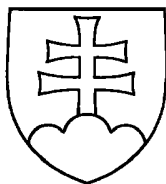


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

1369-96

- (22) Dátum podania: 25.04.95
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/234 987
(32) Dátum priority: 25.04.94
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 11.01.99
(86) Číslo PCT: PCT/US95/04832, 25.04.95

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

A 61K 39/00

(71) Prihlasovateľ: TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE, Hanover, NH, US;
UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER, Worcester, MA, US;

(72) Pôvodca 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;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Liečivo na indukovanie T-bunkovej tolerancie**

(57) Anotácia:

Alogénna alebo xenogénna bunka s antagonistom receptora na povrchu tejto bunky sa používa na prípravu liečiva na indukovanie T-bunkovej tolerancie k tkanivu alebo orgánu darcu u príjemcu. Alogénnu alebo xenogénnu bunku reprezentuje najmenej jeden antigén darcu a táto bunka má na bunkovom povrchu ligand. Alogénnou alebo xenogénnou bunkou je lymfoidná bunka, výhodne B-bunka, najmä pokojová B-bunka. Receptorom na povrchu T-bunky príjemcu je gp39 a antagonistom je anti-gp39 protilátka, ktorou je monoklonálna protilátka alebo antihumánna gp39 protilátka. Monoklonálnou protilátkou je MR1 alebo chimérická monoklonálna protilátka alebo humanizovaná monoklonálna protilátka. Gp39 protilátkou je rozpustná forma gp39 ligandu, najmä CD40 spojovací proteín. Tkanivom alebo orgánom sú pankreatické ostrovčeky, pečeň, oblička, srdce, pľúcny lalok, koža, sval, nervové tkanivo, žalúdok a črevá.

Liečivo na indukovanie T-bunkovej tolerancie

Oblasť techniky

Vynález sa týka alogénnej alebo xenogénnej bunky s antagonistom receptora na povrchu tejto bunky na prípravu liečiva na indukovanie T-bunkovej tolerancie voči tkanivu alebo orgánu darcu u príjemcu.

Doterajší stav techniky

Aby sa indukovala antigén-špecifická T-bunková aktivácia a klonálna expanzia, musia sa na povrch pokojových T-lymfocytov dodať dva signály, ktoré vytvárajú antigény prezentujúce bunky (APC) (Jenkins, M. a Schwartz, R., J.Exp.Med. 165, 302 - 319, 1987; Mueller, D.L. a spol., J.Immunol. 144, 3701 - 3709, 1990; Williams, I.R. a Unanue, E.R., J.Immunol. 145, 85 - 93, 1990). Prvý signál, ktorý udeľuje špecifickosť imunitnej odpovedi, sa sprostredkuje cez T-bunkové receptory (TCR) s následným rozpoznaním cudzieho antigénového peptidu, prezentovaného v súvislosti s hlavným histokompatibilným komplexom (MHC). Druhý signál, ktorý sa nazýva kostimulácia, spôsobuje, že T-bunky proliferujú a stanú sa funkčnými (Schwartz, R.H., Science 248, 1349 - 1356, 1990). Kostimulácia nie je ani antigén-špecifická, ani MHC obmedzená a predpokladá sa, že ju vyvoláva jedna alebo viac odlišných molekúl povrchu bunky, aktivovaných APC bunkami (Jenkins, M.K. a spol., J.Immunol. 140, 3324 - 3330, 1988; Linsley, P.S. a spol., J.Exp.Med. 173, 721 - 730, 1991; Gimmi, C.D. a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88, 6575 - 6579, 1991; Young, J.W. a spol., J.Clin.Invest. 90, 229 - 237, 1992; Koulova L. a spol., J.Exp.Med. 173, 759 - 762, 1991; Reiser, H.

a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89, 271 - 275, 1992; van-Seventer, G.A. a spol., J.Immunol. 144, 4579 - 4586, 1990; LaSalle, J.M. a spol., J.Immunol. 147, 774 - 780, 1991; Dustin, M.I. a spol., J.Exp.Med. 169, 503, 1989; Armitage, R.J. a spol., Nature 357, 80 - 82, 1992; Liu, Y. a spol., J.Exp.Med. 175, 437 - 445, 1992). Jedna kostimulačná cesta, zahrnutá v T-bunkovej aktivácii, zahrnuje molekulu CD28 na povrchu T-buniek. Táto molekula môže prijať kostimulačný signál, dodaný ligandom na B-bunkách alebo iných APC bunkách. Ligandy pre CD28 zahŕňujú členy triedy B7 B-lymfocytových aktivačných antigénov, ako sú B7-1 a/alebo B7-2 (Freedman, A.S. a spol., J.Immunol. 137, 3260 - 3267, 1987; Freeman, G.J. a spol., J.Immunol. 143, 2714 - 2722, 1989; Freeman, G.J. a spol., J.Exp.Med. 174, 625 - 631, 1991; Freeman, G.J. a spol., Science 262, 909 - 911, 1993; Azuma, M. a spol., Nature 366, 76 - 79, 1993; Freeman, G.J. a spol., J.Exp.Med. 178, 2185 - 2192, 1993). B7-1 a B7-2 sú tiež ligandami pre inú molekulu, CTLA4, ktorá je prítomná na povrchu aktivovaných T-buniek, hoci úloha CTLA4 pri kostimulácii je nejasná.

Dodanie antigén-špecifického signálu s kostimulačným signálom T-bunke vedie k aktivácii T-bunky, ktorá môže zahrňovať aj proliferáciu T-buniek, aj vylučovanie cytokínu. Naproti tomu sa predpokladá, že dodanie antigén-špecifického signálu T-bunke za neprítomnosti kostimulačného signálu vyvolá v T-bunke stav, že táto neodpovedá alebo nereaguje na antigén, čím sa v T-bunke vyvolá antigén-špecifická tolerancia.

Interakcie medzi T-bunkami a B-bunkami hrajú hlavnú úlohu pri imunitných odpovediach. Vyvolanie humorálnej imunity voči od týmsu závislého antigénu vyžaduje "pomoc", ktorú poskytujú T-pomocné bunky (ďalej Th). Zatiaľ čo určitá pomoc, poskytovaná B-lymfocytom, sa sprostredkuje rozpustnými molekulami, uvoľnenými Th-bunkami (napríklad lymfokínmi, ako je IL-4 a IL-5), aktivácia B-buniek tiež

vyžaduje od kontaktu závislú interakciu medzi B-bunkami a Th-bunkami. Hirohata a spol., J.Immunol. 140, 3736 - 3744, 1988; Bartlett a spol., J.Immunol. 143, 1745 - 1754, 1989. To naznačuje, že aktivácia B-buniek zahrnuje nevyhnutnú interakciu medzi molekulami bunkového povrchu na B-bunkách a Th-bunkách. Molekula(y) na T-bunke preto sprostredkuje od kontaktu závislé pomocné efektorové funkcie T-bunky. Od kontaktu závislú interakciu medzi molekulami na B-bunkách a T-bunkách ďalej potvrdzuje zistenie, že izolované plazmové membrány aktivovaných T-buniek môžu poskytovať pomocné funkcie, nevyhnutné na aktiváciu B-buniek. Brian, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85, 564 - 568, 1988; Hodgkin a spol., J.Immunol. 145, 2025 - 2034, 1990; Noelle a spol., J.Immunol. 146, 1118 - 1124, 1991.

Na povrchu nezrelých a zrelých B-lymfocytov sa zistila molekula CD40, ktorá, ak je zosieťovaná protilátkami, indukuje proliferáciu B-buniek. Valle a spol., Eur.J.Immunol. 19, 1463 - 1467, 1989; Gordon a spol., J.Immunol. 140, 1425 - 1430, 1988; Gruber a spol., J.Immunol. 142, 4144 - 4152, 1989. CD40 sa molekulovo klonovala a charakterizovala. Stamenkovic a spol. EMBO J. 8, 1403 - 1410, 1989. Ligand pre CD40, gp39 (tiež nazývaný CD40 ligand alebo CD40L) bol tiež molekulovo klonovaný a charakterizovaný. Armitage a spol., Nature 357, 80 - 82, 1992; Lederman a spol., J.Exp.Med. 175, 1091 - 1101, 1992; Hollenbaugh a spol., EMBO J. 11, 4313 - 4319, 1992. gp39 proteín sa prejavuje na aktivovaných, ale nie pokojových CD4⁺ Th-bunkách. Spriggs a spol., J.Exp.Med. 176, 1543 - 1550, 1992; Lane a spol., Eur.J.Immunol. 22, 2573 - 2578, 1992; Roy a spol., J.Immunol. 151, 1 - 14, 1993. Bunky, transfektované génom pre gp39 a prezentujúce proteín gp39 na svojom povrchu, môžu vyvolať proliferáciu B-buniek a spolu s inými stimulačnými signálmi môžu indukovať tvorbu protilátok. Armitage a spol., Nature 357, 80 - 82, 1992; Hollenbaugh a spol., EMBO J. 11, 4313 - 4319, 1992.

Podstata vynálezu

Molekuly na povrchu buniek, ktoré sprostredkujú od kontaktu závislé pomocné efektorové funkcie T-buniek, sú dôležité na indukovanie imunitných odpovedí, ktoré vyžadujú pomoc T-buniek. Napríklad interakcia gp39 na Th-bunkách

s CD40 na B-bunkách hrá hlavnú úlohu pri aktivácii odpovedí B-buniek na protilátku. Tento vynález spočíva, prinajmenšom čiastočne, na objave, že molekuly bunkového povrchu, ktoré sprostredkujú od kontaktu závislé pomocné efektorové funkcie T-buniek, tiež zohrávajú kritickú úlohu pri odpovedi T-buniek na aloantigény. Konkrétne sa zistilo, že pri vhodných podmienkach interferencia s interakciou gp39 s ligandom na alogénnej bunke, ktorá prezentuje aloantigény T-bunke, môže indukovať toleranciu v T-bunke. S výhodou alogénna bunka, ktorá prezentuje aloantigény T-bunke, vyžaduje interakciu medzi gp39 ligandom na bunke a gp39 na T-bunke, aby bola schopná poskytnúť signály, nevyhnutné na aktiváciu T-bunky. Inhibovanie interakcie gp39 ligandu na alogénnej bunke s gp39 na T-bunke zabráni aktivácii T-bunky a skôr indukuje aloantigén-špecifickú T-bunkovú toleranciu. Indukcia T-bunkovej tolerancie voči aloantigénom, ako je tu opísaná, sa môže použiť ako prípravný režim pre transplantáciu tkaniva alebo orgánu.

V súlade s tým podstatou tohto riešenia je použitie alogénnej alebo xenogénnej bunky s antagonistom receptora na povrchu tejto bunky na prípravu liečiva na indukovanie T-bunkovej tolerancie voči tkanivu alebo orgánu darcu u príjemcu. Alogénnu alebo xenogénnu bunku reprezentuje najmenej jeden antigén darcu a táto bunka má na bunkovom povrchu ligand. Alogénnou alebo xenogénnou bunkou je lymfoidná bunka, výhodne B-bunka, najmä pokojová B-bunka.

Receptorom na povrchu T-bunky príjemcu je gp39 a antagonistom je anti-gp39 protilátka, ktorou je monoklonálna protilátka alebo antihumánna gp39 protilátka. Monoklonálnou protilátkou je MR1 alebo chimérická monoklonálna protilátka alebo humanizovaná monoklonálna protilátka.

Gp39 protilátkou je rozpustná forma gp39 ligandu, najmä CD40 spojovací proteín. Tkanivom alebo orgánom sú pankreatické ostrovčeky, pečeň, oblička, srdce, pľúcny lalok, koža, sval, nervové tkanivo, žalúdok a črevá.

Alogénna alebo xenogénna bunka a antagonista (napr. anti-gp39 protilátka) sa typicky podávajú prijímacému subjektu pred transplantáciou tkaniva alebo orgánu tomuto subjektu. Napríklad sa príjemcovi podávajú lymfoidné bunky (napr. B-bunky) od darcu tkaniva alebo orgánu spolu s antagonistom pred transplantáciou tohto tkaniva alebo orgánu príjemcovi.

