

(19)



(10)

LT 4309 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **4309**

(51) Int. Cl.⁶: **A61K 39/00**

(21) Paraiškos numeris: **96-165**

(22) Paraiškos padavimo data: **1996 11 25**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 11 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1998 03 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/04832**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 04 25**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1996 11 25**

(31, 32, 33) Prioritetas: **234987, 1994 04 25, US**

(72) Išradėjas:

**Randolph J. Noelle, US
Fiona H. Durie, US
David C. Parker, US
Michael C. Appel, US
E. Nancy Philips, US
John P. Mordes, US
Dale L. Grenier, US
Aldo A. Rossini, US**

(73) Patent savininkas:

TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE, Hanover, NH 03755, US

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER, 55 Lake Avenue
North, Worcester, MA 01655, US**

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabalienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

**Receptoriaus antagonistų panaudojimas T-ląstelių tolerancijai sukelti
audinių arba organų transplantacijoje**

(57) Referatas:

Aprašomi vaistai, skirti T-ląstelių tolerancijai audinio arba organo transplantatui transplantato recipiente indukavimui. Tokių vaistų gamybai siūloma panaudoti receptoriaus antagonistą, kuris inhibuoja ligando sąveiką su receptoriumi. Šie vaistai yra skirti vartoti kartu su alogeninėmis arba ksenogeninėmis ląstelėmis, kurios ekspresuoja donoro antigenus ir kurios turi ligandą ant ląstelės paviršiaus, sąveikaujantį su receptoriumi ant recipientų T ląstelės paviršiaus, tarpininkaujantį priklausančioje nuo kontakto Helferio efektoriaus funkcijoje. Tinkamiausiame realizavimo variante alogeninės arba ksenogeninės ląstelės yra B ląstelės, geriau ramybės būsenoje esančios ląstelės, o molekulė ant T ląstelės paviršiaus, kuri tarpininkauja priklausančioje nuo kontakto Helferio efektoriaus funkcijoje, yra gp39. Tinkamiausias gp39 antagonistas yra anti-gp39 antikūnas. Alogeninę arba ksenogeninę ląstelę ir vaistą, turintį gp39 antagonistą, siūlo skirti transplantato recipientui prieš audinio arba organo transplantaciją.

Išradimas gali būti panaudotas T ląstelių tolerancijos transplantatams, tokiems kaip kepenys, inkstas, širdis, plaučiai, oda, raumuo, neuroninis audinys, skrandis ir žarnos, indukavimui. Šie vaistai taip pat gali būti panaudoti diabeto gydymui, skiriant juos kartu su alogeninėmis arba ksenogeninėmis ląstelėmis, ekspresuojančiomis donoro antigenus, ir kasos salelių ląsteles.

Norint indukuoti specifinės antigenui T ląstelės aktyvaciją ir kloninę ekspansiją, į ramybėje esančių T limfocitų paviršių turi būti paduodami du signalai, kuriuos pateikia antigeną atstovaujančios ląstelės (APC) (Jenkins, M. and Schwartz, R. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 302-319; Mueller, D.L., et al. (1990) *J. Immunol.* 144, 3701-3709; Williams, I.R. and Unanue, E.R. (1990) *J. Immunol.* 145, 85-93). Pirmajam signalui, kuris suteikia specifiškumą imuniniam atsakui, tarpininkauja T ląstelės receptorius (TCR), po to eina svetimo antigeninio peptido, esančio didžiojo histosuderinamumo komplekso (MHC) struktūroje, atpažinimas. Antrasis signalas, vadinamas kostimuliacija, skatina T ląstelių proliferaciją ir funkcionavimą (Schwartz, R.H. (1990) *Science* 248, 1349-1356). Kostimuliacija nėra nei specifinė antigenui, nei apribota MHC, ir yra manoma, kad ją apsprendžia viena arba daugiau atskirų ląstelės paviršiaus molekulių, ekspresuojamų APC (Jenkins, M.K., et al. (1988) *J. Immunol.* 140, 3324-3330; Linsley, P.S., et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 721-730; Gimmi, C.D., et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6575-6579; Young, J.W., et al., (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 229-237; Koulova, L., et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 759-762; Reiser, H., et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 271-275; van-Seventer, G.A., et al. (1990) *J. Immunol.* 144, 4579-4586; LaSalle, J.M., et al., (1991) *J. Immunol.* 147, 774-80; Dustin, M.I., et al., (1989) *J. Exp. Med.* 175, 437-445). Vienas kostimuliacijos kelias, susijęs su T ląstelės aktyvacija, turi ryšį su CD28 molekule ant T ląstelių paviršiaus. Ši molekulė gali gauti kostimuliacinį signalą, kurį pateikia ligandas ant B ląstelių arba kitų APC. CD28 ligandai apima B limfocito aktyvavimo antigenų B7 šeimos narius, tokius kaip B7-1 ir/arba B7-2 (Freedman, A.S. et al. (1987) *J. Immunol.* 137, 3260-3267; Freeman, G.J. et al. (1989) *J. Immunol.* 143, 2714-2722; Freeman, G.J. et al. (1991) *J. Exp. Med.* 174, 625-631; Freeman, G.J. et al. (1993) *Science* 262, 909-911; Azuma, M. et al. (1993) *Nature* 366, 76-79; Freeman, G.J. et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178, 2185-2192). B7-1 ir B7-2 yra ligandai taip pat ir kitai molekulei, CTLA4, esančiai ant aktyvuotų T ląstelių paviršiaus, nors CTLA4 vaidmuo kostimuliacijoje yra neaiškus.

Specifinio antigenui signalo padavimas į T ląstelę kostimuliaciniu signalu sukelia T ląstelių aktyvaciją, kuri gali apimti tiek T ląstelės proliferaciją, tiek ir citokino sekreciją. Priešingai, specifinio antigenui signalo padavimas, nesant kostimuliacinio signalo, kaip manoma, indukuoja neatsakomumo būseną arba nejautrumą dirgikliams T ląstelėje, ir kaip išdava, T ląstelėje indukuojama specifinė antigenui tolerancija.

Sąveikos tarp T ir B ląstelių vaidina pagrindinį vaidmenį imuniniuose atsakuose. Humoralinio imuniškumo priklausantiems nuo užkrūčio liaukos antigenų indukcijai reikalinga "pagalba", kurią teikia T helperinės ląstelės (toliau Th). Kadangi tam tikroje pagalboje, kurią teikia B limfocitai, tarpininkauja tirpios molekulės, išlaisvinamos Th ląstelių (pavyzdžiui, limfokinai, tokie kaip IL-4 ir IL-5), B ląstelių aktyvacijai reikia nuo kontakto priklausančios sąveikos tarp B ląstelių ir Th ląstelių (Hirohata et al., *J. Immunol.*, 140:3736-3744 (1988); Bartlett et al., *J. Immunol.*, 143:1745-1754 (1989)). Tai rodo, kad į B ląstelių aktyvaciją įjungiamo būtina sąveika tarp ląstelės paviršiaus molekulių ant B ląstelių ir Th ląstelių. Todėl molekulė(ės) ant T ląstelės yra priklausančių nuo kontakto helperio efektoriaus T ląstelių funkcijų tarpininkės. Priklausomą nuo kontakto sąveiką tarp molekulių ant B ir T ląstelių taip pat patvirtina ir pastebėtas faktas, kad izoliuotos aktyvuotų T ląstelių plazmos membranos gali turėti helperio funkcijas, kurios yra būtinos B ląstelės aktyvavimui (Brian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:564-568 (1988); Hodgkin et al., *J. Immunol.*, 145:2025-2034 (1990); Noelle et al., *J. Immunol.*, 146:1118-1124 (1991)).

Ant nesubrendusių ir subrendusių B limfocitų paviršiaus buvo identifikuota molekulė (CD40), kuri, kai ją suriša antikūnai, sukelia B ląstelės proliferaciją (Valle et al., *Eur. J. Immunol.*, 19:1463-1467 (1989); Gordon et al., *J. Immunol.*, 140:1425-1430 (1988); Gruber et al., *J. Immunol.*, 142:4144-4152 (1989)). Buvo atliktas CD40 molekulinis klonavimas ir molekulės charakterizavimas (Stamenkovic et al., *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989)). Taip pat atliktas ligando CD40, gp39 (vadinamo dar ir CD40 ligandu arba CD40L) molekulinis klonavimas ir jo charakterizavimas (Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.*, 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992)). gp39 baltymas yra ekspresuojamas ant aktyvuotų, bet ne ramybėje esančių CD4⁺Th ląstelių (Spriggs et al., *J. Exp. Med.*, 176:1543-1550 (1992); Lane et al., *Eur. J. Immunol.*, 151:1-14 (1993)). Ląstelės, transfekuotos gp39 genu ir

vykdančios gp39 baltymo ekspresiją ant paviršiaus, gali iššaukti B ląstelių proliferaciją ir kartu su kitais stimuliaciniais signalais gali indukuoti antikūnų gaminimąsi (Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992)).

Ląstelės paviršiaus molekulės, kurios tarpininkauja T ląstelių priklausančio nuo kontakto helperio efektoriaus funkcijose, yra svarbios imuninių atsakų, kuriems reikalinga T ląstelės pagalba, sukėlimui. Pavyzdžiui, gp39 ant T ląstelių sąveika su CD40 ant B ląstelių vaidina pagrindinį vaidmenį B ląstelės atsakų į antigeną aktyvavime. Šis išradimas, bent jau dalinai, yra paremtas atradimu, kad ląstelės paviršiaus molekulės, kurios tarpininkauja T ląstelių priklausančio nuo kontakto helperio efektoriaus funkcijose, taip pat vaidina kritinį vaidmenį T ląstelių atsake į aloantigenus. Konkrečiau, buvo nustatyta, kad tam tikromis sąlygomis gp39 sąveikos su ligandu ant alogeninės ląstelės, kuri pateikia aloantigenus T ląstelei, sutrukdytas gali sukelti toleranciją T ląstelėje. Geriausiu atveju, alogeninė ląstelė, kuri perduoda aloantigenus T ląstelei, reikalauja sąveikos tarp gp39 ligando ant ląstelės ir gp39 ant T ląstelės, kad galėtų perduoti signalus, reikalingus T ląstelės aktyvacijai. Inhibuojant gp39 ligando ant alogeninės ląstelės sąveiką su gp39 ant T ląstelės, išvengiama T ląstelės aktyvavimo ir sukeliamas specifinė aloantigenui T ląstelės tolerancija. T ląstelės tolerancijos aloantigenams sukėlimas, kaip čia aprašyta, gali būti panaudotas kaip preparatyvinis režimas audinių arba organų transplantacijoje.

Taigi, išradime siūlomos kombinacijos yra ypatingai naudingos T ląstelių tolerancijai donoro audiniui arba organui audinio arba organo recipiente pasiekti. Kombinacijos apima: 1) alogeninę arba ksenogeninę ląstelę, kuri ekspresuoja bent vieną donoro antigeną ir kuri turi ant ląstelės paviršiaus ligandą, sąveikaujantį su receptoriumi ant recipiento T ląstelės paviršiaus, kuris tarpininkauja priklausančiose nuo kontakto helperio efektoriaus funkcijose; ir 2) molekulę antagonistą ant recipiento T ląstelės paviršiaus, kuri tarpininkauja priklausančiose nuo kontakto helperio efektoriaus funkcijose, kurios yra skiriamos recipientui. Antagonistas inhibuoja sąveiką tarp molekulės ant T ląstelės ir jos ligando ant alogeninės arba ksenogeninės ląstelės.

Tinkamiausiame realizavimo variante receptorius ant recipiento T ląstelės, kuris tarpininkauja priklausančiose nuo kontakto helperio efektoriaus funkcijose, yra gp39. Šiame variante antagonistas yra molekulė, kuri inhibuoja gp39 ant T ląstelės ir gp39

ligando ant alogeninės arba ksenogeninės ląstelės sąveiką. Ypatingai tinkamas gp39 antagonistas yra anti-gp39 antikūnas. Kitame realizavimo variante gp39 antagonistas yra tirpi gp39 ligando forma, pavyzdžiui, tirpus CD40. Geriausia, kai alogeninė arba ksenogeninė ląstelė, skiriama recipientui, yra limfoidinė ląstelė, pavyzdžiui, B ląstelė. Kitu atveju, alogeninė arba ksenogeninė ląstelė yra maža ramybės būsenoje esanti B ląstelė. Alogeninė arba ksenogeninė ląstelė ir antagonistas (pvz., anti-gp39 antikūnas) paprastai skiriami recipientui prieš audinio arba organo transplantaciją į subjektą. Pavyzdžiui, audinio arba organo donoro limfoidinės ląstelės (pvz., B ląstelės) skiriamos recipientui kartu su antagonistu prieš audinio arba organo transplantaciją į recipiento organizmą.

Šio išradimo kombinacijos, pavyzdžiui, gali būti panaudotos indukuoti transplantuoto audinio arba organo, tokio kaip kepenys, inkstas, širdis, plautis, oda, raumuo, neuroninis audinys, skrandis ir žarnos, T ląstelių tolerancijai. Viename realizavimo variante transplantuotas audinys yra kasos salelės. Tokiu būdu, išradime yra siūlomas tokių kombinacijų panaudojimas diabetui gydyti, apimantis: 1) alogeninių arba ksenogeninių ląstelių, kurios ekspresuoja donorinius antigenus; 2) receptoriaus ant recipientų T ląstelių antagonistą, kuris tarpininkauja priklausančiose nuo kontakto Helferio efektoriaus funkcijose, tokio kaip gp39 antagonistas (pvz., anti-gp39 antikūnas); ir 3) donoro kasos salelių skyrimą tokio gydymo reikalingam subjektui.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1. yra transplantuotų kasos salelių alotransplantatų chemiškai sukeltu diabetu sergančiose pelėse, paveiktose tik anti-gp39 antikūnu arba paveiktose tik nefrakcionuotomis arba frakcionuotomis alogeninėmis blužnies ląstelėmis, išgyvenimo grafinis atvaizdavimas.

