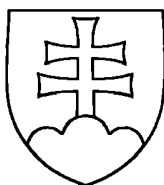


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

211-95

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶ :

A 61K 38/19
A 61K 39/395

(22) Dátum podania: 18.08.93

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 07/932 900, 07/933 419,
07/933 462, 07/933 950

(32) Dátum priority: 20.08.92, 21.08.92, 21.08.92,
21.08.92

(33) Krajina priority: US, US, US, US

(40) Dátum zverejnenia: 02.10.96

(86) Číslo PCT: PCT/US93/07646, 18.08.93

(71) Prihlasovateľ: SCHERING CORPORATION, Kenilworth, NJ, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Coffman Robert, Portola Valley, CA, US;
De Vries Jan E., Los Altos, CA, US;
De Waal Malefyt Rene, Sunnyvale, CA, US;
Powrie Fiona, Mountain View, CA, US;
Rennick Donna, Los Altos, CA, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Farmaceutický prostriedok obsahujúci IL-4 a/alebo IL-10 alebo protilátky proti IL-4 a IL-10, spôsob jeho výroby a jeho použitie**

(57) Anotácia:

Opísaný je farmaceutický prostriedok obsahujúci IL-4 a/alebo IL-10 alebo protilátky IL-4 a IL-10, spôsob výroby tohto farmaceutického prostriedku a použitie týchto látok. Tieto prostriedky sú vhodné na liečenie viacerých ochorení, akými je proliferácia neoplastických buniek závislých od interleukínu-2 (IL-2), hypersenzitívne reakcie neskorého typu (DTH), zápalové črevné ochorenia a na zosilnenie inhibície produkcie cytokínu T bunkami alebo na zvýšenie produkcie γ -interferónu (IFN- γ). Kombinácia IL-4 a IL-10 sa používa na zosilnenie IL-10 sprostredkovej inhibície produkcie cytokínov T bunkami. IL-10 samotný alebo v kombinácii s IL-4 sa používa tiež na inhibovanie hypersenzitívnych reakcií neskorého typu.

Farmaceutický prostriedok obsahujúci IL-4 a/alebo IL-10 alebo protilátky proti IL-4 a IL-10, spôsob jeho výroby a jeho použitie

Oblasť techniky

Vynález sa týka farmaceutického prostriedku, ktorý obsahuje IL-4 a/alebo IL-10 alebo protilátky proti IL-4 a IL-10, spôsobu jeho výroby a jeho použitia. Vynález sa podrobnejšie týka prostriedkov a spôsobu liečenia proliferácie neoplastických buniek závislých od interleukínu-2 (IL-2), hypersenzitívnych reakcií neskorého typu (DTH) a zápalových črevných ochorení a posilnenia inhibície produkcie cytokínu T bunkami alebo zvýšenie produkcie γ -interferónu (IFN- γ). Tieto prostriedky a spôsoby využívajú interleukín-4 (IL-4), interleukín-10 (IL-10) alebo ich kombinácie alebo antagonistov IL-4 a IL-1 ako neutralizujúce protilátky.

Doterajší stav techniky

Leukémie sú heterogénnou skupinou novotvarov pochádzajúcich od malígnej transformácie hematopoéznych (krvotvorných) buniek. Môžu byť odvodené buď od lymfoidných alebo myeloidných typov buniek. Transformované bunky primárne proliferujú v kostnej dreni a v lymfoidnom tkanive, kde interferujú s normálnou hematopézou a imunitou. Môžu taktiež emigrovať do krvi a infiltrovať do iných tkanív, čo často vedie k abnormálnej distribúcii rôznych typov buniek. Príkladmi leukémie je lymfotická leukémia (ALL), akútna myeloidná leukémia (AML), chronická myeloidná leukémia (CML), chronická lymfocytická leukémia (CLL), leukémia vlasových buniek a leukémia dospelých T buniek (ATL). Leukémie sa typicky charakterizujú buď ako akútne alebo ako chronické, podľa povahy klinického priebehu.

Lymfómy, na rozdiel od leukémie, neoplastickej transformácie buniek, sa vyskytujú prevažne v lymfoidných tkanivách. Lymfómy sa typicky delia na Hodgkinovu chorobu a ne-Hodgkinove lymfómy. Pri Hodgkinovej chorobe väčšina buniek predstavuje malé lymfocyty s T bunkovým fenotypom. Viac ako 90 % všetkých prípadov ne-Hodgkinových lymfómov predstavuje deriváty B buniek.

Liečenie väčšiny týchto ochorení nie je dosiaľ úplne úspešné. Dosiaľ známa technika sa primárne sústreďuje na použitie chemoterapie a ožarovania, avšak až do dneška toto liečenie obyčajne stroskotáva pre dlhodobú remisiu alebo pre dlhodobú opateru. Existuje teda potreba bezpečného a spoľahlivého spôsobu liečenia týchto ochorení, zvlášť tých, pri ktorých proliferácia neoplastických buniek závisí od IL-2.

IFN- γ je potencionálnym aktivátorom makrofágov, ktoré sú zodpovedné za obranu hostiteľa proti rôznym infekčným činidlám a ochoreniam. Kvôli dôležitej úlohe IFN- γ v obrane proti infekciám, sú potrebné také prostriedky a spôsoby, ktoré môžu zvyšovať produkciu IFN- γ .

Imunitný systém prináša početné prirodzené a adaptívne imunitné reakcie, dve rozsiahle kategórie, ktoré sa nazývajú humorálna a bunková imunitná odpoveď. Humorálna odpoveď sa v širšom slova zmysle týka produkcie protilátok a pôsobenia B-buniek, vrátane buniek plazmy. Bunková imunita je sprostredkovaná bunkami, vrátane T-buniek, monocytov, makrofágov a histiocyto

T-bunky môžu byť rozdelené do kategórií podľa rôznych funkcií alebo znakov. Napríklad T-bunky je možné klasifikovať ako T pomocné bunky alebo T supresorické bunky. T-bunky môžu byť tiež aktivované, takže sa stávajú cytotoxickými, alebo vytvárajú iné špecializovanejšie funkcie. Normálne majú T-bunky a B-bunky také interakcie, ktoré môžu v istom rozsahu regulovať vzájomnú aktivitu, viď napríklad Paul (red.): Fundamentals of Immunology, druhé vydanie, Raven Press, New York (1989).

V rôznych antigénoch môžu prevládať buď bunkové alebo humorálne odpovede, typicky vzájomne výlučným spôsobom. Nástup niektorých ochorení, napr. lepry, leishmaniózy a niektorých typov autoimunity, môže byť zapríčinený nevhodnou prevahou jednej triedy odpovede nad druhou, viď Mosmann a kol.: Immunol. Today 8, 223 (1987); Mosmann a kol.: Ann. Rev. Immunol. 7, 145 (1989); Parish: Transplant Rev. 13, 35 (1972) a Liew: Immunol. Today 10, 40 (1989).

Jedným z mechanizmov, ktorými je imunitný systém regulovaný, zahŕňa produkciu proteínov, ktoré sa volajú cytokiny. Lymfokiny sú cytokiny produkované T-bunkami a niektorými B-bunkami. Monokiny sú cytokiny produkované monocytmi. Cytokiny, ktoré môžu byť glykozylované, sprostredkovávajú mnohé imunitné odpovede.

IL-4 je cytokin, ktorý je schopný stimulovať produkciu protilátky produkujúcej B-bunky, ktorá tiež podporuje rast ničiacich T-buniek alebo cytotoxických buniek. IL-4 môže tiež inhibovať aktivitu T-pomocných buniek typu 1 (Th1) a tie môžu ďalej inhibovať produkciu viacerých B-buniek alebo produkciu protilátok viacerými B-bunkami. IL-4 je teda súčasťou vnútorného regulačného mechanizmu.

IL-10 je cytokin, ktorý je schopný sprostredkovať mnohé činnosti alebo účinky. IL-10 bol izolovaný ako z myších, tak aj z ľudských buniek. Je prítomný pri regulácii imunitných odpovedí rôznych tried alebo podtried T-pomocných (Th) buniek. Th bunky sa môžu deliť na rôzne podskupiny, ktoré sa odlišujú produkciou cytokinov.

Th1 T-bunkové klony produkujú interleukín-2 (IL-2) a IFN- γ , zatiaľ čo Th2 bunkové klony vylučujú IL-10, IL-4 a interleukín-5 (IL-5), zvyčajne po aktivácii antigénmi alebo mitogénnymi lektínmi. Obe triedy Th bunkových klonov produkujú cytokiny, akými je nádorový nekrozný faktor- α (TNF- α), interleukín-3 (IL-3) a granulocyt-makrofágovú kolóniu stimulujúci faktor (GM-CSF). Tretia kategória Th buniek (Th0) produkuje IL-2, IFN- γ , IL-4,

IL-5, TNF- α , IL-3 a GM-CSF súčasne.

Zostavy produkcií rôznych cytokinov buniek Th1 a Th2 odrážajú ich pomocné funkcie. Th1 bunky sú zahrnuté prevažne v hypertenzívnych odpovediach neskorého typu, zatiaľ čo Th2 bunky súvisia s produkciou protilátok. Nakoľko protilátková hypersenzitivita (cesta Th2) a neskorého typu (cesta Th1) sú vzájomne často totožné, predpokladá sa, že bunky Th1 a Th2 majú skrížené regulačné účinky. IFN- γ produkovaný bunkami Th1 inhibuje proliferáciu buniek Th2 a IL-10 produkovaný Th1 bunkami inhibuje syntézu cytokinu klonmi buniek Th1, najmä produkciu IFN- γ a IL-2.

Hypersenzitivita neskorého typu (DTH) je imunitnou odpoveďou sprostredkovanou bunkami, ktorá je charakterizovaná edémom a celulárnou infiltráciou tkaniva, zvyčajne T-bunkami a monocytmi a/alebo makrofágmi. Niektoré typy cytokinov súvisia s hypersenzitívnymi reakciami neskorého typu a humorálnymi imunitnými odpoveďami. Cher a kol.: J. Immunol. 138, 3688 (1987) a Mosmann a kol. (1987 a 1989, viď vyššie). Ochorenia súvisiace s týmito skupinami odpovedí môžu byť zapríčinené neprimeranou produkciou súvisiacich typov cytokinov.

Zápalové črevné ochorenie (IBD) sa týka skupiny gastrointestinálnych porúch, ktoré sa vyznačujú chronickým, nešpecifickým zápalom častí gastrointestinálneho traktu. Vredovitá kolitída a Crohnova choroba, najznámejšie z príkladov IBD ľudí, súvisia s viacerými príznakmi a komplikáciami, vrátane retardácie rastu detí, rektálneho prolapsu, krvou v stolici (napr. melena a/alebo hematochézia), chudnutie, nedostatok železa a anémia, napr. anémia z nedostatku železa a anémia z chronického ochorenia alebo chronického zápalu.

Pôvod IBD nie je objasnený, viď Wyngaarden a Smith (red.): Cecil's Textbook of Medicine (W.B. Saunders Co., 1985), Berkov (red.): The Merck Manual of Diagnosis and Therapy (Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, 1982) a Harrison's Principles of Internal Medicine, 12. vydanie, McGraw-Hill, Inc. (1991).

Vredovitá kolitída je chronickým, nešpecifickým, zápalovým a vredovitým ochorením, ktoré sa primárne prejavuje mukózou hrubého čreva. Často sa prejavuje krvácajúcou stolicou, abdominálnymi kŕčami, krvou a hlienom v stolici, nevoľnosťou, horúčkou, anémiou, anorexiou, stratou hmotnosti, leukocytózou, hypoalbuminémiou a zvýšenou rýchlosťou sedimentácie erytrocytov (ESR). Medzi komplikácie patrí hemoragia, toxická kolitída, toxický megakolón, príležitostná rektovaginálna fistula a zvýšené riziko rozvinutia rakoviny časti hrubého čreva.

Vredovitá kolitída súvisí taktiež s komplikáciami, ktoré sú vzdialenejšie od časti hrubého čreva (tračníka), akými sú artritída, ankylózna spondylitída, sakroileitída, posteriórna uveitída, nodózný erytém, gangrenózna pyoderma a episkleritída. Liečenie závisí značne od prudkosti a trvania ochorenia. Napríklad pri prudkom nástupe ochorenia je často indikovaná liečba na zabránenie dehydratácie a elektrolytovej nerovnováhy. Niekedy sú vhodné tiež špeciálne diétne opatrenia. Medzi liečivá patria rôzne kortikosteroidy, sulfasalazín a niektoré jeho deriváty a možné sú tiež imunosupresívne liečivá.

Crohnova choroba má veľa spoločných čŕt s vredovitou kolitídou. Crohnova choroba sa odlišuje tým, že poranenie má tendenciu sa ostro ohraničovať od priľahlého normálneho čreva, na rozdiel od poranenia vredovitou kolitídou, ktoré je skôr difúzne. Crohnova choroba ďalej ovplyvňuje prevažne dolnú časť tenkého čreva (ileitída) a dolnú časť tenkého čreva a časť hrubého čreva (ileokolitída). V niektorých prípadoch je zasiahnutá samotná časť hrubého čreva (granulomatózna kolitída) a niekedy tenké črevo (jejunoleitída). Vo vzácných prípadoch je postihnutý žalúdok, dvanástorník alebo pažerák. Medzi poranenia patrí epiteloidný sarkoidný granulóm a asi polovica klinických prípadov.

Poranenie pri Crohnovej chorobe môže byť transmurálne, vrátane hlbokého zvredovatenia, edému a fibrózy, ktoré môžu viesť k obštrukcii a tvorbe fistule, rovnako ako ku vzniku vredu. To je v kontraste s vredovitou kolitídou, ktorá obyčajne vedie k oveľa

jemnejším poraneniach, aj keď pri vredovitej kolitíde je príležitosť možná vidieť tiež komplikácie fibrózy, obštrukcie, tvorby fistúl a vredov. Bežné liečenie je v oboch prípadoch podobné. Zahŕňa použitie steroidov, sulfasalazínu a jeho derivátov a imunosupresívnych liečív, akými sú cyklosporín A, merkaptopurín a azatioprin, ktoré môžu mať silné nežiadúce vedľajšie účinky.

Vzhľadom na lekársku dôležitosť hypersenzitivity neskorého typu a zápalového ochorenia čriev sú potrebné zlepšené prostriedky a spôsoby liečenia týchto stavov.

Podstata vynálezu

Vynález rieši spomínanú potrebu tým, že popisuje prostriedky a spôsoby liečenia hore uvedených stavov.

Podrobnejšie sa tento vynález týka spôsobu inhibovania neoplastickej proliferácie buniek, ktoré sú závislé od IL-2 a to tak, že cicavcovi, ktorý je postihnutý neoplastickou proliferáciou buniek závislých od IL-2, sa podáva efektívne množstvo IL-10.

Vynález popisuje aj spôsob zvýšenia hladiny IFN- γ u pacienta tak, že sa súčasne pacientovi podáva také množstvo protilátok proti IL-4 a IL-10, ktoré je efektívne na zvýšenie produkcie IFN- γ pacientom.

Vynález ďalej popisuje spôsob liečenia zápalového črevného ochorenia u cicavcov a to tak, že cicavcovi, ktorý je postihnutý zápalovým črevným ochorením, sa podáva efektívne množstvo IL-10.

Vynález popisuje tiež spôsob zosilnenia inhibície produkcie cytokínu T-bunkami u cicavcov súčasným podávaním efektívneho množstva IL-4 a IL-10, pričom liečeným cicavcom je s výhodou človek.

Vynález popisuje aj spôsob inhibovania hyposenzitívnej reakcie neskorého typu u cicavcov tak, že sa podáva efektívne množstvo IL-10. Vo výhodnom uskutočnení sa efektívne množstvo IL-4 podáva súčasne s IL-10.

Výhodne sa ľudský IL-4 a IL-10 používajú podľa vyššie uvedených spôsobov na liečenie človeka.

Všetky uvedené odkazy sú tu uvedené ako citácie, Všetky sekvencie tu uvedených nukleových kyselín majú normálnu 5'-3' konvenciu, pokiaľ sa čítajú zľava doprava. Pre bázy nukleotidov v sekvenciách sú použité štandardné jednopísmenové skratky (37 C.F.R. § 1.822).

V ďalšej časti tohto popisu sú uvedené zdroje cytokinov a protilátok.

Pojem "interleukín-4" alebo "IL-4" tak, ako sa tu používa, predstavuje proteín, ktorý a) má aminokyselinovú sekvenciu v podstate identickú so sekvenciou maturovaného ľudského IL-4, popísaného na obr. 1C v medzinárodnej patentovej prihláške č. WO 87/02990 a b) má biologickú aktivitu, ktorá je obvyklá pre prírodný IL-4. V podstate identická aminokyselinová sekvencia znamená, že sekvencia iného IL-4 v porovnaní so sekvenciou popísanou v publikovanej patentovej prihláške je rovnaká alebo sa odlišuje jednou alebo viacerými zmenami aminokyselín (delécia, pridanie, substitúcia), ktoré podstatne neovplyvňujú biologickú aktivitu.

IL-4 je komerčne dostupný z rôznych zdrojov, akým je Genzyme Corporation, Cambridge, Ma., alebo sa môže pripraviť známymi spôsobmi z prírodných zdrojov alebo technológiami rekombinácie DNA [Sheehan a kol.: J. Immunol. 142, 884 (1989) a Starnes a kol.: J. Immunol. 145, 4185 (1990)].

Na identifikáciu DNA kódujúcu IL-4 v genomových alebo cDNA knižniciach pripravených štandardnými spôsobmi sa môžu použiť i

zmesi oligonukleotidových sond, ktoré sú založené na známych IL-4 nukleotidových sekvenciách. Takto identifikované DNA sa môžu vyčleniť z knižnice štiepením reštrikčnou endonukleázou alebo sa môžu pripraviť pomocou príslušných primerov a spôsobom polymerizačnej reťazovej reakcie (PCR) [Saiki a kol.: Science 239, 487 (1988)], môžu byť sekvenované a exprimované v eukaryotickom expresnom systéme alebo (po delácii intronu štandardnými spôsobmi, ak je to nutné) v prokaryotickom alebo eukaryotickom expresnom systéme. Avšak, ako cDNA, tak aj genomové DNA knižnice môžu byť analyzované aplikáciou štandardných spôsobov klonovania namiesto použitia oligonukleotidových sond alebo PCR. Takto vyrobený IL-4 sa potom deteguje známymi spôsobmi, akými sú imunochemické spôsoby alebo bioanalýzy.

Ako IL-4 sa výhodne používa ľudský rekombinantný IL-4. Môže sa tiež použiť glykozylovaný IL-4 (napr. rekombinantný IL-4 produkovaný v eukaryotickom expresnom systéme) rovnako ako neglykozylovaný proteín (napr. chemicky syntetizovaný alebo produkovaný bakteriálnym expresným systémom).

