



(10) **LT 4920 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **4920**

(51) Int. Cl. ⁷: **A61K 38/37**
A61K 38/48
A61K 39/395
A61P 7/04

(21) Paraiškos numeris: **2001 045**

(22) Paraiškos padavimo data: **2001 04 20**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2002 01 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2002 06 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US99/21991**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1999 09 21**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2001 04 20**

(30) Prioritetas: **09/158, 178, 1998 09 21, US**

(72) Išradėjas:

Jiahua QIAN, US
Leon W. HOYER, US
Mary COLLINS, US
Gary S. GRAY, US

(73) Patent savininkas:

GENETICS INSTITUTE, INC., 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140, US
AMERICAN RED CROSS, 8111 Gatehouse Road, Falls Church, VA 22042, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB "Metida", Gedimino pr. 45-6, 2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Kompozicijos ir jų panaudojimas imuninio atsako į terapinius baltymus supresiniam moduliavimui

(57) Referatas:

Pateikiamos kompozicijos gydyti hemostazinį sutrikimą naudojant agentus, kurie skatina hemostazę, ir agentus, kurie inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje. Šios kompozicijos leidžia gydyti hemostazinius sutrikimus svetimais terapiniais baltymais slopinant imuninius atsakus į šiuos terapinius baltymus.

Išradimo kilmė

Vienas iš svarbiausių terapinio gydymo, naudojant biologinius baltymus, apribojimų yra imuninis atsakas, kurį organizmas duoda į pašalinių medžiagų atsiradimą organizme. Šis imuninis atsakas yra ypatingai problemiškas, jėigu pašalinės medžiagos turi būti pakartotinai įvedamos, norint gauti jų optimalų efektyvumą.

Vienas iš tokios situacijos pavyzdžių yra pakartotinas įvedimas agentų gydyti hemostazinius susirgimus, tokius kaip VIII faktoriaus trūkumo ligos (pvz. klasikinė A hemofilija ir von Willebrand'o liga) arba IX faktoriaus trūkumas, dar žinomas kaip B hemofilija. Klasikinė hemofilija (A hemofilija) yra su X susijęs sutrikimas, kuris paveikia 1 iš 10000 vyrų. Von Willebrand'o liga yra labiausiai paplitęs paveldimas kraujavimo sutrikimas, atsirandantis 1 iš 800-1000 individų. B hemofilija, dar žinoma kaip Kalėdų liga, atsiranda apytikriai 1 iš 100000 vyrų (*Harrison's Principles of Internal Medicine*. Isselbacher et al., eds. 13th Edition. 1994. McGraw-Hill N.Y., N.Y.).

VIII faktorius yra 265 kD viengrandininis baltymas, kuris cirkuliuoja komplekse su von Willebrand'o faktoriumi (VWF). VIII faktorius yra svarbus reguliacinis baltymas kraujo koaguliacijos kaskadoje. Po aktyvacijos trombinu, jis didina X faktoriaus aktyvacijos aktyvuotu IX faktoriumi (IXa) greitį, galų gale susidarant fibrininiam krešuliui. VWF molekulė yra lipnus glikoproteinas, kuris vaidina centrinį vaidmenį trombocitų agliutinacijoje. Jis vaidina VIII faktoriaus nešiklio plazmoje vaidmenį ir palengvina trombocitų sąveiką su indo sienelėmis. VWF yra sudarytas iš daugelio, tikriausiai vienodų, maždaug 230 kD subvienetų. VWF sintetuoja endotelinės ląstelės ir megakariocitai. IX faktorius yra viengrandininis 55 kD profermentas, kurį XIa faktorius arba audinių faktoriaus-VIIa kompleksas paverčia aktyvia proteaze (IXa). Po to aktyvuotas IX faktorius arba aktyvuotas VIII faktorius aktyvuoja X faktorių.