Spôsoby podľa tohto vynálezu možno použiť napríklad na indukovanie T-bunkovej tolerancie voči transplantovanému tkanivu alebo orgánom, ako sú pečeň, oblička, srdce, pľúcny lalok, koža, sval, nervové tkanivo, žalúdok a črevá. V jednom uskutočnení transplantované tkanivo zahŕňa pankreatické ostrovčeky. V súlade s tým tento vynález poskytuje spôsob liečenia cukrovky, zahrnujúci podávanie subjektu, ktorý potrebuje liečenie: 1) alogénnych alebo exogénnych buniek, ktoré prezentujú antigény darcu; 2) antagonistu receptora na povrchu T-buniek príjemcu, ktorý sprostredkuje od kontaktu závislé pomocné efektorové funkcie, ako je gp39 antagonista (napr. anti-gp39 protilátka); a 3) pankreatických ostrovčekov darcu.

Stručný popis obrázkov

Obrázok 1 je grafickým znázornením prežívania transplantovaných implantátov pankreatických ostrovčekov u chemicky diabetických myší, predtým ošetrených samotnou anti-gp39 protilátkou alebo samotnými nefrakcionovanými alebo frakcionovanými alogénnymi slezinovými bunkami.

Obrázky 2A a 2B sú grafickým znázornením prežívania transplantovaných implantátov pankreatických ostrovčekov, meraného poklesom koncentrácie glukózy v plazme, u chemicky diabetických myší, predtým ošetrených jedinou dávkou frakcionovaných alogénnych slezinových buniek spolu s liečením anti-gp39 protilátkou (MR1) buď po dobu 2 týždňov (časť A obrázku) alebo 7 týždňov (časť B obrázku). Každá krivka reprezentuje údaje o jednotlivkej myši. Otvorené značky označujú príjemcov, u ktorých ostrovčekový implantát spontánne zlyhal. Plné značky označujú myši, ktorých ostrovčekové implantáty boli funkčné pri skončení experimentu.

Obrázky 3A, B a C sú prietokové cytometrické profily, znázorňujúce zafarbenie 6 hodín aktivovaných ľudských periférnych krvných lymfocytov buď CD40Ig (časť A obrázku), mAb 4D9-8 (časť B obrázku) alebo mAb 4D9-9 (časť C obrázku).

Obrázky 4A, B a C sú prietokové cytometrické profily, znázorňujúce zafarbenie 6 hodín aktivovaných ľudských periférnych krvných lymfocytov, kultivovaných v prítomnosti cykloporínu A, farbených buď mAb 4D9-8 (časť A obrázku), mAb 4D9-9 (časť B obrázku) alebo CD40Ig (časť C obrázku).

Obrázky 5A a B sú prietokové cytometrické profily, znázorňujúce zafarbenie 6 hodín aktivovaných ľudských periférnych krvných lymfocytov buď CD40Ig v prítomnosti neznačkovaného mAb 4D9-8 (časť A obrázku) alebo neznačkovaného mAb 4D9-9 (časť B obrázku).

Obrázok 6 je grafickým znázornením inhibície

proliferácie ľudských B-buniek, indukovanej rozpustným gp39 a IL-4, keď sa bunky kultivujú v prítomnosti antihumánnych gp39 mAb 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 alebo 89-79.

Obrázok 7 je grafickým znázornením inhibície odpovede alošpecifických zmiešaných lymfocytov, keď sa bunky kultivujú v prítomnosti antihumánnych gp39 mAb 24-31 alebo 89-79.

Podrobný popis vynálezu

Tento vynález vyznačuje spôsoby indukovania T-bunkovej tolerancie *in vivo* voči tkanivovému alebo orgánovému transplantátu darcu u príjemcu transplantátu. Tieto spôsoby zahŕňujú podávanie príjemcovi 1) alogénnej alebo xenogénnej bunky, ktorá prezentuje antigény darcu, a ktorá má ligand na bunkovom povrchu, ktorý interaguje s receptorom na povrchu T-bunky príjemcu, ktorý sprostredkuje od kontaktu závislú pomocnú efektorovú funkciu, a 2) antagonistu receptora na povrchu T-bunky, ktorý zabraňuje interakcii tohto ligandu a receptora. Tak, ako sa tu používa, výraz "príjemca" sa vzťahuje na subjekt, do ktorého sa má tkanivový alebo orgánový transplantát transplantovať, transplantuje sa, alebo sa už transplantoval. Ako je tu definované, "alogénna" bunka sa získa z iného jedinca toho istého druhu, ako je príjemca, a prezentuje "aloantigény", ktoré sa líšia od antigénov, ktoré prezentujú bunky príjemcu. "Xenogénna" bunka sa získa z iného druhu, než je príjemca a prezentuje "xenoantigény", ktoré sa líšia od antigénov, prezentovaných bunkami príjemcu. Ako sa tu používa, výraz "antigény darcu" sa vzťahuje na antigény, prezentované tkanivovým alebo orgánovým transplantátom darcu, ktorý sa má transplantovať do príjemcu. Antigény darcu môžu byť aloantigénmi alebo xenoantigénmi v závislosti od zdroja transplantátu. Alogénna alebo xenogénna bunka, podávaná príjemcovi ako súčasť

tolerizačného režimu, prezentuje antigény darcu, t.j. prezentuje niektoré alebo všetky z tých istých antigénov, ktoré sú prítomné v tkanive alebo orgáne darcu, ktorý sa má transplantovať. Alogénna alebo xenogénna bunka sa s výhodou získa od darcu z tkanivového alebo orgánového transplantátu, ale môže sa získať z jedného alebo viacerých zdrojov, ktoré majú antigénne determinanty spoločné s darcom.

Okrem alogénnej alebo xenogénnej bunky sa príjemcovi podáva antagonista molekuly na T-bunkách, ktorý sprostredkuje od kontaktu závislé pomocné efektorové funkcie, ako súčasť tolerizačného režimu. Ako je tu definované, molekulou alebo receptorom, ktorý sprostredkuje od kontaktu závislé pomocné efektorové funkcie, je taký receptor, ktorý sa prezentuje na Th-bunke a interaguje s ligandom na efektorovej bunke (napr. B-bunke), pričom interakcia molekuly s jej ligandom je nevyhnutná na vytvorenie odpovede efektorovej bunky (napr. aktivácia B-bunky). Okrem toho, že sa zúčastňuje na odpovediach efektorovej bunky, sa teraz zistilo, že takáto molekula alebo receptor sa zúčastňuje na odpovedi T-bunky na antigén. S výhodou je molekulou na T-bunke, ktorá sprostredkuje od kontaktu závislú pomocnú efektorovú funkciu, gp39. V súlade s tým vo výhodných uskutočneniach spôsobu podľa tohto vynálezu zahrnujú podávanie alogénnej alebo xenogénnej bunky a gp39-antagonistu príjemcovi transplantátu. Aktivácia T-buniek príjemcu alogénnou alebo xenogénnou bunkou zahŕňa interakciu medzi gp39 na T-bunkách príjemcu a gp39 ligandom na uvedenej alogénnej alebo xenogénnej bunke. Inhibovaním tejto interakcie gp39-antagonistom sa T-bunky príjemcu neaktivujú antigénmi darcu, prezentovanými alogénnou alebo xenogénnou bunkou, ale skôr sa stanú tolerizovanými voči antigénom darcu. Indukcia tolerancie voči antigénom darcu u príjemcu teda umožňuje úspešnú transplantáciu tkaniva alebo orgánu darcu bez imunitne sprostredkovaného odmietnutia transplantátu od darcu.

Rôzne aspekty tohto vynálezu sú ďalej podrobnejšie popísané v nasledujúcich častiach.

I. gp39-antagonisti

V súlade so spôsobmi podľa tohto vynálezu sa gp39 antagonista podáva príjemcovi, aby sa rušila interakcia gp39 na T-bunkách príjemcu s gp39 ligandom na alogénnej alebo xenogénnej bunke, ako je B-bunka, podanej príjemcovi. gp39 antagonista je definovaný ako molekula, ktorá ruší túto interakciu. gp39-antagonistom môže byť protilátka, namierená proti gp39 (napr. monoklonálna protilátka proti gp39), fragment alebo derivát protilátky, namierenej proti gp39 (napr. Fab alebo F(ab)'₂ fragmenty, chimérické protilátky alebo humanizované protilátky), rozpustné formy gp39 ligandu (napr. rozpustná CD40), rozpustné formy spojovacieho proteínu gp39 ligandu (napr. rozpustný CD40Ig) alebo farmaceutické činidlá, ktoré prerušia alebo rušia gp39-CD40 interakciu.

A. Protilátky

Cicavec (napr. myš, škrečok alebo králik) sa dá imunizovať imunogénnou formou gp39 proteínu alebo proteínového fragmentu (napr. peptidového fragmentu), ktorý vyvolá odpoveď na protilátku u cicavca. Bunka, ktorá prezentuje gp39 na svojom povrchu, sa tiež dá použiť ako imunogén. Alternatívne imunogény zahŕňujú čistené gp39 proteíny alebo proteínové fragmenty. gp39 sa dá očistiť z gp39 prezentujúcej bunky štandardnými čistiacimi technikami. Navyiac, gp39 cDNA (Armitage a spol., Nature 357, 80 - 82, 1992; Lederman a spol., J.Exp.Med. 175, 1091 - 1101, 1992; Hollenbaugh a spol., EMBO J. 11, 4313 - 4319, 1992) sa môže prezentovať v hostiteľskej bunke, napr.

v baktérii alebo v bunkovej línii cicavcov, a gp39 proteín sa môže očistiť z bunkových kultúr štandardnými metódami. Alternatívne sa môžu gp39 peptidy syntetizovať na báze sekvencie aminokyselín gp39 (popísané v Armitage a spol., Nature 357, 80 - 82, 1992); Lederman a spol., J.Exp.Med. 175, 1091 - 1101, 1992; Hollenbaugh a spol., EMBO J. 11, 4313 - 4319, 1992) s použitím známych metód (napr. F-moc alebo T-boc chemická syntéza). Metódy vyvolania imunogenity na proteíne zahŕňujú konjugáciu s nosičmi alebo iné metódy, dobre známe v doterajšom stave techniky. Napríklad sa proteín môže podávať v prítomnosti adjuvans. Postup imunizácie sa dá sledovať zisťovaním titrov protilátok v plazme alebo v sére. Štandardný ELISA alebo iné imunologické testy možno použiť s imunogénom ako antigénom, aby sa stanovili hladiny protilátok.

Po imunizácii sa dajú získať antiséra a, ak je to potrebné, z tohto séra sa dajú izolovať polyklonálne protilátky. Na tvorbu monoklonálnych protilátok možno z imunizovaného zvierata odobrať bunky (lymfocyty), vytvárajúce protilátky a spojiť ich s myelómovými bunkami štandardnými metódami spájania somatických buniek, čím tieto bunky nezaniknú a vzniknú hybridómové bunky. Takéto metódy sú v doterajšom stave techniky dobre známe. Napríklad hybridómová metóda, pôvodne vyvinutá Kohlerom a Milsteinom (Nature 256, 495 - 497, 1975), ako aj iné metódy, ako je hybridómová metóda ľudských B-buniek (Kozbar a spol., Immunol.Today 4, 72, 1983), EBV-hybridómová metóda na tvorbu ľudských monoklonálnych protilátok (Cole a spol., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy, 1985, Allen R. Bliss, Inc., str. 77 - 96) a skríning kombinačných sérií protilátok (Huse a spol., Science 246, 1275, 1989). Hybridómové bunky sa môžu skrínovať imunochemicky na tvorbu protilátok, špecificky reagujúcich s proteínom alebo peptidom a môžu sa izolovať monoklonálne protilátky.

Výraz protilátky, ako sa tu používa, má zahrňovať ich fragmenty, ktoré špecificky reagujú s gp39 proteínom alebo jeho peptidom, alebo s gp39 spojovacím proteínom. Protilátky možno fragmentovať s použitím bežných metód a užitočnosť fragmentov sa môže skrýňovať rovnakým spôsobom, ako sme popísali vyššie pre celé protilátky. Napríklad F(ab)'₂-fragmenty možno vytvoriť pôsobením pepsínu na protilátku. Výsledný F(ab)'₂-fragment možno upraviť, aby sa znížil počet disulfidových mostíkov a vznikli Fab'-fragmenty. Protilátka podľa tohto vynálezu má ďalej zahrňovať bišpecifické a chimérické molekuly s anti-gp39 časťou.