Pojem "interleukín 10" alebo "IL-10" tak, ako sa tu používa, predstavuje proteín, ktorý a) má aminokyselinovú sekvenciu maturovaného (napríklad s chýbajúcou sekvenciou sekrečného leaderu) IL-10 v podstate takú, aká je popísaná v medzinárodnej patentovej prihláške WO 91/00349 a b) má biologickú aktivitu, ktorá je obvyklá pre prírodný IL-10. Môže sa používať ako glykozylovaný (napríklad chemicky syntetizovaný štandardnými spôsobmi alebo produkovaný v *E. coli*) IL-10. Patria sem tiež i mutíny a ďalšie analógy, vrátane BCRFI (vírový IL-10 vírusu Epstein Barr; tiež jednoducho nazývaný vírový IL-10) proteínu, ktorý má biologickú aktivitu IL-10. Medzinárodná prihláška č. WO 91/00349 popisuje mnohé in vitro testy, ktoré sú vhodné na meranie aktivity IL-10. V tejto prihláške sú popísané mnohé výhodné modifikácie IL-10.

IL-10 vhodný na použitie podľa vynálezu sa môže získať z viacerých zdrojov. Napríklad sa môže izolovať z kultivačného média aktivovaných T-buniek schopných vylučovať tento proteín.

IL-10 alebo jeho aktívne fragmenty môžu byť tiež chemicky syntetizované známymi štandardnými technikami, viď napr. Merrifield : Science 233, 341 (1986) a Atherton a kol.: Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, I.R.L. Press, Oxford 1989.

Rekombinantný ľudský IL-10 je tiež obchodným článkom, ktorý je možné získať od napr. PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ.

Rekombinantný IL-10 sa môže vyrábať tiež, ako je hore uvedené pre IL-4, s využitím informácií o sekvenciách známeho ľudského IL-10 alebo vírového IL-10. Spôsoby výroby rekombinantného ľudského IL-10 sú popísané napr. v medzinárodnej patentovej prihláške č. WO 91/00349. Klony, obsahujúce sekvencie, ktoré kódujú ľudský IL-10, boli uložené v Americkej zbierke typov kultúr (ATCC), Rockville, Maryland, 20. decembra 1989 a boli im priradené čísla 68191 a 68192. Klonovanie a expresia vírového IL-10 (BCRFI proteínu) z vírusu Epstein Barr boli popísané Moorom a kol. [Science 248, 1230 (1990)].

Ľudský IL-10 sa s výhodou používa na liečenie ľudí, aj keď sa okrem neho môže použiť tiež vírový IL-10 alebo IL-10 z niektorého iného druhu cicavcov. Najvýhodnejšie sa ako IL-10 používa rekombinantný ľudský IL-10.

IL-4 a IL-10 z akéhokoľvek zdroja sa môžu čistiť štandardnými spôsobmi, vrátane (ale bez obmedzenia na tieto) zrážania kyselinou alebo soľou, chromatografiou na ionexe, chromatografiou na chelátoch kovov, gélovou filtráciou, rýchlou proteínovou kvapalinovou chromatografiou (FPLC), vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC), preparatívnou elektroforézou na diskovom géli alebo záclonovou elektroforézou, izoelektrickou fokusáciou, frakcionáciou z organického rozpúšťadla s nízkou teplotou varu, protiprúdnym roztrepávaním a imunoafinitnou chromatografiou.

Protilátky proti IL-4 a IL-10 sa môžu pripravovať štandardnými spôsobmi. Slovo "protilátka" tak, ako sa tu používa,

znamená ako polyklonálne, tak i monoklonálne protilátky (McAbs), zahrňuje tiež celé imunoglobulíny a ich fragmenty viažúce antigén.

Polyklonálne protilátky sa môžu pripravovať imunizáciou hostiteľského zvieraťa, akým je zajac, krysa, koza, ovca, myš, atď., IL-4 a IL-10. Po pôvodnej injekcii sa výhodne podá jedna alebo dve posilňujúce injekcie na zvýšenie titra protilátky, potom sa zvieraťu odoberie krv. Pripraví sa sérum, ktoré sa analyzuje štandardným spôsobom, akým je ELISA s použitím polypeptidu ako antigénu. Štandardnými spôsobmi sa potom pripraví imunoglobulínová frakcia.

Imunogenita IL-4 sa zvýši kombináciou s jedným z mnohých pomocných činidiel a/alebo konverziou na väčšiu formu pred imunizáciou, t.j. zosieťovaním štandardnými spôsobmi.

Sérum, ktoré sa pripraví z takto imunizovaných zvierat, sa môže používať priamo. IgG frakcia sa môže od séra oddeliť tiež štandardnými spôsobmi, ako napríklad plazmaforézou alebo adsorpčnou chromatografiou s použitím IgG špecifických adsorbentov, akým je imobilizovaný proteín A.

Monoklonálne protilátky, ktoré sú výhodné na použitie podľa tohto vynálezu, sa môžu pripravovať štandardnými spôsobmi, napr. tak, ako to popisujú Kohler a kol.: [Nature 256, 495 (1975); Eur. J. Immunol. 6, 511 (1976)]. Na prípravu somatických buniek, ktoré vylučujú protilátku, sa zviera imonizuje v podstate tak, ako je to vyššie uvedené. Tieto bunky sa potom z imunizovaného zvieraťa odoberú pre spojenie s bunkami myelómu.

Somatické bunky, ktoré majú schopnosť produkovať protilátky, zvlášť B bunky, sú vhodné na spojenie s líniou buniek myelómu. Tieto somatické bunky sa môžu odvodzovať od lymfatických uzlín, sleziny a perfiérnej krvi primárne imunizovaných zvierat. Často sa používajú bunky sleziny krýs, najmä preto, že tieto bunky produkujú relatívne vysoké percento stabilných spojení s myšími

myelomovými líniami. Namiesto nich by však bolo možné používať ľudské, myšie, zajačie, ovčie, kozie alebo iné bunky.

Na použitie v postupoch produkujúcich hybridomové spojenia boli vyvinuté špecializované myelómové bunkové línie z lymfatických nádorov [Kohler a Milstein : Eur. J. Immunol. 6, 511 (1976); Shulman a kol.: Nature 276, 269 (1978); Volk a kol.: J. Virol. 42, 220 (1982)]. Spôsoby generovania hybridov buniek sleziny alebo lymfatických žliaz produkujúcich protilátky a myelómových buniek zvyčajne zahŕňujú zmiešanie somatických buniek s myelómovými bunkami v pomere 10 : 1 (aj keď tento pomer môže byť od 20 : 1 do 1 : 1) v prítomnosti činidla alebo činidiel (chemických, vírusových alebo elektrických), ktoré podporujú spojenie bunkových membrán. Spôsoby spojenia sú popísané Kohlerom a Milsteinom : viď vyššie, Gefterom a kol.: Somatic Cell Genet. 3, 231 (1977), tiež Volkom a kol.: J. Virol. 42, 220 (1982). Činidlom podporujúcim spájanie, ktoré bolo použité pôvodcami vynálezu, bol vírus Sendai a polyetylénglykol (PEG).

Pretože postupy spojenia produkujú živé hybridy vo veľmi nízkych frekvenciách (napr. ak sa ako zdroj somatických buniek použije slezina, získa sa jeden hybrid na zhruba každých 1×10^5 buniek sleziny), je podstatné mať prostriedky na oddelenie spájaných bunkových hybridov od ostatných nespojených buniek, zvlášť nespojených myelómových buniek. Nutné sú tiež prostriedky na detegovanie požadovaných hybridomov produkujúcich protilátky z iných výsledných spojených bunkových hybridov.

Oddelenie spojovaných bunkových hybridov sa zvyčajne uskutočňuje tak, že sa bunky kultivujú v médiu, ktoré podporuje rast hybridomov, ale bráni rastu nespojovaných myelómových buniek, ktoré by sa normálne delili do nekonečna. Somatické bunky použité na spojenie si neudržia dlhodobú životaschopnosť v in vitro kultúre a nepredstavujú teda žiadny problém. Môžu sa používať napríklad myelómové bunky, ktorým chýba hypoxantin-fosforibozyltransferáza (HPRT-negatívne). Výber z týchto buniek sa uskutočňuje v hypoxantin-aminopterín-tymidinovom (HAT) médiu, v ktorom

spojované bunkové hybridy prežívajú vďaka HPRT-pozitívnemu genotypu buniek sleziny. Je možné tiež použiť myelómové bunky s rôznymi genetickými deficitmi (citlivosť na liečivá a pod.), ktoré je možné vybrať podľa média podporujúceho rast genotypicky príslušných hybridov.

Na selektívne kultivovanie spojovaných bunkových hybridov je potrebný čas niekoľkých týždňov. Na začiatku tejto doby je nutné identifikovať tie hybridy, ktoré produkujú požadovanú protilátku, takže sa môžu následne klonovať a množiť. Obecne produkuje požadovanú protilátku asi 10 % získaných hybridov, i keď nie je zriedkavé, že toto množstvo je od 1 do 30 %.

Detekcia hybridov produkujúcich protilátku sa môže uskutočňovať akýmkoľvek z niekoľkých štandardných spôsobov testovania, vrátane testu ELISA a rádioimunoanalytických spôsobov, ktoré boli popísané v literatúre (viď napr. Kennet a kol. (red.): *Monoclonal Antibodies and Hybridomas : A New Dimension in Biological Analyses*, str. 376 až 384, Plenum Press, New York 1980).

Akonáhle sa raz požadované spojené bunkové hybridy vyberú a klonujú na jednotlivé bunkové línie produkujúce protilátku, každá bunková línia sa môže množiť jedným zo štandardných spôsobov. Histokompatibilnému zvieraťu sa môže injekčne podať suspenzia hybridomových buniek. V tomto zvierati sa potom vyvinú nádory, ktoré vylučujú špecifickú monoklonálnu protilátku produkovanú spojeným bunkovým hybridom. Telové kvapaliny zvieraťa, akým je sérum alebo kvapalina z ascitov, sa odoberú dutou ihlou. Získajú sa tak monoklonálne protilátky vo vysokej koncentrácii. Jednotlivé bunkové línie sa môžu množiť tiež in vitro v laboratórnych kultivačných nádobách. Kultivačné médium, ktoré obsahuje vysokú koncentráciu jednotlivej špecifickej monoklonálnej protilátky sa izoluje dekantáciou, filtráciou alebo odstredovaním a následne sa vyčistí.

Akonáhle sa raz získa z hybridu, ktorý produkuje požadovanú monoklonálnu protilátku, môžu sa na prípravu interšpecifických

monoklonálnych protilátok použiť spôsoby, v ktorých sa väzbová oblasť jedného druhu kombinuje s neväzbovou oblasťou protilátky iného druhu [Liu a kol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3439 (1987)]. Napríklad CDR z monoklonálnej protilátky hlodavca sa naočkuje na kosť ľudskej protilátky. Tým sa protilátka hlodavca "poľudští" [Riechmann a kol.: Nature 332, 323 (1988)]. Podrobnejšie, CDR sa môže naočkovať na premennú oblasť ľudskej protilátky s alebo bez ľudských stabilných oblastí. Takýto spôsob bol použitý napr. na poľudštenie myši monoklonálnou protilátkou na p55 (Tac) podjednotkou receptora ľudského interleukínu-2 [Queen a kol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989)].

Ľudské monoklonálne protilátky sa môžu pripravovať tiež s použitím IL-4 alebo IL-10 a spôsobov, ktoré sú popísané Banche-reauom a kol.: Science 251, 70 (1991).

Tento vynález zahrňuje tiež fragmenty viažúce protilátku, akým je Fab, F(ab')₂, Fv, atď. Použitie a generácia fragmentov protilátok je dobre známa, napr. Fab fragmentov [Tijssen : Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam 1985)]³, Fv fragmentov [Hochman a kol.: Biochemistry 12, 1130 (1973); Sharon a kol.: Biochemistry 15, 1591 (1976); Ehrlich a kol.: US patent č. 4 355 023] a polovice molekuly protilátky (Auditore-Hargreaves, US patent č. 4 470 925).

Protilátky a fragmenty protilátok používané podľa tohto vynálezu sa môžu s výhodou viazať na IL-4 alebo IL-10 a budú tak neutralizovať biologickú aktivitu IL-4 alebo IL-10, proti ktorým boli pripravené.

V ďalšej časti popisu bude popísaná inhibícia proliferácie neoplastických buniek závislých od IL-2.

Ako je uvedené nižšie v príkladoch, ľudský a vírusový IL-10 majú priamy vplyv na ľudské T bunky. Bolo zistené, že všetky proliferatívne odpovede ľudských Th0-, Th1- a Th2- podobných buniek sú inhibované IL-10 vtedy, ak sa použijú L bunky transfektované

FcγRII (CD32) v kombinácii buď s anti-CD3 monoklonálnymi protilátkami alebo mitogénnym párom anti-CD2 monoklonálnych protilátok. Antigénovo špecifické proliferáčnej odpovede klonov ľudských T buniek boli inhibované IL-10, ak sa ako APC použili myšie L bunky transfektované relevantnou triedou II MHC molekúl. IL-10 neovplyvňuje expresiu skupiny II MHC v tomto systéme, pretože konštitutívna expresia transfektovaných génov triedy II MHC je pod kontrolou promotora SV40.

Inhibičné účinky IL-10 primárne pochádzajú z priameho vplyvu IL-10 na klony T buniek inhibície produkcie IL-2 na úrovni mRNA. Inhibičné účinky boli špecifické pre IL-2, pretože IL-10 neovplyvňuje produkciu IFN-γ, IL-4, IL-5 a GM-CSF. Interakcia IL-10 s IL-10 receptorom zrejme vyvoláva signálnu cestu, ktorá špecificky inhibuje syntézu IL-2.

Na preukázanie účinnosti prostriedku podľa tohto vynálezu sa môžu použiť i iné testy. Napríklad sa môžu použiť modely xenoimplantátov nahých myší. Tieto modely boli použité na testovanie rozličných terapeutických činidiel [viď : Howard a kol.: Cancer Res. 51, 3274 (1991) a McLemore a kol.: Cancer Res. 47, 5132 (1987)].

Táto proliferácia buniek môže súvisieť s leukémiou, akou je B bunková CLL. Cicavcami, ktorí sú liečení spôsobom podľa tohto vynálezu, sú výhodne ľudia, ktorí sú postihnutí proliferáciou neoplastických buniek závislých od IL-2.

Spôsob inhibovania proliferácie neoplastických buniek závislých od IL-2 podľa tohto vynálezu sa vyznačuje tým, že sa cicavcovi, výhodne človeku, ktorý trpí na proliferáciu neoplastických buniek, podáva terapeuticky efektívna dávka druhého biologicky efektívneho činidla.

Farmaceutické prostriedky obsahujúce IL-10 a fyziologicky prijateľný nosič sa typicky podávajú intravenózne. IL-10 môže byť tiež obsiahnutý v tobolkách v lipozóme.

Pojem "proliferácia neoplastických buniek závislých od IL-2" tak, ako sa tu používa, znamená akýkoľvek nový alebo abnormálny rast tkaniva, ktorý je nekontrolovateľný, progresívny a kontinuálna proliferácia závisí od IL-2. Rast môže byť buď benigný alebo maligný. Maligný rast je typicky charakterizovaný vyšším stupňom anaplazie (dediferenciácie) v neoplastických bunkách. Neoplastické bunky závislé od IL-2 sú typicky odvodené od lymfoidných alebo myeloidných línii.

IL-2 je produkovaný T bunkami. Má viac aktivít na rôzne typy buniek, vrátane T buniek, NK buniek a B buniek. Bolo dokázané, že IL-2 pôsobí ako rastový faktor T buniek a zvyšuje produkciu cytokinov T bunkami, ak sú stimulované v prítomnosti IL-2. IL-2 aktivuje bunky prírodného zabíjača (NK) na zabíjanie cieľových buniek MHC nešpecifickým spôsobom. IL-2 je tiež obsiahnutý pri expanzii buniek obmedzených vo voľbe, čím zvyšuje produkciu protilátok týmito bunkami.

Vzhľadom na tieto aktivity IL-2 by mohla byť v niektorých prípadoch ochorenia dôležitá inhibícia produkcie IL-2 spôsobená IL-10. Tá by mohla slúžiť napríklad ako prostriedok na zníženie IL-2 riadenej proliferácie T buniek v situáciách, kedy proliferácia a rast T buniek nie sú žiadúce, ako je to v prípade autoimunitných ochorení, napr. pri autoimúnej tyroiditíde, diabetes závislej od inzulínu, pri reumatickej artritíde, systémovej lupus erytematosus a pri skleróze multiplex.

Schopnosť IL-10 znížovať IL-2 riadenú expanziu T buniek má tiež potenciálne klinické využitie pri liečení hostiteľskej choroby pri akútnom zlomení versus a pri chronických zápalových ochoreniach, akými sú zápalové črevné ochorenia a sarkoidná a pľúcna fibróza. Navyše, inhibovaním IL-2 riadená proliferácia alergénových špecifických T buniek, ktoré sú silnými producentmi IL-4 a IL-5, sa IL-10 môže použiť na liečenie alergických ochorení, akými sú astma a atopická dermatitída.

Medzi ochorenia zahrňujúce neoplastický rast, ktoré môžu byť

liečené farmaceutickými prostriedkami podľa tohto vynálezu, patrí leukémia, o ktorej je známe, že závisí od IL-2, ako je B bunková CLL a ATL. Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu sú vhodné na použitie v rôznych systémoch pre podávanie liečív. Pre stručný prehľad týchto spôsobov podávania liečív viď Langer : Science 249, 1527 (1990). Spôsoby prípravy zlúčenín, ktoré sú schopné na podávanie, sú odborníkom známe alebo zrejmé a sú podrobnejšie popísané napríklad v Remington's Pharmaceutical Science, 17. vydanie, Mack Publishing Company, Easton, Pa (1985).

IL-10, používaný podľa vynálezu, sa môže pripravovať ako prostriedok vo farmaceuticky prijateľnom médiu, napríklad v soľnom roztoku, fosforečnanom pufovanom soľnom roztoku (PBS), v Ringerovom roztoku, v soľnom roztoku s dextrózou, v Hankovom roztoku a v glukóze. Prostriedok môže obsahovať farmaceuticky prijateľné pomocné činidlá, ako je to potrebné pre približne fyziologické podmienky, akými sú pufovacie činidlá, činidlá upravujúce tonicitu, zmáčacie činidlá, detergentné činidlá a pod. Medzi prísady patria tiež ďalšie aktívne zložky, napr. baktericidné činidlá alebo stabilizátory. Množstvo podávané pacientovi bude závisieť od toho, čo sa podáva, od účelu podávania, ako je profylaxia alebo liečba, od stavu hostiteľa, od spôsobu podávania a od podobných faktorov.

