je nejvhodnější nějaká lymfoidní buňka, například B-buňka. Jinou možností je použití malé klidové B-buňky. Allogenní a xenogenní buňka a antagonist (například protilátka proti proteinu gp39) jsou obvykle recipientovi podávány před vlastní transplantací tkáně nebo orgánu tomuto subjektu. Lymfoidní buňky (například B-buňky) pocházející od donora tkáně nebo orgánu jsou například spolu s příslušným antagonistou podány recipientovi před vlastní transplantací tkáně nebo orgánu tomuto subjektu.

Kombinace podle vynálezu může být například využito k navození tolerance T-buněk vůči transplantovaným tkáním nebo orgánům jako jsou například játra, ledviny, srdce, plíce, kůže, sval, nervová tkáň, žaludek nebo střevo. V jednom případě byly jako transplantovaná tkáň použity pankreatické ostrůvky. Vynález tudíž popisuje kombinace k ošetření cukrovky, které zahrnují 1) allogenní a xenogenní buňky exprimující donorovy antigeny; 2) antagonistu receptoru na povrchu recipientových T-buněk, který zprostředkovává helperové efektorové funkce závislé na kontaktu. Tímto antagonistou může být například antagonistu proteinu gp39 (například protilátka proti proteinu gp39); a 3) donorovy pankreatické ostrůvky.

#### 25 Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 je grafickým znázorněním přeživších transplantovaných alloštěpů pankreatických ostrůvků u myši s chemicky indukovaným diabetes. Těmto myším byla před vlastní transplantací podána buď samotná protilátka proti proteinu gp39, nebo pouze frakcionované nebo nefrakcionované allogenní slezinné buňky. Na ose x jsou vyjádřeny dny od počátku experimentu, zatímco osa y udává kumulativní procento přeživších alloštěpů. Legenda k symbolům: čára A odpovídá myším jimž nebyly před transplantací podány žádné buňky ani protilátky (N= 32), čára B platí pro myši jimž byly podány nefrakcionované slezinné buňky ( $75$  až  $88 \times 10^6$ , N = 7), čára C jsou myši jimž byla podána 19. Frakce slezinných buněk ( $75$  až  $88 \times 10^6$ , N = 13), čára D platí pro myši jimž byla podána 19. frakce slezinných buněk v množství  $40$  až  $44 \times 10^6$ , N = 16) a konečně čára E platí pro myši jimž byla podána samotná protilátka proti proteinu gp39 (N = 11).

Obrázky 2A a 2B jsou grafickým znázorněním přeživších transplantovaných alloštěpů pankreatických ostrůvků u myši s chemicky indukovaným diabetes. Množství přeživších transplantovaných alloštěpů bylo stanoveno měřením změny hladiny koncentrace glukózy v plazmě. Těmto myším byla před vlastní transplantací podána jedna dávka frakcionovaných allogenních slezinných buněk a současně byla myším podávána protilátka proti proteinu gp39 (MR1), a to po dobu dvou týdnů (obr. 2A) nebo 7 týdnů (obr. 2B). Každá z křivek reprezentuje data získaná od jednoho jedince. Prázdné symboly označují recipienty, u nichž došlo ke spontánnímu odvržení alloštěpu. Plné symboly označují myši, u nichž byly štěpy pankreatických ostrůvků v době ukončení experimentu ještě funkční. Na svislé ose je vyznačena koncentrace glukózy v plazmě uvedená v mg na 100 ml. Na vodorovné ose jsou dny, přičemž počátek osy je v den transplantace štěpu.

Obrázky 3A, B a C jsou záznamy z průtokového cytometru zobrazující lidské lymfocyty periferního krevního oběhu aktivované po dobu 6 hodin a značené buď CD40Ig (obr. 3A) popřípadě monoklonální protilátkou 4D9-8 (obr. 3B), nebo 4D9-9 (obr. 3C).

Obrázky 4A, B a C jsou záznamy z průtokového cytometru zobrazující lidské lymfocyty periferního krevního oběhu aktivované po dobu 6 hodin a kultivované za přítomnosti cykloporinu A, značené buď monoklonální protilátkou 4D9-8 (obr. 4A), nebo protilátkou 4D9-9 (obr. 4B) nebo CD40Ig (obr. 4C).

5

Obrázky 5A a B jsou záznamy z průtokového cytometru zobrazující lidské lymfocyty periferního krevního oběhu aktivované po dobu 6 hodin značené CD40Ig za přítomnosti neznačené monoklonální protilátky 4D9-8 (obr. 5A) nebo neznačené protilátky mAb 4D9-9 (obr. 5B).

10

Obrázek 6 je grafickým znázorněním inhibice proliferace lidských B-buněk indukované pomocí rozpustného proteinu gp39 a IL-4, přičemž tyto buňky jsou kultivovány za přítomnosti monoklonálních protilátek 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 nebo 89-79 proti lidskému proteinu gp39. Na vodorovné ose je vyjádřena koncentrace použité monoklonální protilátky v mg/ml, na ose svislé je cpm.

15

Obrázek 7 je grafickým znázorněním inhibice allospecifické odpovědi smíšené populace lymfocytů kultivovaných za přítomnosti monoklonálních protilátek 24-31 nebo 89-79 proti lidskému proteinu gp39.

20

#### Podrobný popis vynálezu

Tento vynález popisuje kombinaci, která slouží in vivo k indukci tolerance T-buněk recipienta transplantátu vůči donorově transplantované tkáni nebo orgánu. Jedná se o kombinaci 1) určité allogenní nebo xenogenní buňky, která exprimuje na svém povrchu donorovy antigeny a která nese na svém buněčném povrchu ligand, jenž vstupuje do interakcí s receptorem na povrchu recipientovy T-buňky, který zprostředkovává helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu; a 2) antagonisty této molekuly (receptoru) exprimované na povrchu recipientovy T-buňky, který inhibuje interakci mezi ligandem a příslušným receptorem. Používaný termín „recipient“ označuje subjekt, jemuž bude, je nebo byl transplantován tkáňový nebo orgánový štěp. Podle vynálezu je „allogenní“ buňka definovaná jako buňka získaná z jiného jedince, který ovšem náleží ke stejnému druhu jako recipient, a tato buňka exprimuje „alloantigeny“ lišící se od antigenů exprimovaných na buňkách recipienta. „Xenogenní“ buňka je získána z jedince, který náleží k jinému druhu než recipient, a tato buňka exprimuje „xenoantigeny“ lišící se od antigenů exprimovaných na buňkách recipienta. „Donorovými antigeny“ podle vynálezu se rozumí antigeny exprimované na donorově tkáňovém nebo orgánovém štěpu, který je určen k transplantaci do organismu recipienta. Donorovy antigeny mohou být v závislosti na zdroji štěpu buď alloantigeny, nebo xenoantigeny. Allogenní nebo xenogenní buňka podávaná recipientovi jako součást kombinace sloužící k navození tolerance podle vynálezu exprimuje donorovy antigeny. Exprimuje tedy některé nebo všechny antigeny přítomné na donorově tkáňovém nebo orgánovém štěpu, jenž je určen k transplantaci recipientovi. Allogenní nebo xenogenní buňka je výhodně získávána od donora tkáňového nebo orgánového štěpu, ale může být získána z jednoho nebo více zdrojů, které mají s donorem společné antigenní determinanty.

45

Kromě allogenní a xenogenní buňky je recipientovi jako součást kombinace k navození tolerance podle vynálezu podáván rovněž antagonistu povrchové molekuly T-buněk. Tato povrchová molekula T-buněk zprostředkovává helperové efektorové funkce závislé na kontaktu. Podle vynálezu jako molekulu nebo receptor zprostředkovávající helperové efektorové funkce závislé na kontaktu označujeme molekulu nebo receptor, který je exprimován na Th-buňce a který vstupuje do interakce s ligandem na efektorové buňce (například B-buňce). Interakce zmíněné molekuly s příslušným ligandem je nezbytná k vytvoření efektorové buněčné odpovědi (například k aktivaci B-buňky). Nedávno bylo zjištěno, že tato molekula nebo receptor participuje nejen v procesu efektorové buněčné odpovědi, ale rovněž i při odpovědi T-buňky vůči antigenu. Jako molekula na povrchu T-buňky, která zprostředkovává helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu, se výhodně používá protein gp39. Ve výhodných

55

provedeních vynálezu zahrnuje kombinace podle vynálezu allogenní nebo xenogenní buňku a antagonistu gp39 k podání recipientovi transplantátu. Aktivace T-buněk recipienta prostřednictvím allogenní nebo xenogenní buňky zahrnuje interakci mezi proteinem gp39 na povrchu T-buněk recipienta a ligandem pro protein gp39 na povrchu příslušné allogenní nebo xenogenní buňky. Inhibice této interakce pomocí antagonisty protein gp39 vede k tomu, že T-buňky recipienta nejsou přítomností antigenů donora exprimovaných na allogenní nebo xenogenní buňce aktivovány, ale je u nich spíše navozena tolerance vůči těmto antigenům. Navození tolerance v organismu recipienta vůči těmto antigenům. Navození tolerance v organismu recipienta vůči antigenům donora tudíž umožňuje úspěšnou transplantaci donorovy tkáně nebo orgánu bez následného odvržení tohoto štěpu, jež by bylo způsobeno reakcí imunitního systému.

V následujících odstavcích jsou podrobně popsána různá provedení vynálezu.

#### I. Antagonisté proteinu gp39

V kombinaci podle vynálezu je antagonist proteinu gp39 podáván recipientovi za účelem narušení interakce mezi proteinem gp39 na povrchu T-buněk recipienta a ligandem pro protein gp39 na povrchu allogenní nebo xenogenní buňky, jako například B-buňky, podáván recipientovi. Antagonista proteinu gp39 je definován jako molekula, která narušuje tuto interakci. Antagonistou proteinu gp39 může být protilátka proti proteinu gp39 (například monoklonální protilátka proti proteinu gp39), fragment nebo derivát takovéto protilátky proti proteinu gp39 (například Fab nebo F(ab)<sub>2</sub> fragmenty, chimérické protilátky nebo humanizované protilátky), rozpustné formy ligandu pro protein gp39 (například rozpustný CD40), rozpustné formy fúzního proteinu ligandu pro protein gp39 (například rozpustný CD40Ig) nebo farmaceutická agens, která jsou schopna částečně narušit nebo zcela přerušit interakci mezi proteinem gp39 a receptorem CD40.

#### A. Protilátky

Savec (například myš, křeček nebo králík) může být imunizován imunogenní formou proteinu gp39 nebo jeho proteinového fragmentu (například peptidového fragmentu), která je schopna v daném organismu vyvolat příslušnou humorální imunitní reakci. Jako imunogen může být rovněž použita buňka exprimující na svém povrchu protein gp39. Jako alternativní imunogeny složí purifikovaný protein gp39 nebo jeho proteinové fragmenty. Protein gp39 je možné purifikovat z buněk exprimujících tento protein pomocí standardních purifikačních technik. Dále pak může být v hostitelských buňkách, například v bakteriích nebo v nějaké savčí buněčné linii, exprimována gp39 cDNA (Armitage a další, *Nature*, 357 : 80 až 82 (1992); Lederman a další, *J. Exp. Med.*, 175 : 1 091 až 1 101 (1992); Hollebaugh a další, *EMBO J.*, 11 : 4 313 až 4 319 (1992)) a protein gp39 následně purifikován z příslušné buněčné kultury pomocí standardních technik. Jinou alternativou je přímá syntéza proteinu gp39 podle známé aminokyselinové sekvence (Armitage a další, *Nature*, 357 : 80 až 82 (1992); Lederman a další, *J. Exp. Med.*, 175 : 1 091 až 1 101 (1992); Hollebaugh a další, *EMBO J.*, 11 : 4 313 až 4 319 (1992)) za použití známých způsobů (například F-moc nebo T-boc chemická syntéza). Způsoby sloužící ke zvýšení imunogenity zahrnují například konjugaci proteinu s nosiči nebo jiné techniky dobře v současnosti známé. Příslušný protein může být například aplikován spolu s adjuvans. Imunitní odpověď může být sledována stanovováním titru příslušné protilátky v séru nebo plazmě. Ke stanovení hladiny protilátek může být použita ELISA či jiné standardní imunostanovení, kde jako antigen bude použit příslušný imunogen.