Pakartotinas svetimų baltymų įvedimas gali sukelti imuninį atsaką į šiuos baltymus recipientų organizme. T ląstelių atsako į svetimus baltymus atveju antigenus pateikiančios ląstelės (APCs) ramybės būsenoje esantiems T limfocitams turi duoti du signalus (Jenkins, M. and Schwartz, R. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 302-319; Mueller, D. L., et al. (1990) *J. Immunol.* 144, 3701-3709). Pirmasis signalas, kuris suteikia specifiškumą imuniniam atsakui, yra perduodamas per T ląstelės receptorių (TCR) po svetimo antigeninio peptido, pateikto didžiojo histosuderinamumo komplekso (MHC) sąlygomis, atpažinimo. Antrasis signalas, vadinamas kostimuliaciniu, indukuoja T ląstelių proliferaciją ir vartimą veikliomis (Lenschow et al. 1996. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233). Kostimuliacija nėra nei specifinė antigenui, nei apribota MHC, ir yra laikoma, kad ją sukelia viena arba daugiau atskirų ląstelės paviršiaus molekulių, kurias ekspresuoja APCs (Jenkins, M.K., et al. 1988 *J. Immunol.* 140, 3324-3330; Linsley, P.C., 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. 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.* 169, 503; Armitage, R. J., et al. 1992 *Nature* 357, 80-82; Liu, Y., et al. 1992 *J. Exp. Med.* 175, 437-445).

CD80 (B7-1) ir CD86 (B7-2) baltymai, ekspresuoti ant APCs, yra lemiamos kostimuliacinės molekulės (Freeman et al. 1991. *J. Exp. Med.* 174:625; Freeman et al. 1989 *J. Immunol.* 143:2714; Azuma et al. 1993 *Nature* 366:76; Freeman et al. 1993. *Science* 262:909).

Pasirodo, kad B7-2 yra svarbesnis pirminio imuninio atsako metu, o B7-1, kuris yra aktyvuojamas vėliau imuninio atsako eigoje, gali būti svarbus tęsiant pirminius T ląstelių atsakus arba kostimuliuojant antrinius T ląstelių atsakus (Bluestone. 1995. *Immunity.* 2:555).

B7-1 ir B7-2 yra priešreceptoriai dviems ant T limfocitų ekspresuotiems ligandams. Vienas ligandas, su kuriuo jungiasi B7-1 ir B7-2 (CD28) yra konstitutyviai ekspresuojamas ant ramybės būsenoje esančių T ląstelių ir po aktyvacijos jo ekspresija padidėja. Po signalo perdavimo per T ląstelės receptorių, CD28 susirišimas ir kostimuliacinio signalo transdukcija sukelia T

ląstelių proliferaciją ir IL-2 išskyrimą (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; June, C. H., et al. 1990 *Immunol. Today.* 11, 211-6; Harding, F.A., et al. 1992 *Nature.* 356, 607-609). Antrasis ligandas, vadinamas CTLA4 (CD152), yra homologiškas CD28, bet jo neekspresuoja ramybės būsenoje esančios T ląstelės ir jis pasirodo po T ląstelių aktyvacijos (Brunet, J.F., et al., *Nature* 328, 267-270). Pasirodo, kad CTLA4 yra lemiamas T ląstelių atsakų negatyviojoje reguliacijoje (Waterhouse et al. 1995. *Science* 270:985). Buvo rasta, kad CTLA4 užblokavimas pašalina inhibicijos signalus, o CTLA4 agregacija pateikia inhibicinius signalus, kurie slopina T ląstelių atsakus (Allison and Krummel. 1995. *Science* 270:932). B7 molekulės turi didesnę afiniškumą CTLA4 nei CD28 (Linsley, P.S., et al., 1991 *J. Exp. Med.* 174, 561-569) ir buvo rasta, kad B7-1 ir B7-2 rišasi su skirtingomis CTLA4 molekulės sritimis, ir jų susirišimo su CTLA4 kinetikos taip pat yra skirtingos (Linsley et al. 1994. *Immunity.* 1:793).