Farmaceutické prostriedky sú typicky určené na transdermálne alebo parenterálne podávanie, napr. intravenózne, subkutánne alebo intramuskulárne. Žiadúce sú tiež formy pre orálne podávanie, ktoré sa môžu získať modifikáciou prostriedku tak, aby prešiel prostredím žalúdka. Tieto prostriedky sa môžu používať na profylaxiu a/alebo liečenie a s výhodou sa podávajú intravenózne. Tento vynález popisuje tiež prostriedky, ktoré obsahujú IL-10 polypeptid rozpustený alebo suspendovaný v prijateľnom nosiči, s výhodou vo vodnom nosiči. Tieto prostriedky môžu byť sterilizované konvenčnými spôsobmi sterilizácie, alebo sa môžu sterilne sfiltrovať.

Výsledné vodné roztoky sa môžu zabaliť na používanie ako ta-

ké alebo v lyofilizovanej forme. Lyofilizované prípravky sa pred podávaním spoja so sterilným vodným nosičom. IL-10 sa môže podávať tiež s druhým biologicky aktívnym činidlom, akým je štandardné chemoterapeutické činidlo. Medzi takéto činidlá patria, ale nie sú nimi obmedzené, vincristin, daunorubicin, L-asparagináza, mitoxantron a amsakrin.

Pri terapeutickej aplikácii sa farmaceutické prostriedky podávajú pacientovi v množstve, ktoré je dostatočné na inhibovanie proliferácie neoplastických buniek závislých od IL-2. Množstvo, ktoré je potrebné na dosiahnutie požadovaného efektu, sa definuje ako "terapeuticky efektívne množstvo". Terapeuticky efektívna dávka IL-10 sa bude meniť podľa, napríklad, príslušného použitia, na ktoré je liečenie určené, podľa spôsobu podávania, podľa zdravia a stavu pacienta a podľa posudku ošetrojúceho lekára. Napríklad dávka na kontinuálnu infúziu bude v rozmedzí od 500 μ g do 800 μ g na deň pre pacienta s hmotnosťou 70 kg, s výhodou medzi 10 μ g a 300 μ g. Typickou dávkou je dávka medzi 700 μ g/kg/deň a 16 μ g/kg/deň.

Koncentrácia IL-10 vo farmaceutickom prostriedku môže byť rôzna, t.j. od 10 μ g do asi 5 mg/ml, s výhodou medzi 100 μ g až 2 mg na ml. Koncentrácia sa zvyčajne vyberie primárne podľa objemu kvapaliny, viskozity, atď., v súlade s príslušne zvoleným spôsobom podávania. Tak typický farmaceutický prostriedok na intravenóznou infúziu by mal obsahovať 250 ml soľného roztoku s dext-rózou a 2,5 mg IL-10.

Pre pevné prostriedky sa môžu použiť konvenčné netoxické pevné nosiče, medzi ktoré patria napríklad nasledujúce látky s čistotou pre farmaceutické prostriedky : manitol, laktóza, škrob, stearát horečnatý, sodná soľ sacharínu, talok, celulóza, glukóza, sacharóza, uhličitan horečnatý a podobne. Na orálne podávanie sa vyrobí farmaceuticky prijateľný netoxický prostriedok pridaním normálne používaných riedidiel, akými sú horeuvedené nosiče a zvyčajne 10 až 95 % hmotn. aktívnej zložky, t.j. polypeptidu IL-10 podľa vynálezu, s výhodou 25 až 75 % hmotn.

Na podávanie vo forme aerosolu sa IL-10 s výhodou dodáva v jemne rozomletej forme spoločne s povrchovo aktívnym činidlom a hnacou látkou. Typický obsah IL-10 je 0,01 až 20 % hmotn., výhodne 1 až 10 % hmotn. Povrchovo aktívne činidlo musí však byť netoxické a s výhodou rozpustné v hnacej látke. Reprezentatívnymi príkladmi týchto činidiel sú estery alebo čiastočné estery mastných kyselín so 6 až 22 atómami uhlíka, ako je ester kyseliny kaprovej, oktánovej, laurovej, palmitovej, stearovej, linolovej, linolénovej, olestearovej a olejovej s alifatickým polyhydroxyalkoholom alebo jeho cyklickým anhydridom, ako je napríklad etylén-glykol, glycerol, erytritol, arbutol, manitol, sorbitol, anhydridy hexitolu odvodené od sorbitolu a polyoxyetylénové a polyoxypropylénové deriváty týchto esterov. Môžu sa používať zmiešané estery, ako sú zmesné alebo prírodné glyceridy.

Povrchovo aktívne činidlo môže predstavovať 0,1 až 20 % hmotn. z prostriedku, výhodne 0,25 až 5 % hmotn. Doplnenie prostriedku do príslušného množstva sa obvykle uskutoční hnacou látkou. Skvapalnenými hnacími látkami sú obyčajne plyny s teplotou miestnosti, ktoré sú skondenzované pod tlakom. Vhodnými kvapalnými hnacími látkami sú nižšie alkány s až 5 atómami uhlíka, ako je bután a propán, výhodne sú to fluorované a fluorchlorované alkány. Môžu sa používať tiež zmesi horeuvedených látok. Pri výrobe aerosolu sa nádoba s vhodným ventilom naplní príslušnou hnacou látkou, ktorá obsahuje jemne rozomletý peptid alebo peptidy a povrchovo aktívne činidlo. Tieto zložky sa potom udržujú pod zvýšeným tlakom, pokiaľ sa neuvoľnia ventilom.

Pre zvýšenie polčasu séra sa IL-10 môže uzavrieť do toboliek vložených do lumenu lipozómov, pripravených ako koloidná látka. Na predĺženie životnosti peptidov sa môžu použiť i iné konvenčné spôsoby. Tak v niektorých prípadoch sa IL-10 môže uzavrieť do tobolky v lipozóme. Na prípravu lipozómov sú známe rôzne spôsoby, ako je to popísané napr. Szokom a kol.: nn. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 467 (1980) a v US patentoch č. 4 235 871, 4 501 728 a 4 837 028.

Po príprave sa veľkosť lipozómov môže upraviť tak, aby sa získalo požadované rozmedzie veľkosti a relatívne úzka distribúcia veľkosti lipozómov. Jeden z nich je popísaný v US patente č. 4 737 323.

I pri najúčinnnejších spôsoboch prípravy toboliiek môže pôvodná suspenzia lipozómov obsahovať až 50 alebo viac % hmotn. liečiva vo voľnej forme (t.j. vo forme neuzavretej do tobolky). Odstránenie neuzavretej zlúčeniny zo suspenzie lipozómov je možné urobiť niekoľkými spôsobmi. Podľa jedného z nich sa lipozómy v suspenzii peletujú odstredovaním pri vysokej rýchlosti. V supernatante tak ostane voľná zlúčenina a veľmi málo lipozómov. Podľa iného spôsobu sa suspenzia skoncentruje ultrafiltráciou, potom sa skoncentrované lipozómy resuspendujú v ďalšom médiu. Na oddelenie veľkých lipozómových častíc od rozpustených molekúl sa môže použiť tiež gélová filtrácia.

Na horeuvedené liečenie pre použitie ako intravenózne podanie sa suspenzia lipozómov upraví na žiadanú koncentráciu. Táto úprava zahŕňa resuspendovanie lipozómov vo vhodnom objekte média pre injekcie, lipozómy sa skoncentrujú, napríklad odstredovaním alebo ultrafiltráciou alebo zahustením suspenzie. Suspenzia sa potom sterilizuje filtráciou, ako je to vyššie uvedené. Lipozómy obsahujúce peptidy podľa vynálezu sa môžu podávať parenterálne, ako je to už vyššie uvedené.

Zvýšená produkcia IFN- γ : Spôsob podľa tohto vynálezu je zvlášť vhodný vtedy, ak pacient má infekčnú chorobu, pri ktorej pacientov imunitný systém inhibuje produkciu IFN- τ vďaka produkcii IL-4 a IL-10. Medzi reprezentatívne ochorenia tohto typu patrí viscerálna leishmanióza, lepra s infiltrátmi a pliesňové infekcie. Medzi pliesňové infekcie patria rody húb vybraté zo skupiny pozostávajúcej z : Candida, Paracoccidioidomycosis, Blastomyces a Cryptosporidium.

Viacerým infekčným organizmom vyhovujú, buď priamo alebo nepriamo, nízke hladiny IFN- γ . Tieto infekcie sú často chronické

a je pre nich typická nerovnováha Th2 a Th1 odpovedí na infekčné činidlo. Výsledkom tejto nerovnováhy je inhibícia produkcie IFN- γ bunkami Th1 vďaka produkcii IL-4 a IL-10 bunkami Th2.

Protilátky použité v tomto vynáleze sú pre pacienta s výhodou autologné. Vhodné sú tiež nevlastné protilátky odvodené od buniek rovnakého druhu. Môžu sa používať protilátky z rôznych druhov, ale musia sa používať prostriedky na kontrolu možných nepriaznivých imunitných reakcií (HAMA). Napr. poľudštené krysie protilátky, rovnako ako rôzne väzbové fragmenty, môžu minimalizovať imunitnú odpoveď u ľudí. Výhodné tiež budú také protilátky, ktorých väzbové konštanty sú približne rovnaké alebo prevyšujú afinitu IL-4 a IL-10 k ich prírodným receptorom.

Výhodné sú také protilátky, ktoré majú väzbové konštanty na ich odpovedajúce receptory viac ako 100-krát menšie ako tieto cytokiny. Porovnanie väzby sa uskutočňuje štandardnými spôsobmi, pričom základná technológia je popísaná v kapitole 25, diel I : Immunochemistry, red. D.M. Weir, 4. vydanie, 1986, Blackwell Scientific Publ. 25.1 - 25.30. Je možné použiť tiež test na stanovenie molárneho nadbytku protilátky, ktorá neutralizuje definované množstvo IL-4 alebo IL-10 v štandardnom in vitro biologickom teste. Príklady takýchto testov je možné nájsť v Mosmannovi a kol.: J. Immunol. Methods 116, 151 (1989) (IL-4) a Fiorentini a kol.: J. Exp. Med. 170, 2081 (1989). Rozumným množstvom protilátok je také množstvo, ktoré neutralizuje dané množstvo IL-4 alebo IL-10 v 10- až 1000-násobnom nadbytku.

Pojem "spoločne podávané" tak, ako sa tu používa, znamená, že protilátky proti IL-4 a IL-10 sa podávajú časovo tak blízko seba, že u pacienta sú prítomné súčasne. Poradie podávania nie je rozhodujúce. Protilátky sa môžu podávať súčasne alebo oddelene, môžu byť vopred zmiešané alebo sa môžu podávať oddelene.

Prostriedky na podávanie sú typicky parenterálne, s výhodou intravenózne. Protilátky sa môžu pacientovi podávať infúziou štandardnými intravenóznymi spôsobmi. Protilátky sa najskôr sus-

pendujú v sterilnom, fyziologicky zlúčiteľnom médiu, ako je fosforečnanový soľný pufor. S protilátkami sa môžu zniesť farmaceuticky prijateľné riedidlá, akým je lecitín, glukóza, dextróza a antibiotiká.

Množstvo protilátky, ktoré sa podáva súčasne, sa pohybuje v rozmedzí 1 až 10 mg každej protilátky na kg telesnej hmotnosti. Je žiadúce, aby protilátka bola podávaná v takom množstve, ktoré poskytuje cirkulačnú hladinu 1 až 150 $\mu\text{g/ml}$, výhodne 10 až 100 $\mu\text{g/ml}$ séra pre každú protilátku. Protilátky majú typický polčas 2 až 7 dní. Podanie je potrebné zopakovať vtedy, ak hladina ktorejkoľvek protilátky klesne pod požadované množstvo. Množstvo protilátky vo vzorkách séra sa môže merať konvenčnými testami imunity, s výhodou testom ELISA.

Aj keď sú na ilustráciu príkladov uskutočnenia podľa tohto vynálezu použité monoklonálne protilátky proti IL-4 a IL-10, je možné použiť tiež iných antagonistov, napríklad protilátok, ktoré sa špecificky viažu na IL-4 alebo IL-10 receptory a tým inhibujú naviazanie cytokínu. Podobne sa môžu použiť rozpustné formy IL-4 alebo IL-10 receptora, ktorému chýbajú transmembránové domény. Nakoniec, môžu sa použiť antagonisti mutovaných foriem IL-4 a IL-10, ktoré sa silno viažu na odpovedajúce receptory, ale ktorým v podstate chýba biologická aktivita. Jeden z takýchto antagonistov IL-4 mutantu, v ktorom je zvyšok tyrozínu v polohe 124 prírodného ľudského IL-4 nahradený zvyškom kyseliny aspartovej, bol popísaný Krusom a kol.: EMBO J. 11, 3237 (1992).

Antagonisti sa s výhodou súčasne podávajú intravenózne ako sterilná vodná zmes. Táto zmes môže obsahovať akékoľvek farmaceuticky prijateľné riedidlo, ako napr. sterilné pufry, soľný roztok, antibiotiká a pod.

Liečenie sa ukončí vtedy, ak je infekcia pod kontrolou, čo je možné zistiť podľa klinickej odpovede pacienta. Spoločne s týmto vynálezom je možné použiť i liečenie bežnými antibiotikami.

Zápalové črevné ochorenie : Pojem "zápalové črevné ochorenie" alebo "IBD" sa tu používa pre vredovitú kolitídu a Crohnovu chorobu. Podávanie IL-10 pri liečení IBD je s výhodou parenterálne, ako napríklad intravaskulárne. Najvýhodnejším podávaním je intravenózne podávanie a liečeným cicavcom je človek.

Množstvo podávaného IL-10 je obvyčajne v rozmedzí od 1 μ g do 100 mg na kg telesnej hmotnosti. Najvýhodnejšou podávanou dávkou je množstvo od 50 μ g do 100 μ g na kg telesnej hmotnosti.

IL-10 sa môže podávať samotný alebo spoločne s jedným alebo viacerými ďalšími terapeutickými činidlami. Medzi príklady takýchto činidiel, ktoré sú vhodné na reguláciu epizodného zápalu črevného tkaniva, patria kortikosteroidy, sulfasalazín, deriváty sulfasalazínu, imunosupresívne liečivá, ako je cyklosporín A, merkaptopurín, azatioprin a ďalšie cytokiny. Spoločné podávanie môže byť postupné alebo súbežné. Spoločné podávanie zvyčajne znamená, že viac (dve alebo viac) liečív je u príjemcu prítomné istý špecifický čas. Platí, že ak sa druhé činidlo podáva počas polčasu prvého činidla, potom sa toto podávanie považuje za súčasné podávanie oboch činidiel.

Vynález popisuje aj spôsob predpovedania predispozície cicavca na vývoj zápalového stavu, ktoré sa vyznačuje suboptimálnymi dávkami IL-10 a ktoré obsahuje analyzovanie vzorky odobratej cicavcovi na hladinu IL-10. Suboptimálne hladiny zahrňujú nemerateľné množstvá. Merateľná hladina sa môže porovnať s normálnou hladinou IL-10. Komerčne dostupnými diagnostickými zosťavami sa môžu testovať tiež mediátory zápalu, ako je IL-1, IL-6, TNF a IFN- γ .

Nadprodukcia jedného z týchto mediátorov môže naznačovať, že sú dostupné nedostatočné množstvá IL-10. Zdrojom vzorky je s výhodou krv. Tento spôsob umožňuje predpovedať predispozíciu mnohých zápalových stavov, ako je IBD alebo anémia, artritída, dermatitída alebo iné príznaky súvisiace s IBD.

Podľa vynálezu sa získajú tiež farmaceutické prostriedky. Prostriedok na podávanie cicavcovi, ktorý má IBD, ako je vredovitá kolitída alebo Crohnova choroba, obsahuje také množstvo IL-10, ktoré je efektívne na zlepšenie aspoň jedného príznaku alebo znaku IBD u cicavca, a hore popísaný farmaceutický nosič.

Pojem "príznak" (symptóm) znamená akýkoľvek subjektívny prejav choroby alebo pacientovho stavu. Patria sem príznaky vnímané pacientom. Medzi príklady príznakov IBD patrí diarea, abdominálna bolesť, horúčka, melena, hematochézia a strata hmotnosti. Pojem "znak" sa obecné týka akéhokoľvek objektívneho dôkazu choroby alebo stavu, ktoré sa zistí laboratórnym vyhodnotením alebo inými testami, akými je ultrazvuková štúdia alebo rádiografický test.

Medzi niektoré príklady znakov IBD patria abdominálne ťažkosti, glositída, aftózne vredy, análna fisúra, perianálna fisúra, anémia, malá absorpcia a nedostatok železa. Príležitostne sa znaky prekrývajú s príznakmi. Napríklad pacient si sťažuje na krvavú stolicu (príznak) a laboratórny test vzorky stolice je pozitívny na krv (znak).

Farmaceutické prostriedky podľa uskutočnenia tohto vynálezu sú výhodne vo forme, ktorá je vhodná na parenterálne podávanie. Efektívnym množstvom je s výhodou jednotková dávka v ampulke. Efektívne množstvo má byť prítomné tiež v liekovke obsahujúcej viac dáviek, alebo by sa malo ponúkať v nejakej forme. Medzi príklady farmaceuticky prijateľných prísad patria riedidlá, akými sú vodné riedidlá, pufry, protimikrobiálne činidlá a ochranné činidlá.

Na stanovenie IL-10 aktivity sa môžu používať biologické testy cytokinov. Biologický test ľudského lymfotoxínu je popísaný Aggarwalom: *Methods in Enzymology* 116, 441 (1985) a Matthewsom a kol. (red. Clemens a kol.): *Cytokines and Interferons; A Practical Approach*, str. 221 až 225 (IRL Press, Washington, D.C. 1987). Ľudský IL-2 a GM-CSF môžu byť testované na faktor závis-

kých bunkových línii CTLL-2 a KG-1, ktoré sú dostupné od ATCC pod označením TIB 214 a CCL 246. Ľudský IL-3 je možné testovať na jeho schopnosť stimulovať tvorbu rôznych kolónii hematopoézných buniek v kultúrach mäkkého agaru, napr. tak, ako to popisuje Metcalf: The Hemopoietic Colony Stimulating Factors (Elsevier, Amsterdam 1984). INF- γ môže byť kvantitatívne vyhodnocovaný antivírovými testami, napr. Meager v Clemensovi okol. (red.) na str. 129 až 147. Monitorovanie týchto cytokinov dáva užitočné informácie o tom, kedy bolo podané efektívne množstvo IL-10. Môžu sa používať tiež imunochemické testy, ako je ELISA.