Keď sa protilátky, vytvorené v nehumánnych subjektoch, terapeuticky použijú u ľudí, v rôznych stupňoch sa rozoznávajú ako cudzie a u pacienta môže vzniknúť imunitná odpoveď. Jedným prístupom minimalizácie alebo vylúčenia tohto problému, ktorý je výhodný pre všeobecnú imunosupresiu, je vytvorenie derivátov chimérických protilátok, t.j. molekúl protilátok, ktoré spájajú nehumánnu zvieraciu premenlivú oblasť a humánnu konštantnú oblasť.

Molekuly chimérických protilátok môžu obsahovať napríklad antigén viažúcu oblasť z protilátky myši, krysy, alebo iného druhu, s humánymi konštantnými oblasťami. Bolo popísané množstvo prístupov k vytváraniu chimérických protilátok a možno použiť na vytváranie chimérických protilátok, obsahujúcich imunoglobulínovú premenlivú oblasť, ktorá rozpoznáva gp39. Pozri napríklad Morrison a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81, 6851, 1985; Takeda a spol., Nature 314, 452, 1985, Cabilly a spol., U.S. Patent 4 816 567; Boss a spol., U.S. Patent 4 816 397; Tanaguchi a spol., Európsky patentový dokument EP171496; Európsky patentový dokument 0173494; Britský patent GB 2177096B. Očakáva sa, že takéto chimérické protilátky by boli menej imunogénne v ľudskom subjekte než zodpovedajúce nechimérické protilátky.

Na humánne terapeutické účely sa monoklonálne alebo chimérické protilátky, ktoré špecificky reagujú s gp39 proteínom alebo peptidom, môžu ďalej humanizovať vytváraním ľudských chimér s variabilnými oblasťami, v ktorých časti variabilných oblastí, najmä oblasti nemennej štruktúry antigén viažúcej domény, sú ľudského pôvodu a len hypervariabilné oblasti sú nehumánneho pôvodu. Takéto zmenené imunoglobulínové molekuly možno vytvoriť ľubovoľnou z niekoľkých metód, známych v doterajšom stave techniky (napr. Teng a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80, 7308 - 7312, 1983; Kozbor a spol., Immunology Today 4, 7279, 1983; Olsson a spol., Meth.Enzymol. 92, 3 - 16, 1982), a s výhodou sa vytvoria v súlade s poznatkami z PCT dokumentu WO92/06193 alebo EP 0239400. Humanizované protilátky možno vyrábať komerčne, napr. Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britain.

Inou metódou vytvárania špecifických protilátok alebo fragmentov protilátok, reagujúcich proti gp39 proteínu alebo peptidu, je skríning sérií prezentácií, kódujúcich imunoglobulínové gény alebo ich časti, prezentované baktériou s gp39 proteínom alebo peptidom. Napríklad úplné Fab fragmenty, VH oblasti a FV oblasti sa môžu prezentovať baktériou, keď sa použijú série fágových prezentácií. Pozri napríklad Ward a spol., Nature 341, 544 - 546, 1989; Huse a spol., Science 246, 1275 - 1281, 1989; a McCafferty a spol., Nature 348, 552 - 554, 1990. Skríning takýchto sérií napríklad gp39 peptidom môže zistiť imunoglobulínové fragmenty, ktoré reagujú s gp39. Alternatívne možno na vytváranie protilátok alebo ich fragmentov použiť SCID-hu myš (dostupná od Genpharm).

Metodiky vytvárania monoklonálnych protilátok, namierených proti gp39, vrátane ľudského gp39 a myšieho gp39, a monoklonálnych protilátok, vhodných na použitie v spôsoboch podľa tohto vynálezu, sú ďalej podrobnejšie popísané v príklade 2.

Na použitie pri indukovaní antigén-špecifickej T-bunkovej tolerancie sú výhodné anti-humánne gp39 monoklonálne protilátky podľa tohto vynálezu. Výhodné protilátky zahŕňujú monoklonálne protilátky 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76, popísané v príklade 2. Zvlášť výhodnými protilátkami sú monoklonálne protilátky 89-76 a 24-31. 89-76 a 24-31 hybridómy, vytvárajúce 89-76 a 24-31 protilátky, boli uložené podľa ustanovení Budapeštianskej dohody v Americkej zbierke typov kultúr, Parklawn Drive, Rockville, Md., 2. septembra 1994. Hybridómu 89-76 bolo priradené ATCC prístupové číslo HB11713 a hybridómu 24-31 bolo priradené ATCC prístupové číslo HB11712. Protilátky 24-31 a 89-76 sú izotypu IgG1.

V inom uskutočnení anti-humánny gp39 mAb na použitie v spôsoboch podľa tohto vynálezu viaže epitop, rozoznávaný monoklonálnou protilátkou, vybranou zo skupiny, ktorá pozostáva z 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 a 89-79. Výhodnejšie anti-humánny gp39 mAb viaže epitop, rozoznávaný monoklonálnou protilátkou 24-31 alebo monoklonálnou protilátkou 89-76. Schopnosť mAb viazať epitop, rozoznávaný ľubovoľnou z vyššie uvedených protilátok, možno stanoviť štandardnými krížovými konkurenčnými testami. Napríklad protilátka, ktorá viaže ten istý epitop, rozoznávaný mAb 24-31, bude konkurovať pri viazaní značkovaných 24-31 na aktivované T-bunky, zatiaľ čo protilátka, ktorá viaže odlišný epitop než ten, ktorý rozoznáva mAb 24-31, nebude konkurovať viazaniu značkovaného 24-31 na aktivované T-bunky.

B. Rozpustné ligandy pre gp39

Medzi iných gp39-antagonistov, ktorých možno podávať na indukovanie T-bunkovej tolerancie, patria rozpustné formy gp39 ligandu. Monovalentný rozpustný ligand gp39, ako je

rozpustná CD40, sa môže naviazať na gp39, čím zabráni interakcii gp39 s CD40 na B-bunkách. Výraz "rozpustný" znamená, že ligand nie je permanentne spojený s bunkovou membránou. Rozpustný gp39 ligand možno pripraviť chemickou syntézou alebo, s výhodou, metódami rekombinantnej DNA, napríklad prezentovaním len mimobunkovej oblasti (neprítomné transmembránové a cytoplazmové oblasti) ligandu. Výhodným rozpustným gp39 ligandom je rozpustná CD40. Alternatívne môže rozpustný gp39 ligand existovať vo forme spojovacieho proteínu. Takýto spojovací proteín obsahuje prinajmenšom časť gp39 ligandu, viazanú k druhej molekule. Napríklad CD40 sa môže prezentovať ako spojovací proteín s imunoglobulínom (t.j. CD40Ig spojovací proteín). V jednom uskutočnení sa vytvára spojovací proteín, ktorý obsahuje aminokyselinové zvyšky časti mimobunkovej domény CD40, pripojené k aminokyselinovým zvyškom sekvencie, zodpovedajúcej pánťovým, CH₂ a CH₃ oblastiam imunoglobulínového ťažkého reťazca, napr. Cgamma1, aby sa vytvoril CD40Ig spojovací proteín (pozri napr. Linsley a spol., J.Exp.Med. 1783, 721 - 730, 1991; Capon a spol., Nature 337, 525 - 531, 1989; a Capon U.S. 5 116 964). Spojovací proteín možno pripraviť chemickou syntézou, alebo s výhodou metódami rekombinantnej DNA, založenými na cDNA CD40 (Stamenkovic a spol., EMBO J. 8, 1403 - 1410, 1989).

II. Bunky na indukovanie antigén-špecifickej tolerancie

Tento vynález spočíva, prinajmenšom čiastočne, na objave, že prezentácia aloantigénov B-bunkám alogénnymi bunkami v prítomnosti gp39 antagonistu vedie k T-bunkovej tolerancii voči aloantigénom. Bunky, ktoré sú schopné indukovať toleranciu týmto mechanizmom, zahŕňujú tie, ktoré prezentujú antigén a aktivujú T-bunky interakciou s gp39 (t.j. interakcia medzi gp39 na T-bunkách a gp39 ligandom na

bunke, prezentujúcej antigén, je nevyhnutná na to, aby sa T-bunke dodali príslušné signály na T-bunkovú aktiváciu). Inhibícia interakcie ligandu na alogénnej alebo xenogénnej bunke s gp39 na T-bunkách príjemcu zabraňuje T-bunkovej aktivácii alogénnymi alebo xenoantigénmi a skôr indukuje T-bunkovú toleranciu voči týmto antigénom. Rušenie aktivácie T-bunky cez gp39 môže zabrániť indukovaniu kostimulačných molekúl na alogénnej alebo xenogénnej bunke (napr. skupina B7 molekúl na B-bunke), takže táto bunka v neprítomnosti kostimulačného signálu dodáva T-bunke len antigénový signál, čím indukuje toleranciu.

V súlade s tým sa v spôsoboch podľa tohto vynálezu subjektu príjemcu podáva alogénna alebo xenogénna bunka. Táto alogénna alebo xenogénna bunka je schopná prezentovať antigén T-bunkám príjemcu, a je to napríklad B lymfocyt, "profesionálny" antigén prezentujúca bunka (napr. monocyt, dendritická bunka, Langerhansova bunka) alebo iná bunka, ktorá prezentuje antigén imúnnym bunkám (napr. keratinocyt, endotelová bunka, astrocyt, fibroblast, oligodendrocyt). Ďalej je výhodné, že alogénna alebo xenogénna bunka má zníženú schopnosť stimulovať kostimulačný signál v T-bunkách príjemcu. Napríklad, alogénna alebo xenogénna bunka môže postrádať expresiu alebo prezentovať len nízke hladiny kostimulačných molekúl, ako sú proteíny skupiny B7 (napr. B7-1 a B7-2). Expresiu kostimulačných molekúl na potenciálnych alogénnych alebo xenogénnych bunkách, ktoré sa majú použiť v spôsobe podľa tohto vynálezu, možno dosiahnuť štandardnými metódami, napríklad prietokovou cytometriou s použitím protilátok, namierených proti kostimulačným molekulám.

Výhodnými alogénnymi alebo xenogénnymi bunkami na indukovanie T-bunkovej tolerancie sú lymfoidné bunky, napríklad periférne krvné lymfocyty alebo slezinové bunky. Výhodnými lymfoidnými bunkami na indukovanie T-bunkovej

tolerancie sú B-bunky. B-bunky možno čistením získať zo zmiešanej populácie buniek (napr. iné typy buniek v periférnej krvi alebo slezine) štandardnými metódami na separáciu buniek. Napríklad spojené bunky možno odstrániť kultiváciou slezinových buniek na plastických miskách a izoláciou populácie nespojených buniek. T-bunky možno odstrániť zo zmiešanej populácie buniek pôsobením anti-T-bunkovou protilátkou (napr. anti-Thy1.1 a/alebo anti-Thy1.2) a komplementom. V jednom uskutočnení sa pokojové lymfoidné bunky, s výhodou pokojové B-bunky, použijú ako antigén prezentujúce bunky. Pokojové lymfoidné bunky, ako sú pokojové B-bunky, sa dajú izolovať metódami, známymi v doterajšom stave techniky, napríklad na základe ich malej veľkosti a hustoty. Pokojové lymfoidné bunky možno izolovať napríklad protiprúdovým centrifugačným premývaním, ako je popísané v príklade 1. Pri použití protiprúdového centrifugačného premývania možno získať malú populáciu pokojových lymfoidných buniek, zbavenú buniek, ktoré môžu aktivovať T-bunkové odpovede, odobraním frakcie(í) pri 14 - 19 ml/min., s výhodou 19 ml/min. (pri 3200 ot./min.). Alternatívne možno malé, pokojové lymfocyty (napr. B-bunky) izolovať nespojitým odstredovaním s gradientom hustoty, napríklad s použitím Ficollovho alebo Percollovho gradientu, a po odstredovaní sa dá získať vrstva, obsahujúca malé, pokojové lymfocyty. Malé pokojové B-bunky sa tiež dajú odlíšiť od aktivovaných B-buniek testovaním na expresiu kostimulačných molekúl, ako sú B7-1 a/alebo B7-2, na povrchu aktivovaných B-buniek štandardnými metódami (napr. imunofluorescenciou).