Následně po imunizaci může být získáno antisérum nebo, je-li to žádoucí, mohou být ze séra izolovány polyklonální protilátky. Za účelem produkce monoklonálních protilátek mohou být z imunizovaného zvířete izolovány buňky produkující protilátky (lymfocyty) a jejich následnou fúzi s myeloidními buňkami pomocí standardních postupů sloužících k fúzi somatických buněk můžeme získat immortalizované buňky-hybridomy. Způsoby sloužící popsanému účelu jsou dobře známy ze stavu techniky. Příkladem zmíněných postupů je způsob přípravy hybridomů. Tento

způsob byl původně vyvinut Kohlerem a Milsteinem (Nature (1975) 256 : 495 až 497). Dalšími podobnými způsoby jsou například metoda pro přípravu hybridomů lidských B-buněk (Kozbar a další, Immunol. Today (1983) 4 : 72), metoda pro přípravu hybridomů produkujících lidské monoklonální protilátky pomocí EBV (Cole a další Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) (Allen R. Bliss, Inc., stránky 77 až 96) a screening kombinovaných knihoven protilátek (Huse a další, Science (1989) 246 : 1 275). Hybridomy produkující protilátky specificky reagující s daným proteinem nebo peptidem mohou být rozpoznány a příslušné protilátky následně izolovány.

Podle vynálezu je termín protilátka používán i k označení fragmentů této protilátky, jenž specificky reagují s proteinem gp39, jeho fragmentem nebo fúzním proteinem gp39. Protilátky mohou být rozštěpeny za použití konvenčních způsobů a použitelnost takto získaných fragmentů může být určena stejným způsobem jako u intaktních molekul protilátek. Například F(ab')<sub>2</sub> fragmenty mohou být připraveny působením pepsinu na protilátku. U takto připravených F(ab')<sub>2</sub> fragmentů mohou být redukovány disulfidické můstky, což má za následek vznik Fab' fragmentů. Termín protilátka je podle vynálezu používán rovněž k označení bispecifických a chimérických molekul, které mají ve své molekule úsek specificky rozeznávající pro protein gp39.

Jsou-li u lidí terapeuticky využívány protilátky produkované v jiných než lidských subjektech, jsou tyto protilátky v rozdílné míře rozpoznány jako cizorodé a tudíž u daného pacienta existuje možnost vzniku imunitní reakce. Jedním z přístupů, jenž je výhodnější než celková imunosuprese, používaných k minimalizaci nebo dokonce eliminaci tohoto problému je produkce chimérických derivátů protilátek, tzn. Protilátek, které ve své molekule obsahují variabilní oblast jiného než lidského subjektu a lidskou konstantní oblast. Chimérické molekuly protilátek mohou například obsahovat doménu zodpovědnou za vazbu antigenu odvozenou z myši nebo krysí protilátky nebo protilátky nějakého jiného druhu, spolu s lidskou konstantní oblastí.

Bylo popsáno velké množství přístupů sloužících k přípravě chimérických protilátek a tyto přístupy mohou být použity k přípravě chimérických protilátek obsahujících imunoglobulinovou variabilní oblast, která je schopna rozpoznat protein gp39. Viz. Například Morrison a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 : 6 851 (1985); Takeda a další, Nature 314 . 452 (1985); Cabilly a další, Patent US 4 416 567; Boss a další, Patent US 4 816 397; Tanaguchi a další, European Patent Publication EP 171 496; European Patent Publication 0 173 494, United Kingdom Patent GB 217 709 6B. Předpokládá se, že tyto chimérické protilátky by měly být pro člověka méně imunogenní než odpovídající non-chimérické protilátky.

Jsou-li monoklonální nebo chimérické protilátky specificky reagující s proteinem gp39 nebo jeho peptidovým fragmentem určeny k léčbě lidí, mohou být protilátky dále humanizovány tak, že jsou vytvořeny chimérické variabilní oblasti, kde část této variabilní oblasti, zvláště pak konzervované peptidové úseky domény vážící antigen, je lidského původu, a jiného než lidského původu jsou pouze hypervariabilní úseky. Takto pozměněné imunoglobulinové molekuly mohou být připraveny některou z mnoha v současné době známých technik (například Teng a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 : 7 308 až 7 312 (1983); Kozbor a další, Immunology Today, 4 : 7 279 (1983); Olsson a další, Meth. Enzymol., 92 : 3 až 16 (1982)) a výhodně rovněž technikou popsanou v PCT Publication WO 92/06193 nebo EP 0 239 400. Humanizované protilátky mohou být komerčně připraveny například firmou Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Velká Británie.

Jiným způsobem sloužícím k přípravě specifických protilátek (nebo jejich fragmentů) proti proteinu gp39 nebo jeho peptidovému fragmentu, je screening (právě pomocí proteinu gp39 nebo jeho peptidového fragmentu) expresních knihoven kódujících imunoglobulinové geny nebo jejich části exprimované v bakteriálních buňkách. Kompletní Fab fragmenty, VH oblasti a FV oblasti mohou být například exprimovány v bakteriích za použití fágových expresních knihoven. Viz. například Ward a další, Nature, 341 : 544 až 546 (1989); Huse a další, Science, 246 : 1 275

až 1 281 (1989); a McCafferty a další, Nature, 348 : 552 až 554 (1990). Screening takových knihoven pomocí, například, peptidového fragmentu proteinu gp39 může identifikovat imunoglobulinové fragmenty reagující s proteinem gp39. Jinou možností k produkci protilátek nebo jejich fragmentů je využití SCID-hu myši (Genpharm).

5

Metodologie pro produkci monoklonálních protilátek proti proteinu gp39, a to jak proti lidskému proteinu gp39, tak proti myšimu gp39, jakož i monoklonální protilátky vhodné k použití kombinací podle vynálezu, jsou podrobně popsány v Příkladu 2.

10 Podle vynálezu jsou k navození antigen-specifické tolerance T-buněk výhodně použity monoklonální protilátky proti lidskému proteinu gp39. Mezi výhodné protilátky patří monoklonální protilátky 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 23-43, 89-76 a 89-79, popsané v Příkladu 2. Zvláště výhodné protilátky jsou monoklonální protilátky 89-76 a 24-31. Hybridomy 89-76 a 24-31 produkující protilátky 89-76 a 24-31 byly umístěny podle ustanovení Budapeštské  
15 smlouvy u ATCC (American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, Md., 2. září, 1994). Hybridom 89-76 byl uložen pod číslem HB 117 13 a hybridom 24-31 byl uložen pod číslem HB 117 12. Protilátky 24-31 a 89-76 jsou protilátkami izotopu IgG<sub>1</sub>.

20 V jiném provedení vynálezu se monoklonální protilátka proti lidskému proteinu gp39 používána v kombinaci podle vynálezu váže na epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou vybranou ze skupiny sestávající z monoklonálních protilátek 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 23-43, 89-76 a 89-79. Výhodněji se monoklonální protilátka proti lidskému proteinu gp39 váže na epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou 24-31 nebo monoklonální protilátkou 89-76. Schopnost monoklonálních protilátek vázat se na epitop rozpoznávaný některou z dříve zmíněných protilátek může být stanovena standardními kompetitivními vazebnými testy. Například  
25 protilátka, která se váže na epitop rozpoznávaný rovněž monoklonální protilátkou 24-31, bude se značenou protilátkou 24-31 kompetovat o vazbu na povrch aktivovaných t-buněk, zatímco protilátka, která se váže na epitop odlišný od epitopu rozpoznávaného monoklonální protilátkou 24-31, se značenou protilátkou 24-31 kompetovat nebude.

30

#### B. Rozpustné ligandy proteinu gp39

Mezi jiné antagonisty proteinu gp39, které mohou být podávány za účelem navození tolerance T-buněk, náleží rozpustné formy ligandu pro protein gp39. Monovalentní rozpustný ligand  
35 proteinu gp39, jako například rozpustný receptor CD40, se může vázat na protein gp39 a tudíž může inhibovat interakci mezi proteinem gp39 a receptorem CD40 na povrchu B-buněk. Termín „rozpustný“ označuje skutečnost, že ligand není trvale asociován s plazmatickou membránou. Rozpustný ligand pro protein gp39 může být syntetizován chemickou cestou nebo výhodně pomocí rekombinantních DNA technik, například tak, že je exprimována pouze extracelulární doména příslušného ligandu (zcela chybí transmembránová a cytoplazmatická doména).  
40 Upřednostňovaným rozpustným ligandem proteinu gp39 je rozpustný receptor CD40. Jinou možností je použití fúzního proteinu jako rozpustného ligandu pro protein gp39. Takový fúzní protein tvoří alespoň část ligandu proteinu gp39 připojená k jiné molekule. Například receptor CD40 může být exprimován jako fúzní protein s imunoglobulinem (například fúzní protein složený z aminokyselinových zbytků extracelulární domény části CD40 a na tuto strukturu jsou připojeny aminokyselinové zbytky úseku, který odpovídá patentové, CH2 a CH oblastem těžkého imunoglobulinového řetězce, například Cg1. Vzniklý fúzní protein označujeme CD40Ig  
45 (viz. například Linsley a další (1991) J. Exp. Med. 1783 : 721 až 730; Capon a další (1989) Nature 337, 525 až 531; a Capon US 5 116 964). Fúzní protein může být syntetizován chemickou cestou nebo výhodněji za použití rekombinantních DNA technik využívajících cDNA molekuly  
50 CD40 (Stamenkovic a další, EMBO J., 8 : 1 403 až 1 410 (1989)).

## II. Buňky používané k navození antigen–specifické tolerance

Tento vynález je, alespoň z části, založen na objevu, že za přítomnosti antagonisty proteinu gp39 má prezentace alloantigenů T–buňkám prostřednictvím allogenních buněk za následek navození tolerance T–buněk vůči alloantigenům. Mezi buňky schopné navodit tímto mechanismem toleranci T–buněk náleží ty buňky, které prezentují antigen a aktivují T–buňky prostřednictvím interakce s proteinem gp39 (tzn., že interakce mezi proteinem gp39 na povrchu T–buněk a ligandem proteinu gp39 na povrchu prezentujících buněk je nepostradatelná pro přenos signálů nezbytných k aktivaci T–buňky). Inhibice interakce mezi ligandem na povrchu allogenní nebo xenogenní buňky a proteinem gp39 na povrchu T–buněk recipienta zamezí aktivaci T–buňky alloantigenem nebo xenoantigenem a navodí spíše toleranci T–buňky vůči příslušným antigenům.

Při podání kombinace podle vynálezu je tudíž recipientovi podána allogenní nebo xenogenní buňka. Tato allogenní nebo xenogenní buňka je schopna prezentovat recipientovým T–buňkám určitý antigen. Jako příklad těchto buněk může sloužit B–lymfocyt, „profesionální“ antigen prezentující buňka (například monocyt, dendritická buňka, Langerhansova buňka) nebo i jiná buňka prezentující antigen buňkám imunitního systému (keratinocyt, endoteliální buňka, astrocyt, fibroblast, oligodendrocyt). Dále je výhodné, aby allogenní nebo xenogenní buňka měla sníženou schopnost stimulace kostimulačního signálu v T–buňkách recipienta. Allogenní nebo xenogenní buňka může například úplně postrádat kostimulační molekuly, jako například proteiny rodiny B7 (například B7–1 a B7–2), nebo může tyto molekuly exprimovat na svém povrchu jen v omezeném počtu. Expresí kostimulačních molekul na povrchu potencionálních allogenních nebo xenogenních buněk používaných v kombinaci podle vynálezu může být stanovena pomocí standardních technik, například průtokovou cytometrií za použití protilátek proti těmto kostimulačním molekulám.