Fig.2A ir 2B yra transplantuotų kasos salelių alotransplantatų chemiškai sukeltu diabetu sergančiose pelėse, paveiktose vienkartinę frakcionuotų alogeninių blužnies ląstelių doze kartu su anti-gp39 antikūnu (MR1), gydytų 2 savaites (A) arba 7 savaites (B), išgyvenimo, įvertinto pagal gliukozės koncentracijos plazmoje mažėjimą, grafinis atvaizdavimas. Kiekviena kreivė vaizduoja atskiros pelės duomenis. Neužtušuotais simboliais parodyti recipientai, kuriuose salelių alotransplantatas nefunkcionavo.

Užtušuoti simboliai parodo peles, kurių salelių transplantatai buvo veiksmingi iki eksperimento pabaigos.

Fig.3A, B ir C yra citometrinės apykaitos diagramos, atvaizduojančios 6 val. aktyvuotų žmogaus periferinio kraujo limfocitų nudažymą CD40Ig (A), mAb 4D9-8 (B) arba mAb 4D9-9 (C).

Fig.4A, B ir C yra citometrinės apykaitos diagramos, atvaizduojančios 6 val. aktyvuotų žmogaus periferinio kraujo limfocitų, kultivuotų esant ciklosporinui A, nudažymą mAb 4D9-8 (A), mAb 4D9-9 (B) arba CD40Ig (C).

Fig.5A, B ir C yra citometrinės apykaitos diagramos, atvaizduojančios 6 val. aktyvuotų žmogaus periferinio kraujo limfocitų nudažymą, esant nežymėtam mAb 4D9-8 (A) arba nežymėtam mAb 4D9-9 (B).

Fig.6 yra žmogaus B ląstelės proliferacijos inhibicijos, sukeltos tirpaus gp39 ir IL-4, kai ląstelės kultivuotos esant anti-žmogaus gp39 mAb 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 arba 89-79, grafinis atvaizdavimas.

Fig.7 yra alospecifinio mišraus limfocito inhibicijos atsako, kai ląstelės yra kultivuotos esant anti-žmogaus gp39 mAb 24-31 arba 89-79, grafinis atvaizdavimas.

Šiame išradime aprašomi vaistai, skirti T ląstelių tolerancijos *in vivo* donoro audinio arba organo transplantatui transplantato recipiente indukavimui. Toks indukavimas apima: 1) alogeninės arba ksenogeninės ląstelės, kuri ekspresuoja donoro antigenus ir kuri ant ląstelės paviršiaus turi ligandą, sąveikaujantį su receptoriumi ant recipiento T ląstelės paviršiaus, kuris tarpininkauja priklausančiose nuo kontakto Helferio efektoriaus funkcijose, ir 2) receptoriaus ant T ląstelės paviršiaus antagonistą, kuris inhibuoja ligando ir receptoriaus sąveiką, skyrimą recipientui. Čia naudojamas terminas "recipientas" reiškia subjektą, kuriam reikia transplantuoti, yra transplantuojamas arba buvo transplantuotas audinio arba organo transplantatas. Čia apibrėžiama, kad "alogeninė" ląstelė yra gaunama iš skirtingų tų pačių rūšių, kaip ir recipientas, individų ir ekspresuoja "aloantigenus", kurie skiriasi nuo antigenų, kuriuos ekspresuoja recipiento ląstelės. "Ksenogeninė" ląstelė yra gaunama iš skirtingų rūšių nei recipientas, ir ekspresuoja "ksenoantigenus", kurie skiriasi nuo antigenų, kuriuos ekspresuoja recipiento ląstelės. Čia naudojamas terminas "donoro antigenai" reiškia antigenus, kuriuos ekspresuoja donoro audinio arba organo transplantatas, transplantuotas į recipientą.

Donoro antigenai gali būti aloantigenai arba ksenoantigenai priklausomai nuo transplantato šaltinio. Alogeninė arba ksenogeninė ląstelė, skiriama recipientui kaip dalis toleravimo režimo, ekspresuoja keletą arba visus tuos pačius antigenus, esančius ant transplantuojamo donoro audinio arba organo.. Alogeninę arba ksenogeninę ląstelę geriausia gauti iš transplantato audinio arba organo donoro, bet jas galima gauti taip pat ir iš vieno arba daugiau šaltinių, turinčių bendras antigenines determinantes su donoru.

Apart alogeninės arba ksenogeninės ląstelės, kaip dalis toleravimo režimo, recipientui skiriama molekulės ant T ląstelės, kuri tarpininkauja priklausančiose nuo kontakto helperio efektoriaus funkcijose, antagonistas. Čia priimama, kad molekulė arba receptorių, kurie tarpininkauja priklausančiose nuo kontakto helperio efektoriaus funkcijose, yra tokie, kurie yra ekspresuojami ant Th ląstelės, ir sąveikauja su ligandu ant efektoriaus ląstelės (pvz. B ląstelė), ir kur sąveika tarp molekulės ir jo ligando yra būtina efektoriaus ląstelės atsakui (pvz. B ląstelės aktyvimui) sukelti. Dabar nustatyta, kad apart dalyvavimo efektoriaus ląstelės atsakuose, tokia molekulė arba receptorių dalyvauja T ląstelės atsake į antigeną. Geriausia, kai molekulė ant T ląstelės, kuri tarpininkauja priklausančioje nuo kontakto helperio efektoriaus funkcijoje, yra gp39. Iš to seka, kad tinkamiausiuose realizavimo variantuose išradimo metodai apima alogeninės arba ksenogeninės ląstelės ir gp39 antagonisto skyrimą transplantato recipientui. Recipiento T ląstelių aktyvimas alogenine arba ksenogenine ląstele apima sąveiką tarp gp39 ant recipiento T ląstelių ir gp39 ligando ant alogeninės arba ksenogeninės ląstelės. Inhibuojant šią sąveiką gp39 antagonistu, recipiento T ląstelių neaktyvuoja donoro antigenai, kuriuos ekspresuoja alogeninė arba ksenogeninė ląstelė, bet, atvirkščiai, ją toleruoja donoro antigenai. Taigi, tolerancijos donoro antigenams sukėlimas recipiente suteikia galimybę sėkmingai transplantuoti donoro audinį arba organą, nesant imuniškai valdomo donoro transplantato atmetimo.

Toliau duodamuose poskyriuose detalai aprašomi įvairūs šio išradimo aspektai.

I. gp39 antagonistai

Pagal šiame išradime siūlomus metodus, recipientui yra skiriamas gp39 antagonistas, kad būtų sutrukdoma gp39 ant recipiento T ląstelių sąveika su gp39 ligandu ant alogeninės arba ksenogeninės ląstelės, tokios kaip B ląstelė, skiriamos recipientui.

Laikoma, kad gp39 antagonistas yra molekulė, kuri trukdo tokiai sąveikai. gp39 antagonistu gali būti antikūnas prieš gp39 (pvz., Fab arba F(ab)'2 fragmentai, chimeriniai antikūnai arba humanizuoti antikūnai), tirpios gp39 ligando formos (pvz., tirpus CD40), tirpios gp39 ligando sulieto baltymo formos (pvz., tirpus CD40Ig) arba farmaciniai agentai, kurie ardo arba sutrukdo gp39-CD40 sąveiką.

A. Antikūnai

Žinduolis (pvz., pelė, žiurkėnas arba triušis) gali būti imunizuojamas gp39 baltymo arba baltymo fragmento (pvz., peptidinio fragmento) imunogenine forma, kuri iššaukia žinduolio antikūninį atsaką. Ląstelė, kurios paviršiuje ekspresuojamas gp39, taip pat gali būti naudojama kaip imunogenas. Kitokie imunogenai yra išvalytas gp39 baltymas arba baltymo fragmentai. gp39 gali būti išskirtas iš gp39 ekspresuojančios ląstelės, panaudojant standartines gryninimo metodikas. Be to, šeimininko, pvz., bakterijos arba žinduolių ląstelių linijos, ląstelėje gali būti ekspresuojama gp39 kDNR (Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.*, 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992)), ir iš ląstelių kultūrų, panaudojant standartines metodikas, išskiriamas gp39 baltymas. Kitu būdu, remiantis gp39 aminorūgščių seka (ją nustatė Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.*, 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992)), panaudojant žinomas metodikas (pvz., F-moc arba T-boc chemines sintezes), gali būti susintetinti gp39 peptidai. Imunogeniškumo suteikimo baltymui metodikos yra prijungimas prie nešiklių arba kitokios gerai žinomos metodikos. Pavyzdžiui, baltymą galima skirti su stimulatoriumi. Imunizacijos eigą galima kontroliuoti, nustatant antikūno titrus plazmoje arba serume. Antikūnų kiekiui įvertinti galima naudoti standartinę ELISA arba kitokią imunologinę metodiką, naudojant imunogeną kaip antigeną.

Po imunizacijos galima gauti antiserumus ir, jeigu norima, iš serumo galima išskirti polikloninius antikūnus. Norint gauti monokloninius antikūnus, galima auginti imunizuoto gyvuliuko antikūnus produkuojančias ląsteles (limfocitus) ir pagal standartines somatinių ląstelių suliejimo metodikas sulietas su mieloma ląsteles, tokiu būdu imortalizuojant šias ląsteles ir gaunant hibridomines ląsteles. Tokios metodikos yra gerai žinomos šios srities specialistams. Pavyzdžiui, hibridomų metodika, kurią ištobulino Kohler ir Milstein (*Nature* (1975) 256:495-497), o taip pat ir kitokios metodikos, tokios kaip žmogaus B-ląstelės

hibridomos metodika (Kozbar et al., *Immunol. Today* (1983) 4:72), EBV-hibridomos metodika, duoda galimybę gauti žmogaus monokloninius antikūnus (Cole et al., *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy* (1985) (Allen R. Bliss, Inc., p.77-96) ir atlikti kombinacinių antikūnų bibliotekų skryningą (Huse et al., *Science* (1989) 246:1275). Galima atlikti imunocheminį hibridominių ląstelių skryningą, norint pagaminti antikūnus, specifiskai reaguojančius su baltymu arba peptidu, ir išskirti monokloninius antikūnus.

Čia naudojamas terminas “antikūnas” apima ir jo fragmentus, kurie specifiskai reaguoja su gp39 baltymu arba jo peptidu, arba su gp39 sulietu baltymu. Antikūnus galima suskaldyti į fragmentus, naudojant įprastas metodikas, ir atlikti fragmentų panaudojimo skryningą taip pat, kaip aukščiau aprašyta pačių antikūnų atveju. Pavyzdžiui, $F(ab')_2$ fragmentus galima gauti, veikiant antikūną pepsinu. Gautą $F(ab')_2$ fragmentą galima apdoroti taip, kad būtų redukuojami disulfidiniai tilteliai ir susidarytų Fab' fragmentai. Šio išradimo antikūnas taip pat apima ir bispecifines bei chimerines molekules, turinčias anti-gp39 dalį.

Kai žmonių terapijoje naudojami nežmogiškuose subjektuose pagaminti antikūnai, jie įvairiais laipsniais atpažįstami kaip svetimi, ir paciente gali būti sukliamas imuninis atsakas. Vienas iš šios problemos minimizavimo arba eliminavimo būdų, kuris yra pageidautinas bendrame imunoslopinime, yra pagaminti chimerinius antikūno darinius, t.y. antikūno molekules, kurios susidėtų iš nežmogiško gyvūno kintamosios srities ir žmogaus pastoviosios srities. Į chimerinio antikūno molekulę, pavyzdžiui, gali įeiti antigeno rišanti dalis iš pelės, žiurkės arba kitos rūšies antikūno ir žmogaus pastoviosios sritys. Buvo aprašyta daug chimerinių antikūnų gavimo būdų, ir jie gali būti panaudoti gaminant chimerinius antikūnus, turinčius imunoglobulininę kintamą sritį, kuri atpažįsta gp39. Žr. pvz., Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851 (1985); Takeda et al., *Nature*, 314:452 (1985), Cabilly et al., U.S. Patent No. 4816567; Boss et al., U.S. Patent No. 4816397; Tanaguchi et al., European Patent Publication EP171496; European Patent Publication 0173494, United Kingdom Patent GB 2177096B. Tikimasi, kad tokie chimeriniai antikūnai bus mažiau imunogeniški žmogaus organizme, negu atitinkami nechimeriniai antikūnai.

Žmonių terapijos tikslams monokloniniai arba chimeriniai antikūnai, specifiskai reaguojantys su gp39 baltymu arba peptidu, gali būti toliau humanizuojami, pagaminant

žmogaus kintamos srities chimeras, kuriose kintamų sričių dalys, ypatingai antigeno rišančios dalies išlaikytos karkasinės sritys, yra žmogiškos kilmės, o nežmogiškos kilmės yra tik hiperkintamos sritys. Tokios pakeistos imunoglobulinų molekulės gali būti pagaminamos pagal bet kurią iš keleto žinomų šioje srityje metodikų (pvz., Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:7308-7312 (1983); Kozbor et al., *Immunology Today*, 4:7279 (1983); Olsson et al., *Meth. Enzymol.*, 92:3-16 (1982)), o geriausia jas gaminti pagal PCT Publication WO92/06193 arba EP 0239400. Humanizuotus antikūnus galima gauti komerciniu keliu, pvz., Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britain.