Alogénne alebo xenogénne bunky, podané príjemcovi, pôsobia, prinajmenšom čiastočne, tak, aby sa prezentovali antigény darcu T-bunkám príjemcu. Teda bunky prezentujú antigény, ktoré sú tiež prezentované tkanivom alebo orgánom darcu. Typicky sa toto môže uskutočniť použitím alogénnych

alebo xenogénnych buniek, získaných z tkanivového alebo orgánového transplantátu darcu. Napríklad periférne lymfoidné bunky, B-bunky alebo slezinové bunky darcu tkaniva alebo orgánu možno izolovať a použiť pri spôsobe podľa tohto vynálezu. Alternatívne možno alogénne alebo xenogénne bunky získať z iného zdroja než od darcu tkaniva alebo orgánu, pokiaľ tieto bunky majú antigénové determinanty spoločné s darcom tkaniva alebo orgánu. Napríklad možno použiť alogénne alebo xenogénne bunky, ktoré prezentujú (väčšinu alebo všetky) antigény toho istého hlavného histokompatibilného komplexu ako tkanivo alebo orgán darcu. Teda možno použiť alogénne alebo xenogénne bunky zo zdroja, ktorý zodpovedá MHC haplotypu darcu tkaniva alebo orgánu (napr. blízkeho príbuzného darcu transplantátu).

III. Podávanie buniek a gp39-antagonistov

T-bunková tolerancia voči orgánovému alebo tkanivovému transplantátu sa dá indukovať podľa tohto vynálezu podaním príjemcovi transplantátu gp39-antagonistu v spojení s alogénnou alebo xenogénnou bunkou, ktorá prezentuje antigény darcu a interaguje s T-bunkami príjemcu cez gp39. Vo výhodnom uskutočnení sa alogénna alebo xenogénna bunka a gp39-antagonista podávajú príjemcovi súbežne alebo súčasne. Alternatívne sa gp39 antagonista môže podať pred podaním alogénnych alebo xenogénnych buniek, napríklad, keď antagonistom je protilátka s dlhým polčasom života. Vo výhodnom uskutočnení sa antagonista a alogénne alebo xenogénne bunky podávajú príjemcovi pred transplantáciou orgánu alebo tkaniva príjemcovi (t.j. príjemca je vopred ošetrovaný antagonistom a bunkami). Napríklad podanie alogénnych alebo xenogénnych buniek a antagonistu možno uskutočniť niekoľko dní (napr. päť až osem dní) pred transplantáciou tkaniva alebo orgánu.

Zistilo sa, že podanie jedinej dávky alogénnych buniek (v kombinácii s antagonistom) je postačujúce na indukovanie T-bunkovej tolerancie voči tkanivu alebo orgánu darcu (pozri príklad 1). Počet podaných buniek sa môže meniť v závislosti od typu použitých buniek, typu tkanivového alebo orgánového transplantátu, hmotnosti príjemcu, celkového stavu príjemcu a od iných premenných, známych skúsenému odborníkovi. Vhodný počet buniek na použitie pri spôsobe podľa tohto vynálezu môže stanoviť osoba, štandardne skúsená v tejto oblasti, bežnými metódami (napríklad, ako je popísané v príklade 1). Bunky sa podávajú vo forme a cestou, ktoré sú vhodné na indukovanie T-bunkovej tolerancie u príjemcu. Bunky možno podávať vo fyziologicky prijateľnom roztoku, ako je pufrovaný solný roztok alebo podobný nosič. Bunky možno s výhodou podať intravenózne.

Antagonista podľa tohto vynálezu sa subjektu podáva v biologicky kompatibilnej forme, vhodnej na podávanie liečiva *in vivo*, aby sa indukovala T-bunková tolerancia. Pod "biologicky kompatibilnou formou, vhodnou na podávanie *in vivo*" sa myslí forma antagonistu, ktorý sa má podať, pri ktorej sú akékoľvek toxické účinky vyvážené terapeutickými účinkami zlúčeniny. Výraz "subjekt" má zahrňovať živé organizmy, u ktorých sa dá vyvolať imunitná odpoveď, napr. cicavce. Príklady subjektov zahrňujú ľudí, psy, mačky, myši, krysy a ich transgénne druhy. Ich gp39-antagonista sa môže podávať v ľubovoľnej farmakologickej forme, voliteľne s farmaceuticky prijateľným nosičom. Pod podaním terapeuticky účinného množstva antagonistu sa rozumie množstvo, účinné v dávkach a v časových intervaloch, nevyhnutných na dosiahnutie požadovaného výsledku (napr. T-bunkovej tolerancie). Napríklad terapeuticky účinné množstvo antagonistu gp39 sa môže meniť podľa faktorov, ako sú stav choroby, vek, pohlavie a hmotnosť jednotlivca, a od schopnosti antagonistu vyvolať požadovanú odpoveď u tohto

jednotlivca. Dávkovacie režimy možno nastaviť tak, aby sa dosiahla optimálna terapeutická odpoveď. Napríklad možno podať niekoľko delených dávok denne, alebo túto dávku možno primerane znížiť podľa naliehavosti terapeutickkej situácie. Ako je popísané v príklade 1 pre liečenie anti-gp39 protilátkou, účinný liečebný režim môže zahŕňať začatie podávania protilátky pred transplantáciou tkaniva alebo orgánu (napr. päť až osem dní pred transplantáciou), po ktorom nasleduje opätovné podávanie protilátky (napr. každý druhý deň) po dobu niekoľkých týždňov (napr. dvoch až siedmich týždňov) po transplantácii.

Aktívna zlúčenina (napr. antagonista, ako je protilátka) sa môže podávať bežným spôsobom, ako je injekcia (podkožná, vnútrožilová, atď.), orálne podanie, inhalácia, transdermálna aplikácia alebo rektálne podanie. V závislosti od cesty podania môže byť aktívna zlúčenina potiahnutá materiálom na ochranu zlúčeniny pred účinkom enzýmov, kyselín a iných prirodzených podmienok, ktoré by mohli zlúčeninu inaktivovať. Výhodnou cestou je podanie vnútrožilovou injekciou.

Na podanie antagonistu gp39 iným než parenterálnym podaním môže byť nevyhnutné potiahnuť antagonistu materiálom, ktorý zabráni jeho inaktivácii, alebo súčasne s ním ho podávať. Napríklad antagonistu možno podávať jednotlivcovi vo vhodnom nosiči alebo riedidle, podávať ho súčasne s inhibítormi enzýmov alebo vo vhodnom nosiči, ako sú lipozómy. Farmaceuticky prijateľné riedidlá zahŕňujú soľné a vodné pufovacie roztoky. Inhibítory enzýmov zahŕňujú pankreatický trypsínový inhibítor, diizopropylfluórfosfát (DEP) a trasylol. Lipozómy zahŕňujú emulzie voda-v-oleji-vo-vode, ako aj bežné lipozómy (Strejan a spol., J.Neuroimmunol. 7, 27, 1984).

Aktívna zlúčenina sa tiež môže podať parenterálne alebo intraperitoneálne. Disperzie sa tiež môžu pripraviť

v glycerole, kvapalných polyetylénglykoloch a v ich zmesiach a v olejoch. Za normálnych podmienok skladovania a použitia môžu tieto prípravky obsahovať konzervačný prostriedok, aby sa zabránilo rastu mikroorganizmov.

Farmaceutické kompozície, vhodné na injekčné použitie, zahŕňujú sterilné vodné roztoky (ak sú rozpustné vo vode) alebo disperzie a sterilné prášky na prípravu sterilných injektovateľných roztokov alebo disperzií podľa receptu. Vo všetkých prípadoch musí byť kompozícia sterilná a musí byť tekutá do takej miery, aby bola ľahko injektovateľná. Musí byť stabilná pri podmienkach výroby a skladovania a musí byť chránená pred kontaminačným účinkom mikroorganizmov, ako sú baktérie a huby alebo plesne. Nosičom môže byť rozpúšťadlo alebo disperzné médium, obsahujúce napríklad vodu, etanol, polyol (napríklad glycerol, propylénglykol a kvapalný polyetylénglykol a podobne), a ich vhodné zmesi. Správna tekutosť sa dá udržať napríklad použitím povlaku, ako je lecitín, udržaním požadovanej veľkosti častíc v prípade disperzie a použitím povrchovo aktívnych látok. Ochrana pred účinkom mikroorganizmov sa dá dosiahnuť rôznymi antibakteriálnymi a fungicídnymi prostriedkami, ako sú napríklad parabény, chlórbutanol, fenol, kyselina askorbová, timerosal, a podobne. V mnohých prípadoch bude výhodné zahrnúť do kompozície izotonické prostriedky, napríklad cukry, polyalkoholy, ako je manitol, sorbitol, chlorid sodný. Predĺžená absorpcia injektovateľných kompozícií sa dá dosiahnuť zahrnutím do kompozície prostriedku, ktorý oneskoruje absorpciu, napríklad monostearátu hlinitého a želatíny.

Sterilné injektovateľné roztoky možno pripraviť včlenením aktívnej zlúčeniny (napr. antagonistu gp39) v požadovanom množstve do vhodného rozpúšťadla s jednou alebo s kombináciou vyššie vymenovaných prísad podľa potreby, s následnou sterilizáciou. Vo všeobecnosti sa

disperzie pripravujú včlenením aktívnej zlúčeniny do sterilného nosiča, ktorý obsahuje základné disperzné médium a požadované ďalšie prísady z tých, ktoré sme vymenovali vyššie. V prípade sterilných práškov na prípravu sterilných injektovateľných roztokov sú výhodnými metódami prípravy vákuové sušenie a sušenie vymrazovaním, ktoré poskytuje prášok aktívnej prísady (napr. antagonistu), plus akékoľvek ďalšie požadované prísady z predtým sterilne prefiltrovaného roztoku.

Ak sa aktívna zlúčenina vhodne chráni, ako sme popísali vyššie, proteín sa môže podávať orálne, napríklad s inertným riedidlom alebo s asimilovateľným jedlým nosičom. Ako sa tu používa, výraz "farmaceuticky prijateľný nosič" zahrnuje ktoréhokoľvek a všetky rozpúšťadlá, disperzné médiá, povlaky, antibakteriálne a fungicídne prostriedky, izotonické a absorpciu oneskorujúce prostriedky, a podobne. Použitie takýchto médií a prostriedkov pre farmaceuticky aktívne látky je dobre známe v doterajšom stave techniky. S výnimkou prípadov, kedy niektoré bežné médium alebo prostriedok je nekompatibilný s aktívnou zlúčeninou, predpokladá sa ich použitie v terapeutických kompozíciách. Do kompozícií tiež možno včleniť ďalšie účinné zlúčeniny.

Zvlášť výhodné je formulovať parenterálne kompozície vo forme jednotkových dávok za účelom jednoduchého podávania a rovnomernosti dávky. Forma jednotkovej dávky, ako sa tu používa, sa vzťahuje na fyzicky oddelené jednotky, vhodné ako jednotkové dávky pre subjekty cicavcov, ktoré sa majú liečiť; pričom každá jednotka obsahuje vopred stanovené množstvo aktívnej zlúčeniny, vypočítané na dosiahnutie požadovaného terapeutického účinku v spojení s požadovaným farmaceutickým nosičom. Špecifikácia jednotkových dávkových foriem podľa tohto vynálezu je určená a priamo závisí od a) jednoznačnej charakteristiky aktívnej zlúčeniny a konkrétneho terapeutického účinku, ktorý sa má dosiahnuť, a b) obmedzení, vlastných v doterajšom stave techniky

príprave takej aktívnej zlúčeniny na ovplyvnenie citlivosti jednotlivcov.

Po alebo súbežne s tu popísaným tolerizačným režimom sa tkanivo alebo orgán darcu transplantuje príjemcovi bežnými metódami.