K výhodným allogenním nebo xenogenním buňkám používaným k navození tolerance T–buňky patří lymfoidní buňky, například lymfocyty periferního krevního oběhu nebo slezinné buňky. K výhodným lymfoidním buňkám používaným k navození tolerance T–buňky patří B–buňky. B–buňky mohou být ze směsi obsahující různé populace buněk (například jiných typů buněk přítomných v periferním krevním oběhu nebo slezině) purifikovány použitím standardních separačních technik. Například adhezí buňky mohou být od populace difúzních buněk odstraněny kultivační slezinných buněk v kultivačních plastických miskách. T–buňky mohou být ze směsi obsahující různé populace buněk odstraněny použitím protilátky proti T–buňce (například protilátka proti Thy 1.1 a/nebo protilátka proti Thy 1.2) spolu s komplementem. V jednom provedení vynálezu jsou jako antigen prezentující buňky použity klidové lymfoidní buňky, výhodněji pak klidové B–buňky. Klidové lymfoidní buňky, jako například klidové B–buňky, mohou být izolovány pomocí v současnosti známých způsobů, například pomocí způsobů využívajících malou velikost a vysokou hustotu těchto buněk. Klidové lymfoidní buňky mohou být například izolovány použitím protiproudového centrifugačního propírání (counterflow centrifugal elutriation) popsaném v příkladu 1. Při použití protiproudového centrifugačního propírání může být populace malých klidových lymfoidních buněk zbavená buněk schopných aktivovat imunitní odpověď T–buňky získaná sběrem frakcí při průtoku 14 až 19 ml/min., výhodněji pak sběrem frakcí při průtoku 19 ml/min. (při 3,200 ot/min). Jinou možností izolace malých klidových lymfocytů (například B–buněk) je použití centrifugace v diskontinuálním hustotním gradientu. Jako gradient je možné použít například komerční preparáty Ficoll nebo Percoll a po centrifugaci získáme vrstvu obsahující malé klidové lymfocyty. Malé klidové lymfocyty mohou být rovněž od aktivovaných B–buněk rozlišeny na základě přítomnosti/nepřítomnosti kostimulačních molekul, jako například B7–1 a/nebo B7–2, jenž jsou exprimovány pouze na povrchu aktivovaných B–buněk, a to použitím standardních technik (například imunofluorescence).

Úkolem allogenních nebo xenogenních buněk podávaných recipientovi je, alespoň z části, prezentace donorových antigenů T–buňkám recipienta. Tyto buňky tudíž na svém povrchu exprimují antigeny přítomné rovněž na donorové tkáni nebo orgánu. Této skutečnosti je obvykle

dosaženo použitím allogenních nebo xenogenních buněk získaných z donorova tkáňového nebo orgánového štěpu. V kombinacích podle vynálezu mohou být použity například lymfoidní buňky periferního krevního oběhu, B-buňky nebo slezinné buňky izolované z donorovy tkáně nebo orgánu. Jinou možností je získání allogenních nebo xenogenních buněk ze zdroje, který není donorem tkáně nebo orgánu, jestliže ovšem tyto buňky mají s tkání nebo orgánem donora společné antigenní determinanty. Mohou být například použity allogenní nebo xenogenní buňky, které exprimují (většinu nebo všechny) antigeny hlavního histokompatibilního komplexu shodné s odpovídajícími antigeny na donorově tkáni nebo orgánu. Jako zdroj allogenních nebo xenogenních buněk může tedy fungovat subjekt, který má stejný MHC haplotyp jako donor tkáně nebo orgánu (například blízký příbuzný donora štěpu).

### III. Podávání buněk a antagonistů proteinu gp39

Podle vynálezu může být tolerance T-buněk vůči orgánu nebo tkáňovému štěpu vyvolána, když se příjemci transplantátu podá antagonistu proteinu gp39 společně s allogenní nebo xenogenní buňkou, která exprimuje dárčovy antigeny a interaguje s T-buňkami příjemce přes protein gp39. Ve výhodném provedení vynálezu jsou allogenní či xenogenní buňka a antagonistu proteinu gp39 podány příjemci současně. Eventuelně může být antagonistu proteinu gp39 podán před allogenními či xenogenními buňkami, například je-li antagonistou protilátka s dlouhým poločasem života. V jiném výhodném provedení vynálezu jsou antagonistu a allogenní či xenogenní buňky podány příjemci před transplantací orgánu nebo tkáně tomuto příjemci (tzn. že je příjemce předem vystaven působení antagonisty a buněk). Podání allogenních či xenogenních buněk a antagonisty může být například provedeno několik dní (například pět až osm dní) před transplantací tkáně nebo orgánu.

Bylo zjištěno, že podání jediné dávky allogenních buněk (v kombinaci s antagonistou) je dostačující pro vyvolání tolerance T-buněk k tkáni či orgánu dárce (viz příklad 1). Počet podaných buněk se může měnit v závislosti na typu použitých buněk, na typu tkáňového nebo orgánového štěpu, hmotnosti příjemce, na celkovém stavu příjemce a dalších odborníkům známých proměnných. Vhodný počet buněk použitý v kombinaci podle vynálezu může být určen odborníkem pomocí konvenčních způsobů (například tak, jak je to popsáno v příkladě 1). Buňky jsou podávány v takové formě a takovým způsobem, které jsou vhodné pro indukci tolerance T-buněk v příjemci. Mohou být podávány ve fyziologicky akceptovatelném roztoku jako je například pufrovaný fyziologický roztok nebo podobné médium. Výhodným způsobem podávání buněk je intravenózní aplikace.

Pro vyvolání tolerance T-buněk podle vynálezu je subjektu podáván antagonistu v biologicky kompatibilní formě vhodné pro farmaceutické podávání in vivo. „Biologicky kompatibilní formou vhodnou pro podávání in vivo“ se míní forma antagonisty, který má být podáván, jejíž terapeutické účinky převažují nad účinky toxickými. Termín subjekt zahrnuje živé organismy, ve kterých může být vyvolána imunitní odpověď, například savce. Příklady subjektů zahrnují lidi, psy, kočky, myši, potkany a jejich transgenní druhy. Antagonistu proteinu gp39 může být podáván v jakékoliv farmakologické formě, případně s farmaceuticky akceptovatelným nosičem. Podávání terapeuticky aktivního množství antagonisty je definováno jako množství, které je efektivní v takovém dávkování a v takových časových periodách, které jsou nutné k dosažení požadovaného výsledku (například tolerance T-buněk). Terapeutické množství antagonisty proteinu gp39 může kolísat například v závislosti na faktorech jako jsou nemoc, věk, pohlaví a hmotnost daného individua a také na schopnosti antagonisty vyvolat požadovanou odpověď v tomto individuu. Dávkovací režim může být nastaven tak, aby byla vybavena optimální terapeutická odpověď. Například může být denně podáváno více rozdělených dávek nebo daná dávka úměrně zmenšena podle toho, jak to vyžaduje terapeutická situace. Efektivní léčebný režim může zahrnovat počáteční podání protilátky před transplantací tkáně nebo orgánu (například pět až osm dní před transplantací), následované dalším podáváním protilátky (například každý další den) po dobu několika týdnů (například dvou až sedmi týdnů) po transplantaci (viz příklad 1, kde je použita protilátka proti proteinu gp39).

Aktivní látka (například antagonist, kterým může být protilátka) může být podávána různým způsobem, v závislosti na situaci – například injekcí (subkutánní, intravenózní atd.), perorálně, rektálně, dále může být inhalována nebo aplikována transdermálně. V závislosti na způsobu podávání může být aktivní látka potažena materiálem, který ji chrání před působením enzymů, kyselin a dalších přirozených vlivů, které mohou inaktivovat aktivní látku. Výhodným způsobem podání je intravenózní injekce.

Pokud je antagonist proteinu gp39 podáván jinak než parenterálně, může být nutné povlečení antagonisty materiálem, či spolu s antagonistou podat i materiál, který chrání jeho inaktivaci. Antagonista může být individuálně podán například ve vhodném nosiči či rozpouštědle nebo mohou být spolu s antagonistou podávány inhibitory enzymů či příslušný nosič jakým jsou například liposomy. Mezi farmaceuticky akceptovatelná rozpouštědla patří fyziologický roztok a pufrované vodné roztoky. Mezi inhibitory enzymů patří inhibitor pankreatického trypsinu, di-izopropyl-fluorofosfát (DEP) a trasyol. Liposomy se rozumí emulze voda-olej-voda stejně jako konvenční liposomy (Strejan a ost., (1984) J. Neuroimmunol 7 : 27).

Aktivní látka může být také podávána parenterálně nebo intraperitoneálně. Disperze mohou být připraveny také v glycerolu, kapalných polyethylenglykolech, jejich směsích, a v olejích. Za běžných podmínek uskladnění a použití mohou tyto preparáty obsahovat ochranné prostředky k zabránění růstu mikroorganismů.

Mezi farmaceutické směsi vhodné pro injekční použití patří sterilní vodné roztoky ( u látek rozpustných ve vodě) či disperze a sterilní sypké směsi pro rychlou přípravu sterilního injekčního roztoku nebo disperze. V každém případě musí být směs sterilní a musí být tekutá do té míry, aby byla umožněna snadná injekční aplikace. Musí být stabilní za podmínek výroby a uskladnění a musí být chráněna před kontaminací mikroorganismy jako jsou bakterie či houby. Nosičem může být rozpouštědlo nebo disperzní médium obsahující například vodu, ethanol, polyalkoholy (například glycerol, propylenglykol a kapalný polyethylenglykol apod.) a jejich vhodné směsi. Vhodná viskozita může být udržována například použitím emulgátorů jako je lecitin, zachováním požadované velikosti částic v případě disperze a použitím surfaktantů. Ochrana před působením mikroorganismů může být zajištěna použitím různých antibakteriálních a fungicidních činidel, například parabens, chlorbutanolu, fenolu, kyseliny askorbové, thimerosalu apod. V mnoha případech bude výhodnější, bude-li směs obsahovat izotonická činidla jako jsou například cukry, polyalkoholy jako manitol, sorbitol a nebo chlorid sodný. Prodloužení absorpce injekční směsi může být dosaženo přidáním takových činidel, která zpožďují absorpci, například monostearanu hlinitého a želatiny.

Sterilní injekční roztoky mohou být připravovány inkorporací požadovaného množství aktivní látky (například antagonisty proteinu gp39) do vhodného rozpouštědla, spolu s kombinací výše zmíněných ingrediencí. Sterilní injekční roztoky mohou být dále upravovány filtrační sterilizací. Obecně jsou disperze připravovány inkorporací aktivní látky do sterilního pojidla, které obsahuje výše jmenované základní disperzní médium a další požadované složky. V případě sterilních sypkých směsí určených pro přípravu sterilních injekčních roztoků jsou výhodnými způsoby přípravy vakuové sušení a sušení za zmrazeného stavu. Tyto způsoby poskytují sypkou směs, která obsahuje aktivní danou složku (například antagonistu). Po přidání sterilně filtrovaného roztoku může být tato sypká směs obohacena i o libovolnou další požadovanou ingredienci.

Pokud je aktivní sloučenina patřičně chráněna, jak je popsáno výše, může být protein podáván perorálně, například s inertním rozpouštědlem nebo s požitelným nosičem. „Farmaceuticky akceptovatelný nosič“ podle vynálezu zahrnuje všechna rozpouštědla, disperzní média, povlaky, antibakteriální a fungicidní činidla, izotonická a absorpci prodlužující činidla apod. Použití těchto médií a činidel pro farmaceuticky aktivní substance je známo ze stavu techniky. Je zvažováno použití konvenčních médií a činidel v terapeutických směsích. Výjimku tvoří taková média

a činidla, která jsou nekompatibilní s aktivní sloučeninou. Dodatečně mohou být aktivní sloučeniny inkorporovány do směsí.