Kitas specifinių antikūnų arba antikūnų fragmentų, reaguojančių su gp39 baltymu arba peptidu, pagaminimo metodas yra ekspresijos bibliotekų, koduojančių imunoglobulino genus arba jų dalis, ekspresuotus bakterijose su gp39 baltymu arba peptidu, skyringas. Pavyzdžiui, pilni Fab fragmentai, VH sritys ir FV sritys gali būti ekspresuotos bakterijose, naudojant fago ekspresijos bibliotekas. Žr., pavyzdžiui, Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989); Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989); ir McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Atliekant tokių bibliotekų skyriną su, pavyzdžiui, gp39 peptidu, galima identifikuoti imunoglobulino fragmentus, reaguojančius su gp39. Kitas būdas yra toks, kad antikūnams arba jų fragmentams gauti gali būti panaudotos SCUDU-hu pelės (gaunamos iš Genpharm).

Monokloninių antikūnų prieš gp39, įskaitant žmogaus gp39 ir pelės gp39, ir antikūnų, tinkamų naudoti šiame išradime siūlomuose metoduose, pagaminimo metodikos detaliau aprašytos 2 pavyzdyje.

Specifinės antigenui T ląstelių tolerancijos indukavimui, pagal šį išradimą, tinkamiausia naudoti anti-žmogaus gp39 monokloninius antikūnus. Tinkamiausi antikūnai apima monokloninius antikūnus 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 ir 89-79, aprašytus 2 pavyzdyje. Ypatingai tinkami monokloniniai antikūnai yra 89-76 ir 24-31. 89-76 ir 24-31 hibridomos, gaminančios atitinkamai 89-76 ir 24-31 antikūnus, buvo deponuotos pagal Budapešto sutartį su American Type Culture 1994 m. rugsėjo 2 d. 89-76 hibridomai buvo suteiktas ATCC katalogo numeris HB 11713, o 24-31 hibridomai buvo suteiktas ATCC katalogo numeris HB 11712. 24-31 ir 89-76 antikūnai yra IgG1 izotipo.

Kitame realizavimo variante anti-žmogaus gp39 mAb, skirtas naudoti šiame išradime siūlomuose methoduose, suriša epitopą, kurį atpažįsta monokloninis antikūnas, pasirinktas iš grupės, kurią sudaro 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 89-76 ir 89-79. Geriausiu atveju, anti-žmogaus gp39 mAb suriša epitopą, kurį atpažįsta monokloninis antikūnas 24-31 arba monokloninis antikūnas 89-76. mAb sugebėjimą suriši epitopą, kurį atpažįsta bet kuris iš aukščiau minėtų antikūnų, galima nustatyti standartiniais kros-konkurencijos bandymais. Pavyzdžiui, antikūnas, kuris suriša tą patį epitopą, atpažįstamą mAb 24-31, konkuruos žymėtų 24-31 ryšio sudaryme su aktyvuotomis T ląstelėmis, tuo tarpu kai antikūnas, kuris suriša skirtingą epitopą nei epitopas, kurį atpažįsta mAb 24-31, nekonkuruos ryšio tarp žymėtų 24-31 ir aktyvuotų T ląstelių sudaryme.

B. Tirpūs gp39 ligandai

Kiti gp39 antagonistai, kurie gali būti skiriami, norint indukuoti T ląstelės toleranciją, apima tirpias gp39 ligando formas. Vienvalentis tirpus gp39 ligandas, toks kaip tirpus CG40, gali susiriši su gp39 ir tokiu būdu inhibuoti gp39 sąveiką su CD40 ant B ląstelių. Terminas "tirpus" rodo, kad ligandas nėra pastoviai susijęs su ląstelės membrana. Tirpus gp39 ligandas gali būti pagamintas cheminės sintezės būdu arba, geriau, rekombinantinės DNR būdu, pavyzdžiui, ekspresuojant ligando tik ekstraceliuliarinę sritį (transmembraninės ir citoplazminės sričių nėra). Tinkamiausias tirpus gp39 ligandas yra tirpus CD40. Kitu atveju tirpus gp39 ligandas gali būti sulieto baltymo formos. Į tokį sulietą baltymą įeina bent jau gp39 ligando dalis, prijungta prie antrosios molekulės. Pavyzdžiui, CD40 gali būti ekspresuotas kaip sulietas baltymas su imunoglobulinu (t.y. CD40Ig sulietas baltymas). Viena realizavimo variante gautas sulietas baltymas, turintis CD40 ekstraceliuliarinės srities aminorūgščių liekanas, prijungtas prie aminorūgščių liekanų sekos, atitinkančios imunoglobulino sunkiosios grandinės kilpas, CH2 ir CH3 sritis, pvz., Cγ1, susidarant CD40Ig sulietam baltymui (žr., pvz., Linsley et al. (1991) *J. Exp. Med.* 178:721-730; Capon et al. (1989) *Nature* 337:525-531; ir Capon U.S. 5116964). Sulietas baltymas gali būti pagamintas cheminės sintezės būdu arba, geriau, rekombinantinės DNR technologijos, paremtos CD40 kDNR būdu (Stamenkovic et al., *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989)).

II. Ląstelės, skirtos specifinei antigenui tolerancijai indukuoti

Šis išradimas, bent jau dalinai, paremtas atrastu faktu, kad kai alogeninės ląstelės pateikia aloantigenus T ląstelėms, esant gp39 antagonistui, T ląstelėse atsiranda tolerancija aloantigenams. Ląstelės, kurios gali sukelti toleranciją pagal tokį mechanizmą, apima ląsteles, kurios pateikia antigeną ir aktyvuoja T ląsteles, sąveikaudamos su gp39 (t.y. sąveika tarp gp39 ant T ląstelių ir gp39 ligando ant ląstelės, pateikiančios antigeną, yra būtina, kad būtų perduodami atitinkami T ląstelės aktyvavimui reikalingi signalai į T ląstelę). Ligando ant alogeninės arba ksenogeninės ląstelės sąveikos su gp39 ant recipiento T ląstelės inhibicija leidžia išvengti T ląstelės aktyvavimo alo- arba ksenoantigenais ir netgi indukuoja T ląstelės toleranciją antigenui. T ląstelės aktyvavimo gp39 sutrukdyimas gali padėti išvengti kostimuliatorinių molekulių ant alogeninės arba ksenogeninės ląstelės (pvz., B7 šeimos molekulių ant B ląstelės) indukcijos taip, kad ląstelė paduoda tik antigeninį signalą T ląstelei, nesant kostimuliatorinio signalo, ir tokiu būdu sukelia toleranciją.

Taigi, pagal šį išradimą, recipientui skiriama alogeninė arba ksenogeninė ląstelė. Alogeninė arba ksenogeninė ląstelė gali pateikti antigeną recipiento T ląstelėms ir, pavyzdžiui, yra B limfocitas, „profesionali“ antigeną pateikianti ląstelė (pvz., monocitas, dendritinė ląstelė, Langerhano ląstelė) arba kitokia ląstelė, kuri pateikia antigeną imuninėms ląstelėms (pvz., keratinocitas, endotelinė ląstelė, astrocitas, fibroblastas, oligodendrocitas). Be to, pageidautina, kad alogeninė arba ksenogeninė ląstelė turėtų sumažintą sugebėjimą stimuliuoti kostimuliatorinį signalą recipiento T ląstelėse. Pavyzdžiui, alogeninė arba ksenogeninė ląstelė gali neekspresuoti arba ekspresuoti tik nedidelį kostimuliatorinių molekulių, tokių kaip B7 šeimos baltymai (pvz., B7-1 ir B7-2), kiekį. Kostimuliatorinių molekulių ekspresija ant potencialių alogenių arba ksenogeninių ląstelių, kurią siūloma panaudoti išradimo metoduose, gali būti įvertinama, panaudojant standartines metodikas, pavyzdžiui, apykaitos citometriją, naudojant antikūnus prieš kostimuliatorines molekules.

Tinkamiausios alogeninės arba ksenogeninės ląstelės T ląstelių tolerancijai indukuoti yra limfoidinės ląstelės, pavyzdžiui, periferinio kraujo limfocitai arba blužnies ląstelės. Tinkamiausios limfoidinės ląstelės T ląstelių tolerancijai indukuoti yra B ląstelės. B ląstelės gali būti išskirtos iš mišrios ląstelių populiacijos (pvz., atskirtos nuo kitų periferinio kraujo arba blužnies ląstelių tipų), panaudojant standartines ląstelių atskyrimo

metodikas. Pavyzdžiui, sulipusios ląstelės gali būti pašalinamos, kultivuojant blužnies ląsteles ant plastikinių lėkštelių ir išgaunant nesulipusių ląstelių populiaciją. T ląstelės gali būti išskirtos iš mišrios ląstelių populiacijos, veikiant anti-T ląsteles antikūnu (pvz., anti-Thy1.1 ir/arba anti Thy1.2) ir komplementu. Viena realizavimo variante ramybės būsenoje esančios limfoidinės ląstelės yra naudojamos kaip antigeną pateikiančios ląstelės. Ramybės būsenoje esančios limfoidinės ląstelės, tokios kaip ramybės būsenoje esančios B ląstelės, gali būti išskiriamos pagal šioje srityje žinomas metodikas, pavyzdžiui, paremtas jų mažais dydžiais ir tankiais. Ramybės būsenoje esančios limfoidinės ląstelės, pavyzdžiui, gali būti išskirtos, panaudojant priešpriešinės srovės centrifuginį perplovimą, kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Naudojant priešpriešinės srovės centrifuginį perplovimą, mažų, ramybės būsenoje esančių limfoidinių ląstelių populiacijos, iš kurių pašalintos ląstelės, galinčios aktyvuoti T ląstelių atsakus, gali būti gaunamos, surenkant frakciją(as), esant 14-19 ml/min., geriausia 19 ml/min. greičiui (3200 aps/min.). Kitu būdu, maži, ramybės būsenoje esantys limfocitai (pvz., B ląstelės) gali būti išskirti, panaudojant nepertraukiamą tankio gradiento centrifugavimą, pavyzdžiui, panaudojant Fikol arba Perkol gradientą, ir nucentrifugavus galima gauti sluoksnį, kuriame yra maži, ramybės būsenoje esantys limfocitai. Mažos, ramybės būsenoje esančios B ląstelės taip pat gali būti atskirtos nuo aktyvuotų B ląstelių pagal kostimuliatorinių molekulių, tokių kaip B7-1 ir/arba B7-2, ekspresiją ant aktyvuotų B ląstelių paviršiaus, pasinaudojant standartinėmis metodikomis (pvz., imunofluorescencija).

Alogeninės arba ksenogeninės ląstelės, skiriamos recipientui, funkcionuoja, bent jau dalinai, pateikdamos donoro antigenus recipientui T ląstelėms. Taigi, šios ląstelės ekspresuoja antigenus, kuriuos taip pat ekspresuoja donoro audinys arba organas. Tipišku atveju, tai gali būti atliekama, panaudojant alogenines arba ksenogenines ląsteles, gautas iš audinio arba organo transplantato donoro. Pavyzdžiui, periferinės limfoidinės ląstelės, B ląstelės arba blužnies ląstelės iš audinio arba organo donoro gali būti išskirtos ir panaudotos išradime siūlomose kompozicijose. Kitu atveju, alogeninės arba ksenogeninės ląstelės gali būti gautos iš šaltinio, kitokio nei audinio arba organo donoras, jeigu ląstelės turi bendras su audinio arba organo donoru antigenines determinantes. Pavyzdžiui, galima panaudoti alogenines arba ksenogenines ląsteles, kurios ekspresuoja to paties didžiojo histosuderinamumo komplekso antigenus (daugumą arba visus), kaip ir donoro audinys

arba organas. Taigi, galima panaudoti alogenines arba ksenogenines ląsteles iš šaltinio, kuris yra MHC haplotipas, atitinkantis audinio arba organo donorą (pvz., implantato donoro artimas giminaitis).

III. Ląstelių ir gp39 antagonistų vartojimas

Pagal šį išradimą, T ląstelių toleranciją organo arba audinio transplantatui galima sukelti, skiriant transplantato recipientui gp39 antagonistą kartu su alogenine arba ksenogenine ląstele, kuri ekspresuoja donoro antigenus ir sąveikauja su recipiento T ląstelėmis per gp39. Tinkamiausiame išradimo realizavimo variante alogeninė arba ksenogeninė ląstelė ir gp39 antagonistas yra skiriami recipientui vienu metu. Kitu atveju, gp39 antagonistas gali būti skiriamas prieš alogeninių arba ksenogeninių ląstelių skyrimą, pavyzdžiui, kai antagonistas yra didelį išgyvenimo puslaikį turintis antikūnas. Tinkamiausiame realizavimo variante antagonistas ir alogeninės arba ksenogeninės ląstelės yra skiriamos recipientui prieš organo arba audinio transplantaciją į recipientą (t.y. recipientas iš anksto paveikiamas antagonistu ir ląstelėmis). Pavyzdžiui, alogeninės arba ksenogeninės ląstelės ir antagonistas gali būti skiriamos keletą dienų (pvz., nuo 5 iki 10) prieš audinio arba organo transplantaciją.

Buvo rasta, kad T ląstelių tolerancijai donoro audiniui arba organui indukuoti pakanka vienkartinės alogeninių ląstelių dozės (kartu su antagonistu) panaudojimo (žr. 1 pavyzdį). Skiriamų ląstelių skaičius gali keistis priklausomai nuo naudojamų ląstelių tipo, audinio arba organo transplantato tipo, recipiento svorio, bendro recipiento stovio ir kitų parametrų, žinomų patyrusiam gydytojui. Reikiamas ląstelių, skirtų panaudoti pagal šį išradimą, skaičius gali būti nustatytas vienu iš įprastų, šioje srityje žinomų metodų (pvz., tokiu kaip aprašytas 1 pavyzdyje). Ląstelės vartojamos tokios formos ir tokiu būdu, kurie tinka T ląstelių tolerancijai recipiente indukuoti. Ląstelės gali būti vartojamos fiziologiškai tinkamame tirpale, tokiaime kaip buferinis druskos tirpalas arba panašus tirpiklis. Geriausia vartoti ląsteles intraveniniu būdu.