IV. Použitie spôsobov podľa tohto vynálezu

Spôsoby podľa tohto vynálezu možno použiť v mnohých situáciách transplantácie tkanív alebo orgánov. Tieto spôsoby možno použiť na indukovanie T-bunkovej tolerancie u príjemcu transplantátu tkaniva alebo orgánu, ako sú pankreatické ostrovčeky, pečeň, oblička, srdce, pľúcny lalok, koža, sval, nervové tkanivo, žalúdok a črevá. Teda spôsoby podľa tohto vynálezu možno použiť pri liečení chorôb alebo stavov, ktoré vyžadujú transplantáciu tkaniva alebo orgánu (napr. transplantáciu pečene na liečenie hypercholesterolémie, transplantáciu svalových buniek na liečenie svalovej dystrofie, transplantáciu nervového tkaniva na liečenie Huntingtonovej choroby alebo Parkinsonovej choroby, atď.). Vo výhodnom uskutočnení transplantované tkanivo zahŕňa pankreatické ostrovčeky. V súlade s tým tento vynález zahŕňa spôsob liečenia cukrovky transplantáciou buniek pankreatických ostrovčekov. Tento spôsob zahŕňa podávanie subjektu, ktorý potrebuje liečenie: 1) alogénnych alebo xenogénnych buniek, ktoré prezentujú antigény darcu, 2) antagonistu molekuly, prezentovaného na T-bunkách príjemcu, ktorý sprostredkuje od kontaktu závislé pomocné efektorové funkcie, ako je gp39 antagonist (napr. anti-gp39 protilátka), a 3) buniek pankreatických ostrovčekov. S výhodou sa alogénne alebo xenogénne bunky a antagonist podávajú príjemcovi pred podaním pankreatických ostrovčekov.

Vynález ďalej ilustruje nasledujúci príklad, ktorý sa

nemá chápať ako obmedzujúci. Obsah všetkých odkazov, patentov a publikovaných patentových prihlášok, citovaných v tejto prihláške, je sem týmto zahrnutý odkazom.

PRÍKLAD 1: Indukcia tolerancie voči aloimplantátom pankreatických ostrovčekov ošetrovaním príjemcu alogénnymi bunkami a anti-gp39

Súčasná alotransplantačná štúdia závisia od zovšeobecnenej imunosupresie, ktorá nešpecificky odstraňuje imunitné efektorové funkcie. Avšak imunosupresívne liečivá môžu spôsobiť závažné vedľajšie účinky. Naviac sa dokázalo, že alotransplantácia Langerhansových ostrovčekov na liečenie cukrovky pri tomto prístupe nezaberá (pozri napr. Robertson, R.P., N.Engl.J.Med. 327, 1861, 1992). Terapie protilátkami, namierenými proti T-bunkám, môžu umožniť úspešnú aloimplantáciu ostrovčekov u hlodavcov, ale tento prístup tiež vedie jednotne k celkovej imunosupresii (Carpenter, C.B., N.Engl.J.Med. 322, 1224, 1990; Roark, J.H. a spol., Transplantation 54, 1098, 1992; Kahan, B.D., Curr.Opin.Immunol. 4, 553, 1992). V tomto príklade sa tolerancia voči ostrovčekom aloimplantátom indukovala u príjemcu transplantátu ovplyvnením prezentácie aloantigénu T-bunkám, aby sa zabránilo ich aktivácii. Prežívanie ostrovčekom aloimplantátov u chemicky diabetických C57BL/6(H-2^b) myší sa skúmalo s použitím nasledujúceho postupu:

Indukovanie cukrovky

Samce C57BL/6J (H-2^b) myší sa udržiavali diabetické vnútrožilovým podávaním streptozotocínu (140 mg/kg). Permanentná cukrovka sa potvrdila preukázaním koncentrácie glukózy v plazme > 400 mg/dl v troch prípadoch v priebehu jedného týždňa.

Frakcionácia alogénnych slezinových buniek

Alogénne bunky darcu na predbežné ošetrenie príjemcu transplantátu sa získali z (C57 x BALB/c) (H-2^{b/d}) F₁ hybridných zvierat, aby sa zabránilo chorobe transplantát-kontra-hostiteľ. Na izolovanie malých lymfocytových buniek sa suspenzie slezinových buniek z 8 týždňov starých (C57 x BALB/c) F₁ samíc myší zbavili erytrocytov a potom sa frakcionovali podľa veľkosti premývaním, ako popísali Tony, H.P. a spol., J.Exp.Med. 161, 223, 1985; a Gosselin, E.J. a spol., J.Immunol. 140, 1408, 1988. Stručne povedané, malé lymfocyty sa izolujú protiprúdovým centrifugačným premývaním, napríklad s použitím modelu centrifúgy J-6B (Beckman Instruments, Palo Alto CA). Na približne $1 - 5 \times 10^8$ buniek v 8 ml kultivačného média alebo rovnovážneho soľného roztoku s 1,5 % zárodkového hovädzieho séra sa pôsobí deoxyribonukleázou, vložia sa do premývacej komory so začiatočným protiprúdovým prietokom 13,5 ml/min. a odstredujú sa pri 4 °C konštantnou rýchlosťou 3200 ot./min.. Frakcia malých buniek s veľmi malým množstvom kontaminujúcich veľkých buniek sa eluuje typicky pri 14 - 19 ml/min., hoci presný prietok môže závisieť od média, v ktorom sú bunky suspendované. V tu popísaných pokusoch sa frakcia malých buniek odoberala pri 19 ml/min. (pri 3200 ot./min.). Táto frakcia sa úplne zbavila žiareniu odolnej (3000 rad) sprievodnej bunkovej frakcie, keď sa testovala s T-bunkovými líniami, špecifickými buď pre králičí IgG a H2^d (CDC35) alebo aloreaktívnymi voči H2^b (D10.G4). Malé bunky a nefrakcionované bunky sa dvakrát premyli v médiu bez séra predtým, než sa injektovali do chvostových žíl príjemcu aloimplantátu. Použilo sa približne $40 - 100 \times 10^6$ (C57 x BALB/c) F₁ (H-2^{b/d}) nefrakcionovaných slezinových buniek alebo $40 - 100 \times 10^6$ (C57 x BALB/c) F₁ (H-2^{b/d}) eluovaných malých slezinových buniek.

Predbežné ošetrovanie príjemcov transplantátov

Príjemcovia transplantátov sa predbežne ošetrili buď nefrakcionovanými (C57 x BALB/c)F₁(H-2^{b/d}) alogénnymi slezinovými bunkami, eluovanou "frakciou 19" slezinových buniek s malým priemerom, ktoré boli zbavené APC aktivity (izolované, ako bolo popísané vyššie), anti-gp39 monoklonálnou protilátkou (MR1, pozri príklad 2, pokus 3), alebo kombináciou alogénnych buniek a anti-gp39 protilátky. Bunky frakcie 19 sa testovali vo dvoch rôznych dávkových oblastiach, pri nízkej dávke 40 - 44 x 10⁶ buniek alebo pri vysokej dávke 77 - 88 x 10⁶ buniek. Kontrolné zvieratá neboli ošetrované ani alogénnymi bunkami ani protilátkou. Alogénne bunky sa podali príjemcom transplantátu injekciou do chvostovej žily päť až osem dní pred transplantáciou ostrovčekového aloimplantátu. Ošetrovanie MR1 protilátkou sa uskutočňovalo dávkou 250 g/myš dvakrát týždenne, počnúc 7 dní pred transplantáciou ostrovčekov, a pokračovalo sa v ňom 2 - 7 týždňov alebo do zlyhania implantátu. Prvá injekcia protilátky sa typicky podala v ten istý deň ako prvá injekcia alogénnych slezinových buniek.

Transplantácia ostrovčekového aloimplantátu

Alogénne BALB/c(H-2^d) ostrovčky sa izolovali modifikovanou metódou štiepenia kolagenázy (Gottlieb, P.A. a spol., Diabetes 39, 643, 1990). Ostrovčky sa v dávke 30 ostrovčekov/g telesnej hmotnosti implantovali do subrenálneho puzdra príjemcu, C57B1/6J(H-2^b) myši, ihneď po izolovaní. Prežívanie implantátu sa definovalo ako udržanie koncentrácie glukózy v plazme 200 mg/dl.

Výsledky

V prvej sérii pokusov sa príjemcovia ostrovčekových aloimplantátov predbežne ošetrili buď samotnými alogénnymi slezinovými bunkami alebo samotnou anti-gp39 protilátkou. Ako je znázornené na obrázku 1, bez predbežného ošetrenia slezinovými bunkami boli všetky ostrovčekové aloimplantáty odmietnuté do 13 dní od transplantácie (9 2 d; rozsah 5 - 13; N = 23). Zlé prežívanie ostrovčekov sa pozorovalo tiež u zvierat, ošetrených len nefrakcionovanými slezinovými bunkami s normálnou APC aktivitou (6 3 d; rozsah 4 - 12 d; N = 7) alebo malou dávkou (40 - 44 x 10⁶ buniek) buniek frakcie 19, zbavených APC aktivity (7 3 d; rozsah 3 - 14 d, N = 16). Naproti tomu injekcia vyššej dávky malých splenocytov frakcie 19, zbavených APC (75 - 88 x 10⁶ buniek), predĺžila prežívanie aloimplantátu (19 10 d; rozsah 7 - 40 d; N = 16). Tento účinok na trvanie prežívania transplantátu bol štatisticky významný ($F_{3,58} = 17,3$, $p < 0,001$ pri porovnaní so skupinami, ktoré neboli ošetrené ničím, alebo boli ošetrené transfúziami celej sleziny alebo nižšou dávkou slezinových buniek frakcie 19), ale nebol trvalý. Predĺžené, ale konečné prežívanie alogénnych ostrovčekov u diabetických príjemcov malých buniek frakcie 19, zbavených APC, naznačovalo, že tieto bunky samotné nemôžu udržať prežívanie aloimplantátu. Ďalšia skupina príjemcov transplantátu bola ošetrená 77 - 88 x 10⁶ bunkami frakcie 20. Táto frakcia sa tiež skladala prevažne z malých lymfocytov, ale líšila sa od populácie frakcie 19 tým, že vykazovala merateľnú APC funkciu. Príjemcovia týchto buniek (N = 6) odmietli svoje transplantáty okamžite (stredná hodnota = 8,5 d, rozsah 6 - 12). Iná skupina príjemcov transplantátu bola ošetrená len anti-gp39 monoklonálnou protilátkou MR1. Obrázok 1 ilustruje, že ostrovčekové

aloimplantáty zlyhali v priebehu 15 dní u 7/11 myší, ošetrovaných len anti-gp39 mAb. Zvyšné štyri myši mali funkčné implantáty pri skončení pokusu na 48. deň. Výsledky demonštrujú, že podávanie príjemcovi MR1 anti-gp39 protilátky samotnej môže predĺžiť prežívanie ostrovčekového aloimplantátu (stredná hodnota 20 = 19 d; rozsah 9 až neurčito; N = 5). Stupeň predĺženia bol štatisticky podobný stupňu, ktorý sa dosiahol s použitím vyššej dávky samotných slezinových buniek frakcie 19 a bol významne dlhší než stupeň, ktorý sa dosiahol u ďalších troch skupín ($p < 0,05$).

Vyššie popísaná skupina pokusov naznačila, že samotné ošetrovanie vysokými dávkami slezinových buniek frakcie 19, zbavených APC, alebo anti-gp39 mAb môže zvýšiť prežívanie aloimplantátu z pankreatických ostrovčekov v porovnaní so žiadnym ošetrovaním. Avšak ani samotné ošetrovanie nebolo účinné pri indukovaní dlhodobej tolerancie voči ostrovčekovým aloimplantátom u príjemcu. V nasledujúcej sérii pokusov sa ošetrovanie príjemcu alogénnymi slezinovými bunkami kombinovalo s ošetrovaním anti-gp39. Zistilo sa, že kombinované podanie alogénnych slezinových buniek a anti-gp39 je účinnejšie než ktorejkoľvek samotnej zložky. Výsledky sú znázornené na obrázku 2, kde každá krivka reprezentuje údaje o jednotlivej myši. Otvorené symboly označujú príjemcov, u ktorých ostrovčekový aloimplantát spontánne zlyhal. Plné symboly označujú myši, ktorých ostrovčekové implantáty boli funkčné pri skončení pokusu. Obrázok 2 (časť B obrázku) ukazuje, že neobmedzené prežívanie implantátu sa dosiahlo u všetkých zvierat, ošetrovaných 7 týždňov anti-gp39 mAb a jedinou injekciou slezinových buniek (N = 6) frakcie 19, zbavených APC. Zmena tohto protokolu skrátením trvania ošetrovania anti-gp39 zoslabila, ale nezrušila priaznivý účinok na prežívanie transplantátu. Neobmedzené prežívanie transplantátu sa dosiahlo u 6/8 príjemcov, keď sa anti-gp39 mAb podával len

2 týždne v kombinácii so slezinovými bunkami frakcie 19 (obrázok 2, časť A obrázku). Neobmedzené prežívanie transplantátu sa tiež pozorovalo u príjemcov, ošetrovaných anti-gp39 po dobu 2 alebo 7 týždňov v kombinácii s jednou injekciou nefrakcionovaných alogénnych slezinových buniek.