Apie 10-25 procentams hemofiliją turinčių pacientų išsivysto imuninis atsakas į VIII faktorių. Šiuose pacientuose atsiranda inhibitorių, paprastai IgG antikūnų, kurie neutralizuoja VIII faktoriaus aktyvumą ir tokiu būdu stabdo efektyvų gydymą. Buvo nustatyti du inhibitorių tipai. Labai reaguojantys pacientai su I tipo inhibitoriais turi anamnezinį atsaką į VIII faktorių, kuris duoda padidintą antikūnų prieš VIII faktorių titrą. Mažai reaguojantys pacientai su II tipo inhibitoriumi turi mažą antikūnų titrą, kuris nepadidėja įvedant VIII faktorių. Dabartinės strategijos sumažinti šiems pacientams antikūninį atsaką buvo tik dalinai sėkmingos. Be to, antikūnų prieš pakeistus baltymus atsiradimas yra esminė problema, kuri reikalauja sprendimo, jeigu laukiama, kad genų terapija bus sėkminga gydant hemofilijas ir kitas su deficitais susijusias ligas (Cornelly S. et al., *Blood* 88:3846, 1996; Kuna S-H. et al., *Blood* 91:784, 1998).

Išradimo santrauka

Šiame išradime, tarp kitų dalykų, pateikiamos kompozicijos, kurios leidžia vartoti terapinį baltymą sutrikimo gydymui, sumažinant imuninio atsako į šį terapinį baltymą atsiradimą ir/arba progresavimą.

Vienu aspektu, šis išradimas yra susijęs su kompozicijomis, į kurias įeina pirmasis agentas, skatinantis hemostazę, ir antrasis agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje.

Viename įgyvendinimo variante tikslinėje kompozicijoje yra dar ir farmaciškai priimtino nešiklio.

Viename įgyvendinimo variante pirmasis agentas yra VIII faktorius. Kitame įgyvendinimo variante pirmasis agentas yra VIII faktorius su pašalinta B-sritimi. Viename įgyvendinimo variante pirmasis agentas yra IX faktorius. Kitame įgyvendinimo variante pirmasis agentas yra von Willebrand'o faktorius.

Viename įgyvendinimo variante antrasis agentas yra kostimuliacinės molekulės tirpi forma. Tinkamesniame įgyvendinimo variante antrasis agentas yra CTLA4 tirpi forma. Kitame iš tinkamesnių įgyvendinimo variantų antrasis agentas yra tirpi B7-1 forma, tirpi B7-2 forma arba tirpios B7-1 formos ir tirpios B7-2 formos derinys. Dar labiau tinkamame įgyvendinimo variante antrasis agentas yra CTLA4Ig. Kitame labai tinkamame įgyvendinimo variante antrasis agentas yra B7-1Ig arba B7-2Ig. Dar kitame iš tinkamiausių variantų antrasis agentas yra CD40 arba CD-40L tirpi forma.

Kitame įgyvendinimo variante antrasis agentas yra antikūnas, kuris rišasi su kostimuliacine molekule. Tinkamiausiame įgyvendinimo variante antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš anti-B7-1 antikūno, anti-B7-2 antikūno ir anti-B7-1 ir anti-B7-2 antikūnų derinio. Viename įgyvendinimo variante antikūnas yra neaktyvuojanti anti-CD28 antikūno forma.

Išradimas taip pat yra susijęs su greitai paruošiamos kompozicijos panaudojimu subjekto hemostazinio sutrikimą gydymui.

Viename įgyvendinimo variante subjektas turi didelį antikūnų, kurie rišasi su pirmuoju agentu, titrą. Kitame įgyvendinimo variante subjektas neturi didelio antikūnų, kurie rišasi su pirmuoju agentu, titro.

Pagal vieną įgyvendinimo variantą šiuo tikslu skiriama kompozicija, kurioje yra agento, inhibuojančio kostimuliacinį signalą T ląstelėje.