Šio išradimo antagonistas yra skiriamas subjektui biologiškai priimtinoje formoje, tinkamoje farmaciniam vartojimui *in vivo*, norint indukuoti T ląstelės toleranciją. Terminas “biologiškai priimtina forma, tinkama vartoti *in vivo*” reiškia skiriamo antagonisto formą, kurioje bet kokius toksinius efektus persveria junginio terapiniai efektai. Terminas “subjektas” apima gyvuosius organizmus, kuriuose galima sukelti

imuninį atsaką, pvz., žinduolius. Subjektų pavyzdžiais yra žmonės, šunys, katės, pelės, žiurkės ir jų transgeninės rūšys. gp39 antagonistas gali būti vartojamas bet kokios farmakologinės formos pavidalu, esant reikalui su farmaciškai tinkamu nešikliu. Terapiškai aktyvaus antagonisto kiekio skyrimas reiškia efektyvų kiekį, kuris imant tam tikras dozes ir vartojant tam tikrą laiką, yra reikalingas norimam rezultatui (t.y. T ląstelės tolerancijai) pasiekti. Pavyzdžiui, gp39 antagonisto terapiškai aktyvus kiekis gali kisti priklausomai nuo faktorių, tokių kaip ligos stovis, amžius, lytis ir individo svoris, bei antagonisto sugebėjimas sukelti norimą atsaką individe. Reikia pritaikyti dozavimo režimą taip, kad būtų pasiekiamas optimalus terapinis atsakas. Pavyzdžiui, gali būti skiriama keletas padalintų dozių kasdien arba dozė gali būti proporcingai mažinama, jeigu to neatidėliotinai reikalauja terapinė situacija. Kaip aprašyta 1 pavyzdyje, gydant anti-gp39 antikūnu, efektyvus gydymo režimas gali apimti antikūno skyrimą pradžioje prieš audinio arba organo transplantaciją (t.y. nuo 5 iki 10 dienų prieš transplantaciją), o po to tolimesnį antikūno vartojimą (pvz., kas antrą dieną) keletą savaičių (pvz., nuo 2 iki 7 savaičių) po transplantacijos.

Veiklusis junginys (pvz., antagonistas, toks kaip antikūnas) gali būti vartojamas įprastu būdu, tokiu kaip injekcijos (subkutaninės, intraveninės ir t.t.), peroraliniu būdu, inhaliacijomis, transderminiu arba rektaliniu būdu. Priklausomai nuo vaisto vartojimo būdo, veiklusis junginys gali būti padengiamas medžiaga, norint apsaugoti jį nuo fermentų, rūgščių bei kitokių natūralių sąlygų, kurios gali inaktyvuoti junginį, poveikio. Tinkamiausias vartojimo būdas yra intraveninės injekcijos.

Norint vartoti gp39 antagonistą kitokiu, ne parenteriniu būdu, jį gali reikėti padengti arba antagonistą vartoti kartu su medžiaga, kuri apsaugo jį nuo inaktyvacijos. Pavyzdžiui, antagonistas individui gali būti skiriamas atitinkamame nešiklyje arba skiediklyje, vartojamas kartu su fermentų inhibitoriais, arba atitinkamame nešiklyje, tokiame kaip liposomos. Farmaciškai tinkamais skiedikliais yra valgomosios druskos tirpalas ir vandeniniai buferiniai tirpalai. Fermentų inhibitoriais yra kasos tripsino inhibitorius, diizopropilfluorofosfatas (DEP) ir trasilolis. Liposomos apima vanduo-alyvoje alyva-vandenyje emulsijas, o taip pat ir įprastas liposomas (Strejan et al., (1984) *J. Neuroimmunol.*, 7:27).

Veiklusis junginys taip pat gali būti vartojamas parenteriniu arba intraperitoniniu būdu. Taip pat gali būti pagamintos dispersijos glicerine, skystuose polietilenglikoliuose ir jų mišiniuose, bei aliejuose. Įprastomis laikymo ir vartojimo sąlygomis šiuose preparatuose gali būti apsauginės medžiagos, kurios apsaugo nuo mikroorganizmų augimo.

Farmacinės kompozicijos, tinkamos injekcijoms, apima sterilius vandeninius tirpalus (kai medžiaga tirpi vandenyje) arba dispersijas ir sterilius miltelius, skirtus sterilių, injekcijoms skirtų tirpalų arba dispersijų greitam paruošimui. Visais atvejais kompozicijos turi būti sterilios ir turi būti pakankamai skystos, kad būtų galima lengvai jas išvirkšti. Jos turi būti stabilios gamybos ir laikymo sąlygose ir turi būti apsaugotos nuo mikroorganizmų, tokių kaip bakterijos ir grybeliai, užteršiančio poveikio. Nešikliu gali būti tirpiklis arba dispersinė terpė, susidedanti, pavyzdžiui, iš vandens, etanolio, poliolio (pavyzdžiui, glicerino, propilenglikolio ir skysto polietilenglikolio bei pan.) ir tinkamų jų mišinių. Reikiamas skystumas gali būti palaikomas, pavyzdžiui, panaudojant padengiklius, tokius kaip lecitinas, palaikant reikiamą dalelių dydį dispersijų atveju, ir panaudojant paviršiaus aktyviasias medžiagas. Apsaugoti nuo mikroorganizmų poveikio galima naudojant įvairius priešbakterinius ir priešgrybelinius agentus, pavyzdžiui, parabenus, chlorbutanolį, fenolį, askorbo rūgštį, timerosalį ir pan. Daugeliu atvejų pageidautina į kompoziciją įtraukti izotoninius agentus, pavyzdžiui, cukrus, polialkoholius, tokius kaip manitolis, sorbitolis, natrio chloridą. Injekcijoms skirtų kompozicijų prailginta absorbcija gali būti pasiekama, pridėdant į kompoziciją agento, kuris sulėtina absorbciją, pavyzdžiui, aliuminio monostearato arba želatinos.

Sterilūs injekcijoms skirti tirpalai gali būti pagaminami, įdedant aktyvųjį junginį (pvz., gp39 antagonistą) į reikiamą kiekį atitinkamo tirpiklio su vienu arba kombinacija aukščiau išvardintų ingredientų, jeigu jų reikia, o po to atliekant sterilizacinį filtravimą. Bendru atveju, dispersijos gaminamos, įterpiant aktyvųjį junginį į sterilų tirpiklį, kuriame yra pagrindinė dispersinė terpė ir kiti reikiami ingredientai, pasirinkti iš aukščiau minėtų. Sterilių miltelių, skirtų sterilių injekcijų tirpalų paruošimui, atveju tinkamiausi pagaminimo būdai yra vakuuminis džiovinimas ir džiovinimas šaltyje, duodantys veikliojo ingrediento (pvz., antagonistą) ir bet kokio papildomo norimo ingrediento miltelius, kurie susidaro iš anksčiau steriliai nufiltruoto jų tirpalo.

Jeigu veiklusis junginys yra tinkamai apsaugotas, kaip aprašyta aukščiau, baltymas gali būti vartojamas peroraliniu būdu, pavyzdžiui, su inertiniu skiedikliu arba įsisavinamu valgomu nešikliu. Čia naudojamas terminas “farmaciškai tinkamas nešiklis” reiškia bet kokią ir visus tirpiklius, dispersines terpes, padengiklius, priešbakterinius ir priešgrybelinius agentus, izotoninius ir absorbciją lėtinančius agentus ir pan. Tokių terpių ir agentų panaudojimas farmaciškai aktyvioms medžiagoms yra gerai žinomas šios srities specialistams. Tais atvejais, kai kokia nors įprasta terpė arba agentas yra nesuderinamas su veikliuoju junginiu, jų panaudojimas terapinėse kompozicijose yra specialiai aptariamas. Į kompozicijas gali taip pat būti pridėdama ir papildomų veikliųjų junginių.

Ypatingai pageidautina gaminti dozuotų vienetų formos parenterinio vartojimo kompozicijas, kad būtų galima palengvinti vartojimą ir užtikrinti dozavimo vienodumą. Čia vartojamas terminas “dozuotų vienetų forma” reiškia fiziškai atskirus vienetus, pritaikytus kaip vienkartinės dozės gydymo reikalingiems žinduoliams; kiekvienas vienetas turi iš anksto nustatytą veikliojo junginio kiekį, išskaičiuotą taip, kad jis duotų norimą terapinį efektą, kartu su reikiamu farmaciniu nešikliu. Šio išradimo dozuotų vienetų formų specifikacija yra padiktuota ir tiesiogiai priklauso nuo a) veikliojo junginio unikalų charakteristikų bei tam tikro siekiamo terapinio efekto ir b) apribojimų, išskylančių sumaišant tokius veikliuosius junginius, skirtus individo jautrumo gydymui.

Po šio čia aprašyto toleravimo režimo arba tuo pačiu metu, panaudojant įprastus metodus, į transplantato recipientą persodinamas donoro audinys arba organas.

IV. Išradimo kompozicijų panaudojimas

Išradimo kombinacijos yra tinkamos labai įvairiose audinių ir organų persodinimo situacijose. Kombinacijos gali būti panaudotos, norint indukuoti T ląstelių toleranciją audinio arba organo transplantato, tokio kaip kasos salelės, kepenys, inkstas, širdis, plautis, oda, raumuo, neuroninis audinys, skrandis ir žarnos, recipiente. Tokiu būdu, šio išradimo kombinacijos gali būti pritaikytos gydant ligas arba būsenas, kurias sukelia audinio arba organo transplantacija (pvz., kepenų transplantacija, gydant hipercholesterolemiją, raumenų ląstelių transplantacija, gydant distrofiją, neuroninio audinio transplantacija, gydant Hantingtono arba Parkinsono ligas ir t.t.). Tinkamiausiame realizavimo variante transplantuotas audinys yra kasos salelės. Iš to seka, kad išradimas apima ir šių kombinacijų panaudojimą diabeto gydymui, kuriame naudojama kasos salelių

ląstelių transplantacija. Toks panaudojimas apima: a) alogeninių arba ksenogeninių ląstelių, kurios ekspresuoja donoro antigenus, 2) molekules, ekspresuotos ant recipiento T ląstelių, kuri tarpininkauja priklausančioje nuo kontakto Helferio efektoriaus funkcijoje, antagonisto, tokio kaip gp39 antagonistas (pvz., anti-gp39 antikūnas) ir 3) donoro kasos salelių ląstelių skyrimą subjektui, kuriam reikia tokio gydymo. Geriausia, kai alogeninės arba ksenogeninės ląstelės ir antagonistas yra skiriami recipientui prieš skiriant kasos saleles.

Toliau išradimą iliustruoja žemiau duodami pavyzdžiai, kurie neturi būti laikomi apribojančiais jo apimtį. Visų literatūros šaltinių, patentų ir publikuotų paraiškų patentams, cituotų šioje paraiškoje, turiniai čia pridedami kaip literatūros šaltiniai.

1 pavyzdys

Tolerancijos kasos salelių alotransplantatams indukcija, veikiant recipientą alogeninėmis ląstelėmis ir anti-gp39

Dabartiniai alotransplantacijos tyrimai priklauso nuo bendrosios imunosupresijos, kuri nespecifiškai pašalina imunines efektoriaus funkcijas. Tačiau, imunosupresiniai vaistai gali sukelti didelius pašalinius efektus. Be to, pasirodė, kad Langerhano salelių alotransplantacija diabetui gydyti nepasiduoda tokiam priėjimui (žr., pvz., Robertson, R.P. (1992) *N. Eng. J. Med.* 327, 1861). Terapijos, naudojant antikūnus prieš T ląsteles, gali duoti galimybę sėkmingai alotransplantuoti saleles graužikuose, bet šis priėjimas taip pat duoda ir bendrąją imunosupresiją (Carpenter, C.B. (1990) *N. Eng. J. Med.* 322, 1224; Roark, J.H. et al. (1992) *Transplantation* 54,1098; Kahan, B.D. (1992) *Curr. Opin. Immunol.* 4, 553). Šiame pavyzdyje transplantato recipiente tolerancija salelių alotransplantatams buvo sukurta, valdant aloantigeno padavimą T ląstelėms taip, kad būtų sulaukiama jų aktyvacija. Salelių alotransplantatų išgyvenimas C57BL/6 (H-2^b) pelėse, kurioms buvo chemiškai sukeltas diabetas, buvo tyrinėtas, naudojant tokią metodiką:

Diabeto sukėlimas

C57BL/6J (H-2^b) pelių patinėliams buvo sukeltas diabetas, suleidžiant į veną streptozotocino (140 mg/kg). Trim atvejais pastovų diabetą patvirtina gliukozės koncentracija plazmoje ≥ 400 mg/dl vienos savaitės laikotarpyje.