IL-10 sa môže podávať vo vodných riedidlách, ako je voda, soľný roztok alebo pufrované riedidlá s pridaním alebo bez pridania rôznych prísad a/alebo riedidiel. Môže sa tiež pripraviť suspenzia, napríklad zinková suspenzia, ktorá obsahuje IL-10. Táto suspenzia je vhodná na subkutánne (sc) alebo intramuskulárne (im) injekcie. Množstvo IL-10 a prísady sa môže pohybovať v širokom rozpätí, pokiaľ sú obidve prítomné v efektívnych množstvách. Množstvo IL-10 by malo byť v rozmedzí od 1 μ g do 100 μ g.

Celkovú dennú dávku predstavuje množstvo od 1 μ g do 100 mg na kilogram telesnej hmotnosti, výhodne v rozmedzí od 10 μ g do 1000 μ g na kilogram telesnej hmotnosti, výhodnejšie v rozmedzí od 50 μ g do 100 μ g na kilogram telesnej hmotnosti. Dávky sa podávajú podľa takej schémy, ktorou sa dosahuje požadovaný terapeutický účinok a ktorá môže byť periodická alebo nepravidelná, môže trvať kratší alebo dlhší čas podľa povahy takýchto zápalov.

Prostriedky sa do tela môžu dostávať orálne alebo injekčne. Medzi prostriedky orálneho podávania patria zlúčeniny, ktoré chránia polypeptidy pred proteínázami a ktoré sa vyskytujú v gastrointestinálnom trakte. Injekcie sú obvyčajne intramuskulárne, subkutánne, intradermálne alebo intravenózne. Podľa okolností sa môžu podávať tiež intraartikulárne injekcie alebo použiť iné možnosti podávania. Prostriedky obsahujúce IL-10 môžu tiež byť pacientovi implantované alebo môžu byť podané injekčne systémom podávania liečiv, viď napr. Urguhart a kol.: Ann. Rev. Pharmacol.

Toxicol. 24, 199 (1984), Lewis (red.): Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals (Plenum Press, New York, 1981) a US patenty č. 3 773 919 a 3 270 960.

Peptid sa s výhodou podáva parenterálne, s výhodou v jednotkovej dávkovej injektovateľnej forme. Príkladmi injektovateľnej formy sú roztoky, suspenzie a emulzie. Výhodnejšie sa efektívne množstvo IL-10 podáva intravenózne.

Pojem "efektívne množstvo" tak, ako je tu definované, znamená množstvo, ktoré je dostatočné na zmiernenie príznaku alebo znaku autoimunného stavu alebo nežiadúcej zápalovej alebo imunitnej odpovede. Medzi typických cicavčích hostiteľov patria myši, krysy, mačky, psi a primáti vrátane človeka. Efektívne množstvo pre príslušného pacienta závisí od faktorov, ako je stav liečeného, celkový zdravotný stav pacienta, forma a dávka podávania a prejav vedľajších účinkov.

Stanovenie príslušnej dávky sa určuje podľa parametrov, ktoré sú odborníkom známe. Obvykle dávkovanie začína množstvom menším ako je optimálna dávka a zvyšuje sa malými prírastkami, pokiaľ sa nedosiahne optimálny účinok, viď The Merck Manual § 269 "Pharmacokinetics and Drug Administration". Dôležitými indikátormi dosiahnutia efektívnej dávky sú hladiny TNF α , IFN- γ , IL-1 a IL-6. Výhodne sa používa IL-10 odvodený od cicavčích typov.

Typicky sa IL-10 podáva injekčne spoločne s farmaceutickým nosičom, akým je normálny soľný roztok, Ringerov roztok, roztok dextrózy a ďalšie vodné nosiče odborníkom známe. Môžu sa používať tiež príslušné nevodné nosiče. Príkladom sú netuhnúce oleje a etyloléat. Výhodným nosičom je 5 % (hmotn.) roztok dextrózy v soľnom roztoku. Často sa vyžaduje, aby v nosiči boli prítomné pomocné činidlá, akými sú pufry a ochranné činidlá alebo iné látky na zvýšenie izotonicity a chemickej stability.

Celková denná dávka sa môže podávať ako jediná injekcia alebo ako kontinuálna infúzia. Môže byť tiež rozdelená do niekoľ-

kých menších dávok pre bolus intravenózne podanie alebo podanie inou formou, akou je intramuskulárna injekcia. IL-10 sa výhodne podáva ako intravenózny bolus.

IL-10 sa môže podávať samotný alebo v kombinácii s inými terapeutickými činidlami. Príkladmi takýchto činidiel pri indikácii zápalu čriev sú kortikosteroidy, sulfasalazín, deriváty sulfasalazínu a vybrané cytotoxické liečivá, akým je cyklosporín A, merkaptopurín a azatioprin. Násobné liečenie sa uskutočňuje tak, že sa oddelene podajú infúzie alebo sa po sebe podajú injekcie. V niektorých prípadoch sa násobné liečenie uskutočňuje tak, že sa liečivá zmiešajú a podávajú sa súčasne infúziou alebo injekciou, napr. IL-10 spoločne s inými cytokínmi, steroidmi alebo terapeutickými reakčnými činidlami.

Je potrebné uviesť, že príznaky IBD môžu byť prípadné, takže sa efektívne liečenie môže dosiahnuť podaním malých dávok vo vhodných momentoch. Malé množstvá kontinuálneho podávania môžu zabezpečiť dlhé obdobie bezepizódneho zdravia pre postihnuté cieľové živočíchy.

Podávanie môže byť súčasné alebo postupné. Obecne pojem "súčasné podávanie" znamená, že obidva cytokiny sú prítomné v príjemcovi počas špecifického časového intervalu. Zvyčajne platí, že ak sa druhý cytokin podáva počas polčasu prvého cytokinu, sú obidva cytokiny podávané súčasne. Súčasné podávanie je s výhodou parenterálne, výhodnejšie intravenózne. Efektívne množstvo sa zvolí v rozmedzí od 15 μg do 1500 μg na kilogram telesnej hmotnosti cicavca.

V tejto časti popisu je popísaná inhibícia hypersenzitívnych reakcií neskorého typu. Toto uskutočnenie vynálezu popisuje in vivo spôsob inhibovania reakcie hypersenzitivity neskorého typu u cicavcov, ktorý zahrňuje podávanie efektívneho množstva IL-10 cicavcovi. Efektívne množstvo IL-4 sa cicavcovi môže podávať súčasne s IL-10, pričom cicavcom je obyčajne človek. Podávanie IL-4 a IL-10 môže byť súčasné alebo postupné, obyčajne parenterálne,

výhodne intravaskulárne.

Vynález popisuje aj spôsob inhibovania bunkovej migrácie na miesto zápalu v tele cicavca. Migrácia buniek sa týka vyrovnaní alebo pritiahnutia bunkovej imunitnej odpovede cicavca, ktorá zahŕňa lymfocyty, monocyty a makrofágy na miesto zápalu. Vynález popisuje aj spôsob inhibície edému v tkanivách.

Horeuvedené spôsoby popisujú podávanie IL-4 a/alebo IL-10, ktoré je parenterálne, ako napr. intravaskulárne, alebo ktoré je v blízkosti miesta zápalu. Efektívne množstvo IL-4 alebo IL-10 sa obyčajne zvolí z rozmedzia od 15 μ g do 1500 μ g na kilogram telesnej hmotnosti cicavca.

Vynález ďalej popisuje in vivo spôsob obmedzenia reakcie hypersenzitivity neskorého typu u cicavcov, ktorý spočíva v súčasnom podávaní efektívneho množstva IL-4 a IL-10 cicavcovi, pričom súčasné podávanie je parenterálne a efektívne množstvo je v rozmedzí od 15 μ g do 1500 μ g na kilogram telesnej hmotnosti cicavca. Výhodné množstvo je možné zvoliť z rozmedzia od 100 μ g do 1000 μ g.

Vynález popisuje zostavu na posilnenie IL-10 sprostredkovej inhibície produkcie cytokínu T bunkami u cicavcov. Zostava obsahuje ampulku s jednotkovou dávkovou zmesou IL-4 a IL-10. Miesto ampulky sa môže použiť i iná nádoba, ako liekovka, plastový sáčok, sklenená skúmavka a podobné. Zmes IL-4 a IL-10 je výhodne vo forme vhodnej na parenterálne podávanie. Jednotková dávka sa zvolí z rozmedzia od 15 μ g do 1500 μ g ako IL-4, tak i IL-10 na kilogram telesnej hmotnosti cicavca.

Vynález sa týka aj spoločného účinku IL-4 a IL-10 na aktivitu T-buniek. Tento vynález prvýkrát popisuje, že táto spolupráca bola identifikovaná špecificky na T-bunkách. Predchádzajúce údaje naznačujú účinky na makrofágy alebo monocyty a efektorovú úlohu makrofága. Aditívny účinok IL-4 a IL-10 na aktivitu T-buniek je prekvapujúci a podporuje ďalšie terapeutické použitia, zvlášť

vzhľadom na bunkami sprostredkovanú imunitu. Nakoľko kombinácia IL-4 a IL-10 posilňuje IL-10 sprostredkovanú inhibíciu produkcie cytokínu T-buniek, tento vynález je vhodný vtedy, ak je potrebné regulovať odpoveď T-buniek, ktorá sa týka produkcie cytokínu. Medzi príklady patrí hypersenzitivita neskorého typu, bunkou sprostredkovaný zápal a proliferácia a aktivácia T-buniek.

Napríklad autoimunitné ochorenie diabetes mellitus typu I sa vyznačuje tým, že ostrovčeky buniek sú infiltrované lymfocytmi, makrofágmi a bunkami plazmy. Potlačenie produkcie cytokínu T-bunkami môže zmierniť príznaky a deštrukciu ostrovčeka buniek u pacienta s diabetes. Tento vynález môže hrať úlohu aj pri liečení bunkami sprostredkovaných imunitných odpovediach pri transplantáciách a implantáciách orgánov.

Je známe, že pri odmietaní ľadvín hrá úlohu imunita sprostredkovaná bunkami. Cytokiny v oblasti transplantovanej ľadviny spôsobujú aktiváciu buniek, proliferáciu, agregáciu, fibrogenézu, inhibíciu rastu a cytotoxicitu. Vynález môže hrať priaznivú úlohu aj pri liečení GVDH. Tiež sarkoidóza, lymfoproliferačná porucha, súvisia s dôkazom odumierania DTH a aktivovaných T alebo pomocných buniek s následnou tvorbou granulómu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález môže byť objasnený nasledujúcimi neobmedzujúcimi príkladmi. Pokiaľ nie je stanovené inak, percentá uvedené pre pevné látky v zmesi sú percentami hmotnostnými vzhľadom k hmotnostným dielom, kvapalín v kvapalinách objemovými k objemovým dielom a v prípade pevných látok v kvapalinách hmotnostné k objemovým dielom.

Inhibícia proliferácie neoplastických buniek závislých od IL-2

Príklad 1

IL-10 inhibuje proliferáciu ľudských Th0, Th1 a Th2 "podobných" klonov po aktivácii anti-CD3 monoklonálnymi protilátkami zosieťovanými na myších L bunkách transfektovaných CD32.

Bunky a bunkové línie

Používajú sa línie T-buniek CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺ a CD8⁺. Klony HY-06, 827 a 837 boli už skôr popísané [Yssel a kol.: Eur. J. Immunol. 16, 1187 (1986) a Haanom a kol.: J. Exp. Med. 174, 583 (1991)]. Klon T buniek 827 rozpoznáva toxín tetanu (TT) v kontexte HLA-DR3 a klon T buniek HY-06 rozpoznáva peptid 2-12 z proteínu Mycobacterium leprae s molekulovou hmotnosťou 65 000. Antigénová špecifickosť klonu T buniek 837 nie je známa.

Klony T buniek SP-B21 a SP-A3 boli získané z pacienta, ktorý mal silnú kombinovanú nedostatočnú imunitu (SCID) a ktorému boli úspešne transplantované fetálny tymus a pečeň [Roncarolo a kol.: J. Exp. Med. 168, 2139 (1988)]. Klony T buniek NP 12, NP 14 a NP 44 boli získané z PBMC atopického pacienta a proliferujú špecificky v odpovedi na peptid p89-117 molekuly Der p 1 hlavného alergénu roztoča v bytovom prachu [Yssel a kol.: J. Immunol. 148, 738 (1992)]. Klony T buniek CR253, CR378, AP74 a AP75 boli izolované z PBMC pacienta, ktorý mal chronickú Lymskú artritídu a reagujú na homológ heat shock proteínu Borrelia burgdorferi s molekulovou hmotnosťou 60 000 (HSP60) [Shanafelt a kol.: J. Immunol. 146, 3985 (1991)].

Tieto klony buniek boli priradené k T pomocným podradám na základe ich profilov produkcie lymfokinov (tabuľka 1). Klony T buniek ($2 \cdot 10^5$ buniek/ml) boli stimulované v dvojtýždenných intervaloch zmesou krvných buniek, ktorá pozostáva z 10^6 ožiarených (4 000 rad) alogénnych periférnych krvných leukocytov (PBL) na ml, 10^5 ožiarených (5 000 rad) buniek na ml B bunkových línií transformovaných vírusom Epstein-Bar (EBV-LCL) JY a 0,1 mg/ml vyčistených PHA (Wellcome Diagnostics, Beckenham, Kent, Anglicko) v 24 jamkách Linbro dosiek (Flow, Mc Lean, Va.), ako to bolo už skôr popísané [Spits a kol.: J. Immunol. 128, 95 (1982)]. Tri až

štyri dni po každej restimulácii sa kultúry rozštepia a ďalej sa expandujú v médiu, ktoré obsahuje 20 jednotiek rIL-2 na ml. Všetky klonované línie T buniek a EBV-LCL boli kultivované v Ysselovom médiu (Yssel a kol.: J. Immunol. Methods 72, 219 (1984) doplnenom 1 % ľudského AB⁺ séra.

Myšie L bunky transfektované CD32 (FcγRII) (16.2CG7) boli pripravené podľa Peltza: J. Immunol. 141, 1891 (1988). Táto citácia je tu zahrnutá ako odkaz. Stručne - bol použitý FcγRII cDNA klon, 16.2, izolovaný z ľudskej monocytovej bunkovej línie mutanta U937 (viď Stuart a kol.: J. Exp. Med. 166, 1668 (1987)). Použitím štandardných spôsobov miestne špecifickej mutagenézy sa vytvorí mutant, ktorému chýba cytoplazmová doména, zavedením mutácií, ktoré menia dva lyzínové kodóny po prvej aminokyseline (arginíne) predpokladanej cytoplazmovej domény na stop kodóny. Prechodná transfekcia myších L buniek sa uskutočňuje štandardnými spôsobmi.

Reakčné činidlá

Rekombinantný IL-10 sa exprimuje v E. coli. Vyčistí sa podľa spôsobu popísaného v spisoch: de Waal Malefyt a kol.: J. Exp. Med. 174, 915 (1991) a WO 91/00349, viď vyššie.

Proliferačné testy

Klonované T bunky sa používajú 10 až 12 dní po stimulácii kŕmnymi bunkami. V tomto štádiu boli klony T buniek malé a v "odpočívajúcom" stave. Klony T buniek ($2 \cdot 10^4$ buniek na jamku) boli inkubované L bunkami transfektovanými CD32 ($2 \cdot 10^4$ buniek na jamku) v prítomnosti anti-CD3 mAbs (SPV-T3b) ($1 \mu\text{g/ml}$) [Spits a kol.: Hybridoma 2, 423 (1983)] v 200 μl miskách s plochým dnom (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ). L bunky boli predinkubované s mAbs ($1 \mu\text{g/ml}$) 1 hod. v prítomnosti alebo bez prítomnosti IL-10 (100 jednotiek na ml) pred tým, ako sa pridajú

T bunky, a boli kultivované 72 hodín. Na L bunky sa potom pôsobí mitomycinom C (50 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) pri teplote 37° C po dobu 45 minút a následne pred použitím sa štyrikrát premyjú. Bunky sa inkubujú 72 hodín pri teplote 37° C a s 5 % oxidu uhličitého sa na ne pôsobí 4 hodiny [³H]TdR a boli izolované tak, ako to popisujú Yssel a kol.: Eur. J. Immunol. 16, 1187 (1986). Tieto výsledky boli vyjadrené ako počet impulzov za minútu zahrnutého [³H]TdR a predstavujú strednú hodnotu troch kultivácií.

Účinky IL-10 na proliferáciu klonov T buniek sa neodlišujú zostavou produkovaných T bunkových lymfokinov. Klony T buniek 837, SP-B21 a 827 po aktivácii produkujú IL-2, IL-4 a IFN- γ a sú teda považované za reprezentantov ľudských Th0 klonov. HY-06, CR 253, CR 378, CR 380, AP 74 a AP 75 produkujú vysoké hladiny IFN- γ a nezistiteľné alebo nízke množstvo IFN- γ po aktivácii ich špecifickým antigénom. Klon T buniek SP-A3 po aktivácii produkuje IL-2, IL-5, IFN- γ a GM-CSF, ale nikdy nie IL-4.

Ako je uvedené v tabuľke 1, IL-10 po aktivácii inhibuje proliferáciu klonov T buniek 837, SP-B21, SP-A3, 827, HY-06, CR 253, CR 378, CR 380, AP 74, AP 75, NP 12 a NP 44. IL-10 nie je teda schopný inhibovať proliferáciu klonov T buniek patriacich ku všetkým T pomocným podskupinám. Obecne IL-10 inhibuje proliferáciu klonov T buniek pri podmienkach tohto testu na 20 až 50 %. Táto inhibícia je závislá od dávky a je špecifická, pretože je možné ju zvrátiť neutralizovaním anti-IL-10 mAb 19F1.

Tabuľka 1

Vplyv IL-10 na proliferačnú odpoveď ľudských Th0, Th1 a Th2 klonov po aktivácii anti-CD3 mAbs zosieťovaných na CD32 (Fc RII) transfektovaných L bunkách

inkorporácia [³ H]TdR] (počet impulzov za minútu.10 ⁻³)			
typ klonov T buniek	klon T buniek	kontrola	+IL-10 (100 j./ml)
T pomocné 0	837	69	51
	SP-B21	88	51
	827	5,5	3,5
	SP-A3	28	12
T pomocné 1	HY-06	11	8
	CR253	12,8	10
	CR378	14,9	4,3
	CR380	19,8	8,5
T pomocné 2	AP74	22	9
	AP75	38	33
	NP12	72	49
	NO44	15,3	7

Myší IL-10, ktorý je špecifickou časticou, nemá žiadny vplyv na proliferáciu týchto klonov ľudských T buniek. To naznačuje, že IL-10 priamo pôsobí na klony T buniek a nie na CD32 transfektovanej myšiej L bunky použitej na skrížené naviazanie anti-CD3 mAbs. Tieto výsledky ukazujú, že IL-10 priamo inhibuje proliferáciu ľudských Th0, Th1 a Th2 klonov po aktivácii TCR/CD3 komplexom anti-CD3 mAbs zosieťovaných na L bunkách transfektovaných CD32.