5 Zvláště výhodné je směsi pro mimostřevní aplikaci připravit v jednotkové dávkovací formě z důvodů snadného podávání a jednotnosti dávkování. Jednotková dávkovací forma podle vynálezu odpovídá fyzicky diskretním jednotkám, které jsou vhodné jako jednotko dávkování pro léčbu savců. Každá jednotka obsahuje předem určené množství aktivní látky ve spojení s potřebným farmaceutickým nosičem. Toto množství aktivní látky je vypočítané tak, aby byl vyvolán požadovaný terapeutický efekt. Údaje pro jednotkové dávkovací formy vynálezu jsou přímo závislé (a) na specifických charakteristikách aktivní látky a na specifickém terapeutickém efektu, který má být dosažen, a (b) na vymezeních daných technikou přípravy takových sloučenin jako je aktivní látka používaná pro léčení senzitivity.

15 Donorova tkáň nebo orgán jsou konvenčními způsoby transplantovány příjemci transplantátu současně s popsáním tolerizačním režimem nebo po něm.

## VI. Použití kombinací podle vynálezu

20 Kombinace podle vynálezu jsou aplikovatelné při různých transplantacích tkání a orgánů. Mohou být používány k navození tolerance T-buněk příjemce orgánového nebo tkáňového štěpu, pocházejícího z následujících tkání a orgánů : Langerhansovy ostrůvky slinivky břišní, játra, ledviny, srdce, plíce, kůže svaly, nervová tkáň, žaludek a střeva. Kombinace podle vynálezu tedy mohou být používány při léčení takových onemocnění či stavů, které vyžadují transplantaci tkáně nebo orgánu (například transplantace jater při hypercholesterolemii, transplantace svalových 25 buněk při svalové dystrofii, transplantace nervové tkáně při Huntingtonově či Parkinsonově chorobě atd.). Ve výhodném provedení jsou transplantovanou tkání pankreatické ostrůvky. Vynález tedy popisuje kombinaci pro léčení cukrovky pomocí transplantace buněk pankreatických ostrůvků. Kombinace podle vynálezu tedy zahrnuje:

- 30 1) allogenní či xenogenní buňky, které exprimují donorovy antigeny,
- 2) antagonistu molekuly exprimované na povrchu T-buněk recipienta, která zprostředkovává helperovu efektorovou funkci závislou na kontaktu, příkladem takového antagonisty je antagonistu proteinu gp39 (například protilátka proti proteinu gp39) a
- 35 3) donorové buňky pankreatických ostrůvků.

40 Allogenní či xenogenní buňky a antagonistu jsou, pokud možno, recipientovi podávány před podáváním pankreatických ostrůvků.

Vynález je dále ilustrován následujícími příklady, které však vynález neomezuje.

45 **Příklad 1:** Vyvolání tolerance recipienta vůči štěpům z pankreatických ostrůvků působením allogenních buněk a protilátky proti proteinu gp39

Současné allotransplantační studie závisí na celkové imunosupresi, která nespécificky potlačuje imunitní efektorové funkce. Imunosupresivní léky však mohou vyvolávat podstatné vedlejší efekty. Navíc bylo prokázáno, že imunosuprese je nevhodná při allotransplantaci 50 Langerhansových ostrůvků, používané při léčení cukrovky (viz například Robertson, R. P. (1992) N. Engl. J. Med. 327, 1861). Terapie pomocí protilátek proti T-buňkám mohou umožňovat úspěšnou transplantaci allogenních štěpů u hlodavců, ale tento přístup má stejně za následek celkovou imunosupresi (Carpenter, C. B. (1990) N. Engl. J. Med. 322, 1224, Roark, J. H. a ost. (1992) Transplantation 54, 1098, Kahan, B. D. (1992) Curr. Opin. Immunol. 4, 553). V tomto 55 příkladě byla v recipientovi transplantátu indukována tolerance vůči alloštěpům ovlivněním

prezentace alloantigenu T-buňkám. V důsledku tohoto ovlivnění je zabráněno jejich aktivaci. Přežívání alloštěpů z pankreatických ostrůvků v myších, u kterých byla chemicky indukována cukrovka C57BL/6 (H-2b) bylo ověřováno použitím následujících způsobů:

#### 5 Indukce cukrovky

Cukrovka u myší C57Bl/6J (H-2b) samčího pohlaví byla indukována podáním streptozotocinu (140 mg/kg). Trvání cukrovky bylo ověřováno měřením plazmatické koncentrace glukózy, přičemž pro cukrovku typické byly požadovány hodnoty od 400 mg/100 ml. Měření byla  
10 prováděna třikrát během jednoho týdne.

#### Frakcionace allogenních buněk sleziny

Reakci štěpu proti hostiteli bylo zabráněno tím, že dárci allogenních buněk, určených pro  
15 předběžné ošetření příjemců štěpů, byli získáni z (C57 x BALB/c) (H-2b/d) F1 hybridních zvířat. Malé lymfoidní buňky byly izolovány tak, že suspenze slezinných buněk staré alespoň 8 týdnů (C57 x BALB/c) F1 myší samčího pohlaví byly zbaveny erytrocytů a pak frakcionovány podle velikosti propíráním (elutriation), jak popisuje Tony, H. P. a ost. (1985) J. Exp. Med. 161, 223, a Gosselin E. J. a ost. (1988) J. Immunol. 140, 1 408. Malé lymfocyty byly izolovány pomocí  
20 protiproudového centrifugačního propírání například za použití modelu centrifugy J-6B (Beckman Instruments, Palo Alto CA). Přibližně 1 až 5 x 10<sup>8</sup> buněk v 8 ml kultivačního média nebo vyváženého solného roztoku s 1,5 % fetálním hovězím sérem je vystaveno působení deoxyribonukleasy, zavedeno do propírací komůrky s počáteční rychlostí protiproudového toku 13, 5 ml/min a roztočeny konstantní rychlostí 3, 200 rpm při teplotě 4 °C. Průtoková  
25 rychlost frakce malých buněk je typicky 14 až 19 ml/min. Tato frakce je jen velmi málo kontaminována velkými buňkami. Konkrétní rychlost toku může záviset na médiu, ve kterém jsou buňky suspendovány. V experimentech, které jsou popsány zde, byla frakce malých buněk odebírána při průtokové rychlosti 19 ml/min (3, 200 rpm). Veškeré doplňkové buněčné frakce sloužící k radiační resistenci (3 000 rad) byly vyčerpány. To bylo ověřeno buněčnými liniemi  
30 T-lymfocytů specifickými pro králičí IgG a H<sub>2</sub>d (CDC35) nebo allokreativními s H<sub>2</sub>b (D10 . G4). Před injikováním do ocasní žíly příjemce alloštěpu byly malé buňky a nefrakcionované buňky dvakrát promyty v médiu, které neobsahovalo sérum. Bylo používáno přibližně 40–100 x 10<sup>6</sup> (C57 x BALB/c) F1 (H-2b/d) nefrakcionovaných buněk nebo 40–100 x 10<sup>6</sup> (C57 x BALB/c) F1 (H-2b/d) propraných malých slezinných buněk.

#### 35 Předběžné ošetření recipientů štěpu

Příjemci štěpu byli předem ošetřeni buď nefrakcionovanými (C57 x BALB/c) F1 (H-2b/d) allogenními slezinnými buňkami, propranými („frakce 19“) malými slezinnými buňkami, které  
40 byly zbaveny APC aktivity (izolovanými tak, jak je popsáno výše), a monoklonální protilátkou proti proteinu gp39 (MR1, viz příklad 2, experiment 3), nebo kombinací allogenních buněk a protilátky proti proteinu gp39 . 19. Frakce buněk byla testována ve dvou odlišných rozsazích dávek. Při nízkých dávkách 40 až 44 x 10<sup>6</sup> buněk a při vysokých dávkách 77 až 88 x 10<sup>6</sup> buněk. Kontrolní zvířata nedostala ani allogenní buňky, ani protilátky. Allogenní buňky byly příjemci  
45 štěpu injikovány do ocasní žíly pět až osm dní před transplantací alloštěpů z pankreatických ostrůvků. Protilátka MR1 byla myším podávána dvakrát týdně v dávkách 250 µg/myš. Počátek imunizace byl sedm dní před transplantací a imunizace dále pokračovala po dobu 2 až sedmi týdnů nebo dokud nebyl štěp odmítnut. První dávka protilátky byla myším injikována tentýž den jako první dávka allogenních slezinných buněk.

#### 50 Transplantace allogenních štěpů z pankreatických ostrůvků

Allogenní pankreatické ostrůvky z myší BALB/c (H-2d) byly izolovány modifikovaným způsobem podle práce Gottlieb P. A. další (1990), Diabetes 39, 643, využívajícím částečného  
55 štěpení pomocí kolagenasy. Do subrenálních kapsulí recipientních myší C57Bl/6J (H-2d) byly

okamžitě po izolaci implantovány ostrůvky v množství 30 ostrůvků na jeden gram hmotnosti recipienta. Přežití ostrůvků bylo definováno schopností udržet koncentraci glukózy v plazmě pod 200 mg/ml.

## 5 Výsledky

V první sadě experimentů byly jednotlivé recipientní myši před vlastní implantací allogenních štěpů ošetřeny buď allogenními nebo slezinnými buňkami, nebo protilátkou proti proteinu gp39. Jak je patrné z obrázku 1, u myší, které nebyly předem ošetřeny slezinnými buňkami, došlo odhojení všech allogenních štěpů do 13 dní po transplantaci. Poměrně výrazné odhojování bylo možno pozorovat rovněž u zvířat, které byly ošetřeny pouze nefrakcionovanými slezinnými buňkami s normální APC aktivitou ( $6 \pm 3$  dní, rozsah 4 až 12 dní  $N = 7$ ), nebo malými dávkami ( $40$  až  $44 \times 10^6$ ) buněk z 19. Frakce slezinných buněk bez APC aktivity ( $7 \pm 3$  dní, rozsah 3 až 14 dní,  $N = 16$ ). Naproti tomu injekce velkých dávek ( $75$  až  $88 \times 10^6$ ) těchto buněk z 19. Frakce malých slezinných buněk bez APC aktivity prodloužily dobu přežití alloštěpů na  $19 \pm 10$  dní při rozsah 7 až 40 dní,  $N = 16$ . Tento vliv na dobu přežití štěpů se ukázal jako statisticky významný ( $F_3, 58 = 17, 3, p < 0, 001$ ) ve srovnání se skupinami, které nebyly předem ošetřeny, nebo byly ošetřeny celým spektrem slezinných buněk nebo malými dávkami frakcionovaných splenocytů. Nicméně ani u takto ošetřených myší nelze mluvit o trvalém přijmutí štěpu. Z delšího, nicméně časově omezeného přežití štěpů allogenních pankreatických ostrůvků v příjemcích ošetřených 19. Frakcí malých slezinných buněk bez APC aktivity lze usuzovat, že tyto buňky sami o sobě nemohou zajistit přežití alloštěpů. Další skupina recipientů štěpů byla ošetřena injekcí  $77$  až  $88 \times 10^6$  buněk z 20. Frakce. Tato frakce je z převážné části rovněž tvořena malými lymfocyty, ale od frakce 19 se liší tím, že obsahuje měřitelnou APC aktivitu. Všichni recipienti (6 myší) odhojili transplantované štěpy okamžitě (v průměru za 8,5 dne, rozsah 6 až 12 dní). Další skupina recipientů byla před transplantací štěpů ošetřena pouze monoklonální protilátkou MR1 proti proteinu gp39. Obrázek 1 znázorňuje jak bylo těmito recipienty v průběhu 15 dní odmítnuto 7 z 11 implantovaných alloštěpů. Zbývající 4 pokusná zvířata si zachovala funkční štěpy ještě v době ukončení pokusu po 48 dnech. Z výsledků vyplývá, že podání samotné monoklonální protilátky MR1 proti proteinu gp39 recipientnímu organismu může prodloužit dobu přežití alloštěpů pankreatických ostrůvků (průměr 20 až 19 dní, rozsah 9 až nekonečno,  $N = 5$ ). Míra prodloužení byla statisticky podobná prodloužení jež bylo dosaženo po podání vyšších dávek slezinných buněk z 19. frakce, a byla rovněž výrazně delší než prodloužení dosažené v dalších třech pokusných skupinách ( $p < 0,5$ ).