Alogeninių blužnies ląstelių frakcionavimas

Donoro alogeninės ląstelės, skirtos preliminariniam transplantato recipientui apdoroti, kad būtų galima išvengti transplantatas-prieš recipientą ligos, buvo gautos iš (C57xBALB/c)(H-2^{b/d})F₁ hibridinių gyvuliukų. Norint išskirti mažas limfocitų ląsteles, blužnies ląstelių, gautų iš 8 savaičių amžiaus (C57xBALB/c)F₁ pelių patelių, suspensijos buvo išvalytos nuo eritrocitų ir tada frakcionuotos pagal dydį, panaudojant perplovimą, kaip aprašyta Tony, H.P. et al., (1985) *J. Exp. Med.* 161, 223; ir Gosselin E.J. et al. (1988) *J. Immunol.* 140, 1408. Trumpai tariant, mažieji limfocitai atskirti panaudojant priešpriešinės srovės centrifuginį perplovimą, pavyzdžiui, naudojant J6B modelio centrifugą (Beckman Instruments, Palo Alto CA). Apie $1-5 \times 10^8$ ląstelių 8 ml kultūrinės terpės arba subalansuoto druskos tirpalo su 1,5 % fetalinio jaučio serumo veikiamą deoksiribonukleazę, patalpinama į perplovimo kamerą, esant 13,5 ml/min. priešpriešinės srovės greičiui, ir sukama 4 °C temperatūroje pastoviu 3200 aps./min. greičiu. Paprastai mažųjų ląstelių frakcija su labai nedideliu kiekiu didžiųjų ląstelių priemaišų eliuuojama, esant 14-19 ml/min., nors tikslus srauto greitis gali priklausyti nuo terpės, kurioje suspenduotos ląstelės. Čia aprašytuose eksperimentuose mažųjų ląstelių frakcija surinkta, esant 19 ml/min. greičiui (3200 aps./min.). Ši frakcija visiškai laisva nuo radiacijai atsparių (3000 rads) papildomų ląstelių frakcijos, kai tirama su T ląstelių linijomis, specifinėmis arba triušio IgG ir H2^d (CDC35) arba aloreaktingomis H2^b (D10.G4). Prieš suleidžiant į alotransplantatų recipiento uodegos veną, mažosios ląstelės ir nefrakcionuotos ląstelės buvo perplautos du kartus neturinčia serumo terpe. Panaudota apie $40-100 \times 10^6$ (C57xBALB/c)F₁ (H-2^{b/d}) nefrakcionuotų blužnies ląstelių arba $40-100 \times 10^6$ (C57xBALB/c)F₁(H-2^{b/d}) perplautų mažųjų blužnies ląstelių.

Transplantato recipientų preliminarinis apdorojimas

Transplantato recipientai preliminariai apdorojami arba nefrakcionuotomis (C57xBALB/c)F₁(H-2^{b/d}) alogeninėmis blužnies ląstelėmis, išplautos "19 frakcijos" mažo diametro blužnies ląstelėmis, iš kurių pašalintas APC aktyvumas (išskirtomis taip kaip aprašyta aukščiau), anti-gp39 monokloniniu antikūnu (MR1, žr. 2 pavyzdį, 3 eksperimentą), arba alogeninių ląstelių ir anti-gp39 antikūno kombinacija. 19 frakcijos ląstelės buvo tiriamos, imant du skirtingus dozių intervalus - mažą $40-44 \times 10^6$ ląstelių dozę arba didelę $77-88 \times 10^6$ ląstelių dozę. Kontroliniai gyvuliukai negavo alogeninių ląstelių ir nebuvo paveikti antikūnu. Alogeninės ląstelės buvo suleistos į transplantato recipiento

uodegos veną 5-8 dienos prieš salelių alotransplantatų transplantaciją. Apdorojimas MR1 antikūnu buvo pradėtas 7 dienos prieš salelių transplantaciją ir tęsiamas 2-7 savaites arba tol, kol transplantatas buvo atmestas, imant 250 mg/pelei dozę ir leidžiama du kartus per savaitę. Pirmoji antikūno injekcija paprastai padaroma tą pačią dieną, kaip ir pirmoji alogeninių blužnies ląstelių injekcija.

Salelių alotransplantato transplantacija

Alogeninės BALB/c (H-2^d) salelės buvo išskirtos, panaudojant modifikuotą kolagenazinio suskaldymo metodą (Gottlieb, P.A. et al. (1990) *Diabetes*, 39, 643). Salelės, kurių dozė 30 salelių/kg kūno svorio, buvo implantuotos į recipientui (C57Bl/6J (H-2^b) pelės) subrenalinę kapsulę tuoj pat po jų išskyrimo. Transplantato išgyvenimas buvo nustatomas pagal gliukozės koncentracijos plazmoje išsilaikymą ≤ 200 mg/dl.

Rezultatai

Pirmoje eksperimentų serijoje salelių alotransplantatų recipientai buvo preliminariai apdoroti arba vien tik alogeninėmis blužnies ląstelėmis, arba tik anti-gp39 antikūnu. Kaip parodyta fig.1, nesant preliminarinio apdorojimo blužnies ląstelėmis, visi salelių alotransplantatai buvo atmesti per 13 dienų po transplantacijos (9 ± 2 d., 5-13 d intervalas, N=23). Blogas salelių išgyvenimas stebėtas taip pat ir gyvuliukuose, kurie buvo apdoroti tik nefrakcionuotomis blužnies ląstelėmis, turinčiomis normalų APC aktyvumą (6 ± 3 d., 4-12 d. intervalas, N=7), arba mažomis dozėmis ($40-44 \times 10^6$ ląstelių) 19 frakcijos, kurioje pašalintas APC aktyvumas, blužnies ląstelių (7 ± 3 d., 3-14 d. intervalas, N=16). Priešingai, suleidus didesnę 19 frakcijos, kurioje pašalintas APC aktyvumas, mažųjų splenocitų ($77-88 \times 10^6$ ląstelių) dozę, pailgėjo alotransplantato išgyvenimas (19 ± 10 d., 7-40 d. intervalas, N=16). Šis efektas transplantato išgyvenimo trukmei buvo statistiškai reikšmingas ($F_{3,58} = 17,3$ $p < 0,001$, lyginant su neapdorota grupe, grupe, gavusia pilnos blužnies transfuziją, ir grupe, apdorota 19 frakcijos blužnies ląstelių mažąja doze), bet nebuvo tolydinis. Pailgintas, bet baigtinis alogeninių ląstelių išgyvenimas diabetu sergančiuose recipientuose, gavusiuose be APC 19 frakcijos mažąsias ląsteles, leidžia manyti, kad vienos šios ląstelės negali išlaikyti alotransplantato išgyvenimo. Papildoma transplantato recipientų grupė buvo apdorota $77-88 \times 10^6$ 20 frakcijos ląstelių. Šią frakciją taip pat pagrindinai sudarė mažieji limfocitai, bet nuo 19 frakcijos ji skiriasi tuo, kad ji turi išmatuojamą APC funkciją. Visi šių ląstelių recipientai (N=6) atmetė transplantatus iš

karto (vidurkis 8,5 d., 6-12 d. intervalas). Kita transplantato recipientų grupė buvo apdorota vien tik anti-gp39 monokloniniu antikūnu MR1. Fig.1 parodyta, kad salelių alotransplantatai žuvo per 15 dienų 7 iš 11 pelių, apdorotų vien tik anti-gp39 mAb. Likusios 4 pelės turėjo funkcionuojančius transplantatus iki eksperimento pabaigos (48 dienos). Šie rezultatai rodo, kad vieno MR1 anti-gp39 antikūno skyrimas recipientui gali pailginti salelių alotransplantato išgyvenimą (vidurkis 20=19 d., 9-neapibrėžtas intervalas, N=5). Pailginimo laipsnis buvo statistiškai panašus į laipsnį, pasiektą naudojant vien tik didesnę 19 frakcijos blužnies ląstelių dozę, ir daug ilgesnis, nei pasiektas kitose trijose grupėse ($p<0,05$).

Aukščiau aprašytų eksperimentų serijos parodė, kad apdorojimas didesnėmis 19 frakcijos be APC blužnies ląstelių dozėmis arba vienu anti-gp39 mAb gali sustiprinti kasos salelių alotransplantato išgyvenimą, lyginant su neapdorotais gyvuliukais. Tačiau nei vienas apdorojimas nėra efektyvus, norint indukuoti ilgalaikę toleranciją salelių alotransplantatams recipientuose. Kitose eksperimentų serijose apdorojimas alogeninėmis blužnies ląstelėmis buvo sujungtas su recipiento apdorojimu anti-gp39. Rasta, kad kombinuotas alogeninių blužnies ląstelių ir anti-gp39 panaudojimas yra efektyvesnis, negu vieno bet kurio reagento. Rezultatai parodyti fig.2, kurioje kiekviena kreivė vaizduoja atskiros pelės duomenis. Neužtušuoti simboliai rodo recipientus, kuriuose salelių alotransplantatas iš karto neprigijo. Užtušuoti simboliai rodo peles, kuriose salelių transplantatai funkcionavo iki eksperimento pabaigos. Fig.2(B) rodo, kad pasiektas neapibrėžtas transplantato išgyvenimas visuose gyvuliukuose, kurie 7 savaites buvo veikiami anti-gp39 mAb ir kuriems padaryta tik viena 19 frakcijos be APC blužnies ląstelių injekcija (N=6). Metodikos pakeitimas, sumažinant apdorojimo anti-gp39 trukmę, susilpnino bet neanuliuo teigiamo efekto į transplantato išgyvenimą. Neapibrėžtas transplantato išgyvenimas buvo pasiektas 6 iš 8 recipientų, kai anti-gp39 mAb buvo vartojamas tik 2 savaites kartu su 19 frakcijos blužnies ląstelėmis (fig.2A). Neapibrėžtas transplantato išgyvenimas taip pat stebėtas recipientuose, paveiktuose anti-gp39 2 arba 7 savaites kartu su viena nefrakcionuotų alogeninių blužnies ląstelių injekcija.

Norint patvirtinti salelių transplantato funkciją ir tai, ar likusios natyvios salelės, kurių nesuardė apdorojimas streptozotocinu, neišskiria insulino, buvo pašalinti inkstai,

turintys subrenalinius implantatus. Visais atvejais vienas nefrektomija 3 dienų bėgyje davė hiperglikemijos (>300 mg/dl) recidyvą.

Atlikti visų gyvuliukų (tiek su žuvusiais transplantatais, tiek ir eksperimento pabaigoje) salelių alotransplantatų ir natyvios kasos histologiniai tyrimai. Recipientų, gavusių frakcionuotus alogeninius mažuosius limfocitus ir nepertraukiamą (7 savaitės) poveikį MR1 mAb, inkstuose salelių alotransplantatų histologiniai pjūviai parodė gausias nepažeistas saleles, matomas žemiau inksto kapsulės, kurios neturi vienbranduolinių infiltracijų ir turi gerai granuluotas insulino ir glukagono teigiamas saleles. Priešingai, recipientų, paveiktų vien tik anti-gp39 mAb, inkstuose salelių alotransplantatų histologiniai pjūviai parodė charakteringą intensyvią vienbranduolinės ląstelės uždegimą ir gretimos salelės ląstelių destruktiją. Visose šeimininkų kepenyse salelių morfologija buvo vienodai charakteringa streptozotociniam diabetui.

2 pavyzdys

Anti-gp39 antikūnų gavimas ir charakterizavimas

1 eksperimentas - Antikūnai prieš žmogaus gp39

Norint indukuoti specifinę antigenui T ląstelės toleranciją žmogaus organizme, pageidautina vartoti antikūną prieš žmogaus gp39. Pelės anti-žmogaus gp39 monokloniniams antikūnams pagaminti buvo naudojama tokia metodika: Balb/c pelės buvo imunizuojamos tirpiu gp39 sulietu baltymu (gp39-CD8) pilname Froindo stimulatoriuje (CFA). Po to, pelės po 6 savaitių buvo paveikiamos tirpiu gp39-CD8 nepilname Froindo stimulatoriuje (IFA). Tirpus gp39-CD8 buvo duodamas tirpioje formoje, praėjus 4 savaitėms po antrinio imunizavimo. Tada po 2 savaitių pelės buvo reimunizuotos aktyvuotais žmogaus periferinio kraujo limfocitais, o dar po 2 savaitių galutinai reimunizuotos tirpiu gp39-CD8. Ketvirtą dieną po galutinės imunizacijos splenocitai sulieti su NS-1 suliejimo partneriu pagal standartines metodikas.

Remiantis daugeliu skryningo būdų, atrinkti klonai, gaminantys anti-žmogaus gp39 antikūnus. Klonų atrinkimas iš pradžių buvo atliktas pagal susirišimo su plokštele testą, naudojant gp39-CD8. Tada atrinkti teigiami klonai kontrolinio CD8 sulieto baltymo - CD72-CD8- atžvilgiu. Klonai, kurie nedavė teigiamo atsako CD8-CD72 plokštelės susirišimo teste, buvo atmesti. Po to atliktas likusių klonų skryningas ramybėje esančių ir 6

val. aktyvuotų žmogaus periferinio kraujo limfocitų (PBL) atžvilgiu, panaudojant apykaitos citometrinę analizę. Hibridomas nudažantys aktyvuoti, bet ne ramybės būsenoje esantys PBL buvo laikomi teigiamais. Pagaliau buvo tiriamas likusių klonų sugebėjimas blokuoti CD40Ig prisirišimą prie plokštelės su prijungtu gp39.

Iš pradžių buvo atrinkta apie 300 klonų gp39-CD8 ir CD72-CD8 atžvilgiu, naudojant susirišimo su plokštele testus. Buvo rasta, kad 30 iš šių klonų detektuoja pririštą prie plokštelės gp39, bet nedetektuoja CD8. Po to atliktas šių klonų skryningas gp39 ant aktyvuotų žmogaus PBL detektavimo atžvilgiu. Apie 15 klonų detektavo molekulę ant aktyvuotų PBL, bet nedetektavo ant ramybės būsenoje esančių ląstelių. Specifiškumas buvo papildomai patvirtintas, panaudojant klonų sugebėjimą blokuoti CD40Ig detekciją ant prie plokštelės prijungto gp39. Trys iš 10 tirtų klonų blokavo CD40Ig susijungimą šiame teste. Šie klonai buvo 3E4, 2H5 ir 2H8. Tokie klonai geriausiai tinka panaudoti išradime siūlomuose būduose. Klonai, kurie rodė teigiamą atsaką ant aktyvuotų, bet ne ramybės būsenoje esančių PBL, buvo taip pat atrenkami, nustatant jų reakingumą su aktyviu žiurkės T ląstelės klonu POMC8. 2H8 klonas rodė krosreaktingumą su šia žiurkės T ląstelių linija.