Príklad 2

IL-10 inhibuje proliferáciu CD4⁺ klonov T buniek nezávisle od ko-stimulačných signálov poskytovaných ICAM-1, LFA-3 alebo B7

Aktiváciu klonov ľudských T buniek je možné upraviť interakciou prídavných molekúl na T bunkách s ich opačnými štruktúrami na antigén prezentujúcich bunkách (APC). Ukázalo sa, že interakcia medzi LFA-1 a ICAM1, CD2 a LFA3, CD28 a B7 alebo CTLA-4 a B7 dáva ko-stimulačné signály posilňujúce proliferáciu a efektorové funkcie T buniek. Na stanovenie, či IL-10 inhibuje proliferáciu T buniek ovplyvnením ko-stimulačnej funkcie týchto prídavných molekúl, boli vytvorené L bunky, ktoré exprimujú CD32 a ICAM1, LFA-3 alebo B7.

Vytvorenie pCD-SRa-LFA-3 HYG, pCDM8-ICAM-1 HYG a pBJ-B7 HYG

LFA-3 cDNA bola získaná z Raji cDNA knižnice PCR amplifikáciou použitia LFA-3 špecifických primerov. Raji cDNA knižnica bola vytvorená v pCD-SRa vektore, ako to bolo popísané skôr [Matsui a kol.: Science 154, 1788 (1991)]. Na klonovanie transmembránovej formy LFA-3 boli použité nasledujúce primery :
sense 5'-GGCTGCAGCGACGAGCCATGGTTGCTGGGAGCGACGCG-3' (nt 780 až 745).

Na vhodné subklonovanie amplifikovaných produktov bol LFA-3 sense primer narhnutý s Pst-I miestom a LFA-3 antisense primer s miestom Kpn-I. Amplifikácia sa uskutočňuje pri nasledujúcich podmienkach: 1 µg plazmidovej DNA rozštiepenej pôsobením Hind-III z Raji knižnice sa amplifikuje v 50 µl reakciu obsahujúcej po 25 móloch každého primeru, po 125 mI dGTP, dATP, dCTP a dTTP (Pharmacia, Uppsala, Švédsko), 50 nM KCl, 10nM tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 1 mg/ml želatíny a 5 jednotiek Tag polymerázy (IBI, New Haven, Kt.).

Zmesi sa inkubujú v 20 cykloch (denaturácia 30 s, 94° C, anelácia 30 s, 55° C, predĺženie 60 s, 72° C) prístrojom Perkin-Elmer /Cetus DNA Thermal Cycler. Odoberie sa 5 ul podiel a podrobí sa druhej časti amplifikácie pri rovnakých podmienkach. Reakcia sa extrahuje chloroformom a nanesie sa na 1 % agarový gel. Amplifikovaný produkt s očakávanou veľkosťou 785 párov nukleotidov sa po rozdelení vyreže z gélu, izoluje sa adsorpciou na

silikagéli pomocou zostavy Geneclea kit (Bio 101, La Jolla, Ka.), rozštiepi sa pôsobením Pst-1 a Kpn-1 a subklonuje sa v Bluescripte II KS(+) (Stratagene, La Jolla, Ka.).

Štandardnými spôsobmi sa izolujú mnohé klony obsahujúce LFA-3. Štyri klony sa sekvenujú dideoxy-terminačnou metódou s použitím zostavy na sekvenovanie Sequenase DNA sequencing kit (USA, Cleveland, Oh.). Všetky štyri klony sú na 100 % identické s publikovanou sekvenciou. Izoluje sa Pst-1-Kpn-1 fragment jedného z týchto klonov a subklonuje sa do pCD-SRa 296 expresívneho vektora Matsui a kol., viď vyššie.

pCDM8-ICAM-1 [Blanchard a kol.: J. Immunol. 138, 2417 (1987)] bol darom Dr. Briana Seeda (Massachusetts General Hospital, Boston, Ma.). Amínocyklitol-fosfotransferázový gén, ktorý kóduje rezistenciu na hydromycín-B, bol umiestnený pod kontrolu promotora SV-40 a polyadenylačných signálov a štandardnými spôsobmi bol vložený do miest Sfi-I pCD-SRa-LFA-3 a pCDM8-ICAM-1. Získajú sa tak pCD-SRa-LFA-3 HYG a pCDM8-ICAM-1 HYG. pB7-B7-HYG obsahuje ľudský B7 pod kontrolou SRa promotora, Makgoba a kol.: Nature 331, 86 (1988). Bol získaný darom od Dr. L. Laniera (DNAX Research Institute).

L bunky, ktoré expresiou dávajú HLA-DR3 alebo CD32, boli transfektované pCD-SRa-LFA-3-HYG, pCDM8-ICAM-1-HYG alebo pBJ-B7-HYG lipofekciou (BRL, Gaithersburg, Md.) podľa postupu uvedeného výrobcom. Bunky boli štiepené 48 hodín po transfekcii. Pridané bolo médium, ktoré obsahuje 200 µg/ml hydromycínu-B (Lilly, Indianapolis, In.), a toto médium bolo vymieňané každé 3 dni.

Po 12 dňoch boli viditeľné jednotlivé kolónie, rezistentné na hydromycín-B. Tieto bunky boli spojené, sfarbené na expresiu LFA-3, ICAM-1 alebo B7 nepriamou imunofluorescenciou a čistené dvoma po sebe nasledujúcimi kolami pozitívneho triedenia na FACS-Star Plus. Kontransfektované bunkové línie boli udržiavané v RPMI-1640, doplnenom o 200 µg/ml hydromycínu-B a 10 % FCS.

Pre FACS analýzu sa bunky inkubujú v mikrotitrovacích doskách s dnom v tvare V (Flow Laboratories, Mc Lean, Va.) s vyčistenou mAb (10 µg/ml) 30 minút pri 4° C. Po dvoch premytiach PBS, ktorý obsahuje 0,02 mM azidu sodného a 1 % BSA (Sigma, St. Louis, Mo.) boli bunky inkubované s 1/40 riedenia FITC označených fragmentov F (ab)2 kozieho protimýšieho protilátky (TAGO, Inc., Burlingame, Ka.) 30 minút pri 4° C. Po troch ďalších premytiach sa vzorky označených buniek analyzujú prietokovou mikrofluorimetriou (FMP) na FACScane (Becton Dickinson, Sunnyvale, Ka.). Používa sa anti-LFA-3 mAbs TS 2/9, ktorá bola popísaná Krenským a kol.: J. Immunol. 132, 2180 (1984). Boli použité anti-ICAM-1 mAb LB2 a anti-B7 mAb L307, ktoré popísali Azuma a kol.: J. Exp. Med. 175, 353 (1992).

Klony T buniek boli aktivované pôsobením anti-CD3 alebo anti-CD2 mAbs zosieťovaných na L bunkách koexprimujúcich CD32 a ICAM-1, LFA-3 alebo B7 v neprítomnosti alebo v prítomnosti IL-10. Bolo zistené, že proliferácia klonov T buniek SP-B21 a NP 12 bola zosilnená vtedy, keď klony boli stimulované anti-CD3 mAbs prezentovanými CD32 transfektovanými L bunkami, ktoré koexprimovali ICAM-1 a LFA-3. Koexpresia LFA-3 bola účinnejšia pri zvyšovaní proliferácie klonov T buniek v porovnaní s ICAM-1 alebo B7 a viedla stabilne k 2 až 4-násobnému zvýšeniu proliferácie. Pri koexpresii ICAM-1 bolo pozorované len mierne zvýšenie proliferácie. B7 obyčajne neovplyvňuje proliferáciu klonov T buniek.

IL-10 inhiboval proliferáciu odpoveď klonov T buniek po aktivácii anti-CD3 mAbs zosieťovaných na L bunkách transfektovaných CD32 i v prítomnosti ICAM-1, LFA-3 a B7. Avšak inhibícia pôsobením IL-10 proliferácie klonov T buniek aktivovaných CD32 bunkami exprimujúcimi LFA-3 bola menej významná.

Proliferácia klonov T buniek by mohla byť indukovaná tiež mitogénnou kombináciou anti-CD2 mAbs zosieťovaných na L CD32 bunkách pre klony T buniek SP-B21 a NP-12. Klony T buniek ($2 \cdot 10^4$ buniek na jamku) boli stimulované anti-CD2 mAbs X11-1 (0,5 mg/ml)

a D66 (0,5 mg/ml) v 200 μ l miskách s guľatým dnom (Linbro, Flow laboratories, Mc Lean, Va.), ako je vyššie uvedené. Produkcia týchto protilátok je popísaná Brottierom: J. Immunol. 135, 1624 (1985).

Proliferácia T buniek nebola ovplyvnená vtedy, ak sa ko-exprimoval ICAM-1 alebo LFA-3. Bolo však pozorované mierne zvýšenie proliferácie vtedy, ak sa použili L bunky koexprimujúce CD32 a B7. Proliferácia klonov T buniek indukovaná anti-CD2 bola inhibovaná na 30 až 50 % tiež v prítomnosti IL-10 vtedy, ak boli použité L bunky exprimujúce CD32 a ICAM-1, LFA-3 alebo B7. IL-10 neovplyvnil expresiu LFA-1, CD2 alebo CDE28 klonov T buniek. Súhrnne tieto výsledky poukazujú na to, že priamy inhibičný vplyv IL-10 na proliferáciu T buniek nebol dôsledkom zmien ko-stimulačných signálov poskytovaných ICAM-1, LFA-3 alebo B7.

Príklad 3

IL-2, ale nie IL-4, môže zmeniť inhibíciu proliferácie T buniek indukovanou IL-10

Na stanovenie, či by IL-2 alebo IL-4 mohli zmeniť inhibíciu proliferácie T buniek indukovanou IL-10, boli klony T buniek aktivované anti-CD3 alebo anti-CD2 mAbs zosieťovanými na L bunkách expresujúcich CD32 a ICAM-1, LFA-3 alebo B7 v prítomnosti IL-2 alebo IL-4. IL-2 sa pridá v množstve 20 j./ml a IL-4 v množstve 200 j./ml. Vyčistený ľudský r-IL-4 (špecifická aktivita $2 \cdot 10^7$ j./mg) bol dodaný firmou Schering-Plough Research (Bloomfield, NJ.).

Bolo zistené, že pridanie IL-2 v nízkych koncentráciách by mohlo úspešne prevrátiť inhibičné účinky IL-10 na proliferáciu klonov T buniek SP-B21 a NP-12. Pridanie IL-4 v koncentrácii 200 j./ml by však nemohlo prevrátiť tieto inhibičné efekty IL-10 na proliferáciu T buniek. Kultivovanie klonov T buniek v trvaní až 72 hodín v prítomnosti IL-10 nevedie k zníženiu regulácie expre-

sie IL-2 receptora α alebo β reťazca. Navyiac, aktivácia klonov T buniek PHA v prítomnosti IL-10 nemala žiadny efekt na indukciu expresie IL-2 receptora α a β reťazca. Bola použitá anti-IL-2R α mAb B10, popísaná Hervom a kol.: Blood 75, 1017 (1990). Použitá bola tiež anti-IL-2R β mAb Tu 27, popísaná Takeshitom: J. Exp. Med. 169, 1323 (1989). Tieto výsledky súhrnne ukazujú, že inhibícia proliferácie T buniek IL-10 by mohla byť prevrátená účinkom IL-2, nie však účinkom IL-4 a to pravdepodobne preto, že dochádza k inhibícii produkcie IL-2.

Príklad 4

IL-10 inhibuje produkciu IL-2, ale nie IL-4, IL-5, IFN- γ a GM-CSF klony ľudských T buniek.

Na stanovenie, či priamy inhibičný efekt IL-10 na proliferáciu klonov T buniek existuje vďaka inhibícii produkcie IL-2, boli klony T buniek 837, SP-B21, 827, HY-06, CR 253, NP 12 a NP 44 aktivované anti-CD3 mAbs zosieťovanými na L bunkách transfektovaných CD32 a ICAM-1, LFA-3 alebo B7 v neprítomnosti alebo v prítomnosti IL-10 po dobu 24 hodín. Produkcia IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ a GM-CSF bola meraná testom ELISA špecifickým pre cytokin. Citlivosť týchto testov ELISA bola : IL-2 : 10pg/ml, IL-4 50 pg/ml, IL-5 : 50 pg/ml, IFN- γ : 300 pg/ml a GM-CSF : 50 pg/ml.

Klony T buniek boli izolované na testy produkcie lymfokinov 10 až 12 dní po stimulácii kŕmnymi bunkami, ako to bolo už vyššie uvedené. Bunky boli inkubované 24 hodín pri teplote 37° C, vo zvlhčenej atmosfére s 5 % oxidu uhličitého, kultivačné supernatanty boli izolované, odstredované pri 250 x G, rozdelené na jednotlivé podiely a pred testovaním skladované pri teplote -20° C.

Aktivácia klonov T buniek viedla k produkcii IL-2, IL-4, IL-5, GM-CSF a IFN- γ podľa ich odpovedajúcich profilov produkcie Th bunkovej podrady cytokinov. Všeobecne boli namerané najvyššie

hodnoty produkcie cytokinov vtedy, keď klony T buniek boli aktivované L bunkami exprimujúcimi CD32 a LFA-3 alebo B7. V skutočnosti bola produkcia IL-2 detegovaná prevažne v supernatantoch klonov T buniek aktivovaných anti-CD3 na L CD32-LFA-3 a L CD32-B7 transfektantoch. IL-10 silne inhibuje produkciu IL-2 klonmi T buniek. Produkcia IL-4 nebola ovplyvnená IL-10, zatiaľ čo produkcia IL-5, GM-CSF a IFN- γ bola IL-10 len nepatrne inhibovaná. IL-10 teda špecificky inhibuje produkciu IL-2 aktivovanými klonmi ľudských T buniek.

Príklad 5

IL-10 inhibuje produkciu IL-2 klonmi ľudských T buniek po polyklonálnej aktivácii

Na zistenie, či IL-10 je schopný priamo pôsobiť na klony ľudských T buniek pri inhibícii produkcie lymfokinu, boli klony T buniek 827, SP-B21 a NP 44 aktivované acetátom tetradekanoylforbolu (TPA) (Calbiochem), anti-CD3 mAbs a TPA, PHA a TPA alebo mitogénnou kombináciou anti-CD2 mAbs v neprítomnosti prídavných buniek. Klony T buniek boli stimulované pri koncentráciách $1 \cdot 10^6$ buniek/ml, PHA (100 μ g/ml), antiCD3 mAb SPV-T3b (1 μ g/ml) a TPA (1 μ g/ml).

Ako je znázornené v tabuľke 2, polyklonálna aktivácia klonov T buniek 827, SP-B21 a NP 44 vedie k vysokým hladinám produkcie lymfokinu podľa ich produkcie. IL-10 silne inhibuje produkciu IL-2 týmito klonmi vo všetkých testovaných spôsoboch aktivácie, zatiaľ čo produkcia IL-4, IL-5, IFN- γ a GM-CSF nie je ovplyvnená. IL-10 bol schopný inhibovať produkciu IL-2 týmito klonmi T buniek po aktivácii anti-CD3 + TPA a následne Ca^{2+} ionoforom + TPA, čo naznačuje, že mechanizmus inhibície nezahrňuje cesty transdukcie signálu T bunkový receptor/CD3 a že tento mechanizmus pôsobí v smere aktivácie proteínovej kinázy C.

Tabuľka 2

Vplyv IL-10 na produkciu lymfokinov klonmi T buniek 827, HY-06 a NP 44 po aktivácii anti-CD3 mAbs a TPA, PHA a TPA alebo ConA

klon		produkcia lymfokinov (ng/ml)					
T buniek	stimul	IL-2		IL-4		IL-5	
		-	+	-	+	-	+
827	médium	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	10,6	<u>4,9</u>	6,1	6,4	2,4	2,9
	PHA+TPA	17,8	<u>5,7</u>	5,1	4,0	0,8	0,6
	ConA	3,4	<u>1,4</u>	2,3	2,4	ND	ND
HY-06	médium	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	1,3	<u>0,2</u>	ND	ND	ND	ND
	PHA+TPA	5,0	<u>2,0</u>	ND	ND	ND	ND
	ConA	5,1	<u>0,2</u>	ND	ND	ND	ND
NP 44	médium	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	0,5	<u>ND</u>	18,6	19,6	6,3	5,9
	PHA+TPA	1,3	<u>0,3</u>	35,4	33,5	8,4	7,9
	ConA	0,3	<u>ND</u>	20,1	18,7	7,8	7,3

Vplyv IL-10 na produkciu lymfokinov klonov T buniek 827, HY-06 a NP 44 po aktivácii anti-CD3 mAbs a TPA, PHA a TPA alebo ConA

klon T buniek	stimul	produkcia lymfokinov (ng/ml)			
		IFN- τ		GM-CSF	
		+	-	+	-
827	médium	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	26,9	21,0	15,4	15,2
	PHA+TPA	32,8	39,3	14,3	15,5
	ConA	32,6	33,7	14,0	15,2
HY-06	médium	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	23,9	25,5	10,0	13,2
	PHA+TPA	17,6	19,9	16,4	13,1
	ConA	12,8	14,9	14,2	13,3
NP 44	médium	ND	ND	ND	ND
	CD3+TPA	1,5	1,1	9,1	8,8
	PHA+TPA	1,4	1,6	13,1	14,6
	ConA	2,6	2,6	18,9	18,9

Klony T buniek (10^6 buniek/ml) boli aktivované anti-CD3 mAbs (0,5 μ g/ml) a TPA (1 ng/ml), PHA (200 ng/ml) a TPA alebo (ConA 10 μ g/ml) bez prítomnosti alebo v prítomnosti IL-10 (100 j./ml) 24 hodín. Produkcia IL-2, IL-4, IL-5, IFN- τ a GM-CSF bola stanovená testami ELISA špecifickými na cytokiny.

ND: znamená nedetegované (menej ako citlivosť príslušnej ELISY)

Príklad 6

IL-10 inhibuje IL-2 produkciu klonov ľudských T buniek na úrovni mRNA

Na stanovenie toho, na akej úrovni IL-10 inhibuje produkciu IL-2, bola Northernovými blotmi analyzovaná expresia IL-2, IL-4, IL-5 a IFN- γ mRNA v klonoch T buniek NP-12, HY-06, 827, SP-A3, 837 a SP-B21 po aktivácii anti-CD3 mAb a TPA bez prítomnosti alebo v prítomnosti IL-10. Celková RNA bola izolovaná spôsobom podľa Chirgwina a kol.: Biochem. 18, 5294 (1979). Northernové analýzy boli urobené podľa de Waal Malefyt: J. Immunol. 142, 3634 (1989).