Viename įgyvendinimo variante hemostazinis sutrikimas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš A hemofilijos, B hemofilijos ir von Willebrand'o ligos.

Kitu aspektu šis išradimas yra susijęs su pirmojo agento, kuris skatina hemostazę, ir antrojo agento, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, panaudojimu subjekto hemostazinio sutrikimo gydymui.

Kitu aspektu šis išradimas yra susijęs su pirmojo agento, kuris skatina hemostazę, ir antrojo agento, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, skyrimu subjektui, tokiu būdu gaunant imunotoleranciją pirmajam agentui ir taip gydant hemostazinį sutrikimą.

Viename įgyvendinimo variante pirmasis agentas yra VIII faktorius. Kitame įgyvendinimo variante pirmasis agentas yra VIII faktoriaus su pašalinta B-sritimi variantas. Kitame įgyvendinimo variante pirmasis agentas yra IX faktorius. Kitame įgyvendinimo variante pirmasis agentas yra von Willebrand'o faktorius.

Viename įgyvendinimo variante antrasis agentas yra agento, kuris paduoda kostimuliacinį signalą T ląstelei, tirpi forma. Tinkamesniame įgyvendinimo variante šis agentas yra CTLA4 tirpi forma. Kitame dar tinkamesniame įgyvendinimo variante agentas yra CTLA4lg. Kitame iš tinkamesnių įgyvendinimo variantų šis agentas yra tirpi B7-1 forma, tirpi B7-2 forma arba B7-1 ir B7-2 derinys. Kitame iš tinkamiausių įgyvendinimo variantų šis agentas yra B7-1lg, B7-2lg arba B7-1lg ir B7-2lg derinys.

Viename įgyvendinimo variante antrasis agentas yra antikūnas, kuris rišasi su kostimuliacine molekule. Kitame įgyvendinimo variante antrasis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš anti-B7-1 antikūno, anti-B7-2 antikūno ir anti-B7-1 ir anti-B7-2 antikūnų derinio. Kitame įgyvendinimo variante antikūnas yra neaktyvuojanti anti-CD28 antikūno forma.

Viename įgyvendinimo variante hemostazinis sutrikimas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš A hemofilijos, B hemofilijos ir von Willebrand'o ligos.

Viename įgyvendinimo variante subjektas turi didelį antikūnų, kurie rišasi su pirmuoju agentu, titrą.

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig.1 iliustruoja eksperimento planą, naudotą 1 pavyzdyje pirminio antikūninio atsako į VIII faktorių inhibavimą.

Fig.2 rodo, kad pelės, kurios negavo CTLA4Ig, turi didelius antikūno titrus pradedant jau nuo 20 dienos (G-1), o pelės, kurios gavo CTLA4Ig, neturi antikūnų iki 82 dienos (G-2 ir G-3).

Fig.3 rodo eksperimento planą, naudotą 2 pavyzdyje, kuriame tiriamas antrinio antikūninio atsako į VIII faktorių inhibavimas.

Fig.4 rodo, kad gyvuliukai, kurie negavo CTLA4Ig, turi didelius anti-VIII faktoriaus antikūnų titrus (G-1), o pelės, kurios gavo CTLA4Ig, (G-2), išskyrus 1 pelę, neišvystė antrinio imuninio atsako į VIII faktorių.

Fig.5 rodo mCTLA4-Ig poveikį į anti-VIII faktoriaus antikūnų susidarymą.

Fig.6 rodo pakartotino mCTLA4-Ig įvedimo poveikį į anti-VIII faktoriaus antikūnų susidarymą.

Fig.7 rodo vienalaikio mCTLA4-Ig ir VIII faktoriaus įvedimo poveikį.

Fig.8 rodo mCTLA4-Ig poveikį antriniam imuniniam atsakui į VIII faktorių.

Fig.9 rodo B7-1 ir B7-2 vaidmenį antikūninio atsako prieš VIII faktorių susidaryme.