Ve výše popsané sérii experimentů bylo dokázáno, že podání vysoké dávky slezinných buněk bez APC aktivity (19. frakce) nebo monoklonální protilátky proti proteinu gp39 může prodloužit dobu přežití alloštěpů pankreatických ostrůvků ve srovnání s postupem, kdy transplantaci nepředchází žádná příprava. Nicméně ukazuje se, že žádný způsob přípravy, při kterém se samostatně podává pouze jedna účinná složka není dostatečně účinný při indukcí dlouhodobé tolerance k alloštěpům pankreatických ostrůvků. Výsledky znázorňuje obrázek 2, kde každá křivka znázorňuje data platná pro jednu z pokusných myší. Prázdné symboly platí pro myši, u kterých došlo ke spontánnímu odmítnutí štěpů, zatímco vyplněné symboly znázorňují zvířata, jejichž pankreatické alloštěpy byly funkční v době ukončení experimentu. Obrázek 2 (část B) znázorňuje, že neomezené doby přežití štěpů bylo dosaženo u zvířat 7 týdnů ošetřovaných monoklonální protilátkou proti proteinu gp39 a jednou injekcí slezinných buněk bez APC aktivity z frakce 19 ( $N = 6$ ). Zkrácení doby, po kterou byly podávány monoklonální protilátky proti proteinu gp39, zmenšilo poněkud pozitivní účinek na přijmutí štěpů, nicméně tento účinek byl stále patrný. Neomezené doby přijmutí štěpů bylo dosaženo u šesti z osmi pokusných zvířat, u kterých byla doba podávání monoklonální protilátky proti proteinu gp39 zkrácena ze sedmi na dva týdny v kombinaci s podáním 19. frakce slezinných buněk (obrázek 2, část A). Neomezené životnosti alloštěpů bylo dosaženo rovněž u příjemců ošetřovaných monoklonální protilátkou proti proteinu gp39 po dobu 2 nebo 7 týdnů spolu s jednou injekcí nefrakcionovaných allogenních slezinných buněk.

55

Funkčnost štěpů pankreatických ostrůvků a absence jakékoli přirozené sekrece insulinu pankreatickými ostrůvků, které by přežily ošetření streptozotocinem, byla ověřena tak, že byly zvířatům odebrány ledviny, ve kterých byly umístěny subrenální implantáty. Ve všech případech vedla jednostranná nefrektomie k hyperglykemii ( $> 300 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ) v průběhu 3 dnů.

5

Alloštěpy pankreatických ostrůvků a nativní slinivky všech zvířat byly histologicky prozkoumány poté co došlo k odmítnutí štěpu nebo po ukončení experimentu. Histologické řezy štěpů z pankreatických ostrůvků z ledvin recipientních zvířat, která byla ošetřena podáním frakcionovaných allogenních malých lymfocytů a kontinuálním (7 týdenním) podáváním monoklonální protilátky MR1, vykazovaly velké množství intaktních pankreatických ostrůvků viditelných pod povrchem renální kapsule. Tyto ostrůvky byly prosté jakékoli infiltrace monocytů a obsahovaly granulované insulin a glukagon pozitivní buňky. Naproti tomu histologické řezy štěpů pankreatických ostrůvků z ledvin recipientů, kteří byli ošetřeni pouze podáním monoklonální protilátky proti proteinu gp39 vykazovaly charakteristické rysy intenzivního zánětu způsobeného monocytů, který byl doprovázen destrukcí buněk štěpu. Slinivky všech pokusných zvířat vykazovaly morfologické rysy charakteristické pro streptozocinem indukovaný diabetes.

20 Příklad 2: Produkce a charakterizace protilátek proti proteinu gp39.

Pokus 1: Protilátky proti proteinu gp39

K indukci antigenně-specifické tolerance T-buněk v lidském příjemci je výhodné použít protilátky proti lidskému proteinu gp39. Myši monoklonální protilátky proti lidskému proteinu gp39 byly připraveny podle následujících postupů. Myši Balb/c byly imunizovány rozpustným fúzním proteinem gp39, gp39-CD8 v kompletním Freundově adjuvans (CFA). Po 6 týdnech byly myši exponovány injekcí rozpustného proteinu gp39-CD8 v neúplném Freundově adjuvans (IFA). Rozpustný protein gp39-CD8 byl podán v rozpuštěné formě 4 týdny po sekundární imunizaci. Dva týdny na to byla myšim podána posilovací dávka (booster) tvořená aktivovanými lidskými lymfocyty z periferního krevního oběhu. Dva týdny po této dávce následovala závěrečná posilovací dávka tvořená rozpustným gp39-CD8. Slezinné buňky byly 4 dny po poslední imunizaci fúzovány s buňkami NS1 podle standardního postupu.

35 Několikanásobným screeningem byly vybrány klony buněk produkující monoklonální protilátky proti lidskému proteinu gp39. Úvodní vyhledávací krok byl proveden na titračních deskách potažených proteinem gp39-CD8. Pozitivní klony byly testovány vazbou na kontrolní CD8 fúzní protein, CD72-CD8. Klony, které byly schopny se na desce vázat na protein CD72-CD8 byly z dalšího postupu vyloučeny. Zbývající klony byly poté testovány průtokovou cytometrií s klidovými a 6 hodin aktivovanými lidskými lymfocyty z periferního krevního oběhu (PBL-peripheral blood lymphocytes). Hybridomy, které barvily aktivované, ale ne klidové PBL, byly považovány za pozitivní. V posledním kroku byly zbývající klony testovány na jejich schopnost blokovat vazbu CD40Ig na imobilizovaný protein gp39.

45 Přibližně 300 klonů bylo v počáteční fázi testováno proti gp39-CD8 ve vazebných testech na mikrotitračních deskách. Z těch bylo vybráno 30 klonů, které byly schopny vázat se na imobilizovaný protein gp39 a přitom se nevázaly na CD8. Tyto klony byly poté testovány na svoji schopnost vázat se na protein gp39 na povrch aktivovaných lidských PBL. Přibližně 15 klonů se bylo schopno vázat na molekuly na povrchu aktivovaných PBL. Specifita klonů byla dále potvrzena stanovením schopnosti blokovat vazbu protilátky CD40Ig na titrační desku potaženou proteinem gp39. Tři z deseti klonů v tomto testu dokázaly blokovat vazbu protilátky CD40Ig. Těmito klony byly klony 3E4, 2H5 a 2H8. Tyto klony jsou výhodné pro použití v kombinaci podle vynálezu. Klony, které byly pozitivně vyselektovány při vazbě na aktivované, avšak nerozpoznávaly klidové PBL, byly dále testovány na schopnost vazby na klon

50

aktivovaných krysích T-lymfocytů POMC8. Klon 2H8 byl schopen reakce s touto buněčnou linií krysích T-lymfocytů.

Pokus 2: Protilátky proti lidskému proteinu gp39

5

Podobné imunizační schéma jako v pokusu 1 bylo použito k přípravě dalších protilátek proti lidskému proteinu gp39. Jedna myš Balb/c byla imunizována rozpustným proteinem gp39-CD8 v CFA, po čtyřech týdnech následovala expozice 6 hodin aktivovanými lymfocyty z periferního krevního oběhu. Čtyři dny před fúzí byla myšim podána obnovovací dávka obsahující rozpustný protein gp39-CD8. Poté byly myši usmrceny a byla provedena fúze jejich slezinných buněk s buňkami NS-1. Fúze byla provedena podle standardního protokolu. Screening hybridomických klonů byl prováděn pomocí průtokové cytometrie. Byly vybrány klony barvící 6 hodin aktivované, nikoli však klidové PBL. Pro další analýzu bylo vybráno 6 klonů 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 a 89-79.

15

Specifita vybraných protilátek byla ověřena několika testy. Nejprve bylo průtokovou cytometrií dokázáno, že všech šest monoklonálních protilátek obarvuje aktivované avšak nikoli klidové T buňky z periferního krevního oběhu (viz obrázek 3B a 3C, který znázorňuje barvení aktivovaných T-lymfocytů protilátkami klonů 4D9-8, respektive 4D-9). Expres molekuly, která je rozeznávána každou ze šesti monoklonálních protilátek je detekovatelná již 4 hodiny po aktivaci. Maximálních hladin dosáhne exprese této molekuly mezi 6 až 8 hodinou po aktivaci. Po 24 hodinách od aktivačního signálu již nelze tuto molekulu detekovat. Všech šest monoklonálních protilátek rozeznává molekulu na povrchu aktivovaných lymfocytů CD3<sup>+</sup>, převážně fenotypu CD4<sup>+</sup>, ale rovněž jistá část T-lymfocytů CD8<sup>+</sup> exprimuje tuto molekulu. Expres této rozpoznávané molekuly je inhibována v přítomnosti cyklosporinu A v kultivačním médiu tak, jako je inhibována i exprese proteinu gp39 (viz obrázek 4A a 4B znázorňující barvení T-lymfocytů, ošetřených cyklosporinem, pomocí protilátek produkovaných klonem 4D9-8 respektive 4D9-9). Kinetika a distribuce exprese této molekuly rozpoznávané těmito monoklonálními protilátkami je shodná s kinetikou a distribucí proteinu gp39, jak byla zjištěna pomocí fúzního proteinu obsahujícího lidskou CD40Ig. Navíc všech 6 monoklonálních protilátek dokáže zablokovat barvení proteinu gp39 pomocí CD40Ig (viz obrázek 5A a 5B, který znázorňuje inhibici barvení proteinu gp39 pomocí CD40Ig v přítomnosti 4D9-8 respektive 4D9-9). V ELISA testu rozeznalo všech 6 monoklonálních protilátek protein gp39-CD8, což je rozpustná fúzní forma proteinu gp39. Navíc všech šest monoklonálních protilátek dokázalo precipitovat molekulu o velikosti přibližně 36 kd z aktivovaných lidských PBL značených pomocí 35S-methioninu. Tato precipitovaná molekula je identická s molekulou, která byla precipitována fúzním lidským proteinem CD40Ig.

20

25

30

35

Funkční aktivita šesti vybraných monoklonálních protilátek ( 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 a 89-79) byla ověřena následujícím způsobem. Nejprve byla změřena schopnost monoklonálních protilátek inhibovat proliferaci purifikovaných lidských B-lymfocytů kultivovaných na médiu, které obsahovalo IL-4 a rozpustný protein gp39. Purifikované lidské B-lymfocyty byly kultivovány na médiu, které obsahovalo IL-4, rozpustný protein gp39 a dále pak buď obsahovalo, nebo neobsahovalo purifikované monoklonální protilátky nebo fúzní protein CD40Ig v koncentracích 0 až 12,5 µg/ml. Proliferace B-lymfocytů byla stanovena na základě inkorporace thymidinu po 3 dnech kultivace. Výsledky (viz obrázek 6) ukazují, že všech 6 monoklonálních protilátek inhibují proliferaci B-lymfocytů indukovanou proteinem gp39 a IL-4. V této inhibici byly nejúčinnější protilátky 89-76 a 24-31.