Pre Northernové analýzy boli použité nasledujúce sondy: PstI XbaI fragment (nt 1 až 285) s 285 párami nukleotidov z pCD-hIL-2, ktorý popísali Yokota a kol.: In Lymphokines 13 (1987), NheI-EcoRI fragment (nt 106 až 424) s 318 párami nukleotidov z pCD-hIL-4, ktorý popísali Yokota a kol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5894 (1986), PstI-HincII fragment (nt 5 až 1106) s 1100 párami nukleotidov, ktorý popísal Yokota (viď vyššie) a PstI fragment s 1200 párami nukleotidov z pA1, ktorý popísali de Waal Malefyt a kol.: J. Immunol. 145, 2297 (1990).

IL-10 silne inhibuje množstvo IL-2 mRNA exprimovanej v týchto klonoch, ale neovplyvňuje expresiu IL-4 a IL-5 Th0 a Th2 podobných klonov alebo expresiu IFN- γ , Th0- a TH1-podobných klonov. Tieto výsledky ukazujú, že IL-10 špecificky inhibuje produkciu IL-2 klonov ľudských T buniek na úrovni mRNA.

Príklad 7

IL-10 inhibuje produkciu IL-2 T bunkami izolovanými z periférnych krvných buniek

V tomto príklade bolo zisťované, či IL-10 môže inhibovať proliferáciu a produkciu IL-2 odpočívajúcimi T bunkami. T bunky boli izolované z periférnej krvi a aktivované anti-CD3 alebo anti-CD2 mAbs zosieťovanými na CD32 transfektovaných L bunkách samotných alebo CD32 L bunkách, ktoré koexprimujú ICAM-1, LFA-3 alebo B7. Z potahov zrazených leukocytov zdravých darcov sa odst-

reďovaním cez Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostics, St. Louis, Mo.) hustotný gradient podľa Boyuma A.: Scan. J. Clin. Lab. Invest 21 (Suppl. 97), 77 (1968) izoluje PBMNC.

T bunky sa vyčistia z PBMNC zachytením na umelej hmote, pasážovaním kolónou s nylonovou vlnou a negatívnou selekciou magnetickou depleciou. Stručne - $100 \cdot 10^6$ PBMNC sa kultivuje 30 minút pri teplote 37°C v 100 mm miske pre pletivové kultúry (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ.) v Ysselovom médiu doplnenom o 1 % ľudského AB séra. Nezachytené bunky sa odstránia a pasážujú sa kolónou s nylonovou vlnou (Robbins Scientific, Sunnyvale, Ka.) [Julius a kol.: Eur. J. Immunol. 3, 645 (1973)]. Bunky sa potom inkubujú s nasýtenými koncentráciami anti-CD14 (Leu M3), CD16 (LEU 11a), CD19 (Leu 12) a CD56 (Leu 19) mAbs 30 minút pri teplote 4°C , premyjú sa a inkubujú s magnetickými perličkami potiahnutými ovčím protimýšim IgG (Dynabeads M450, Dynal A.S., Oslo, Nórsko) pri pomere perličiek k bunkám 40 : 1.

Táto zmes sa inkubuje a mierne trepe 30 minút pri teplote 4°C . Bunky v tvare ružice sa odstránia magnetickým koncentrátorom častíc podľa doporučenia výrobcu. Populácie T buniek boli 97 až 99 % CD2^+ , CD3^+ . Anti-CD14 (Leu-M3), CD16 (Leu 11a), CD19 (Leu 12) a CD56 (Leu 19) mAbs a kontrolné mAbs príslušných izotypov boli získané od Becton Dickinson, Mountain View, Ka.

PBMNC T bunky ($2 \cdot 10^5$ buniek/jamku) boli stimulované anti-CD3 alebo anti-CD2 mAbs zosieťovanými na LFc γ RII bunkových transfektantoch, ako už bolo hore uvedené. Po 24 hod. inkubácie pri teplote 37°C sa izolujú kultivačné supernatanty.

Bolo zistené, že odpočívajúce T bunky boli úplne závislé od prítomnosti antigénu B7 na CD32 L bunkách pre aktiváciu. Ako anti-CD3, tak anti-CD2 mAbs zosieťované na CD32 L bunkách boli neúčinné pri indukovaní proliferácie T buniek a produkcie lymfokinov. Navyiac, tieto bunky ostávali neúčinné po kotransfekcii ICAM-1 alebo LFA-3 do týchto buniek. Avšak anti-CD2 alebo anti-CD3 mAbs zosieťované do CD32 buniek, ktoré boli kotransfek-

tované B7, indukovali silnú proliferáciu T buniek a vysoké množstvo produkcie IL-2, IFN- γ a GM-CSF. IL-10 v týchto podmienkach významne neinhiboval proliferáciu odpočívajúcich T buniek. Oproti tomu IL-10 inhiboval produkciu IL-2, ale nie produkciu IFN- γ a GM-CSF týmito bunkami.

Množstvo IL-2 produkované v prítomnosti IL-10 však bolo ešte dostatočné na indukovanie maximálnej proliferácie v okamihu testu (3. deň). Súhrnne tieto výsledky ukazujú, že angažovanie CD28 alebo CTLA-4 na T bunkách interakciou s B7 na prídavnej bunke bolo absolútne nutné na indukciu proliferácie a produkciu lymfokínu odpočívajúcimi T bunkami a že IL-10 bol v týchto podmienkach ešte stále schopný inhibovať produkciu IL-2.

Príklad 8

IL-10 inhibuje antigénovo špecifickú proliferáciu T buniek, ak sa ako APC použijú myšie L bunky transfektované ľudskými HLA molekulami

Skúmané boli účinky IL-10 na antigénovo špecifickú proliferáciu na toxín tetánu (TT) špecifického klonu T buniek 827 a M. Leprae 65 kD hsp pt [2-12] špecifického klonu T buniek HY-06, ak boli ako bunky prezentujúce antigén, použité myšie L bunky transfektované HLA-DR3 alebo HLA-DR3 a ICAM-1, LFA-3 alebo B7, ako je to hore uvedené. FACS profily expresie HLA-DR, ICAM-1, LFA-3 a B7 transfektantov L buniek ukázali, že IL-10 nemal žiadny vplyv na konštitutívnu expresiu skupiny II MHC týchto buniek.

Toxín tetánu bol poskytnutý Dr. B. Bizzinim (Institute Pasteur, Paríž, Francúzsko) a bol použitý v konečnej koncentrácii 1 $\mu\text{g/ml}$. Hsp pt [2-12] bol pripravený spôsobom syntézy peptidov v pevnej fáze a skontrolovaný analytickou HPLC na obrátených fázach a aminokyselinovou analýzou. Peptidy boli používané v konečnej koncentrácii 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Stimulácia klonov T buniek 827 a HY-06, analýzy proliferácie a merania cytokinov boli uskutočňované tak, ako je to vyššie uvedené. Bolo zistené, že IL-10 inhibuje antigénovo špecifickú proliferáciu HY-06 a 827 L bunkami transfektovanými HLA-DR3 ako antigén prezentujúcimi bunkami (APC) v závislosti od dávky. IL-10 pridaný v množstve 10 j./ml mal inhibičnú aktivitu a v dávke 100 j./ml a 500 j./ml bola získaná 30 až 50 % inhibícia proliferácie.

Tieto výsledky boli potvrdené vtedy, ak ako APC boli použité L bunky transfektované HLA-DR a ICAM-1, LFA-3 alebo B7. Proliferačné odpovede klonov T buniek 827 a HY-06 boli zvýšené, ak sa použili L bunky kotransfektované LFA-3, a inhibičný účinok IL-10 bol menej významný. Inhibícia proliferáčnych odpovedí 827 a HY-06 pôsobením IL-10 bola úplne prevrátená neutralizovaním anti-IL-10 mAb 19F1, čo poukazuje na špecifickosť inhibície. Tieto výsledky ukázali, že IL-10 inhiboval antigénovo špecifické proliferačné odpovede 827 a HY-06, ak sa ako APC použili HLA-DR transfektované myšie L bunky.

Bolo zistené, že inhibícia antigénovo špecifickej proliferácie pôsobením IL-10 existuje na úrovni T buniek. Aby sa toto potvrdilo, boli klony T buniek 827 a HY-06 aktivované TT a pt [2-12] v prítomnosti ľudského alebo myšieho IL-10. Tým sa skúmalo, či IL-10 pôsobil na antigén prezentujúce L bunky alebo priamo na klony T buniek. Ako bolo hore diskutované, ľudský IL-10 je účinný na ľudské a myšie bunky, ale myší IL-10 je účinný len na myšie bunky.

Bolo zistené, že myší IL-10 nebol schopný inhibovať antigénovo špecifickú proliferáciu 827 a HY-06, ak sa ako APC použili L bunky transfektované HLA-DR alebo kotransfektované ICAM-1, LFA-3 alebo B7. Tieto výsledky ukazujú, že IL-10 mal priamy vplyv na proliferáciu klonov ľudských T buniek.

Klony T buniek 827 a HY-06 boli aktivované TT alebo pt [2-12] s L bunkami exprimujúcimi HLA-DR alebo v kombinácii s

ICAM-1, LFA-3 alebo B7 v prítomnosti alebo bez prítomnosti IL-10 a IL-2, aby sa zistilo, či pridanie exogénneho IL-2 zmení inhibičné účinky IL-10. Nízke koncentrácie IL-2 by mohli prevrátiť inhibičné účinky IL-10 na antigénovo špecifickú proliferáciu klonov T buniek 827 a HY-06.

Klon T buniek HY-06 bol aktivovaný [2-12] s L bunkami exprimujúcimi HLA-DR3 samotný alebo v kombinácii s ICAM-1, LFA3 alebo B7 v prítomnosti alebo bez prítomnosti IL-10. Produkcia IL-2 a IFN- γ bola stanovená v kultúre supernatantov izolovaných po 24 hodinách. IL-10 inhiboval produkciu IL-2, ale nie IFN- γ klonom T buniek HY-06 po antigénovo špecifickej aktivácii. Súhrnne tieto výsledky ukazujú, že IL-10 inhiboval antigénovo špecifickú proliferáciu T buniek špecifickou inhibíciou produkcie IL-2.

Zápalové črevné ochorenia

Bol vyvinutý myšší model IBD. Tento model prispieva na objasnenie pôvodu alebo mechanizmu IBD. Je tiež experimentálnym základom pre rôzne terapeutické činidlá. Pre vývoj tohto modelu sa gén IL-10 buď odstráni alebo sa uskutoční to, že v pokusnom zvierati bude neúčinný alebo neexpresovateľný. O tomto zvierati sa potom hovorí, že má gén IL-10 "ochromený" alebo že ide o "knock-autované" zviera (KO). KO je možné dosiahnuť niekoľkými rôznymi spôsobmi, ktoré sú odborníkom známe.

Je možné napríklad získať transgenného živočícha, ktorého gén IL-10 má byť inaktivovaný, viď Goodnow C.: "Transgenic Animals", 1502 až 1504, Encyclopedia od Immunology, Ritt (red.), Academic Press, San Diego (1992). V stručnosti- vyčistená DNA sa podá mikroinjekciou do pronuklea oplodnených oocytov, potom sa oocyty chirurgicky implantujú do vajcovodu zvieraťa použitého ako pestúnka. Na izoláciu homozygotného mutovaného zvieraťa kmeňa je možné použiť tiež štandardné spôsoby genetického kríženia.

Existujú tiež spôsoby, ktoré inaktivujú špecifické gény v zárodočnej línii myši. V tomto prípade sa do miesta génu prírodného typu homológovej rekombinácie zavedie mutovaný transgén. Línie embryonálnych kmeňových (ES) buniek "sa môžu izolovať a kultivovať in vitro z myších blastocytov a neskôr reimplantovať do iného blastocytu tak, aby čiastočne kolonizovali ako somatické tkanivá tak i tkanivá zárodočnej línie výslednej myši" (Goodnow na str. 1503).

Do ES buniek v kultúre sa zavedie DNA. Blastocyty sa chirurgicky implantujú do pestúnky. Výsledkom je heterozygotný mutantný predok, ktorý sa navzájom skríži, takže nakoniec má potomok dve mutované alely, napr. sa získa homozygotný mutant. Títo potomci by nemali mať žiadne funkčné alely génu, o ktorý ide, a mali by umožňovať "genetické vyrezanie", aby sa odstránili špecifické gény. Analýza výsledného potomka môže poskytnúť pohľad na úlohu cieľového génu v KO myši pri získavaní výsledných fenotypov.

Ďalšie spôsoby tvorenia experimentálnych zvierat s deléciami príslušného génu uvádza napr. viď McMahon a kol.: "The Midbrain-Hindbrain Phenotype of Wnt-1-/Wnt-1-Mice results from Stepwise Depletion of engrailed - Expressing Cells by 9.5 Days Postcoitum", Cell 69, 581 (1992), a Travis "Scoring a Technical Knockout in Mice", Science 256, 1392 (1992). Ďalšie aplikovateľné spôsoby v odbornej literatúre popisujú spôsoby mutagenézy a antisenzie technológie, viď hore uvedený Goodnow C. (1992).

Príklad 9

Myší model pre zápalové črevné ochorenie

Boli získané myši, ktoré boli zbavené génu IL-10, viď Kuhn a kol.: Science 254, 7097 (1991) ; Capecchi: Science 244, 1288 (1989) ; Robertson (red.) "Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A Practical Approach, I.R.L. Press, Oxford 1987, a

Zijestra a kol.: Nature 336 (1986) pre popisy všeobecného spôsobu a postupov získania myši zbavených zvoleného génu. Na myši, ktorým chýba gén IL-10, sa tu odkazuje ako na IL-10 myši alebo ako na knockoutované (KO) myši.

Prvá skupina : Štyri myši boli zabitú pre analýzu kostnej drene. Časť ich drene bola analyzovaná, aby sa stanovila ich schopnosť produkovať myeloidných a erytroidných predkov (viď tabuľka 3) a aby bola posúdená produkcia kmeňových buniek (viď tabuľka 4). Ostatná časť drene bola použitá na dlhodobú kultiváciu kostnej drene, aby sa posúdila schopnosť buniek z najbližšieho okolia podporovať normálnu hematopoézu generáciu. Brzlík a slezina obsahovali normálne počty T buniek a normálne počty B buniek. Analýzy krátkodobého predka a kmeňových buniek sú uvedené nižšie v tabuľkovej forme. Bunky z kontroly a z KO myši boli spojené oddelene.

Tabuľka 3

Počet kolónií vytváraných buniek /stehenná kosť

celkový počet buniek/ /stehenná kosť	GM	BFU-e	CFU-e	Meg	Meg/Mix
kontrola: $9,5 \cdot 10^6$	18430	475	42500	2470	285
IL-2T: $9,4 \cdot 10^6$	21902	940	59740	2271	658

GM znamená granulocyty a makrofágy

BFU znamená jednotky tvoriace krv

CFU znamená jednotky tvoriace kolóniu

-e znamená erytroid

Meg znamená megakaryocytické kolónie

Meg/Mix znamená megakaryocyty zmiešané s inými líniami

Faktory stimulujúce kolónie použité v teste: IL-3 + IL-6 + erythropoetín (Epo)

Tabuľka 4

Počet CFU-S 14. deň

kontrolná skupina:	1678 na stehennú kosť
IL10T skupina:	1517 na stehennú kosť

Produkcia kmeňových buniek znamená počet CFU-S v stehennej kosti myši. CFU-S je mierou tvorby hemopoézných uzlíkov v slezine smrteľne ožiarených myší po transplantácii, viď Till a kol.: Radiation Research 14, 213 (1961).

IL10T myši nevykazovali žiadny zrejmy defekt pri produkcii myeloidných, erytroidných a kmeňových buniek. Súčasne dlhodobé kultúry vytvorili vrstvu podporného väzivového tkaniva vo všetkých kultúrach z IL-10 myší. Tieto kultúry boli usporiadané do dvoch stupňov: Prvý stupeň : bunky boli kultivované tak, aby vytvorili komplexné vrstvy podporného tkaniva potrebné na podporu kontinuálnej tvorby krvi. Tieto kultúry boli potom preočkované ďalšími bunkami kostnej drene z ekvivalentných typov donorov, takže poskytli skutočne prekursory, ktoré asociujú s bunkami podporného väzivového tkaniva. Tento druhý stupeň bol urobený po tom, čo bola dostupná druhá a tretia skupina myší.

Druhá a tretia skupina: Na dokončenie dlhodobých pokusov kultivácie kostnej drene boli potrebné bunky kostnej drene týchto zvierat. Okrem použitia ich kostnej drene na tieto účely boli urobené ďalšie procedúry (viď tabuľky 5 až 9). IL-10T - zvierat boli anemické, ale zdalo sa, že majú normálne hladiny prekursorov kostnej drene. Preto boli vyhodnotené ich anémie a ich orgány boli histologicky vyšetrené.

Tabuľka 5

Počty v periférnej krvi

myši		WBC/ml $\cdot 10^6$	RBC/ml $\cdot 10^6$	doštičiek/ml $\cdot 10^6$
kontrola	č. 1	7,2	7,3	12,6
	č. 2	11,2	5,6	10,7
	č. 3	10,0	6,7	8,5
	č. 4	8,2	5,6	9,8
	č. 5	7,7	5,6	8,0
IL-10T	č. 1	4,0	2,4	20,6
	č. 2	4,8	7,1	8,0
	č. 3	7,5	3,9	27,3
	č. 4	6,5	5,5	23,9

WBC znamená biele krvinky

RBC znamená červené krvinky

Tabuľka 6

Diferenciály periférnej krvi

myši		% lymf.	% neut.	% mono.	% eos.	% retik.
kontrola	č. 1	87	12	1	0	2,4
	č. 2	72	26	2	0	1,2
	č. 3	80	18	1	1	0,6
IL-10T	č. 1	36	64	0	1	3,8
	č. 2	40	57	0	3	5,3
	č. 3	23	77	0	0	17,1

lymf. znamená lymfocyty

neut. znamená neutrofily

mono. znamená monocyty

eos. znamená eosinofily

retik. znamená retikulocyty

RBC morfológia: Všetky kontrolné zvieratá mali normálny vzhľad červených krviniek (RBC). IL-10T myši vykazovali rozličnú morfológiu. IL-10T č. 1 mali mikrocytické bunky, č. 2 a 3 mali mikrocytické bunky a nejaké makrocytické, polychrómne bunky a prípadne nukleované červené krvinky (NRBC). Nátery červených krviniek boli zafarbené novou metylénovou modrou. Spočítané boli bunky so zafarbením ribozómov. Pozitívne zafarbenie sa vyskytuje vo veľmi mladých červených krvinkách (retikulocytov) a zahrňuje prematurované uvoľnenie z hemopoézných orgánov. Tento počet sa označuje ako počet retikulocytov.