2 eksperimentas - Antikūnai prieš žmogaus gp39

Panaši į 1 eksperimente imunizavimo metodika buvo panaudota papildomiems antikūnams prieš žmogaus gp39 gauti. Viena Balb/c pelė buvo imunizuota tirpiu gp39-CD8 CFA, po to po 4 savaitių apdorota 6 valandas aktyvuotais žmogaus periferinio kraujo limfocitais. Po to pelė buvo reimunizuota tirpiu gp39-CD8 4 dienas prieš splenocitų suliejimą su NS-1 suliejimo partneriu pagal standartinę metodiką. Hibridomos klonų skryningas atliktas 6 val. aktyvuotų žmogaus PBL apykaitos citometrinio nuspalvinimo būdu. Atrinkti klonus nudažantys aktyvuoti, bet ne ramybės būsenoje esantys PBL. Tolesnei analizei atrinkti šeši klonai: 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 ir 89-79.

Atrinktų antikūnų specifiškumas buvo patvirtintas keletu bandymų. Pirma, apykaitos citometrinė analizė parodė, kad visi šeši mAb dažo aktyvuotas, bet ne ramybės būsenoje esančias kraujo T ląsteles (žr. fig.2A ir 3C, kaip parodomąjį pavyzdį, vaizduojantį aktyvuotų T ląstelių nuspalvinimą atitinkamai 4D9-8 ir 4D9-9). Molekulės, kurią atpažįsta kiekvienas iš 6 antikūnų, ekspresija yra pastebima 4 aktyvacijos valandų bėgyje, maksimalią reikšmę pasiekia tarp 6 ir 8 val. po aktyvacijos ir nebepastebima praėjus 24

val. po aktyvacijos. Visi šeši mAb atpažįsta molekulę, ekspresuotą ant aktyvuotų CD3⁺PBL, geriau CD4⁺ fenotipo, bet CD8⁺ T ląstelių dalis taip pat ekspresuoja šią molekulę. Molekulės, atpažįstamos šešių mAb, ekspresiją inhibuoja ciklosporino A buvimas kultūrinėje terpėje, kaip ir gp39 ekspresiją (žr. fig.4A ir 4B, kaip parodomąjį pavyzdį, vaizduojantį ciklosporinu apdorotų T ląstelių nuspalvinimą atitinkamai 4D9-8 ir 4D9-9). Molekulės, atpažįstamos šių mAb, ekspresijos kinetika ir pasiskirstymas yra identiški gp39, kas buvo nustatyta pagal žmogaus CD40Ig suliejimo baltymą. Be to, visi šeši mAb blokuoja gp39 nudažymą CD40Ig (žr. fig.5A ir 5B, kaip parodomąjį pavyzdį, vaizduojantį gp39 nudažymo CD40Ig inhibiciją, esant atitinkamai 4D9-8 ir 4D9-9). ELISA bandyme visi šeši mAb atpažįsta gp39-CD8 - tirpią sulietą gp39 molekulės formą. Be to, visi šeši mAb imunonusodina apytikriai 36 kd molekulę iš ³⁵S-metioninu žymėtų aktyvuotų žmogaus PBL. Imunonusodinta molekulė yra identiška molekulei, nusodintai žmogaus CD40Ig sulietu baltymu.

Šešių atrinktų mAb (4D9-8, 4D9-9, 24-32, 24-43, 89-76 ir 89-79) funkcinis aktyvumas buvo išbandytas taip: pirmiausia buvo išmatuotas mAb sugebėjimas inhibuoti išgrynintų žmogaus B ląstelių, kultivuotų su IL-4 ir tirpiu gp39. Išgrynintos žmogaus B ląstelės buvo kultivuotos su gp39 ir IL-4, esant arba nesant išgrynintų monokloninių antikūnų arba CD40Ig, naudojant 0-12,5 μg/ml dozes. B ląstelės proliferacija buvo nustatyta po 3 dienų kultūroje, panaudojant timidino inkorporaciją. Rezultatai (parodyti fig.6) rodo, kad visi šeši mAb gali inhibuoti B ląstelės proliferaciją, sukeltą gp39 ir IL-4. 89-76 ir 24-31 mAb efektyviausiai inhibavo indukuotos B ląstelės proliferaciją.

Tada buvo tirtas mAb sugebėjimas inhibuoti B ląstelės diferenciaciją, matuojant pagal Ig pasigaminimą, indukuotą anti-CD3 aktyvuotų T ląstelių ir IL-2. Išvalytos žmogaus IgD⁺ B ląstelės buvo gautos, panaudojant teigiamą selekciją su FACS, ir tada kultivuotos su anti-CD3 aktyvuotomis žmogaus T ląstelėmis (apdorota mitomicinu C) ir IL-2 šešias dienas, esant arba nesant išvalytų anti-gp39 monokloninių antikūnų, naudojant 0-10 μg/ml dozes. Šeštą dieną įvertinta IgM, IgG ir IgA pasigaminimas ELISA metodu. Rezultatai (parodyti 1 lentelėje) rodo, kad visi šeši antikūnai gali inhibuoti priklausančią nuo T ląstelių B ląstelių diferenciaciją, matuojant pagal IgM, IgG ir IgA pasigaminimą.

1 lentelė

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

Norint ištirti anti-gp39 mAb įtaką į T ląstelės atsakus, mAb buvo įvesti į standartines mišrių limfocitų reakcijas (MLR). 300000 žmogaus periferinio kraujo limfocitų (reagentai = R) buvo kultivuojami su 100000 apspinduliuotų alogeninių periferinio kraujo limfocitų (stimulatoriai = S), esant arba nesant anti-gp39 mAb (10 $\mu\text{g/ml}$). Kultūros paveiktos 3H timidinu 4-tą, 5-tą ir 6-tą dieną, ir po 18 valandų surinktos ląstelės. Visi šeši anti-žmogaus gp39 mAb inhibavo alospecifinius atsakus, išmatuojamus pagal MLR (žr. fig.7, kaip parodomąjį pavyzdį, vaizduojantį alospecifinių atsakų inhibiciją, kai R ir S yra inkubuojami, esant 24-31 arba 89-76; sulietas baltymas CTLA4-imunoglobulinas ir anti-CD28 mAb buvo naudoti kaip teigiamos kontrolės).

Norint nustatyti ar visi šeši mAb atpažįsta skirtingus epitopus ant žmogaus gp39 molekulės, atlikti krosblokavimo eksperimentai. Aktyvuoti žmogaus PBL pirmiausia buvo blokuoti su kiekvienu iš šešių mAb (25 $\mu\text{g/ml}$ nekonjuguoto antikūno). Ląstelės perplautos ir nudažytos 10 $\mu\text{g/ml}$ biotino-konjuguoto antikūno, po to paveiktos fitoeritrinu konjuguotu su avidinu (PE-Av). Ląstelių nusidažymas PE-Av analizuotas FACS metodu. Rezultatai parodyti 2 lentelėje

Blokavimo Ab	Nudažymo antikūnas					
	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
nėra	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	ND	-	++++	++++	+++	+++
4D9-9	+++	ND	+++	++++	+++	+++
24-31	+	+	ND	+++	++	++
24-43	+	+	+++	ND	++	+
89-76	+	+	+++	+++	ND	+++
89-79	+	+	+++	+++	+++	ND

Nudažymo intensyvumas ir teigiamų dalelių procentai atvaizduoti + simboliu (++++ = MI>200; +++ = MI>125; ++ = MI>50; + = MI>25; - nesiskiria nuo fono). ND - nenustatyta.

Visi antikūnai blokavo CD40Ig susirišimą su aktyvuotais žmogaus PBL. Tačiau 2 lentelėje pateikti duomenys aiškiai rodo, kad kai kurie antikūnai neblokuoja kitų antikūnų susirišimo su aktyvuotais žmogaus PBL, kas duoda pagrindą manyti, kad jie atpažįsta atskirus epitopus ant žmogaus gp39 molekulių.

89-76 ir 24-31 hibridomos, produkuojančios atitinkamai 89-76 ir 24-31 antikūnus, buvo deponuotos pagal Budapešto sutartį su American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, Md., 1994 m. rugsėjo 2 d. 89-76 hibridomai priskirtas ATCC depozito numeris HB 11713, o 24-31 hibridomai priskirtas ATCC depozito numeris HB 11712.

3 eksperimentas - Antikūnai prieš pelės gp39

Viename iš šio išradimo realizavimo variantų gp39 antagonistas yra anti-pelės gp39 monokloninis antikūnas, MR1. MR1 monokloniniam antikūnui gauti naudotas toliau aprašomas metodas, ir jį galima naudoti kitiems antikūnams prieš gp39 generuoti.

Žiurkėnai buvo imunizuojami, suleidžiant į pilvą kartą per savaitę 5×10^6 aktyvųjų T_H1 ląstelių (d1.6) 6 savaites. Kai serumo titras pagal pelės T_H1 buvo didesnis nei 1:10000, atliktas ląstelių suliejimas su polietilenglikoliu, naudojant imunizuoto žiurkėno splenocitus ir NS-1. Supernatantas iš talpų, turinčių augančias hibridomas, buvo išskirstytas į ramybės būsenoje esančias ir aktyvuotas T_H1 . Viena ypatinga hibridoma, kuri gamino Mab, selektyviai atpažįstantį aktyvuotą T_H1 , buvo toliau testuojama ir subklonuojama, norint

gauti MR1. MR1 buvo pagamintas ascituose ir išvalytas jonų mainų HPLC. MR1 hibridoma deponuota American Type Culture Collection su depozito numeriu HB 11048.

Ekvivalentai

Šios srities specialistai pripažins arba galės užtikrinti, naudodami ne daugiau negu įprastus eksperimentus, daugybę ekvivalentų šio išradimo čia aprašytiems realizavimo variantams. Manoma, kad tokius ekvivalentus apima toliau duodama apibrėžtis. Visos literatūros nuorodos ir publikuotos paraiškos patentams, cituojamos šioje paraiškoje, čia įeina kaip literatūros šaltiniai.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kombinacijos, susidedančios iš:

a) alogeninės arba ksenogeninės ląstelės, kuri ekspresuoja bent vieną donoro antigeną ir kuri turi ligandą ant ląstelės paviršiaus, sąveikaujantį su receptoriumi ant recipiento T ląstelės paviršiaus, kuris tarpininkauja priklausančioje nuo kontakto Helferio efektoriaus funkcijoje; ir

b) receptoriaus ant T ląstelės paviršiaus antagonistą, kuris inhibuoja ligando sąveiką su receptoriumi, panaudojimas vaistų, skirtų T ląstelės tolerancijos donoro audiniui arba organui audinio arba organo recipiente indukavimui, kuris yra reikalingas organų transplantacijoje, gamyboje.

2. Panaudojimas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad receptoriaus ant recipiento T ląstelės paviršiaus, kuris tarpininkauja priklausančioje nuo kontakto Helferio efektoriaus funkcijoje, yra gp39.

3. Panaudojimas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad antagonistas yra anti-gp39 antikūnas.

4. Panaudojimas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad anti-gp39 antikūnas yra monokloninis antikūnas.

5. Panaudojimas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad anti-gp39 antikūnas yra anti-žmogaus gp39 antikūnas.

6. Panaudojimas pagal 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra MR1.

7. Panaudojimas pagal 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra chimerinis monokloninis antikūnas.

8. Panaudojimas pagal 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra humanizuotas monokloninis antikūnas.

9. Panaudojimas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad alogeninės arba ksenogeninės ląstelės yra limfoidinės ląstelės, tokios kaip B limfocitai, "profesionalus" antigenas, pateikiantis ląsteles, tokias kaip monocitai, dendritinės ląstelės ir Langerhamo

ląstelės, ir kitos ląstelės, kurios pateikia antigeną imuninėms ląstelėms, tokios kaip keratinocitai, endotelinės ląstelės, astrocitai, fibroblastai ir oligodendrocitai.

10. Panaudojimas pagal 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad limfoidinė ląstelė yra B ląstelė.

11. Panaudojimas pagal 10 punktą, besiskiriantis tuo, kad B ląstelė yra ramybės būsenoje esanti B ląstelė.

12. Panaudojimas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad pagaminami vaistai yra skirti naudoti prieš transplantuojant audinį arba organą.

13. Panaudojimas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad pagaminami vaistai yra skirti donoro audinių arba organų, kurie apima kepenis, inkstus, širdį, plaučius, odą, raumenis, neuroninį audinį, skrandį ir žarnas, T ląstelių tolerancijai recipiente indukuoti.

14. Panaudojimas pagal 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad audinys arba organas yra kasos salelės.

15. Kombinacijos, susidedančios iš:

a) alogeninės arba ksenogeninės ląstelės, kuri ekspresuoja bent vieną donoro antigeną, ir

b) gp39 antagonistą,

panaudojimas vaistų, skirtų T ląstelės tolerancijos donoro audiniui arba organui audinio arba organo recipiente indukavimui, kuris yra reikalingas organų transplantacijoje, gamyboje.

16. Panaudojimas pagal 15 punktą, besiskiriantis tuo, kad gp39 antagonistas yra anti-gp39 antikūnas.

17. Panaudojimas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad anti-gp39 antikūnas yra monokloninis antikūnas.

18. Panaudojimas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad anti-gp39 antikūnas yra anti-žmogaus gp39 antikūnas.