Na potvrdenie funkcie ostrovčekového implantátu a neprítomnosti vylučovania inzulínu zvyškovými natívnymi ostrovčekmi, nezničenými streptozotocínovým ošetrením, sa odstránili obličky nesúce subrenálne implantáty. Vo všetkých prípadoch jednostranná nefrektómia viedla k návratu hyperglykémie (> 300 mg/dl) do troch dní.

Ostrovčekové aloimplantáty a natívny pankreas sa histologicky skúmali u všetkých zvierat, buď po zlyhaní transplantátu alebo na konci pokusu. Histologické rezy ostrovčekových aloimplantátov v obličkách príjemcov frakcionovaných alogénnych malých lymfocytov a priebežného (7 týždňov) ošetrovania MR1 mAb vykazovali početné neporušené ostrovčeky, viditeľné pod obalom obličky, ktoré boli zbavené mononukleárnej infiltrácie a obsahovali dobre granulovaný inzulín a glukagón-pozitívne bunky. Na rozdiel od toho histologické rezy ostrovčekových aloimplantátov v obličkách príjemcov, ošetrovaných samotným anti-gp39 mAb, vykazovali charakteristický intenzívny zápal s mononukleárnymi bunkami a poškodenie sprievodných ostrovčekových buniek. Vo všetkých hostiteľských pankreasoch bola morfológia ostrovčekov rovnomerne konzistentná so streptozotocínovou cukrovkou.

PRÍKLAD 2: Príprava a charakterizácia anti-gp39 protilátok

Pokus 1 - Protilátky, namierené proti ľudskému gp39

Na indukovanie antigén-špecifickej T-bunkovej tolerancie v humánnom subjekte je výhodné podať protilátku,

namierenú proti ľudskému gp39. Na prípravu myších anti-humánnych gp39 monoklonálnych protilátok sa použil nasledujúci postup. Balb/c myši sa imunizovali rozpustným gp39 spojovacím proteínom gp39-CD8 v Úplnom Freundovom Adjuvans (CFA). Myši potom o 6 týždňov dostali provokačnú dávku rozpustného gp39-CD8 v Neúplnom Freundovom Adjuvans (IFA). Rozpustný gp39-CD8 bol podaný v rozpustnej forme 4 týždne po sekundárnej imunizácii. Myši potom dostali druhú injekciu s aktivovanými ľudskými periférnymi krvnými lymfocytmi o 2 týždne a následnú konečnú dávku rozpustného gp39-CD8 po ďalších dvoch týždňoch. Splenocyty sa spojili s NS-1 spojovacím partnerom vo štvrtom dni po konečnej imunizácii podľa štandardného protokolu.

Klony, vytvárajúce anti-humánne gp39 protilátky, sa vybrali na základe násobného skrínového postupu. Klony sa najprv skrínovali doštičky viažúcimi testami s použitím gp39-CD8. Pozitívne klony sa potom skrínovali voči kontrolnému CD8 spojovaciemu proteínu CD72-CD8. Klony, ktoré boli pozitívne pri CD8-CD72 doštičky viažúcom teste, sa vyradili. Zvyšné klony sa potom skrínovali na pokojových a 6 hodín aktivovaných ľudských periférnych krvných lymfocytoch (PBL) prietokovou cytometrickou analýzou. Hybridómami farbením aktivované, ale nie pokojové PBL sa považovali za pozitívne. Nakoniec sa zvyšné klony testovali na svoju schopnosť blokovat viazanie CD40Ig na doštičkami viazaný gp39.

V doštičky viažúcich testoch sa pôvodne skrínovalo približne 300 klonov voči gp39-CD8 a CD72-CD8. Zistilo sa, že 30 z týchto klonov detekovalo doštičkami viazaný gp39 a nie CD8. Tieto klony sa potom skrínovali na detekciu gp39 na aktivovaných ľudských PBL. Približne 15 klonov detekovalo molekulu na aktivovaných PBL, ale nie na pokojových bunkách. Špecifickosť sa ďalej potvrdila stanovením schopnosti klonov blokovat CD40Ig detekciu doštičkami viazaného gp39. 3 z 10

testovaných klonov blokujú CD40Ig viazanie v tomto teste. Tieto klony boli 3E4, 2H5 a 2H8. Také klony sú výhodné na použitie v tu popísaných spôsoboch. Klony, ktoré sa pri testovaní ukázali byť pozitívnymi na aktivovaných, ale nie na pokojových PBL, sa tiež skrínovali na reaktivitu s aktivovaným krysím T-bunkovým klonom POMC8. Klon 2H8 vykázal krížovú reakciu s touto krysou T-bunkovou líniou.

Pokus 2 - Protilátky, namierené proti ľudskému gp39

Podobný postup imunizácie, ako je popísaný v pokuse 1, sa použil na prípravu ďalších protilátok, namierených proti ľudskému gp39. Jedna Balb/c myš sa imunizovala rozpustným gp39-CD8 v CFA s následnou provokačnou dávkou 6 hodín aktivovaných ľudských periférnych krvných lymfocytov o 4 týždne neskôr. Myš potom dostala dávku rozpustného gp39-CD8 4 dni pred spojením splenocytov s NS-1 spojovacím partnerom podľa štandardného protokolu. Skrínovanie hybridómových klonov sa uskutočnilo prietokovým cytometrickým farbením 6 hodín aktivovaných ľudských PBL. Vybrali sa farbením aktivované klony, ale nie pokojové ľudské PBL. Na ďalšiu analýzu sa vybralo šesť klonov, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 a 89-79.

Špecifickosť vybraných protilátok sa potvrdila niekoľkými testami. Po prvé, prietoková cytometrická analýza demonštrovala, že všetkých šesť mAb farbením aktivovaných, ale nie pokojových periférnych krvných T-buniek (pozri obrázok 3B a 3C ako reprezentatívny príklad, znázorňujúci farbenie aktivovaných T-buniek so 4D9-8 a 4D9-9). Expresia molekuly, rozoznanej každou z týchto šiestich protilátok, je detekovateľná do 4 hodín po aktivácii, je maximálna medzi 6 a 8 hodinami po aktivácii a nedá sa detekovať 24 hodín po aktivácii. Všetkých šesť mAb rozoznáva molekulu, prezentovanú na aktivovaných CD3⁺ PBL, prevažne CD4⁺

fenotypu, ale časť $CD8^+$ T-buniek tiež prezentuje túto molekulu. Expresiu molekuly, rozoznanej uvedenými šiestimi mAb, inhibuje prítomnosť cyklosporínu A v kultivačnom médiu, ako je expresia gp39 (pozri obrázky 4A a 4B ako reprezentatívny príklad, znázorňujúce farbenie cyklosporínom ošetrovaných T-buniek 4D9-8 a 4D9-9). Kinetika a distribúcia expresie molekuly, rozoznanej týmito mAb, je identická s kinetikou a distribúciou pre gp39, ako sú detekované spojovacím proteínom ľudského CD40Ig. Navyše, všetkých šesť mAb blokuje farbenie gp39 s CD40Ig (pozri obrázky 5A a 5B ako reprezentatívny príklad, znázorňujúce inhibíciu farbenia gp39 CD40Ig v prítomnosti 4D9-8 a 4D9-9). V ELISA-teste všetkých šesť mAb rozoznáva gp39-CD8, rozpustnú spojovaciu formu gp39 molekuly. Navyše, všetkých šesť mAb imunoprecipituje molekulu približne 36 kd z ^{35}S -metionínom značkovaných aktivovaných ľudských PBL. Imunoprecipitovaná molekula je totožná s molekulou, precipitovanou ľudským CD40Ig spojovacím proteínom.

Funkčná aktivita šiestich vybraných mAb (4D9-8, 4D9-9, 24-32, 24-43, 89-76 a 89-79) sa testovala nasledujúcim spôsobom. Po prvé sa merala schopnosť mAb inhibovať proliferáciu čistených ľudských B-buniek, kultivovaných s IL-4 a rozpustným gp39. Čistené ľudské B-bunky sa kultivovali s gp39 a IL-4 v prítomnosti alebo neprítomnosti čistených monoklonálnych protilátok alebo CD40Ig v dávkach medzi 0 a 12,5 g/ml. B-bunková proliferácia sa stanovila po 3 dňoch v kultúre včlenením tymidínu. Výsledky (znázornené na obrázku 6) demonštrujú, že všetkých šesť mAb môže inhibovať B-bunkovú proliferáciu, indukovanú gp39 a IL-4. mAb 89-76 a 24-31 boli najúčinnšie pri inhibovaní indukovanej B-bunkovej proliferácie.

Potom sa skúmala schopnosť mAb inhibovať B-bunkovú diferenciáciu, meranú tvorbou Ig, indukovanou anti-CD3 aktivovanými T-bunkami a IL-2. Čistené IgD^+ ľudské B-bunky

sa pripravili pozitívnym výberom s FACS a potom sa kultivovali s anti-CD3 aktivovanými ľudskými T-bunkami (ošetrenými mitomycínom C) a IL-2 po dobu 6 dní v prítomnosti alebo neprítomnosti čistených anti-gp39 monoklonálnych protilátok v dávkach medzi 0 a 10 g/ml. Tvorba IgM, IgG a IgA sa zistila pomocou ELISA na 6. deň. Výsledky (uvedené ďalej v tabuľke 1) demonštrujú, že všetkých šesť protilátok môže inhibovať od T-buniek závislú B-bunkovú diferenciáciu, meranú tvorbou IgM, IgG a IgA.

Tabuľka 1

<u>Tvorba imunoglobulínu</u>				
<u>mAb</u>	<u>g/ml</u>	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>	<u>IgA</u>
žiadna	-	17500	6710	4471
4D9-8	0,1	4813	2130	2819
	1,0	4394	2558	1519
	10,0	1081	389	396
4D9-9	0,1	3594	919	1731
	1,0	2659	1233	1606
	10,0	374	448	266
24-31	0,1	3863	981	344
	1,0	1287	314	165
	10,0	1120	596	23
24-43	0,1	6227	4132	432
	1,0	3193	2130	192
	10,0	7021	1232	1081
89-76	0,1	3783	1069	344
	1,0	2180	352	171
	10,0	818	551	19
89-79	0,1	9763	1924	3021
	1,0	2314	460	156
	10,0	183	135	434

Na preskúmanie účinku anti-gp39 mAb na T-bunkové odpovede sa mAb zahrnuli do štandardných reakcií zmiešaných lymfocytov (MLR). 300 000 ľudských periférnych krvných lymfocytov (reagujúce bunky = R) sa kultivovalo so 100 000 ožiarenými alogénnymi periférnymi krvnými lymfocytmi (stimulátory = S) v prítomnosti alebo neprítomnosti anti-gp39 mAb (10 g/ml). Ku kultúram sa pridal 3H-tymidín na 4., 5. a 6. deň a odobrali sa o 18 hodín neskôr. Všetkých šesť anti-humánnych gp39 mAb inhibovalo alo-špecifické odpovede, ako sa nameralo MLR (pozri obrázok 7 ako reprezentatívny príklad, zobrazujúci inhibíciu alo-špecifických odpovedí, keď sa R a S inkubujú v prítomnosti 24-31 alebo 89-76; CTLA4-imunoglobulínový spojovací proteín a anti-CD28 mAb sa použili ako pozitívne kontroly).