Fig.10 rodo T ląstelių atsaką į VIII faktorių A/B7-1^{-/-} hemofiliją ir A/B7-2^{-/-} hemofiliją turinčioms pelėms.

Smulkus aprašymas

Šis išradimas atstovauja svarbią pažangą hemostazinių sutrikimų gydyme, pateikdamas kompozicijas, kurios tokiam sutrikimui gydyti leidžia vartoti terapinį baltymą, sumažinant imuninio atsako į šį terapinį baltymą atsiradimą ir/arba progresavimą.

Prieš tolimesnį išradimo aprašymą, čia surinkti kai kurie terminai, naudojami aprašyme, pavyzdžiuose ir pridedamoje apibrėžtyje.

1. Apibrėžimai

Šiame išradime naudojamas posakis "hemostazinis sutrikimas" apima sutrikimus, kurie pasireiškia nenormaliu kraujavimu ir/arba tromboze. Normali hemostazė riboja kraujo praradimą per eilę sąveikų tarp kraujo indų sienelių komponentų, trombocitų ir plazmos baltymų. Hemostaziniai sutrikimai

atsiranda, pavyzdžiui, dėl trombocitų agregacijos sumažėjimo ir/arba negalėjimo susidaryti fibrino krešuliui, kas gali duoti netinkamus atsakus į ligą arba traumą, pvz. nekontroliuojamą kraujavimą. Tokios ligos gali būti nustatytos, pvz. nustatant kraujavimo laiką, dalinį tromboplastino laiką (PTT), protrombino laiką (PT), trombino laiką (TT) arba kiekybiškai nustatant fibrinogeną, naudojant gerai žinomus metodus. Hemostazinių susirgimų pavyzdžiais yra A hemofilija, B hemofilija ir von Willebrand'o liga.

Čia naudojamas posakis "agentas, kuris skatina hemostazę" apima baltymą arba peptidą, kurio trūksta arba kurio neturi subjektas, ir kurį įvedus subjektui, pagerinama būklė arba yra gydomas hemostazinis sutrikimas. Tarp tinkamiausių agentų, kurie skatina hemostazę, yra koaguliacijos faktoriai, tokie kaip VIII faktorius, IX faktorius, VWF ir jų analogai.

Čia naudojamas terminas "B7 šeima" arba "B7 molekulės" apima kostimuliacines molekules, kurios turi aminorūgščių sekos tapatumą su B7 polipeptidais, pvz. su B7-1, B7-2 arba B7-3 (jas atpažįsta BB-1 antikūnas). Be to, B7 molekulių šeima turi bendrą funkciją, pvz. gebėjimą susirišti su B7 šeimos ligandu (pvz., vienu arba keliais iš CD28, CTLA4 arba ICOS) ir gebėjimą kostimuliuoti T ląstelių aktyvavimą.

B7 polipeptidai gali suteikti kostimuliaciją aktyvuotoms T ląstelėms ir tokiu būdu indukuoti T ląstelių proliferaciją ir/arba citokinų sekreciją, arba gali inhibuoti T ląstelių kostimuliaciją, pvz., kai jie yra tirpioje formoje. B7 šeimos nariais yra B7-1, B7-2 ir jų tirpūs fragmentai arba dariniai. Vienaime įgyvendinimo variante B7 šeimos nariai rišasi su CTLA4, CD28, ICOS ir/arba kitais ligandais ant imuninių ląstelių ir gali inhibuoti arba indukuoti imuninių ląstelių kostimuliaciją.