40

45

Dále byla stanovena schopnost monoklonálních protilátek inhibovat diferenciaci B-lymfocytů. Tato schopnost byla měřena na základě produkce Ig po indukci aktivovanými T-lymfocyty anti-CD-3 a interleukinem IL-2. Pozitivní selekcí pomocí FACS byly purifikovány IgD<sup>+</sup> lidské B-lymfocyty. Tyto lymfocyty byly poté kultivovány s aktivovanými lidskými T-lymfocyty anti-CD3 (ošetřenými mitomycinem C) a s IL-2 po dobu 6 dní přidavkem respektive bez přidavku purifikovaných monoklonálních protilátek proti proteinu gp39. Tyto protilátky byly

55

v médiu přítomny v koncentracích 0 až 10 µg/ml. Pomocí ELISA testu byla po 6 dnech vyhodnocena produkce IgM, IgG a IgA. Změřením produkce IgM, IgG a IgA bylo prokázáno, že všech šest monoklonálních protilátek je schopno inhibovat na T-lymfocytech závislou diferenciaci B-lymfocytů (viz tabulka 1).

5

Tabulka 1

mAb	µg/ml	IgM	Produkce imunoglobulinů	
			IgG	IgA
žádná	–	17 500	6 710	4 471
4D9–8	0,1	4 813	2 013	2 819
	1,0	4 394	2 558	1 519
	10,0	1 081	389	396
4D9–9	0,1	3 594	919	1 731
	1,0	2 659	1 233	1 606
	10,0	374	448	266
24–31	0,1	3 863	981	344
	1,0	1 287	314	165
	10,0	1 120	596	23
24–43	0,1	6 227	4 132	432
	1,0	3 193	2 130	192
	10,0	721	1 232	1 081
89–76	0,1	3 783	1 069	344
	1,0	2 180	352	171
	10,0	818	551	119
89–79	0,1	9 763	1 924	3 021
	1,0	2 314	460	156
	10,0	183	135	434

- 10 Účinek monoklonálních protilátek proti proteinu gp39 na odpověď T-lymfocytů byl stanoven tak, že byly tyto monoklonální protilátky přidány do standardní reakční směsi se smíšenou populací lymfocytů (MLR–mixed lymphocyte reaction). 300.000 lidských lymfocytů z periferního krevního oběhu (R= respondentní buňky) bylo kultivováno spolu se 100.000 ozářenými allogenními lymfocyty z periferního krevního oběhu (S = stimulační buňky)
- 15 v přítomnosti nebo v nepřítomnosti 10 µg/ml monoklonální protilátky proti proteinu gp39. Ke kulturám byl 4, 5 a 6 dne přidán <sup>3</sup>H–thymidin a po dalších 18 hodinách byly buňky odebrány. Všech 6 monoklonálních protilátek proti lidskému proteinu gp39 dokázalo inhibovat allospecifickou odpověď (viz obrázek 7, který znázorňuje inhibici allospecifické odpovědi, R a S byly inkubovány v přítomnosti protilátek 24–31 nebo 89–76, fúzní protein imunoglobulinu
- 20 CTLA–4 a monoklonální protilátka proti proteinu CD–28 byly použity jako pozitivní kontrola).

Dále byly provedeny kompetitivní vazebné testy. Těmito testy bylo stanoveno, zda-li jednotlivé monoklonální protilátky rozeznávají různé epitopy na povrchu lidského proteinu gp39. Aktivované lidské PBL byly nejprve blokovány každou ze šesti monoklonálních protilátek (25 µg/ml neznačené protilátky). Poté byly buňky promyty a obarveny 10 µg/ml protilátky značené biotinem. Značené protilátky byly detekovány konjugátem avidin–phytoerythrin (PE–Av). Pomocí FACS byla nakonec vyhodnocena barevná reakce. Výsledky viz tabulka 2.

25

Tabulka 2

<u>Blokující protilátka</u>	<u>Značená protilátka</u>					
	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
žádná	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	nej.	-	++++	++++	+++	+++
4D9-9	+++	nej.	+++	++++	+++	+++
24-31	+	+	nej.	+++	++	++
24-43	+	+	+++	nej.	++	+
89-76	+	+	+++	+++	nej.	+++
89-79	+	++	+++	+++	+++	nej.

- 5 Intenzita obarvení a procento pozitivních buněk je vyjádřeno symbolem + (++++ značí průměrnou intenzitu vyšší než 200, +++ vyšší než 125, ++ vyšší než 50, + vyšší než 25, - značí intenzitu shodnou s pozadím, nej. - nebylo stanoveno).

10 Všech šest monoklonálních protilátek blokovalo vazbu protilátky CD40Ig na aktivované lidské PBL. Nicméně údaje v tabulce 2 ukazují neschopnost některých protilátek blokovat vazbu jiných protilátek na aktivované lidské PBL, což lze vysvětlit tím, že rozeznávají vzdálené epitopy na povrchu lidského gp39.

15 Hybridomy 89-76 a 24-31 produkující protilátky 89-76 respektive 24-31 byly 2. září 1994 uloženy podle ustanovení Budapeštské smlouvy u Americké sbírky kultur (ATCC, Parklawn Drive, Rockville, Md). Hybridom 89-76 byl uložen pod číslem HB 11 713 a hybridom 24-31 byl uložen pod číslem HB 11 712.

#### 20 Pokus 3: Protilátky proti myšimu proteinu gp39

V jednom z provedení vynálezu je antagonistou proteinu gp39 monoklonální protilátka (MR1) proti myšimu proteinu gp39. Monoklonální protilátka MR1 byla připravena následujícím způsobem. Tento způsob může být rovněž použit k přípravě jiných protilátek proti proteinu gp39.

25 V průběhu 6 týdnů byly v týdenních intervalech imunizováni křečci intraperitoneální injekcí  $5 \times 10^6$  aktivovaných Th1 buněk (d1. 6). Buněčná fúze byla provedena v době, kdy byl titer séra proti myším Th1 lymfocytů vyšší než 1 : 10. 000. K fúzi pomocí polyethylenglykolu byly použity slezinné buňky imunizovaných křečků a buňky NS-1. Supernatant z jamek, které obsahovaly rostoucí hybridomy, byl testován průtokovou cytometrií proti klidovým a aktivovaným Th1 lymfocytům. Jeden hybridom, který produkoval monoklonální protilátku schopnou selektivně rozeznat aktivované Th1 lymfocyty byl dále testován a subklonován za vzniku protilátky MR1. Protilátka MR1 byla produkována v ascitických tekutinách a purifikována pomocí HPLC na iontoměřiči. Hybridom MR1 byl uložen v Americké sbírce kultur (ATCC) pod číslem HB 11 048.

35 Odborníci mohou rozeznat nebo určit, pouze pomocí rutinního experimentování mnoho dalších ekvivalentů specifických provedení vynálezu. Takovéto ekvivalenty jsou však pokryty následujícími nároky.

40

## PATENTOVÉ NÁROKY

5

## 1. Kombinace

10 a) allogenní nebo xenogenní buňky, která exprimuje alespoň jeden donorův antigen a která má na povrchu buňky ligand vstupující do interakce s receptorem na povrchu recipientovy T-buňky, který zprostředkovává helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu, a

b) antagonisty tohoto receptoru na povrchu T-buňky, který inhibuje interakci ligandu s receptorem,

15 k indukci tolerance T-buňky vůči donorově tkáni nebo orgánu v recipientovi této tkáně nebo orgánu.

20 2. Kombinace podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že receptorem na povrchu recipientovy T-buňky, který zprostředkovává helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu, je gp39.

3. Kombinace podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antagonistou je protilátka proti gp39.

25 4. Kombinace podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je monoklonální protilátka.

5. Kombinace podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je protilátka proti lidskému gp39.

30

6. Kombinace podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je hybridom MR1 uložený v ATCC pod číslem HB 11 048.

35 7. Kombinace podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je chimerická monoklonální protilátka.

8. Kombinace podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je humanizovaná monoklonální protilátka.

40 9. Kombinace podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že allogenní nebo xenogenní buňkou je lymfoidní buňka.

10. Kombinace podle nároku 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že lymfoidní buňkou je B-buňka.

45 11. Kombinace podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že B-buňkou je klidová buňka.

12. Kombinace podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že allogenní nebo xenogenní buňka a antagonistu jsou určeny k podání recipientovi před transplantací tkáně nebo orgánu.

50 13. Kombinace podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že tkáň nebo orgán zahrnuje pankreatické ostrůvky.

14. Kombinace podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že tkáň nebo orgán jsou vybrány ze skupiny zahrnující játra, ledvinu, srdce, plíci, kůži, sval, nervovou tkáň, žaludek a střevo.

55

15. Kombinace
- a) allogenní nebo xenogenní buňky, která exprimuje alespoň jeden donorův antigen, a
- 5 b) antagonisty gp39,
- k indukci tolerance T–buňky vůči donorově tkáni nebo orgánu v recipientovi této tkáně nebo orgánu.
- 10 16. Kombinace podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antagonistou gp39 je protilátka proti gp39.
17. Kombinace podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je monoklonální protilátka.
- 15 18. Kombinace podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je protilátka proti lidskému gp39.
19. Kombinace podle nároku 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je hybridom MR1 uložený v ATCC pod číslem HB 11 048.
- 20 20. Kombinace podle nároku 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je chimerická monoklonální protilátka.
- 25 21. Kombinace podle nároku 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je humanizovaná monoklonální protilátka.
22. Kombinace podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antagonistou gp39 je rozpustná forma ligandu gp39.
- 30 23. Kombinace podle nároku 22, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že rozpustnou formou ligandu gp39 je fúzní protein CD40.
24. Kombinace podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že allogenní nebo xenogenní
- 35 buňkou je lymfoidní buňka.
25. Kombinace podle nároku 24, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že lymfoidní buňkou je B–buňka.
- 40 26. Kombinace podle nároku 25, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že B–buňkou je klidová B–buňka.
27. Kombinace podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že allogenní nebo xenogenní buňka a antagonistu jsou určeny k podání recipientovi před transplantací tkáně nebo orgánu.
- 45 28. Kombinace podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že tkáň nebo orgán zahrnuje pankreatické ostrůvky.
29. Kombinace podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že tkáň nebo orgán jsou vybrány
- 50 ze skupiny zahrnující játra, ledvinu, srdce, plíci, kůži, sval, nervovou tkáň, žaludek a střevo.

30. Kombinace

a) allogenní nebo xenogenní buňky, která exprimuje alespoň jeden donorův antigen,

5 b) antagonisty gp39, a

c) donorových buněk pankreatických ostrůvků, k ošetření cukrovky.

10 31. Kombinace podle nároku 30, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je monoklonální protilátka.

32. Kombinace podle nároku 30, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je protilátka proti lidskému gp39.

15 33. Kombinace podle nároku 31, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je hybridom MR1 uložený v ATCC pod číslem HB 11 048.

34. Kombinace podle nároku 31, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je chimerická monoklonální protilátka.

20 35. Kombinace podle nároku 31, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je humanizovaná monoklonální protilátka.

25 36. Kombinace podle nároku 30, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antagonistou gp39 je rozpustná forma ligandu gp39.

37. Kombinace podle nároku 36, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že rozpustnou formou ligandu gp39 je fúzní protein CD40.

30 38. Kombinace podle nároku, 30, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že allogenní nebo xenogenní buňkou je lymfoidní buňka.

39. Kombinace podle nároku 38, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že lymfoidní buňkou je B-buňka.

35 40. Kombinace podle nároku 39, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že B-buňkou je klidová B-buňka.

40 41. Kombinace podle nároku 30, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že allogenní nebo xenogenní buňka a antagonisty jsou určeny k podání recipientovi před transplantací buněk pankreatických ostrůvků.