19. Panaudojimas pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra MR1.

20. Panaudojimas pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra chimerinis monokloninis antikūnas.

21. Panaudojimas pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra humanizuotas monokloninis antikūnas.

22. Panaudojimas pagal 15 punktą, besiskiriantis tuo, kad gp39 antagonistas yra gp39 ligando tirpi forma.

23. Panaudojimas pagal 22 punktą, besiskiriantis tuo, kad gp39 ligando tirpi forma yra CD40 sulietas baltymas.

24. Panaudojimas pagal 15 punktą, besiskiriantis tuo, kad alogeninė arba ksenogeninė ląstelė yra limfoidinė ląstelė.

25. Panaudojimas pagal 24 punktą, besiskiriantis tuo, kad limfoidinė ląstelė yra B ląstelė.

26. Panaudojimas pagal 25 punktą, besiskiriantis tuo, kad B ląstelė yra ramybės būsenoje esanti B ląstelė.

27. Panaudojimas pagal 15 punktą, besiskiriantis tuo, kad pagaminami vaistai yra skirti naudoti prieš tranplantuojant audinį arba organą.

28. Panaudojimas pagal 15 punktą, besiskiriantis tuo, kad pagaminami vaistai yra skirti donoro audinių arba organų, kurie apima kepenis, inkstus, širdį, plaučius, odą, raumenis, neuroninį audinį, skrandį ir žarnas, T ląstelių tolerancijai recipiente indukuoti.

29. Panaudojimas pagal 28 punktą, besiskiriantis tuo, kad audinys arba organas yra kasos salelės.

30. Kombinacijos, susidedančios iš:

a) alogeninės arba ksenogeninės ląstelės, kuri ekspresuoja bent vieną donoro antigeną, ir

b) gp39 antagonistu, panaudojimas vaistų, skirtų diabeto gydymui, kai transplantuojamos donoro kasos salelių ląstelės, gamyboje.

31. Panaudojimas pagal 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad anti-gp39 antikūnas yra monokloninis antikūnas.

32. Panaudojimas pagal 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad anti-gp39 antikūnas yra anti-žmogaus gp39 antikūnas.

33. Panaudojimas pagal 31 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra MR1.

34. Panaudojimas pagal 31 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra chimerinis monokloninis antikūnas.

35. Panaudojimas pagal 31 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra humanizuotas monokloninis antikūnas.

36. Panaudojimas pagal 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad gp39 antagonistas yra gp39 ligando tirpi forma.

37. Panaudojimas pagal 36 punktą, besiskiriantis tuo, kad gp39 ligando tirpi forma yra CD40 sulietas baltymas.

38. Panaudojimas pagal 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad alogeninė arba ksenogeninė ląstelė yra limfoidinė ląstelė.

39. Panaudojimas pagal 38 punktą, besiskiriantis tuo, kad limfoidinė ląstelė yra B ląstelė.

40. Panaudojimas pagal 39 punktą, besiskiriantis tuo, kad B ląstelė yra ramybės būsenoje esanti B ląstelė.

41. Panaudojimas pagal 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad pagaminami vaistai yra skirti naudoti prieš tranplantuojant kasos salelių ląsteles.

42. Vaistas, skirtas T ląstelių tolerancijos donoro audiniui arba organui audinio arba organo recipiente indukavimui, besiskiriantis tuo, kad jis recipientą paveikia alogeninėmis arba ksenogeninėmis ląstelėmis, kurios ekspresuoja donoro antigeną, ir kuriame yra gp39 antagonisto.

43. Vaistas pagal 42 punktą, besiskiriantis tuo, kad alogeninės arba ksenogeninės ląstelės yra limfoidinės ląstelės, tokios kaip B limfocitai, “profesionalus” antigenas, pateikiantis ląsteles, tokias kaip monocitai, dendritinės ląstelės ir Langerhamo ląstelės, ir kitos ląstelės, kurios pateikia antigeną imuninėms ląstelėms, tokios kaip keratinocitai, endotelinės ląstelės, astrocitai, fibroblastai ir oligodendrocitai.

44. Vaistas pagal 42 punktą, besiskiriantis tuo, kad antigeną pateikianti ląstelė yra B ląstelė.

45. Vaistas pagal 42 punktą, besiskiriantis tuo, kad donoro audinys arba organas yra kepenys, inkstai, širdis, plaučiai, oda, raumenys, neuroninis audinys, skrandis ir žarnos.

46. Vaistas, skirtas diabeto gydymui subjekto, kuriam transplantuojamos donoriaus

kasos salelių ląstelės, besiskiriantis tuo, kad jis recipientą paveikia alogeninėmis arba ksenogeninėmis ląstelėmis, ekspresuojančiomis bent vieną donoriaus antigeną, ir kuriame yra gp39 antagonisto.

47. Vaistas pagal 46 punktą, besiskiriantis tuo, kad alogeninės arba ksenogeninės ląstelės, kurios ekspresuoja bent vieną donoro antigeną yra limfoidinės ląstelės, tokios kaip B limfocitai, dendritinės ląstelės, monocitai ir Langerhano ląstelės.

48. Vaistas pagal bet kurį iš 42-47 punktų, besiskiriantis tuo, kad gp39 antagonistas yra anti-gp39 antikūnas arba tirpus CD40 sulietas baltymas.

49. Vaistas pagal 48 punktą, besiskiriantis tuo, kad antikūnas yra monokloninis antižmogaus gp39 antikūnas.

50. Vaistas pagal 49 punktą, besiskiriantis tuo, kad monokloninis antikūnas yra chimerinis antikūnas arba humanizuotas monokloninis antikūnas.

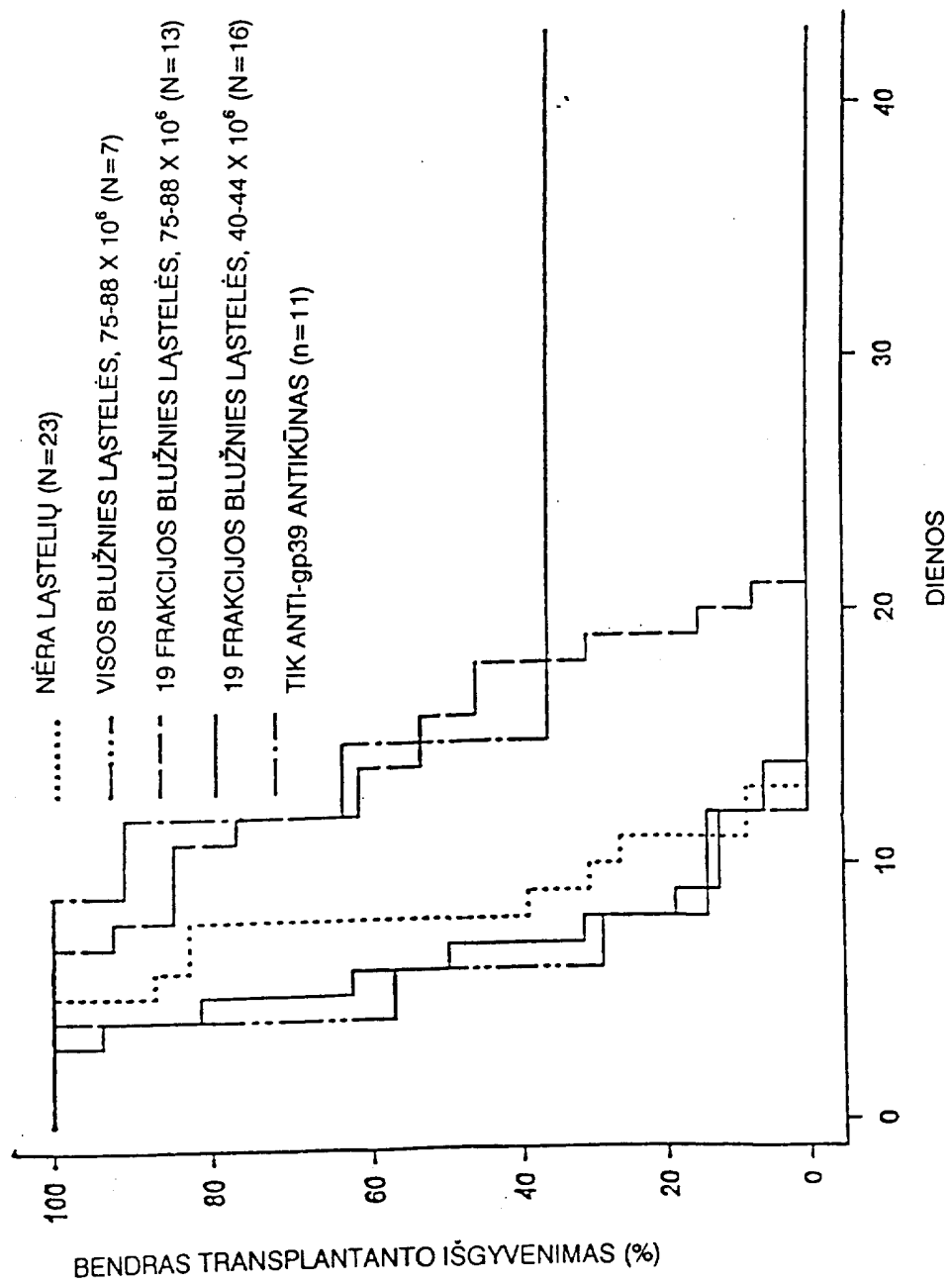
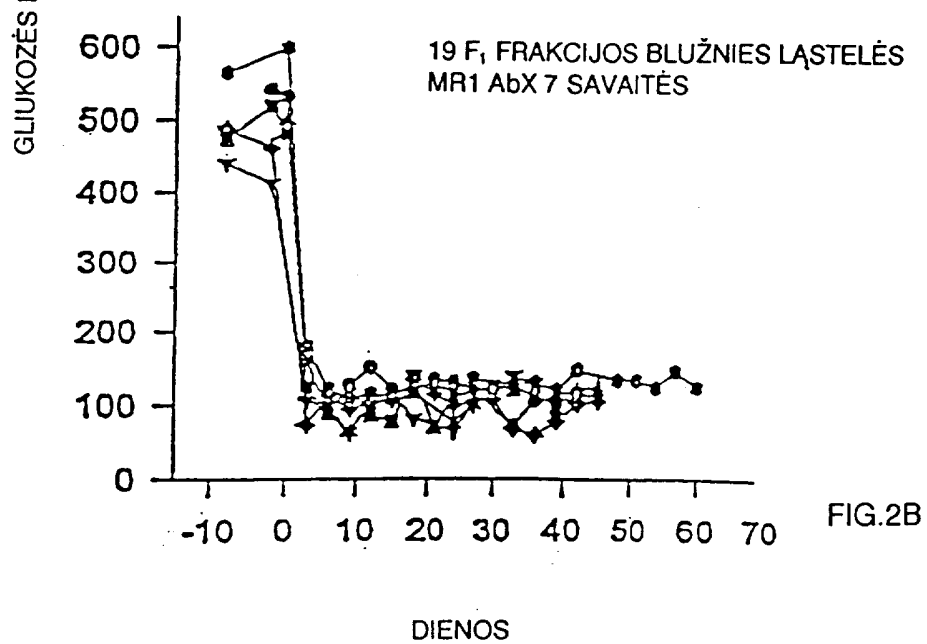
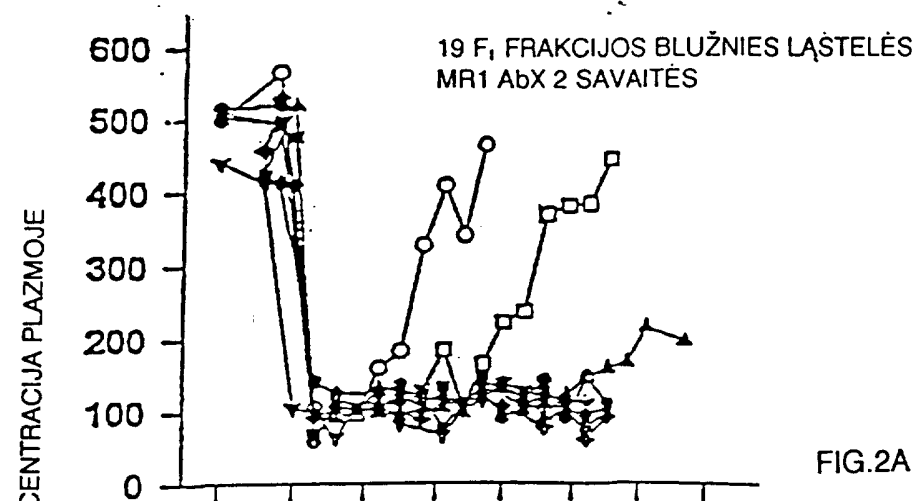