Čia naudojamas posakis "agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje" apima agentus, kurie inhibuoja signalą, generuojamą sąveikaujant kostimuliacinei molekulei ant antigeną pateikiančios ląstelės (APC), pvz. B7 šeimos molekulei, su jos priešreceptoriumi ant T ląstelės. Kostimuliacinės molekulės ant APCs (pvz., B7 šeimos nariai) ir joms giminingi ligandai ant T ląstelių (pvz. CTLA4, CD28 ir ICOS) čia yra bendrai vadinami kostimuliacinėmis molekulėmis. Agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą, gali veikti arba ekstraląsteline būdu, inhibuodamas sąveiką tarp kostimuliacinių molekulių ir tokiu būdu blokuodamas viduląstelių signalų

atsiradimą, arba gali veikti viduląsteliniu būdu, inhibuodamas kostimuliacinius signalus signalo perdavimo kelyje. Agentų pavyzdžiai smulkiai aprašyti toliau, ir jais yra, pavyzdžiui, tirpios kostimuliacinių molekulių formos ir antikūnai, kurie jungiasi prie kostimuliacinių molekulių.

Čia naudojama frazė "imuninio atsako supresinis moduliavimas" apima imuninio atsako sumažinimą (pvz. nuslopinimą, sustabdymą arba inhibavimą) pacientui, kuris neturi egzistuojančio imuninio atsako, arba egzistuojančio imuninio atsako ilgumo ir dydžio sumažinimą. Terminas "imuninis atsakas" apima bet kokio tipo imuninį atsaką, kuris yra inicijuojamas arba priklausomas nuo kostimuliacinių signalų, pvz. ląstelinį arba humoralinį atsaką, kuris gali atsirasti subjektui atsakant į svetimą antigeną. Viena įgyvendinimo variante imuninis atsakas yra antikūninis atsakas į agentą, kuris skatina hemostazę (pvz. VII faktorių, VWF arba IX faktorių). Terminas "imunotoleravimas" apima antigeninės specifinės tolerancijos indukciją, kuri gali būti išmatuojama specialistams žinomais metodais, pvz. matuojant antrinį imuninį atsaką (pvz. ląstelinį arba humoralinį atsaką) į antikūną.

II. Agentai, kurie skatina hemostazę

Viena įgyvendinimo variante agentas, kuris skatina hemostazę, yra VIII faktorius. Čia naudojamas terminas "VIII faktorius" apima baltymus, kurie pasižymi VIII faktoriui būdingu prokoaguliantiniu aktyvumu. Viena šio išradimo įgyvendinimo variante VIII faktoriaus tipo baltymai yra gamtiniai VIII faktoriaus baltymai. Tokie baltymai gali būti išskirti iš kraujo arba gali būti įvedami kaip kraujo produktas arba kaip praturtintas kraujo produktas. Viena įgyvendinimo variante labai išgrynintas VIII faktorius gali būti gaunamas adsorbuojant ir eliuuojant šį faktorių iš kraujo produkto ant monokloninio antikūno kolonėlės. Kitu atveju, tokie gamtiniai baltymai gali būti pagaminami rekombinantiniu būdu naudojant nukleorūgščių molekules, geriausia gamtinių nukleorūgščių molekules. Pavyzdžiui, viena įgyvendinimo variante VIII faktoriaus baltymai yra pagaminami panaudojant VIII faktorių koduojančios nukleorūgšties molekulės ekspresiją ląstelėje pagal specialistams žinomas metodikas taip, kad būtų gaunamas VIII faktoriaus baltymas. Žmogaus VIII faktoriaus nukleotidų seka (ir atitinkama aminorūgščių

seka) yra žinoma. (Žr. pvz., Toole et al. *Nature* 1984, 312:5992; arba GenBank Accession Nos. X01179; K01740).

Kitame įgyvendinimo variante hemostazę skatinantis agentas yra negamtinis VIII faktorius, pvz. VIII faktoriaus mutantas, kuris išlaiko terapinę funkciją, t.y. VIII faktoriaus hemostazę skatinantį aktyvumą. Pavyzdžiui, DNR sekos, galinčios hibridizuotis su žmogaus VIII faktorių koduojančia DNR sąlygomis, kurios leidžia išvengti hibridizacijos su ne-VIII faktoriaus genais (pvz. sąlygomis, kurios yra ekvivalentinės 65 °C temperatūrai 5 x SSC (1 X SSC = 150 mM NaCl/0,15 M Na citratas), arba homologinės DNR sekos, išlaikančios sekų identiškumą nukleorūgšties molekulės dalyse, kurios koduoja VIII faktoriaus funkcijai svarbias baltymo sritis, pagal šį išradimą gali būti naudojamos VIII faktoriui gauti. Kaip pavyzdžiai yra pridedami U.S. Patent 5,744,446; 5,663,060; 5,583,209; 5,661,008; 5,422,260 ir 5,707,832.