42. Kombinace

45 a) donorovy allogenní buňky, a

b) protilátka proti gp39,

50 přičemž tato donorova allogenní buňka a protilátka proti gp39 jsou určeny pro podání recipientovi před transplantací tkáně nebo orgánu,

k indukci tolerance T-buňky vůči donorově tkáni nebo orgánu v recipientovi této tkáně nebo orgánu.

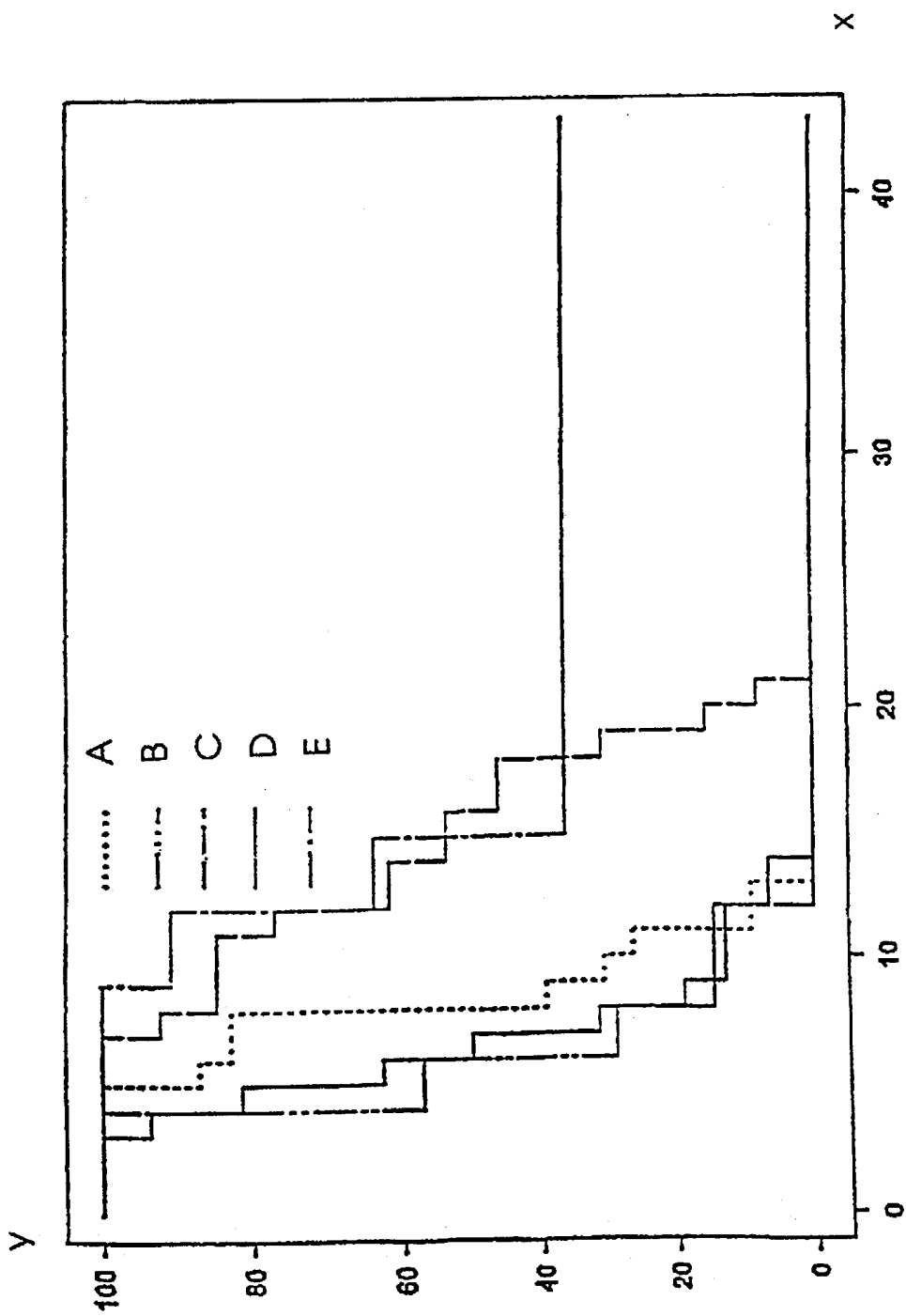
43. Kombinace podle nároku 42, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je monoklonální protilátka.
- 5 44. Kombinace podle nároku 42, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je protilátka proti lidskému gp39.
45. Kombinace podle nároku 43, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je hybridom MRI uložený v ATCC pod číslem HB 11 048.
- 10 46. Kombinace podle nároku 44, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je chimerická monoklonální protilátka.
47. Kombinace podle nároku 44, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je humanizovaná monoklonální protilátka.
- 15 48. Kombinace podle nároku 42, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že donorovou allogenní buňkou je lymfoidní buňka.
49. Kombinace podle nároku 48, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že lymfoidní buňkou je B-buňka.
- 20 50. Kombinace podle nároku 49, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že B-buňkou je klidová B-buňka.
- 25 51. Použití antagonisty receptoru na povrchu T-buňky, který inhibuje interakci ligandu s receptorem, k přípravě farmaceutického prostředku k indukci tolerance T-buňky v recipientovi donorovy tkáně nebo orgánu, kterážto tkáň nebo orgán obsahuje allogenní nebo xenogenní buňku, která exprimuje alespoň jeden donorův antigen a která má na povrchu buňky ligand vstupující do interakce s receptorem na povrchu recipientovy T-buňky, který zprostředkovává helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu.
- 30 52. Použití podle nároku 51, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že receptorem na povrchu recipientovy T-buňky, který zprostředkovává helperovou efektorovou funkci závislou na kontaktu, je gp39.
- 35 53. Použití podle nároku 52, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antagonistou je protilátka proti gp39.
- 40 54. použití podle nároku 53, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je monoklonální protilátka.
55. Použití podle nároku 53, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protilátkou proti gp39 je protilátka proti lidskému gp39.
- 45 56. Použití podle nároku 54, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je chimerická protilátka.
57. Použití podle nároku 54, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že monoklonální protilátkou je humanizovaná monoklonální protilátka.
- 50 58. Použití podle nároku 51, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že xenogenní nebo allogenní buňkou je lymfoidní buňka.
- 55 59. Použití podle nároku 58, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že lymfoidní buňkou je B-buňka.

60. Použití podle nároku 51, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že tkáň nebo orgán obsahující uvedenou allogenní nebo xenogenní buňku jsou vybrány ze skupiny zahrnující játra, ledvinu, srdce, plíci, kůži, sval, nervovou tkáň, žaludek a střevo.

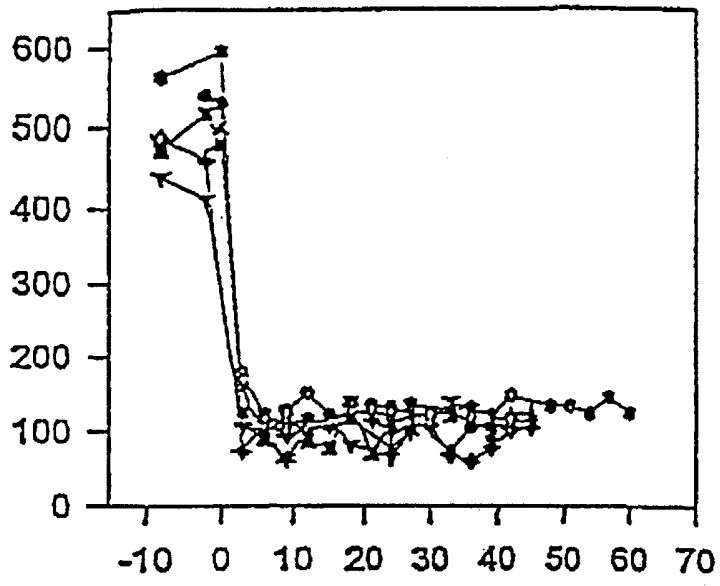
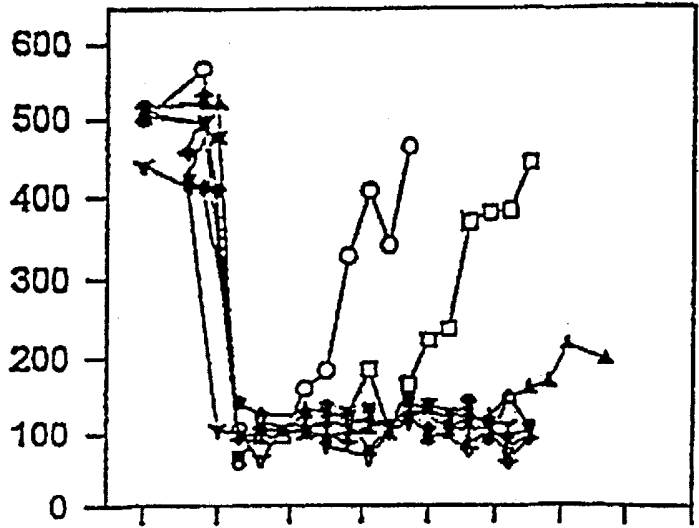
5