Histológia orgánov IL-10T myší: Podľa prehliadky časti srdca, pľúc, ľadvín a brzlíka sa zdá, že všetko je normálne. Pečeň sa zdá byť tiež v poriadku až na náhodilé ložiská jednojadrových a neutrofilných granulocytov. Slezina bola makroskopicky abnormálna. Boli prítomné folikuly, ale oblasť červenej drene bola vyplnená hematopoéznymi bunkami, väčšinou NRBC a blastocytmi (nematurované bunky). Bolo nájdených niekoľko alebo nebola nájdená žiadna RBC a nebolo zistené ukladanie železa v makrofágoch.

Tabuľka 7

Diferenciály buniek sleziny

(% z celkového množstva buniek)								
myši	bunky/ slezina	lymf.	mono.	neu.	eos.	bunky/ plazma	blast.	nuk. RBC
kontrola								
č. 1	1,5.10 ⁸	88	2	1	<1	<1	1	6
č. 2	1,5.10 ⁸	89	1	<1	<1	<1	2	7
č. 3	1,1.10 ⁸	79	3	4	1	2	2	8
IL-10T								
č. 1	2,1.10 ⁸	64	2	7	1	1	2	22
č. 2	2,5.10 ⁸	54	2	13	3	1	6	21
č. 3	1,6.10 ⁸	43	2	10	1	1	10	32

lymf. znamená lymfocyty
 mono. znamená monocyty
 neu. znamená neutrofilny
 eos. znamená eozinofily
 blast. znamená blastocyty
 nuk.RBC znamená nukleované červené krvinky

Tabuľka 8
 Diferenciály kostnej drene

(% z celkového množstva)								
myši	neu.	neu.	eos.	eos.	nuk.	plazma	lym.	blast.
		MB		MB	RBC	bunky		nedif.
kontrola								
č. 1	46	12	10	4	20	<1	4	4
č. 2	39	9	5	3	37	<1	5	2
č. 3	35	10	12	4	29	<1	6	2
IL-10T								
č. 1	46	12	7	2	28	<1	2	2
č. 2	56	19	4	1	18	<1	1	1
č. 3	53	14	2	1	27	1	1	1

neu. MB znamená neutrofilný myeloblast
 eos. MB znamená eozinofilný myeloblast
 nuk. RBC znamená nukleované RBC
 blast nedif. znamená primitívny nediferencovaný blastocyt
 lym. znamená lymfocyty

Nasledujúce údaje sú výsledkami analýz tvorby kolónií. Tieto analýzy boli robené s bunkami sleziny a tiež s bunkami kostnej drene. Na stimulovanie buniek tvoriacich kolónie boli použité IL-3 + C-kit ligand namiesto IL-3 + IL-6. Kombinácia IL-3 + C-kit ligand je pri stimulovaní erytroidných prekursorov účinnejšia, ako je to vidieť z porovnania počtov BFU-e získaných pri prvej

analýze (hore) s počtami BFU-e získanými v nasledujúcich analýzach.

Tabuľka 9

Testy tvorby kolónií

myš	GM	GEM	GEMN	BFU-e	CFU-e	MEG	MEG/MIX
slezina (kolónie/slezina)							
C1	18535	618	309	9268	42322	618	1236
C2	7736	893	595	2678	44926	1488	893
C3	8670	650	650	7152	71741	433	433
K1	55020	8400	3360	51660	393120	2100	6300
K2	111060	25746	10601	96925	498762	14135	12116
K3	68274	20096	9890	103050	1012633	14357	9252
kostná dreň (kolónie/stehenná kosť)							
C1	37300	3632	838	7963	35065	978	419
C2	49159	2552	510	5954	81478	680	1021
C3	30343	1916	639	6069	24754	958	958
K1	63440	1823	1641	8750	58336	1276	1276
K2	37340	6570	438	8870	47085	986	1424
K3	35432	4006	1753	14273	52208	1628	4132

C1, C2 a C3 sa týkajú rovnakých kontrolných myší, tiež označovaných ako kontrola č. 1, č. 2 a č. 3

K1, K2 a K3 sa týkajú rovnakých myší označovaných tiež ako IL-10T č. 1, č. 2 a č. 3

GM znamená granulocyt, makrofág

GEM znamená granulocyt, erytroid, makrofág

GEMN znamená granulocyt, erytroid, makrofág, megakaryocyt

Tabuľka 10

Testy krvi vo výkaloch

myš		1. deň	2. deň
kontrola	č. 1	neg.	neg.
	č. 2	neg.	neg.
	č. 3	žiadna vzorka	neg.
IL-10T	č. 1	neg.	neg.
	č. 2	poz.	poz.
	č. 3	poz.	poz.

Vyšetrenie výkalov

Štúdie výkalov IL-10T myši nezistili prítomnosť vajíčok, ktoré by poukázali na infekciu parazitmi. Neexistuje žiadny dôkaz prítomnosti maturovaných parazitov v tenkom alebo v hrubom čreve.

Zvieratá boli mierne až značne anemické. Anémiu nie je možné vysvetliť neschopnosťou generovať erytrocyty. IL-10T myši vykazujú snahu vyrovnať sa s anémiou. Po prvé, myši produkovali v svojej slezine väčší ako normálny počet prekursorov RBC. Slezina myši má snahu kompenzovať deficit RBC, je dvakrát väčšia ako v normálnych zvieratách a vykazuje nadmernú aktivitu pri snahe generovať RBC.

Niektoré z myši boli dobre kompenzované. Vykazovali takmer normálny počet RBC v krvi a nemali uvoľnených veľa nematurovaných buniek v obehu, pretože počet ich retikulocytov bol relatívne normálny. Iné myši však boli mimo normálnej hodnoty a do obehu vpúšťali nematurované bunky, čo je dôvodom pre to, prečo mali taký vysoký počet retikulocytov (t.j. 17 %). V obehu cirkulovalo tiež niekoľko nukleovaných RBC.

Tieto myši mali tiež vyšší ako normálny počet doštičiek a

zvýšený počet megakaryocytov v svojej slezine. To bol znak toho, že môžu krváčať. Stratou krvi je možné vysvetliť chronickú anémiu s vyčerpaním zásob železa (tento deficit železa bol zrejmý ako v kompartmentoch sleziny, tak i v kostnej dreni). Po pitve bolo jasné, že myši nemali žiadne vnútorné krvácanie, avšak väčšina z IL-10T myší mala v svojich výkaloch krv a tiež mala prolapsus konečníka. Myši boli podrobne vyšetrené a bolo zistené, že sú negatívne na mrľu detskú, na pásomnicu alebo na iné parazitárne infekcie. Bola zistená priama korelácia medzi pozitívnym nálezom krvi vo výkaloch a silou ich anémie.

Okrem anémie a problému s krvácaním mali IL-10T myši v krvi viac neutrofilných granulocytov ako lymfocytov. To je opakom toho, čo je u myší normálnym stavom, viď diferenciál periférnej krvi (tabuľka 6). Toto pozorovanie je v súlade tiež s obrovským zvýšením myeloidných prekursorov zistených v testoch tvorby kolónií v slezine (tabuľka 9). Myši teda trpeli príznakom "anémie z chronického zápalu".

Pri pitve boli skúmané sekcie tkanív pripravených z IL-10T myší a kontrolných myší z rovnakého hniezda. Všetky vzorky kontrôl sa zdali byť normálne. Pokiaľ ide o IL-10T myši, tkanivo brzlíka a chrbtice bolo normálne. Slezina vykazovala mierne až značné zvýšenie erytroblastov a myeloblastov plus megakaryocytov. Sústava RBC bola malá alebo v podstate neexistovala. Zafarbenie pruskou modrou ukázalo na vyčerpanie zásob železa. To bol dôkaz zvýšenej extramedulárnej hematopoézy.

Vyčerpanie zásob železa je v súlade so stratou krvi a vedie k abnormálnej erytropoéze. Pri makroskopickom skúmaní vykazovali sleziny 1,5 až 3-krát väčšiu veľkosť ako normálne. Mezenterické lymfatické uzliny boli veľmi veľké v porovnaní s normálnymi a boli takmer tak veľké, ako normálna slezina. Podobne boli zväčšené folikuly B a T buniek. Tento obraz je v súlade so zápalovou odpoveďou.

Tenké črevo malo dobre vytvorenú mukózu a submukózu. V

niektorých sekciách bol počet polymorfonukleovaných bielych buniek (PMN) a jednojadrových buniek mierne zvýšený. Hrubé črevo a konečník vykazovali viditeľný zápal konečníka od približne dolnej časti tračníka. Je zrejme značné množstvo edému a infiltrujúcich buniek. Prevládajúcim typom buniek boli PMN, ale prítomné boli aj eozinofily, lymfocyty, plazmové bunky a epiteloidné bunky (bunky, ktoré pripomínajú epitel). Zápal zasiahol mukózu, krypty a submukózu. Príležitostne sa infiltráty nachádzali v svalovej vrstve, najmä vo vnútornej oblasti zvierača. Na mnohých plochách sa stratil alebo bol neprítomný epitel. Viac poranení vykazoval fibrózný materiál s agregovanými RBC a PMN. Niektoré krvné cievy boli zapchaté RBC. Zhluky epitelových buniek predpokladajú včasnú tvorbu granulómu, ale granulómy neboli zrejme dobre vytvorené. Nebol dokázaný žiadny výskyt parazitov, vajíčok alebo intracelulárnych baktérií, ktoré by mohli spôsobiť chronický zápal. Násobné poranenia a hemoragie boli v súlade s pozitívnym výsledkom testu na skrytú krv vo výkaloch. Celkový obraz bol v súlade s IBD, s druhou anémiou a chudnutím.

Príklad 10

IL-10 KO myši odpovedajú na liečenie exogénnym IL-10

Boli skúmané štyri myši, ktoré boli zbavené IL-10 génu (IL-10 KO), a tri normálne kontrolné myši. Vzhľad kontrolných myši bol normálny. Všetky tri kontrolné myši boli negatívne na výskyt skrytej krvi vo vzorkách výkalov a mali aj normálne vyzerajúci konečník. Niektoré z IL-10 KO myši boli zjavne menšie ako kontroly a vykazovali znaky slabšieho zdravia. Mali zješené chlpy a malý životný elán v porovnaní s normálnymi kontrolami. Jedna zo štyroch IL-10 KO myši bola zhrbená a mala abnormálnu chôdzu. Všetky štyri IL-10 KO myši mali napuchnutý konečník a erytematózne rektálne tkanivo alebo prolapsus konečníka.

Dve z pokusných KO myši mali pozitívny nález na skrytú krv vo vzorkách výkalov dvakrát, zatiaľ čo tretia myš bola raz

negatívna a druhýkrát nejednoznačná. Rektálne nátery boli urobené všetkým štyrom myšiam. Tri mali hnisavé výpotky s veľkým počtom neutrofilných granulocytov. V jednotlivých náteroch zvierat, ktoré v čase odoberania vzoriek krvácali z konečníka, boli prítomné tiež erytrocyty. Pretože IL-10 KO myši časom vykazovali pokles síl, bola ako časť skúmania zaznamenávaná hmotnosť IL-10 KO myší a normálnych kontrolných myší.

Trom z IL-10 myší bolo injekčne denne v priebehu dvoch týždňov podávaných 35 μ g IL-10. Tieto tri myši mali stále hnisavé výpotky (len 2 z 3 mali tiež známky krvácania a 1 z 3 sa zhrbila a abnormálne behala). Jednej IL-10 KO myši (negatívnej na krvácanie a hnisavý výpotok) a normálnym kontrolám boli denne v priebehu dvoch týždňov podávané injekcie trometamínového (TRIS) pufru. Bol sledovaný celkový zdravotný stav, fyzický zjav, rektálny výpotok, výskyt skrytej krvi a hmotnosť.

Po dvoch týždňoch infúzie IL-10 všetky tri IL-10 KO myši mali zvýšenú životnú silu, hladké chlpy, normálne držanie tela a normálnu chôdzu. Všetkým trom sa zmenšil opuch konečníka, aj keď ešte boli prítomné znaky zápalu. Všetky tri myši mali negatívne výsledky na skrytú krv a v ich rektálnom nátere sa nevyskytovali erytrocyty. Množstvo výpotkov bolo znížené, v ich rektálnych náteroch však boli pozorovateľné ešte neutrofilné granulocyty. Náter jedného zo zvierat teraz mal viac epitelových a lymfocytových buniek ako neutrofilných granulocytov. Jedno zo zvierat si udržiavalo svoju hmotnosť približne 16 gramov, u ďalších dvoch sa hmotnosť zvýšila zo 16 na 17,8 g a z 11,4 na 14 gramov.

IL-10 KO myš, ktorej bol podávaný TRIS pufor po dobu dvoch týždňov, mala negatívny výskyt skrytej krvi vo vzorke stolice. Myš mala silný výpotok, ktorý obsahoval veľké množstvo neutrofilných granulocytov. Konečník bol ešte stále opuchnutý a citlivý na prolapsus. Zviera bolo zhrbené, malo abnormálnu chôdzu a vykazovalo tiež zrejmé znaky chudnutia. Jeho hmotnosť sa znížila zo 16,6 g na 14 g. Normálne kontroly, ktorým bol tiež injekčne

podávaný TRIS pufor, si zachovali svoj normálny zdravotný vzhľad, vrátane konečníka. Vzorky stolice boli negatívne na skrytú krv a neboli zistené žiadne výpotky z konečníka. Ich hmotnosť sa zvýšila zo 17,1 na 19 g a 17,4 g na 18,7 g, dokonca aj o niekoľko týždňov neskôr zvieratá mali stále zvýšenú hmotnosť.

Príklad 11

- . Zlepšovanie znakov alebo príznakov zápalového črevného ochorenia
- . Človek ako pacient s IBD môže byť liečený IL-10 podľa vynálezu nasledujúcim spôsobom. Takýto pacient má príznaky, medzi ktoré patrí diarea, abdominálna bolesť, horúčka, melena, hematochézia a strata hmotnosti, a znaky, medzi ktoré patrí abdominálna hmotnosť, glositída, aftózný vred, análna fisura, perianálna fisura, anémia, malá sorbcia a deficit železa. Pacient sa zo začiatku lieči 5 μ g IL-10 na kg hmotnosti na deň. Ak pacient váži 70 kg, začiatočná dávka je 350 μ g IL-10 na deň. Táto dávka sa podáva ako intravenózný bolus. Táto dávka sa zvyšuje o 50 až 150 μ g na deň podľa znášanlivosti a reakcie pacienta. Optimálne dávky 700 μ g na deň (10 μ g na kg na deň) sa dosiahnu počas niekoľkých dní.

- . Pred začiatkom liečenia a potom denne až niekoľko dní po skončení liečenia sa pacient sleduje klinicky a laboratórnymi parametrami, medzi ktoré patrí počet krviniek vzhľadom k celkovému počtu bielych krviniek a diferenciál. Zvlášť zaujímavé je to, či počty bielych krviniek zostávajú v norme alebo bez významnej zmeny v porovnaní s ich množstvom pred liečením pacienta. Vzhľadom na diferenciál bielych krviniek je veľká pozornosť venovaná tomu, či sa v periférnej krvi objavujú nematurované formy a či zostáva stály, alebo sa mení normálny pomer rôznych typov bielych krviniek. Zvláštna pozornosť sa venuje pomeru lymfocytov a monocytov v periférnej krvi.

Medzi ďalšie parametre, ktoré môžu byť sledované, patrí

rýchlosť sedimentácie erytrocytov (ESR), chemické profily a množstvo IL-6, TNF a IFN- γ v krvi. Nakoniec pravidelne, napríklad denne, sa hodnotí stolica pacienta na krv a hnisavý výpotok, čo môže ukazovať na reakciu pacienta na liečenie. Liečením sa zlepšuje jeden alebo viac príznakov alebo znakov črevného zápalu.

Inhibícia hypersenzitívnych reakcií neskorého typu

Príklad 12

Zníženie účinkov v myšiach

Na BALB/c myši sa vopred pôsobí anti-CD4 monoklonálnou protilátkou (MoAb) a po štyroch týždňoch sú infikované *Leishmania major*. BALB/c sú komerčne dostupné myši inbredného kmeňa získané od Simonsen Laboratories (Gilroy, Kalifornia). Tieto myši sa používajú vo veku 8 až 12 týždňov. *L. major* (kmeň W3HO označenia WHOM/-/173) sa kultivuje ako promastigoty v M199 (dostupné od GIBCO, Grand Island, NY.) obsahujúcim 30 % plodového teľacieho séra (FCS) (dostupné od J.R. Scientific, Woodland, Ka.), 2 mM L-glutamínu a po 100 j./ml penicilínu a streptomycínu. Promastigoty sa izolujú z kultúry v stacionárnej fáze a premyjú sa soľným roztokom pufrovaným fosforečnanom (PBS). Myši sa potom infikujú $1,5 \cdot 10^7$ živými promastigotami injekčne subkutánne do ľavej zadnej tlapky. Antigén *L. major* sa pripraví štyrmi cyklami zmrazenia a roztopenia parazitov a nasledujúcim odstredovaním. Antigénový prípravok sa pridá do kultivačných jamiek v množstve $2 \cdot 10^6$ organizmov na ml.

Pre in vitro testy boli použité nasledujúce monoklonálne protilátky (McAbs): neutralizujúci protimyši IL-4 MoAb (ATCC č. HB188), neutralizujúci protimyši IL-10 McAb (pripravený spôsobom pre anti-IL-4 popísaný Chatelainom a kol.: J. Immunol. 148, 1182 (1992)) a protimyši CD4 (ATCC č. TIB207). Všetky protilátkové prostriedky boli vyčistené zo supernatantov pletivovej kultúry chromatografiou na ionexe a gélovou filtráciou. Obsahovali menej ako 3 endotoxínové jednotky (EU) na mg proteínu

podľa merania Limulusovým testom aglutinácie.

Na čistenie buniek boli použité nasledujúce vyčistené McAbs: biotinylovaná RM-4-5 a RM-4-4, protimyší CD4 a AMS-32.1, protimyší Mac-1 (ATCC č. TIB128), RA3-6B2 a protimyší B220 [Coffman: Immunological Reviews 69, 5 (1982)]. Rekombinantný myší IL-4 a IL-10 boli exprimované v *E. coli* a vyčistené afinitnou chromatografiou, ako to bolo už popísané.