Kitame įgyvendinimo variante hemostazę skatinantis agentas yra VIII faktoriaus tipo baltymas, kuriame yra pašalinta bent viena dalis (pvz. neesminė dalis). Pavyzdžiui, viename įgyvendinimo variante VIII faktoriaus baltymas yra modifikuotas VIII faktoriaus baltymas, kuriame yra pašalinta viena arba daugiau aminorūgščių, arba jos yra pakeistos tarp 90 kD ir 69 kD skaldymo vietų, lyginant su gamtiniu VIII faktoriumi; tai smulkiau aprašyta United States Patent 4,868,112, kuris yra pridedamas kaip literatūros šaltinis.

Kitame įgyvendinimo variante hemostazę skatinantis agentas yra VIII faktoriaus analogas, turintis vienos arba daugiau aminorūgščių trūkumą tarp 50/40 skaldymo vietos ir 73 kD skaldymo vietos, kuris gali būti gaunamas pagal būdus, analogiškus aprašytiems United States Patent 4,868,112 (pridedamas kaip literatūros šaltinis). Tinkamiausiame įgyvendinimo variante VIII faktoriaus analogas išlaiko dalį arba visas rūgštines aminorūgščių sritis tarp 80 kD ir 73 kD skaldymo vietų. Kitame įgyvendinimo variante šios srities dalis arba visa sritis yra pakeista atitinkama rūgštine sritimi prie pat 50/40 skaldymo vietos. Dar kituose įgyvendinimo variantuose VIII faktoriaus baltymai yra analogai (turintys arba neturintys aukščiau paminėtų delecijų), tokie kaip aprašyti International Application PCT/US87/01299 (ji pridedama kaip literatūros šaltinis), pvz. kuriuose viena arba daugiau skaldymo vietų, apimančių arginino liekanas 226, 336, 562, 740, 776, 1313, 1648 arba 1721 padėtyse, buvo padarytos atsparios proteolitiniam skaldymui, pvz. pakeičiant

vieną arba daugiau aminorūgščių kitomis aminorūgštimis, panaudojant kDNR mutagenezę, vykdomą žinomais būdais, pvz. standartine kryptinga mutageneze.

Agentai, kurie skatina hemostazę, taip pat apima hibridinius VIII faktoriaus baltymus, kurie susideda iš dalies žmogaus VIII faktoriaus ir dalies nežmogaus VIII faktoriaus iš kitos rūšies (pvz., kiaulės VIII faktoriaus). Tokie hibridiniai baltymai gali būti pagaminti naudojant žinomas metodikas, pvz. parodytas U.S. Patent 5,744,446; 5,663,060 ir 5,583,209.

U.S. Patent 5,693,499; 5,681,746; 5,663,060; 5,583,209; 5,563,045; 5,460,951 ir 5,455,031 taip pat yra pridedami kaip literatūros šaltiniai.