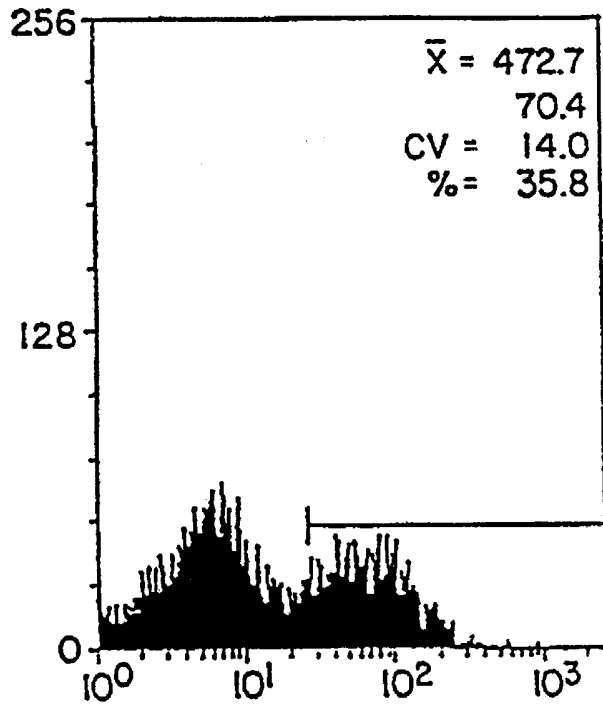
8 výkresů

10

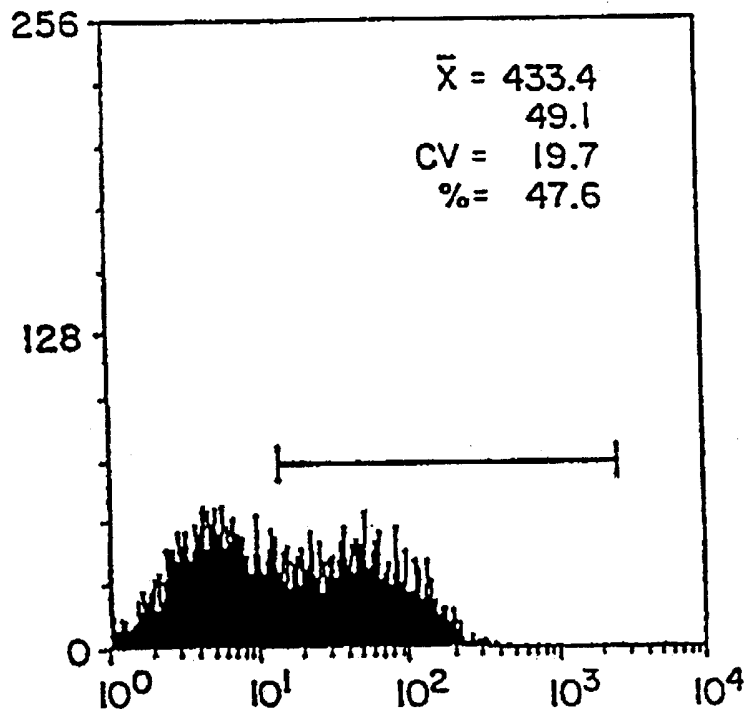


Obr. 1

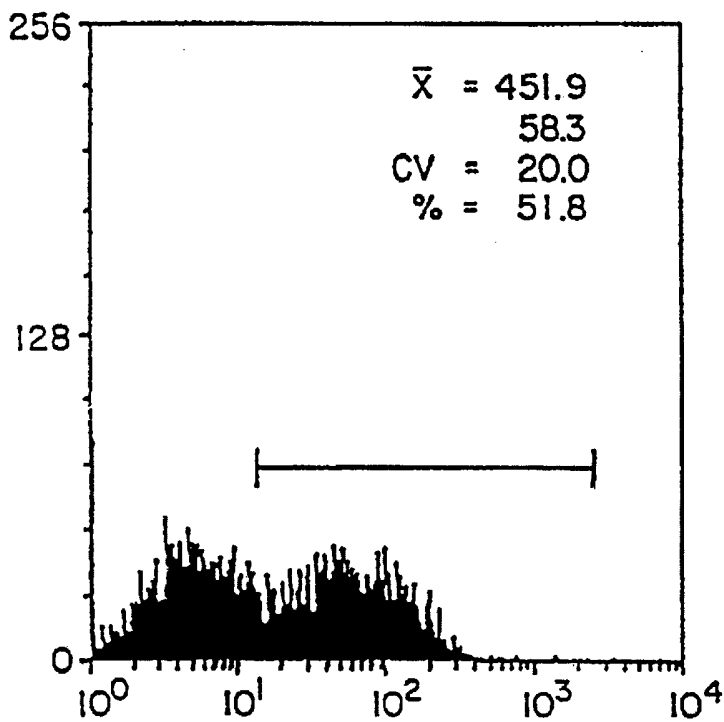




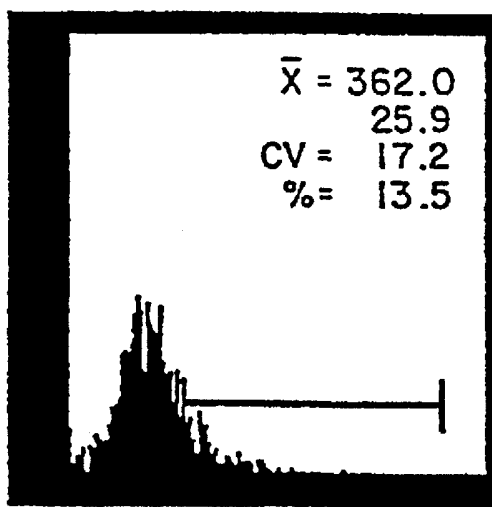
Obr. 3A



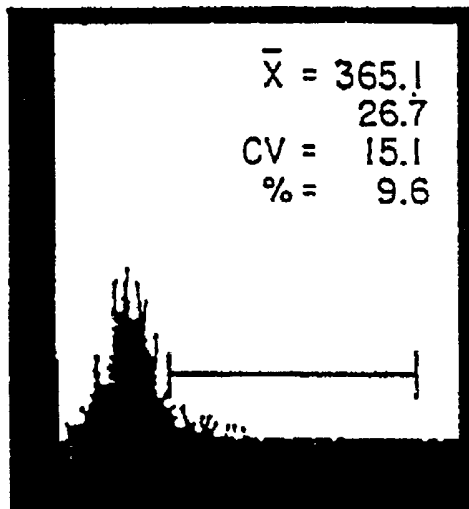
Obr. 3B



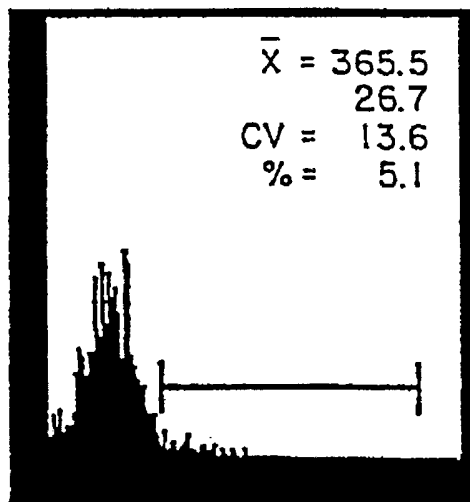
Obr. 3C



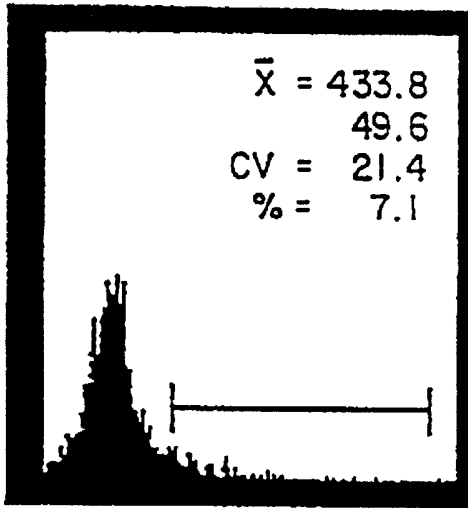
Obr.4A



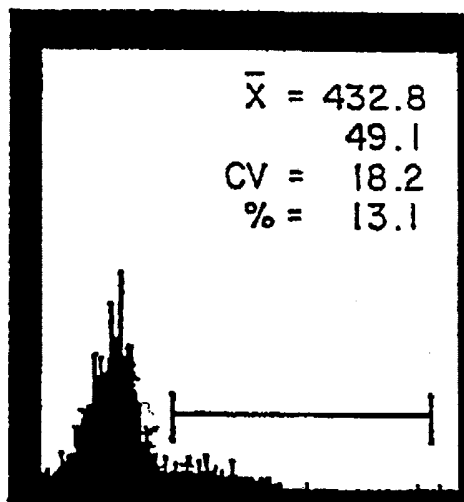
Obr. 4B



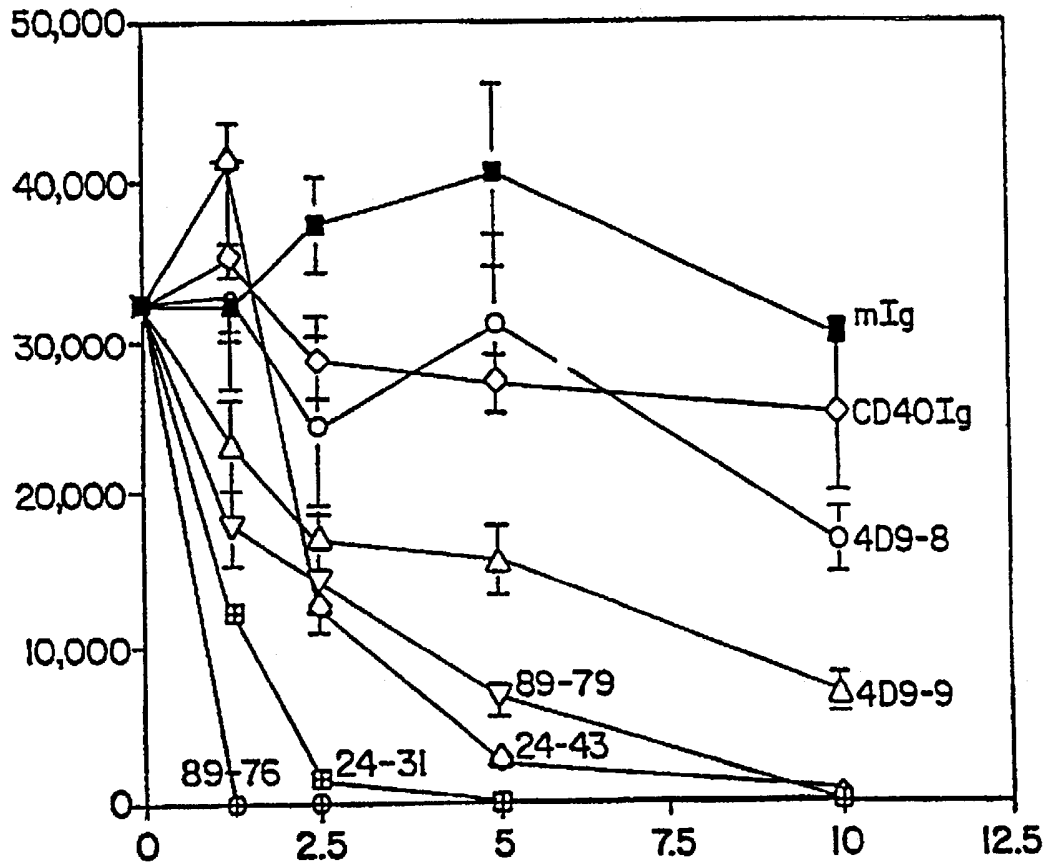
Obr. 4C



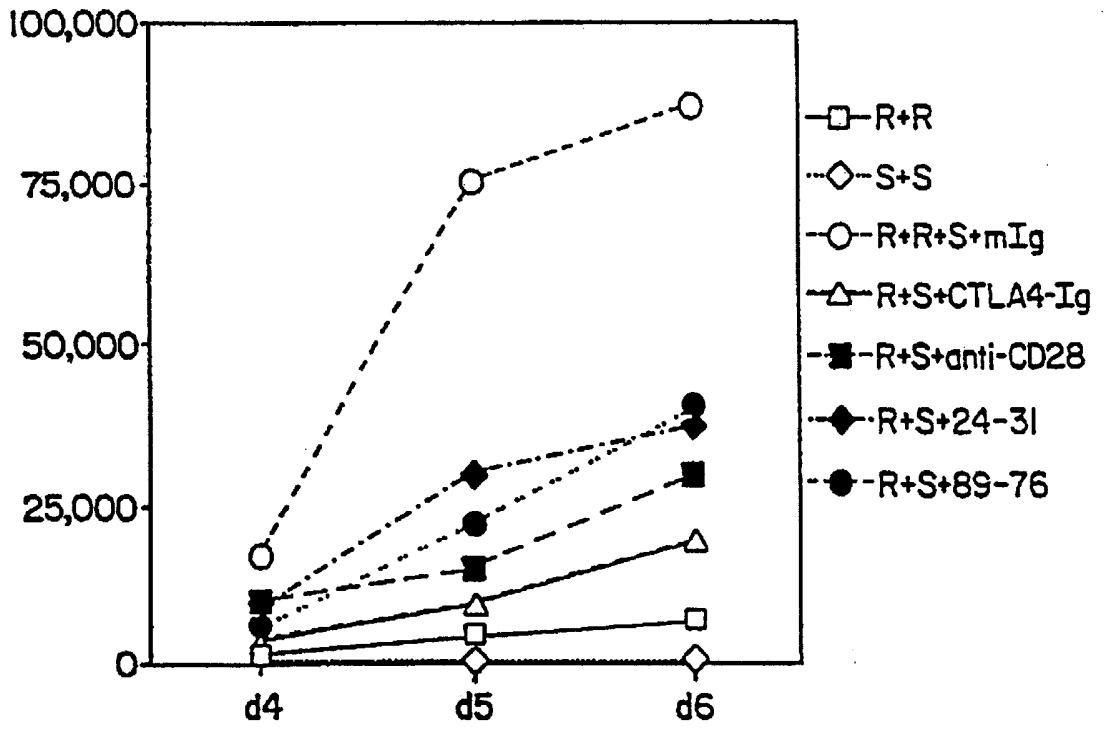
Obr. 5A



Obr. 5B



Obr. 6



Obr. 7

5

Konec dokumentu