Podkolenné lymfatické uzliny (LN) odvádzajúce sekréty z miesta infekcie L.major boli odstránené 4 až 6 týždňov po infekcii myší BALB/c alebo BALB/c vopred liečených anti-CD4 a rozdelené na suspenzie jednotlivých buniek v PBS obsahujúcom 0,25 % hovädzieho sérového albumínu (BSA). Pri čistení CD4⁺ T buniek boli všetky úkony robené pri teplote 4° C. Asi $4 \cdot 10^8$ LN buniek bolo označených 2 ml PBS/BSA roztokom obsahujúcim po 12 µg/ml anti-B220, anti-Mac-1, anti-CD8 a anti-triedy II I-A^d po dobu 30 minút. Suspenzia McAb označených buniek sa po premytí PBS/BSA inkubovala na rotujúcom kolese 30 minút s ovčimi protikrysími potiahnutými perličkami Dynabeads (Dynabeads sú dostupné od firmy Robbins Scientific, Mountain View, Ka.) v pomere 3 perličky na bunku. Magnetickým oddelením boli získané negatívne bunky.

CD4⁺ T bunky boli ďalej obohatené z výslednej suspenzie buniek, ktoré mali 85 % CD4⁺, pozitívnym výberom magneticky aktivovaných buniek druhom buniek (MACS, Miltenyi, Düsseldorf, Nemcko). Stručne -bunky sa značia 12 µg/ml biotinylovaným anti-CD4 v PBS/BSA, 50 ml/ 10^8 buniek, 15 minút. Premyjú sa PBS a inkubujú sa streptavidinovými mikroperličkami (od firmy Becton Dickinson, Sunnyvale, Ka.) v množstve 50 µl/ 10^8 buniek. Po 15 minútach sa pridá Streptavidin-PE na konečnú koncentráciu 1/50. Po ďalších 5 minútach inkubácie sa suspenzia buniek premyje a nechá sa prejsť magnetickou kolónou. Bunky, ktoré sa na zomagnetizovanej kolóne zadržia, sa eluujú odstránením kolóny od magnetu a viacerým premytím PBS/BSA. Výsledná populácia buniek bola viac ako 96 % CD4⁺.

Splenocyty zbavené T buniek boli pripravené zo sleziny nor-

málnych darcov, z ktorých boli negatívnou selekciou použitím ovčích proti-krysích Dynabeads odstránené anti-CD4 a anti-CD8 zafarbené bunky presne podľa horeuvedeného popisu pre LN bunky. Prípravky boli bežne na 99 % negatívne na CD4 a CD8 podľa FACS analýzy.

Neoddelené bunky lymfatických uzlín alebo vyčistené CD4+ T bunky boli usporiadané do dvojnásobných kultúr v cRPMI obsahujúcom 5 % FCS vo vyznačených dávkach, v 250 ul objemových doskách s 96 jamkami s guľatým dnom spoločne, v prípade vyčistených CD4+ T buniek, $5 \cdot 10^5$ normálnych buniek zbavených splenocytov v prítomnosti alebo v neprítomnosti antigénu L. major. cRPMI označuje úplné kultivačné médium obsahujúce RPMI-1640 (dostupné od J.R.H. Biosciences, Lenaxa, Kansas), 10 % FCS, 2 mM L-glutamínu, 0,05 mM 2-ME a 100 jednotiek penicilínu a streptomycínu na ml.

Na bunky prezentujúce antigén (APC) sa pôsobilo 4 hodiny antigénom L. major (ekvivalent $2 \cdot 10^6$ organizmov/ml), alebo samotným médium 4 hodiny. Splenocyty zbavené T buniek boli pred kultivovaním vystavené pôsobeniu γ -žiarenia (1000 rad.). Do kultivačných jamiek sa v niektorých prípadoch pridá rekombinantný IL-10 (rIL-10) (50 μ g/ml), rekombinantný IL-4 (rIL-4) (100 ng/ml) a/alebo neutralizujúci McAbs na tieto cytokiny. Supernatanty na detekciu syntézy cytokinov sa izolujú po 72 hodinách.

Množstvo cytokinov v supernatantoch sa stanovuje dvojmiestnym sendvičovým testom ELISA, ako je to hore popísané pre IFN- γ , IL-4, IL-10 a IL-3 (viď Chatelain a kol., 1992). Vzorky boli kvantitatívne vyhodnotené porovnaním so štandardnými krivkami vyčisteného rekombinantného alebo prírodného cytokinu.

Predbežné pôsobenie anti-CD4 MoAb pôvodne odstránilo živočíšne dostupné T bunky, ale nakoniec posilnilo rezistenciu živočícha na parazitárnu reakciu vyvolanú L. major. Aj keď bol tento jav protizmyselný a jeho mechanizmus nie je jasný, bol často pozorovaný. DTH silne koreluje s rezistenciou živočícha na parazitárnu infekciu.

Štyri týždne po infekcii bola u živočíchov vyvolaná reakcia antigénom *Leishmania* (získaný roztavením a zmraznutím) v protiľahlej tlapke. Počas nasledujúcich 48 hodín bolo opuchanie tlapky merané kaliprom. Každému zvieraťu bolo intraperitoneálne podaných 5 dáviek cytokinov. Jednej skupine bolo podaných 5 dáviek IL-4, druhej 5 dáviek IL-10 a tretej skupine 5 dáviek kombinácie IL-4 s IL-10. Každá z 5 dáviek bola podávaná po 12 hodinách s tým, že prvá dávka bola podaná 12 hodín pred vyvolaním reakcie antigénom.

Tabuľka 11

Kombinácia IL-4 s IL-10 inhibuje DTH na antigény *L. major*

liečenie	veľkosť tlapky ($\text{mm} \cdot 10^{-2}$)
20 μg IL-4	84 ± 16
20 μg IL-10	68 ± 7
20 μg IL-4 + 20 μg IL-10	33 ± 11
4 μg IL-4 + 4 μg IL-10	54 ± 25
PBS kontrola	91 ± 20

Tabuľka 11 ukazuje veľkosť myšej tlapky po 24 hodinách od injekcie antigénu *Leishmania*. Odpoveď kontrolných zvierat, ktorým bola podaná injekcia samotného PBS, je porovnaná s odpoveďou zvierat, ktorým bol podaný IL-4, IL-10 alebo kombinácia oboch v uvedených množstvách. Cytokiny boli podávané intraperitoneálne (ip) každých 12 hodín po dobu 48 hodín s tým, že prvá dávka bola podaná 12 hodín pred vyvolaním reakcie antigénom. V každej skupine bolo 5 zvierat. Tieto výsledky ukazujú, že myšiam liečeným samotným IL-4 sa darilo približne rovnako ako myšiam liečeným PBS. Myši, ktoré boli liečené samotným IL-10, mali menšie opuchy ako kontrolné myši. Myši, ktoré boli liečené kombináciou IL-4 s IL-10 mali najmenšie opuchy, najmä skupina, ktorá bola liečená po 20 μg každého cytokinu.

Tabuľka 12

Kombinácia IL-4 s IL-10 inhibuje DTH na antigény L. major

liečenie	veľkosť tlapky (mm.10 ⁻²)
50 µg IL-4	73 ± 11
50 µg IL-10	65 ± 12
50 µg IL-4 + 50 µg IL-10	43 ± 13
20 µg IL-4 + 20 µg IL-10 + ICA	42 ± 9
20 µg IL-4 + 20 µg IL-10 + αIL-10 + αIL-4	93 ± 21
PBS kontrola	119 ± 27

Tabuľka 12 ukazuje údaje druhého nezávislého pokusu. Rámec pokusu bol rovnaký až na to, že údaje o tlapke boli zisťované 48 hodín po injekcii antigénu *Leishmania*.

V každej skupine bolo 5 zvierat. Inhibičný účinok IL-4 a IL-10 bol blokováný podávaním 2 mg monoklonálnej protilátky proti IL-4 a 5 mg monoklonálnej protilátky proti IL-10. Protilátky proti IL-4 a IL-10, použité ako kontroly, boli podané ip 12 hodín pred prvým podaním cytokinov. 5 mg izotypovej kontrolnej monoklonálnej protilátky (ICA), pridanej ako negatívna kontrola, nemalo na inhibíciu žiadny vplyv. ICA bola pridaná podľa už spomínaného Chatelaina a kol., 1992.

Protilátky proti IL-4 a IL-10 boli pridané preto, aby sa ukázalo, že kompetícia na IL-4 a IL-10 znižuje účinok cytokinov. Tieto protilátky tiež dávajú ďalšiu kontrolu rekombinantne produkováných cytokinov.

Tieto údaje ukazujú, že kombinácia IL-4 s IL-10 je na zníženie DTH reakcie zvierata účinnejšia ako ktorýkoľvek cytokin samotný. IL-10 samotný je účinnejší ako samotný IL-4, ale menej účinný ako kombinácia. Podávanie kombinácie cytokinov s monoklonálnymi protilátkami proti obom cytokinom vedie k negácii účinnosti liečenia cytokinmi.

Tabuľka 13

Produkcia IFN- γ z LN buniek miesta indukcie DTH

liečenie	IFN- γ (ng/ml)
20 μ g IL-4	147 $\pm$ 34
20 μ g IL-10	109 $\pm$ 49
20 μ g IL-4 + 20 μ g IL-10	53 $\pm$ 33
PBS kontrola	242 $\pm$ 54

Údaje v tabuľke 13 boli získané podávaním cytokinov každých 12 hodín až do 24 hodín po vyvolaní reakcie antigénom, začínajúc 12 hodín pred vyvolaním reakcie antigénom. Bunky z lymfatických uzlín (LN) z miesta injekcie antigénu *Leishmania* boli odobraté zvieratám, ktorým bol podaný cytokin a antigén, 5 dní po vyvolaní reakcie antigénom. Stĺpec označený "liečenie" sa týka liečenia zvierat, ktorým boli odobraté bunky LN. Lymfatické uzliny boli stimulované in vitro pôsobením antigénu *L. major* získaného zmrazením a roztápaním. Supernatant bol testovaný na obsah IFN- γ p o 72 hodinách. Uvedené údaje sú od troch jednotlivých zvierat ($n = 3 \pm$ štandardná chyba).

Tieto údaje ukazujú, že zvieratá liečené cytokinom poskytujú menej IFN- γ ako kontroly liečené PBS. Navyiac zvieratá, ktoré boli liečené kombináciou IL-4 s IL-10, mali oveľa menej IFN- γ ako hociktoré iné z kontrolných zvierat, ktorému bol podaný jeden cytokin.

Tabuľka 14

IL-4 a IL-10 inhibícia produkcie IFN- γ populáciou Th1

pridané	IFN- γ (ng/ml)
nič	100 $\pm$ 6
5 ng/ml IL-10	53 $\pm$ 4
100 ng/ml IL-4	44 $\pm$ 2
5 ng/ml IL-10 a 100 ng/ml IL-4	20 $\pm$ 1

Na získanie údajov uvedených v tabuľke 14 boli z myší, na ktoré bolo vopred pôsobené anti-CD4, infikovaných L. major, po 4 týždňoch získané CD4⁺ T bunky ($3,5 \cdot 10^5$ /jamku). Bunky boli stimulované in vitro antigénom L. major získaným zmrazovaním a roztápaním spoločne s plenocytmi zbavenými T buniek ($5 \cdot 10^5$ /jamku), ako zdrojom APC. Hladiny IFN- γ boli stanovené po 72 hodinách testom ELISA. Stĺpec označený "pridané" znamená látky pridané k médiu, v ktorom boli kultivované Th1 bunky.

Údaje z tabuľky 14 ukazujú, že ako IL-4, tak i IL-10 pri samostatnom podávaní významne znižujú hladiny IFN- γ produkované Th1 bunkami v porovnaní s kontrolami liečenými PBS. Navyiac, prídanie kombinácie IL-4 s IL-10 k médiu vedie k asi 50 % zníženiu IFN- γ , ako prídanie ktoréhokoľvek cytokinu samotného.

Predchádzajúce údaje ukazujú, že IL-10 v porovnaní s kontrolami znižuje DTH odpoveď, opuchy a produkciu IFN- γ z lymfatických žliaz všeobecne a z Th1 buniek špecificky. Kombinácia IL-4 s IL-10 je lepšia ako samostatný IL-4 alebo IL-10 pri rovnakom dávkovaní. Kombinačná liečba s 20 μ g každého cytokinu vykazuje lepšie výsledky pri jednej liečbe než viac ako dvojnásobná dávka (50 μ g) ako IL-4, tak i IL-10. Dávka 20 μ g IL-4 alebo IL-10 podaná ako kombinačná liečba vykazuje teda priaznivejšie účinky ako 50 μ g buď IL-4 alebo IL-10, pokiaľ sú tieto podávané ako jediné terapeutické činidlo.

Príklad 13

Liečenie pacienta s diabetes mellitus typu I

Na liečenie bol vybratý pacient s diabetes mellitus typu I alebo s diabetes mellitus závislým od inzulínu, podľa diagnózy a podľa kritérií vyvinutých buď National Diabetes Data Group alebo Svetovou zdravotníckou organizáciou. Pacient bol zo začiatku liečený 20 μ g ako IL-4, tak IL-10 na kg telesnej hmotnosti na deň. Ak pacient vážil 70 kg, začiatočná dávka bola 1400 μ g každého cytokinu denne. Táto dávka bola podávaná ako intravenózne bolus injekcie. Táto dávka bola zvyšovaná o 250 až 1000 μ g na deň podľa znášanlivosti pacienta a podľa jeho odpovede. Po niekoľkých dňoch bola dosiahnutá optimálna dávka 7000 μ g na deň (100 μ g na kg na deň).

Pred prvým liečením a potom denne, až niekoľko dní po poslednom liečení, bol pacient sledovaný klinicky a laboratórne. Medzi laboratórne sledované parametre patrí glukóza v krvi a počet krviniek so zvláštnou pozornosťou zameranou na celkový počet bielych krviniek a jeho diferenciál. Sledovanie glukózy v krvi je dobre známe z liečenia diabetikov. Ďalej sa sledovalo, či množstvo bielych krviniek zostáva v norme alebo bez výraznej zmeny v porovnaní s množstvom pred liečením. Pokiaľ ide o diferenciál bielych krviniek, zvláštna pozornosť bola venovaná tomu, či sa nematurované formy objavujú v periférnej krvi a či je normálny pomer rôznych typov bielych krviniek konštantný, alebo či sa mení. Špeciálna pozornosť bola venovaná pomeru lymfocytov a monocytov v periférnej krvi.

Je možné urobiť veľa modifikácií a variácií tohto vynálezu bez toho, aby sa tieto odchýlili od jeho rozsahu. Tu uvedené špecifické uskutočnenia sú príkladmi. Vynález je obmedzený len pripojenými patentovými nárokmi.

Zoznam sekvencií

Sekvencia vzorca I

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

Sekvencia vzorca II

Thr	Asp	Gln	Cys	Asp	Asn	Phe	Pro	Gln	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg
1				5					10					15
Asp	Ala	Phe	Ser	Arg	Val	Lyz	Thr	Phe	Phe	Gln	Thr	Lyz	Asp	Glu
				20					25					30
Val	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu	Lyz	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lyz
				35					40					45
Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr
				50					55					60

Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln	Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Glu	Ala	
				65					70					75	
Lyz	Asp	His	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Glu	Asn	Leu	Lyz	Thr	Leu	Arg	
				80					85					90	
Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lyz	
				95					100					105	
Ser	Lyz	Ala	Val	Glu	Gln	Ile	Lyz	Asn	Ala	Phe	Asn	Lyz	Leu	Gln	
				110					115					120	
Glu	Lyz	Gly	Ile	Tyr	Lyz	Ala	Met	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile	Phe	Ile	
				125					130					135	
Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Ile	Lyz	Ala	Arg				
				140					145		147				

Sekvencia vzorca III

GGCCTGCAGCG ACGAGCCATG GTTGCTGGGA GCGACGCG

Sekvencia vzorca IV

TTCATCTTCT GGTACCAATC AATTGGAGTT GGTTC

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že jeho použitie je zvolené zo skupiny pozostávajúcej z :
 - a) inhibovania proliferácie neoplastických buniek závislých od IL-2,
 - b) zvýšenia hladín IFN- γ ,
 - c) liečenia zápalového črevného ochorenia,
 - d) zosilnenia inhibície produkcie cytokinu a
 - e) inhibovania hypersenzitívnej reakcie neskorého typu, pričom tento farmaceutický prostriedok obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič a na použitie ad a), prípadne b), c) d) alebo e) :
 - i) IL-10,
 - ii) protilátky proti IL-4 a IL-10,
 - iii) IL-10,
 - iv) IL-4 a IL-10 a
 - v) IL-10.
2. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 e) v), v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ďalej obsahuje IL-4.
3. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ako IL-4 alebo IL-10 sa používa ľudský IL-4 alebo IL-10.
4. Spôsob výroby farmaceutického prostriedku, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že jeho použitie je zvolené zo skupiny pozostávajúcej z :
 - a) inhibovania proliferácie neoplastických buniek závislých od IL-2,
 - b) zvýšenia hladín IFN- γ ,
 - c) liečenia zápalového črevného ochorenia,
 - d) zosilnenia inhibície produkcie cytokinu a

e) inhibovania hypersenzitívnej reakcie neskorého typu, pričom tento spôsob zahrňuje zmiešanie farmaceuticky prijateľného nosiča a na použitie ad a), prípadne b), c), d) alebo e) :

- i) IL-10,
- ii) protilátok proti IL-4 a IL-10,
- iii) IL-10,
- iv) IL-4 a IL-10 a
- v) IL-10.

5. Spôsob výroby podľa nároku 4 e) v), v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ďalej obsahuje zmiešanie IL-4 s nosičom a s IL-10.

6. Spôsob výroby podľa nároku 4 alebo 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ako IL-4 alebo IL-10 sa používa ľudský IL-4 a IL-10.

7. Použitie i) IL-10,
ii) protilátok proti IL-4 a IL-10,
iii) IL-10,
iv) IL-4 a IL-10 a
v) IL-10

na a) inhibovanie proliferácie neoplastických buniek závislých od IL-2, prípadne
b) zvýšenie hladín IFN- γ ,
c) liečenie zápalového črevného ochorenia,
d) zosilnenia inhibície produkcie cytokinu a
e) inhibovanie hypersenzitívnej reakcie neskorého typu.

8. Použitie podľa nároku 7 e) v), v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že IL-4 sa podáva súčasne s IL-10.

9. Použitie i) IL-10,
ii) protilátok proti IL-4 a IL-10,
iii) IL-10,
iv) IL-4 a IL-10 a
v) IL-10

na výrobu liečiva pre :

- a) inhibovanie proliferácie neoplastických buniek závislých od IL-2, prípadne,
- b) zvýšenie hladín IFN- γ ,
- c) liečenie zápalového črevného ochorenia,
- d) zosilnenia inhibície produkcie cytokinu a
- e) inhibovanie hypersenzitívnej reakcie neskorého typu.

10. Použitie podľa nároku 9 e) v), v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že liečivo ďalej obsahuje IL-4.

11. Použitie podľa hociktorého z nárokov 7 až 10, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že ako IL-4 alebo IL-10 sa používa ľudský IL-4 alebo IL-10.