Na zistenie, či týchto šesť mAb rozoznáva rôzne epitopy na ľudskej gp39 molekule, uskutočnili sa krížové blokovacie pokusy. Aktivované ľudské PBL sa najprv blokovali každým z uvedených šiestich mAb (25 g/ml nekonjugovanej protilátky). Bunky sa premyli a potom sa zafarbili 10 g/ml biotín-konjugovanej protilátky, po čom nasledovala reakcia fytoeritrín-konjugovaným avidínom (PE-Av). Zafarbenie buniek pomocou PE-Av sa analyzovalo pomocou FACS. Výsledky sú uvedené nižšie v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Blokovanie	Farbiaca protilátka					
	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
Ab						
žiadne	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	ND	-	++++	++++	+++	+++
4D9-9	+++	ND	+++	++++	+++	+++
24-31	+	+	ND	+++	++	++
24-43	+	+	+++	ND	++	+
89-76	,+	+	+++	+++	ND	+++
89-79	+	++	+++	+++	+++	ND

Intenzita zafarbenia a percento pozitívnych buniek sú reprezentované symbolom + (++++ = MI > 200; +++ = MI > 125; ++ = MI > 50; + = MI > 25; - = žiadne zafarbenie nad pozadím). ND = neurčené.

Všetky protilátky blokovali viazanie CD40Ig na aktivované ľudské PBL. Avšak údaje, uvedené v tabuľke 2, jasne demonštrujú neschopnosť niektorých protilátok blokovať viazanie iných protilátok na aktivované ľudské PBL, čo naznačuje, že rozoznávajú rôzne epitopy na molekulách ľudského gp39.

Hybridómy 89-76 a 24-31, vytvárajúce 89-76 a 24-31 protilátky, sa uložili podľa ustanovení Budapeštianskej dohody v Americkej zbierke typov kultúr, Parklawn Drive, Rockville, Md., 2. septembra 1994. Hybridómu 89-76 bolo priradené ATCC prístupové číslo HB11713 a hybridómu 24-31 bolo priradené ATCC prístupové číslo HB11712.

Pokus 3 - Protilátky, namierené proti myšiemu gp39

V jednom uskutočnení tohto vynálezu je gp39 antagonistom anti-myšia gp39 monoklonálna protilátka MR1. Na tvorbu MR1 monoklonálnej protilátky sa použil nasledujúci spôsob, ktorý sa môže použiť na tvorbu iných protilátok, namierených proti gp39.

Škrečky sa imunizovali intraperitoneálne 5×10^6 aktivovanými T_H1 bunkami (d1.6) v týždenných intervaloch po dobu šesť týždňov. Keď bol sérový titer proti murínu T_H1 väčší než asi 1 : 10 000, uskutočnilo sa spojenie buniek polyetylénglykolom s použitím imúnnych splenocytov škrečkov a NS-1. Supernatant zo zdrojov, obsahujúcich rastúce hybridómy, sa testoval prietokovou cytometriou na pokojových a aktivovaných T_H1 . Jeden konkrétny hybridóm, ktorý produkoval Mab, ktorý selektívne rozoznával aktivované T_H1 , sa ďalej testoval a subklonoval, aby sa získal MR1. MR1 sa produkoval v ascitoch a čistil sa iónovými HPLC.

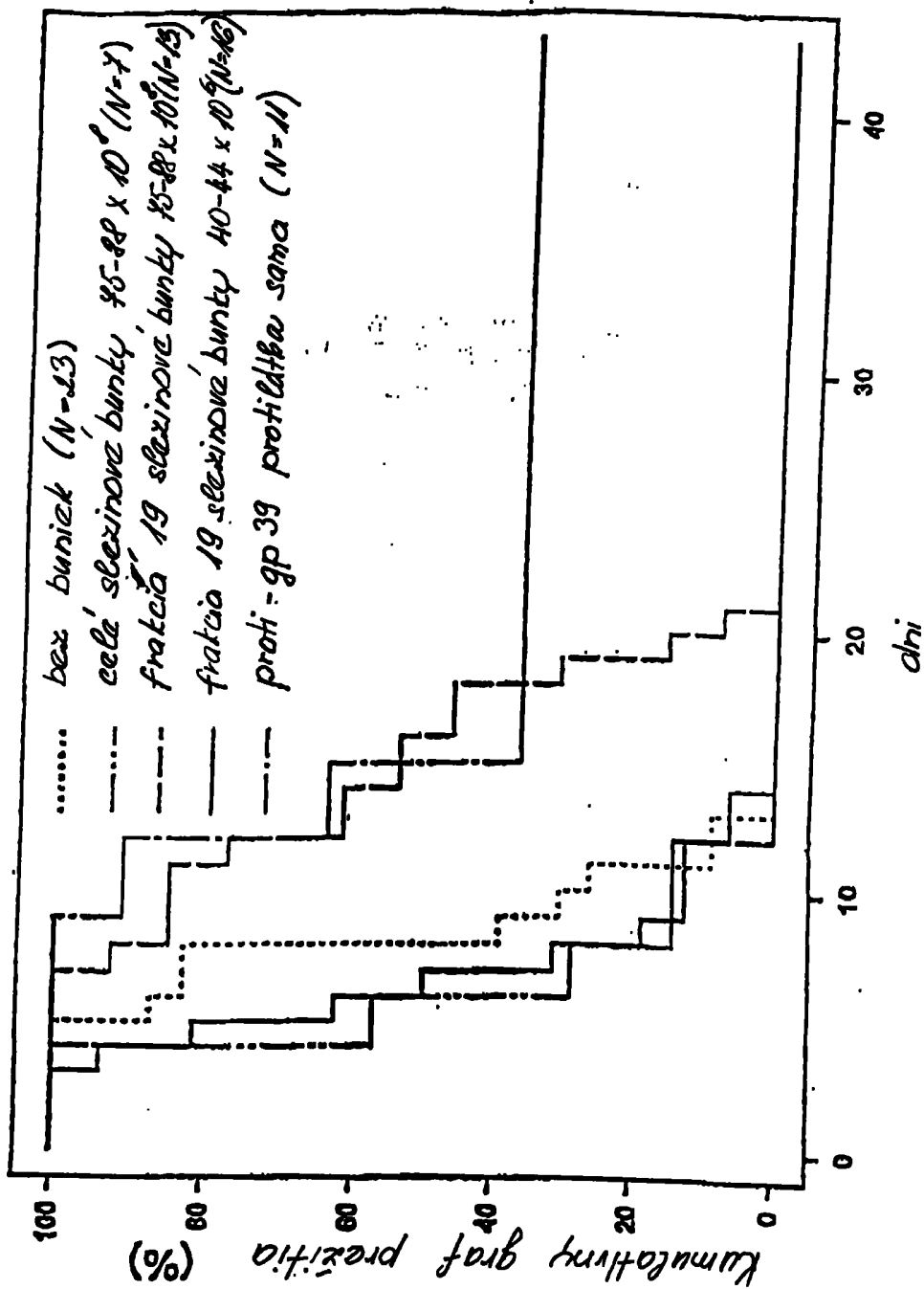
Hybridóm MR1 bol uložený v Americkej zbierke typov kultúr a bolo mu priradené prístupové číslo HB11048.

Odborníci v tejto oblasti zistia, alebo budú schopní zistiť bez použitia iných než rutinných pokusov mnohé ekvivalenty špecifických uskutočnení tohto vynálezu, ktoré sú tu popísané. Predpokladá sa, že takéto ekvivalenty zahrnujú nasledujúce nároky. Obsah všetkých odkazov a publikovaných patentových prihlášok, ktoré sú citované v tejto prihláške, sú sem týmto zahrnuté odkazom.

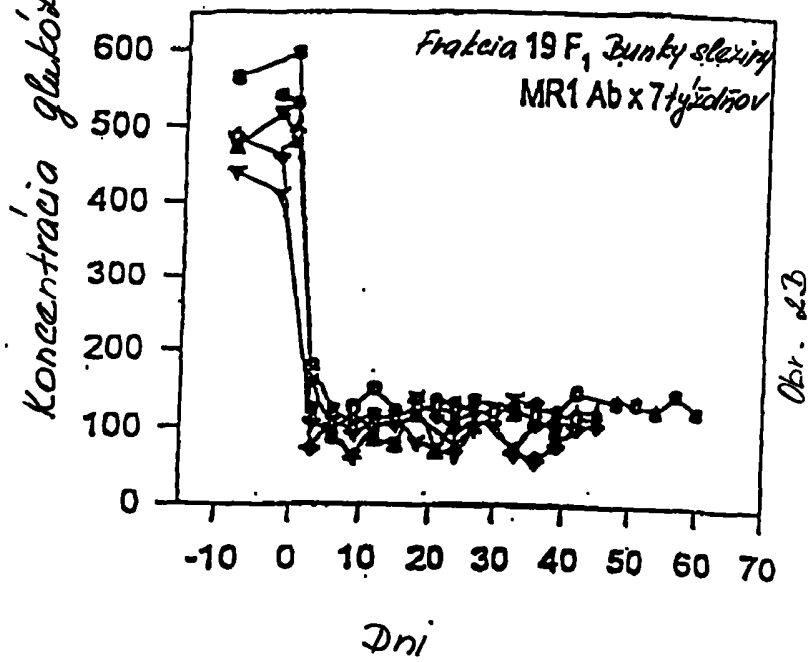
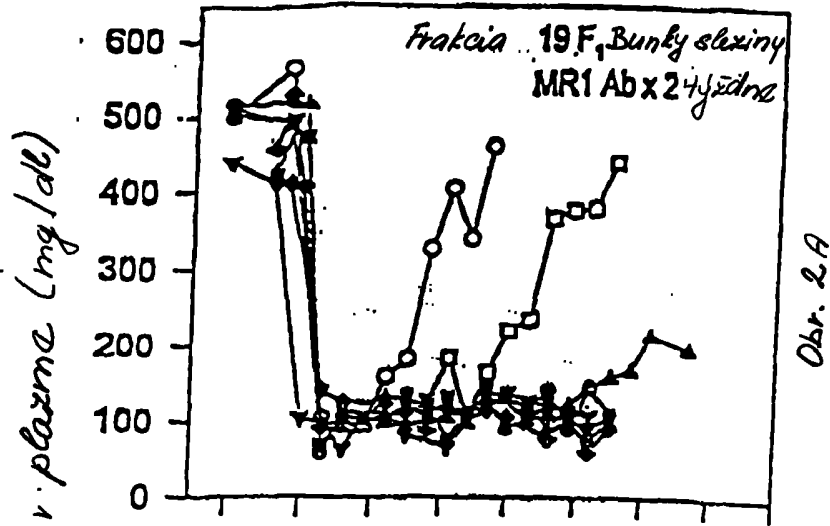
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie alogénnej alebo xenogénnej bunky s antagonistom receptora na povrchu tejto bunky na prípravu liečiva na indukovanie T-bunkovej tolerancie voči tkanivu alebo orgánu darcu u príjemcu.
2. Použitie podľa nároku 1, kde alogénnu alebo xenogénnu bunku reprezentuje najmenej jeden antigén darcu a ktorá má na bunkovom povrchu ligand.
3. Použitie podľa nároku 1, kde alogénnou alebo xenogénnou bunkou je lymfoidná bunka.
4. Použitie podľa nároku 3, kde lymfoidnou bunkou je B-bunka.
5. Použitie podľa nároku 4, kde B-bunkou je pokojová B-bunka.
6. Použitie podľa nároku 1, kde receptorom na povrchu T-bunky príjemcu je gp39.
7. Použitie podľa nároku 1, kde antagonistom je anti-gp39 protilátka.
8. Použitie podľa nároku 7, kde anti-gp39 protilátkou je monoklonálna protilátka alebo antihumánna gp39 protilátka.
9. Použitie podľa nároku 8, kde monoklonálnou protilátkou je MR1 alebo chimérická monoklonálna protilátka.
10. Použitie podľa nároku 8, kde monoklonálnou protilátkou je humanizovaná monoklonálna protilátka.
11. Použitie podľa nároku 7 až 10, kde gp39 protilátkou je rozpustná forma gp39 ligandu.
12. Použitie podľa nároku 11, kde rozpustnou formou gp39 ligandu je CD40 spojovací proteín.