FIG.1



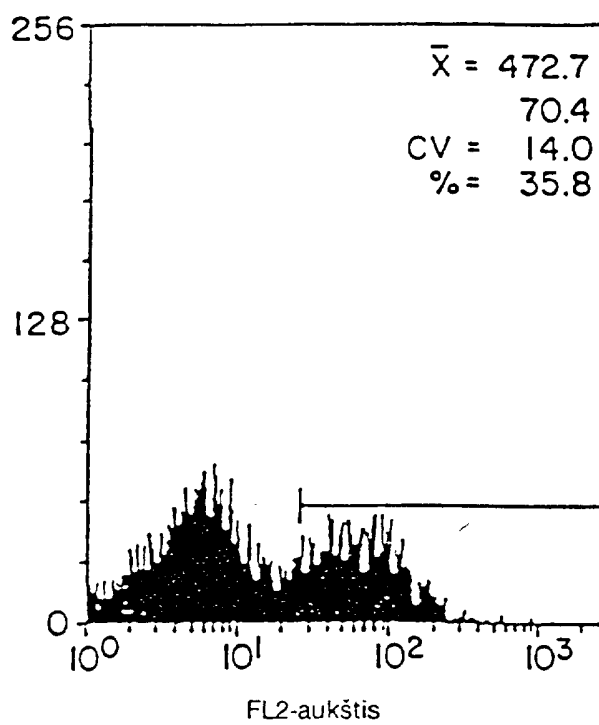


FIG.3A

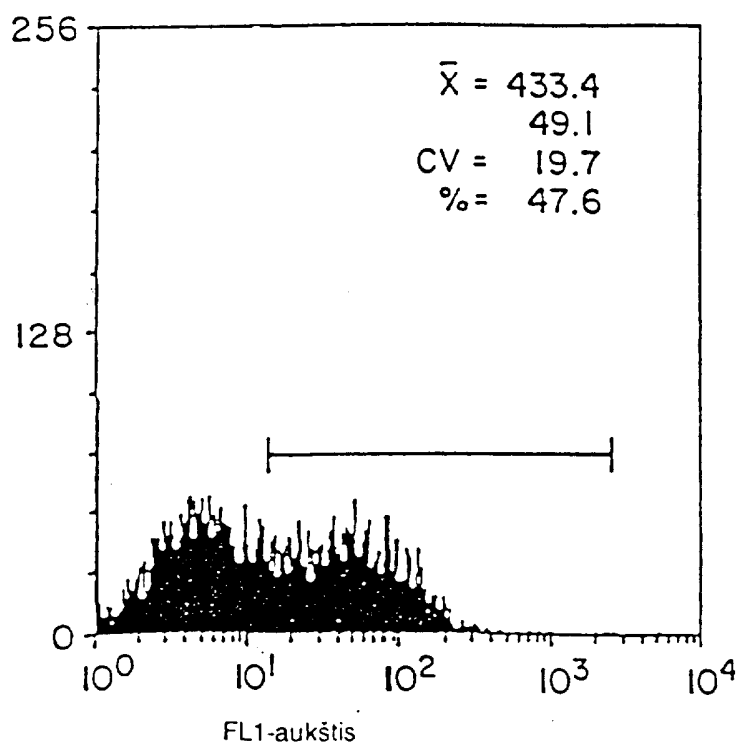


FIG.3B

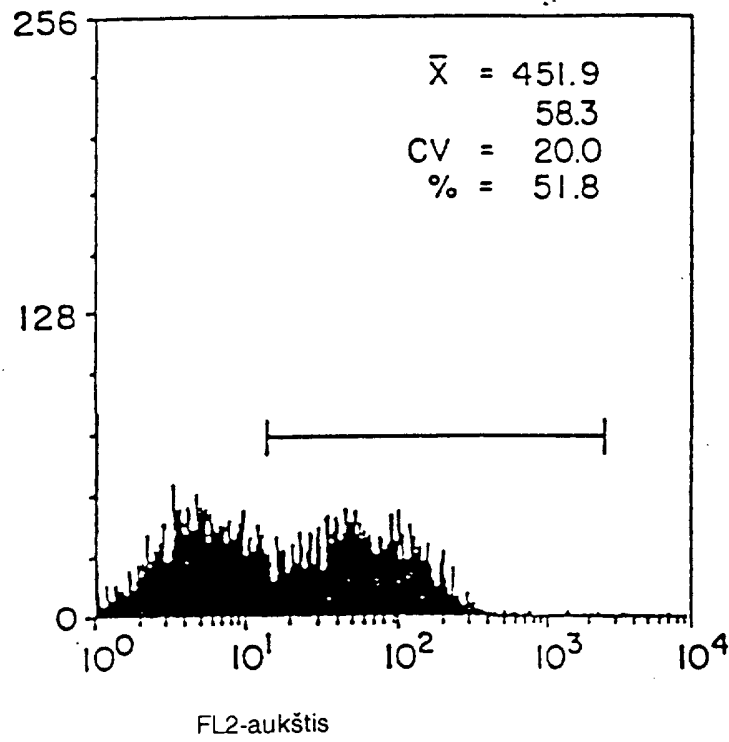


FIG.3C

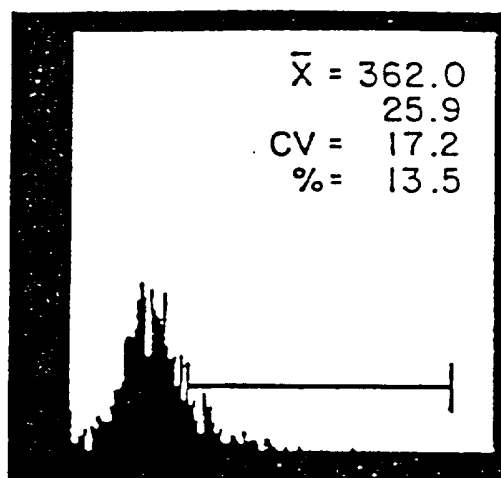


FIG.4A

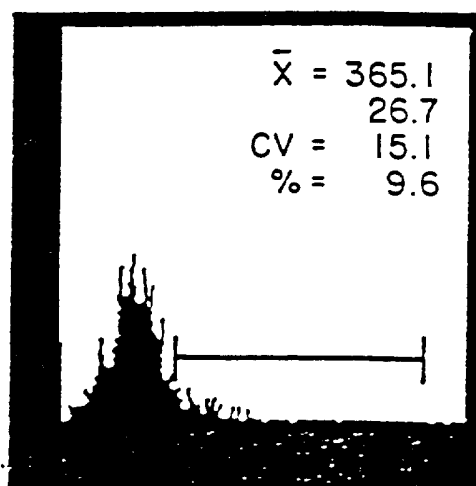


FIG.4B

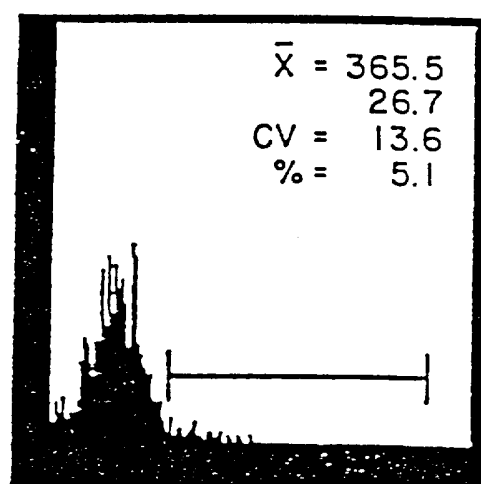


FIG.4C

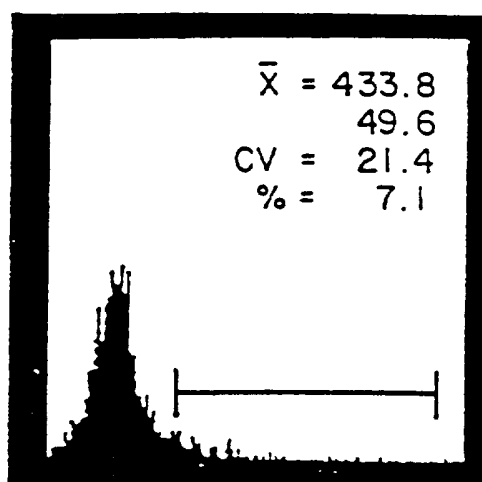


FIG.5A

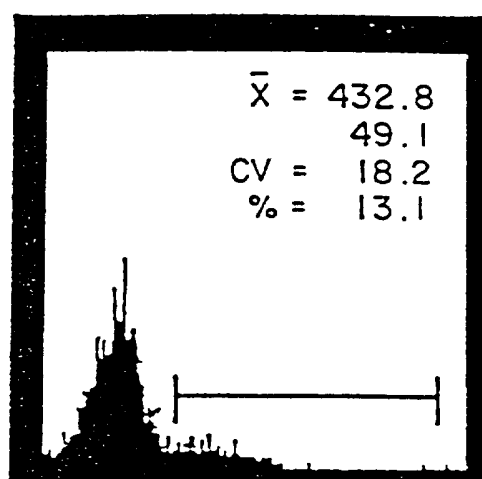


FIG.5B

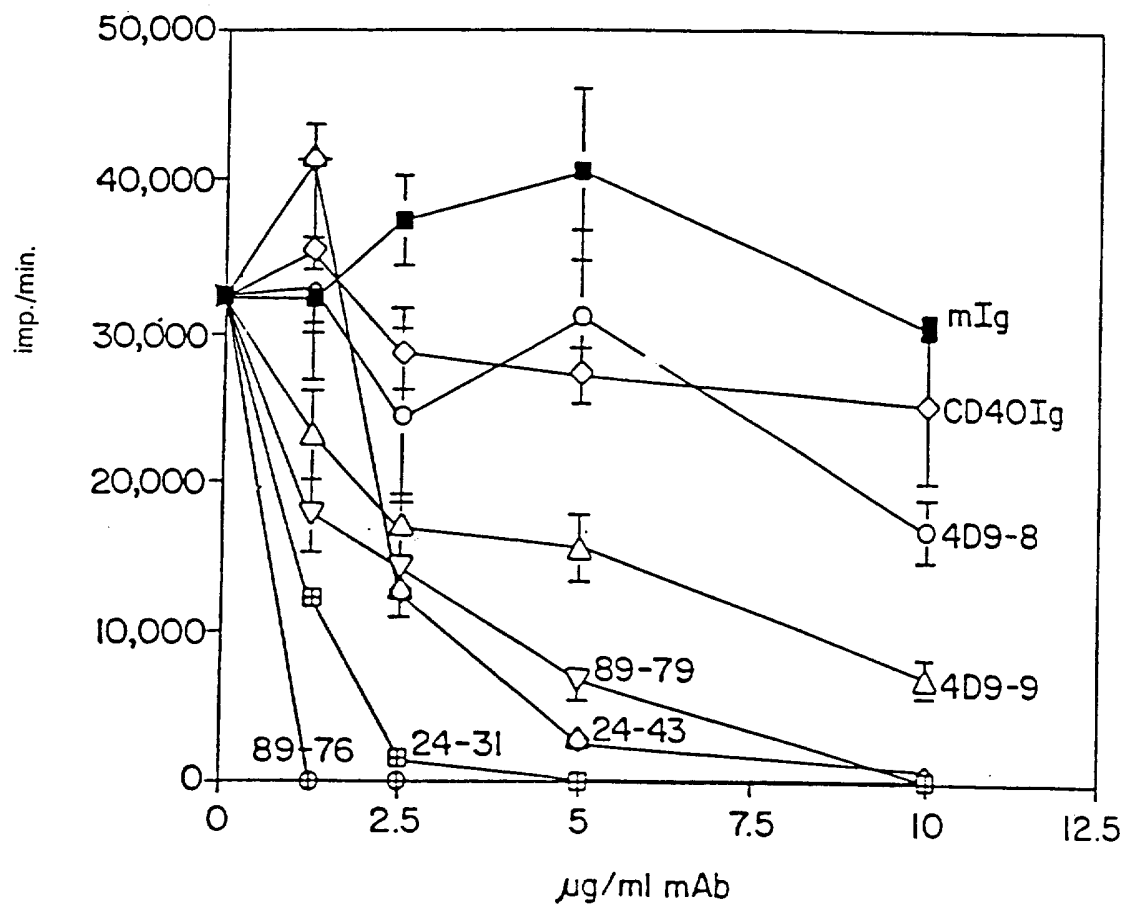


FIG.6

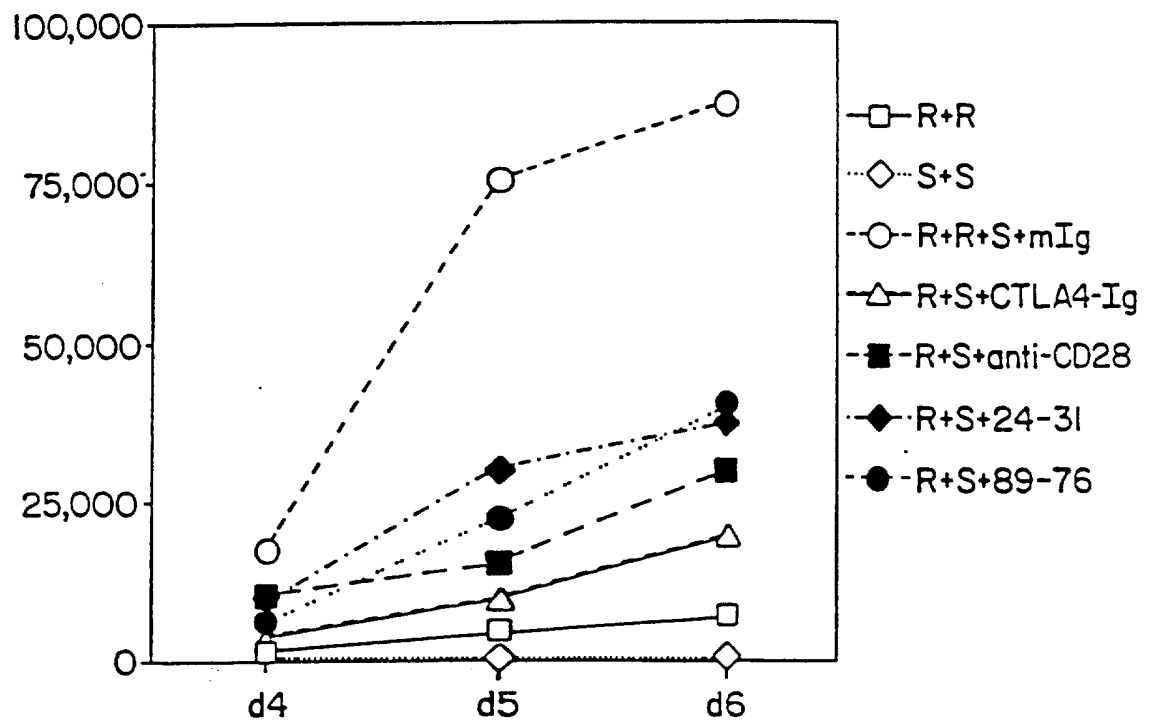


FIG.7