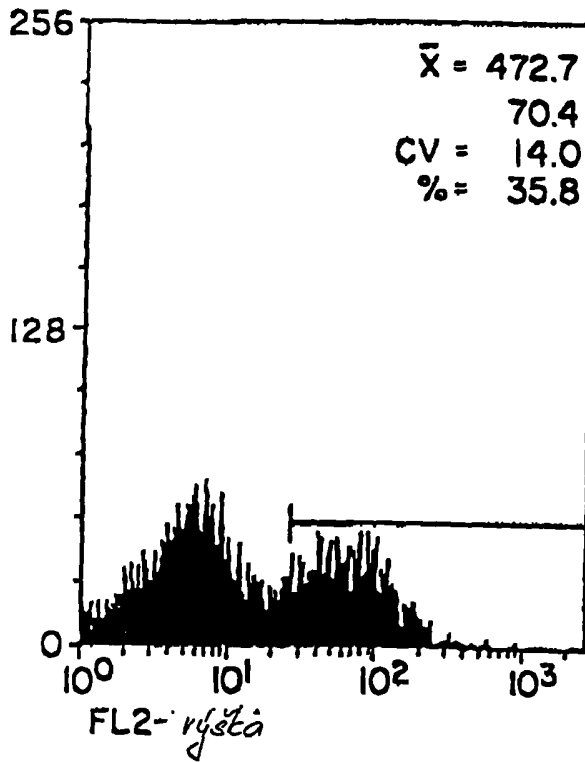
13. Použitie podľa nároku 1, kde tkanivom alebo orgánom sú pankreatické ostrovčeky, pečeň, oblička, srdce, pľúcny lalok, koža, sval, nervové tkanivo, žalúdok a črevá.



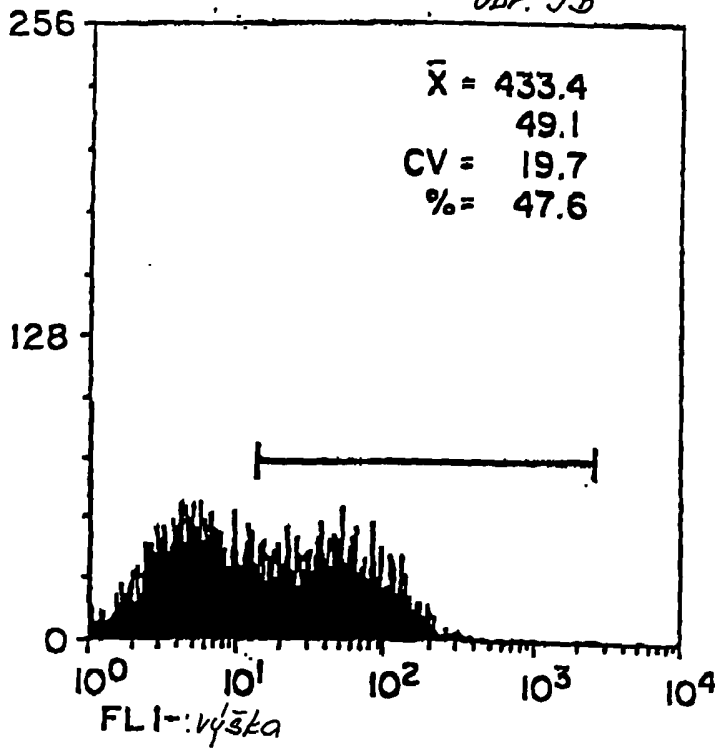
Obr. 1



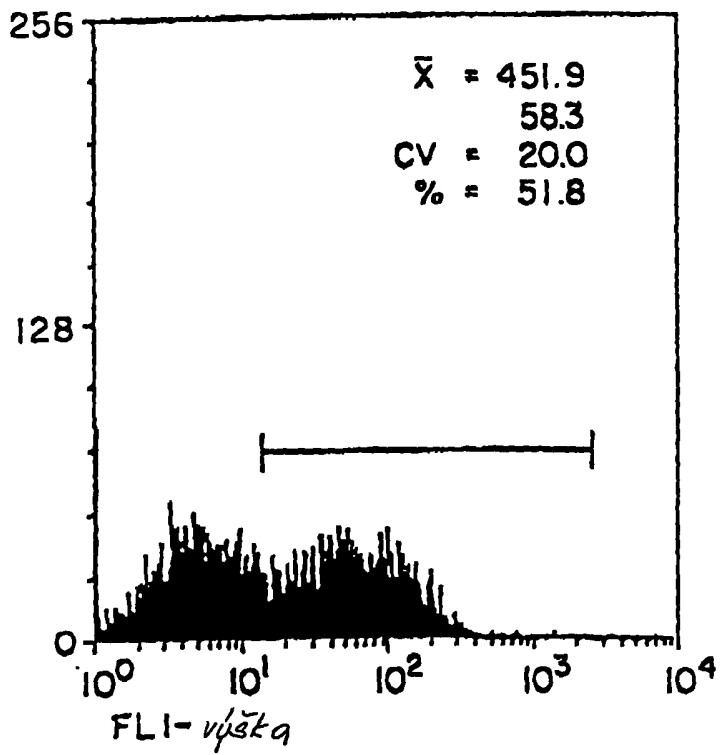
Obr. 3A



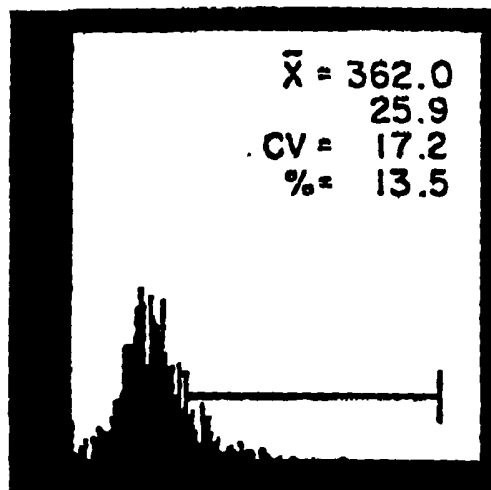
Obr. 3B



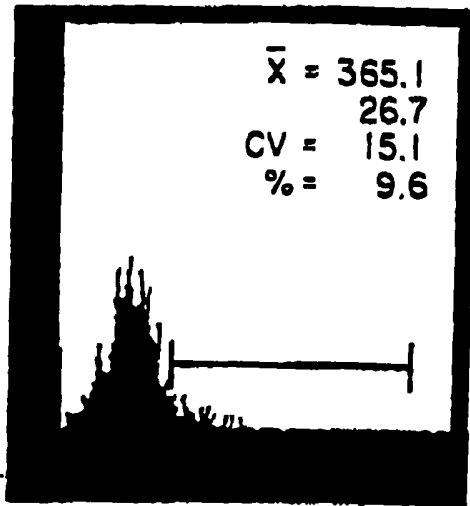
Obr 3C



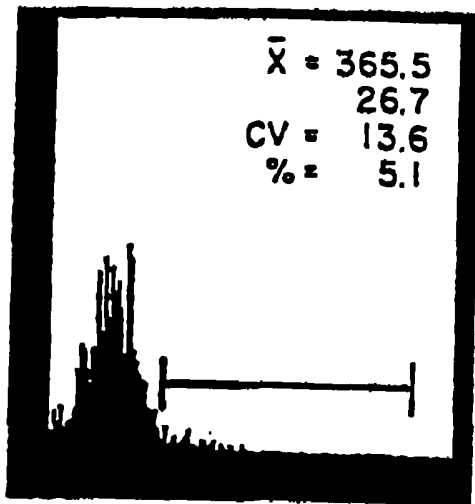
Obr 4A

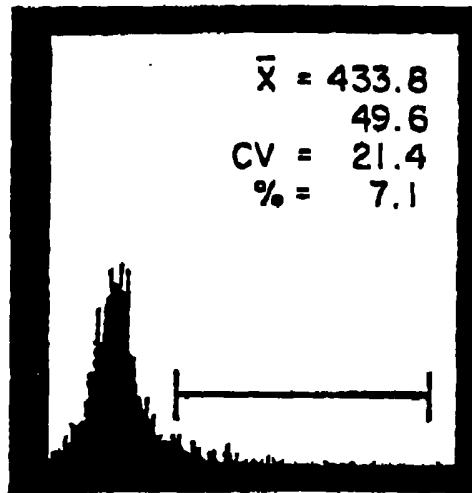
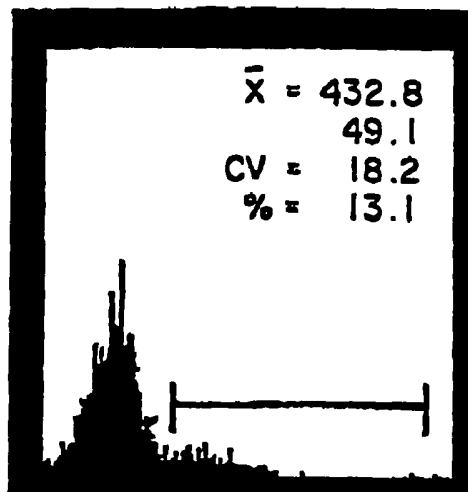


Obr. 4B

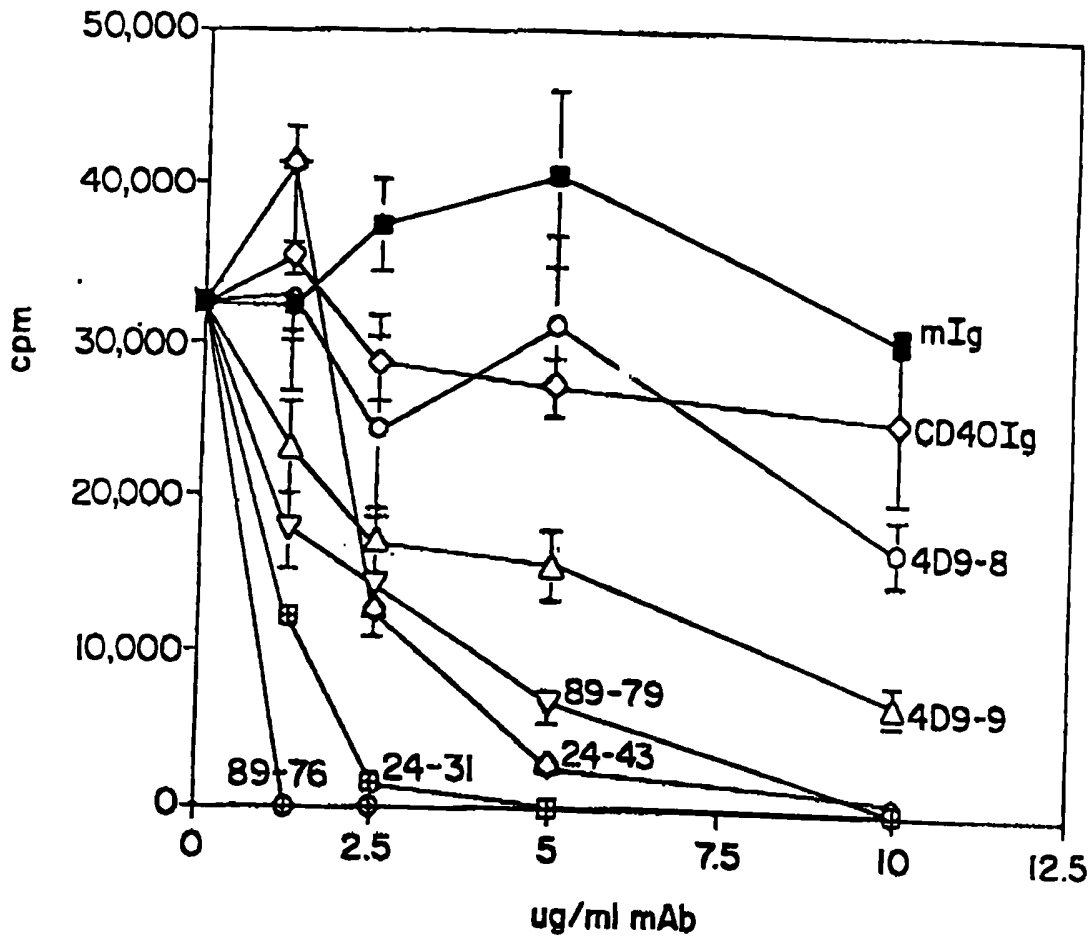


Obr. 4C



Obr. 5A*Obr. 5B*

Obv. 6



Oct. 7