Kitame įgyvendinimo variante agentas, kuris skatina hemostazę, yra IX faktorius. Čia naudojamas terminas "IX faktorius" apima, bet neapsiriboja, išskirtą iš plazmos, transformuotų ląstelių linijos IX faktorių ir rekombinantiniu būdu gautą IX faktorių, išskirtą iš šeimininko ląstelių auginimo terpės. IX faktorius gali būti išskirtas iš kraujo arba gali būti įvedamas kaip kraujo produktas arba kaip praturtintas kraujo produktas. Viena įgyvendinimo variante labai išgrynintas IX faktorius gali būti gaunamas adsorbuojant ir eliuuojant šį faktorių iš kraujo produkto ant monokloninio antikūno kolonėlės. Išskyrimo būdų pavyzdžiai taip pat aprašyti U.S. Patent 5,639,857; 5,457,181 ir 5,286,849. Kitu atveju, tokie gamtiniai baltymai gali būti pagaminami rekombinantiniu būdu, naudojant nukleorūgščių molekules, geriausia gamtinių nukleorūgščių molekules. Pavyzdžiui, viename įgyvendinimo variante IX faktoriaus baltymai yra pagaminami panaudojant IX faktorių koduojančios nukleorūgšties molekulės ekspresiją ląstelėje pagal specialistams žinomas metodikas taip, kad būtų gaunamas IX faktoriaus baltymas. Genetinių konstrukto IX faktoriui ekspresuoti pavyzdžiai gali būti rasti U.S. Patents 5,650,503 ir 4,994,371.

IX faktoriaus nukleotidų seka yra žinoma. (Žr. pvz., Yoshitake et al. 1985. *Biochemistry* 24:3726 arba GenBank Accession Nos. K022402; A07407; A01819 arba X54500).

Kituose įgyvendinimo variantuose IX faktorius apima, pavyzdžiui, United States Patents 4,994,371; 5,171,569; 5,679,639; 5,621,039 ir 5,714,583 (jų aprašymai yra pridedami kaip literatūros šaltiniai) aprašytus baltymus.

Apart gamtinių IX faktoriaus formų, terminas "IX faktorius" taip pat apima negamtines formas, pvz. IX faktoriaus mutantus, kurie išlaiko terapinę funkciją, t.y. IX faktoriaus hemostazę skatinančias savybes. Pavyzdžiui, DNR sekos, galinčios hibridizuotis su žmogaus IX faktorių koduojančia DNR sąlygomis, kurios leidžia išvengti hibridizacijos su ne-IX faktoriaus genais (pvz. sąlygomis, kurios yra ekvivalentinės 65 °C temperatūrai 5 x SSC (1 X SSC = 150 mM NaCl/0,15 M Na citratas), arba DNR sekos, išlaikančios sekų identiškumą nukleorūgšties molekulės dalyse, kurios koduoja IX faktoriaus funkcijai svarbias baltymo sritis, pagal šį išradimą gali būti naudojamos IX faktoriui gauti.

VIII faktoriaus arba IX faktoriaus baltymai taip pat gali būti gaunami iš prekybininkų. Pavyzdžiui, galima gauti koncentruotas VIII faktoriaus formas, pvz. Immunate® (Immuno, Beriate® (Behring); galima gauti VIII faktoriaus monokloninio antikūno išgrynintas formas, pvz. Oktanativ-M® (Pharmacia), Hemofil M® (Baxter) ir Monoclote-P® (Armour); taip pat galima gauti rekombinantines VIII faktoriaus formas, pvz. Recombinate® (Baxter) ir Kogenate® (Bayer). Taip pat yra prieinama VIII faktoriaus rekombinantinė forma su pašalinta B-dalimi – r-VIII SQ® (Pharmacia ir Upjohn, Stockholm). IX faktorius gali būti įsigijamas, pvz., kaip Nanotiv® (Kabi Pharmacia) arba Immunine® (Immuno); taip pat galima gauti išgrynintą IX faktoriaus monokloninį antikūną kaip Mononine® (Armour). Taip pat galima gauti rekombinantinį IX faktorių, pvz. kaip BeneFIX® (Genetics Institute).

VWF yra didelis multimerinis plazmos baltymas, sudarytas iš atskirų subvienetų. VWF subvienetai yra sujungti vienas su kitu disulfidiniais ryšiais. Plazmoje VWF cirkuliuoja kaip multimerai – nuo dimerų iki daugiau nei iš 50 subvienetų susidedančių multimerų. Dimerai susideda iš dviejų subvienetų, sujungtų tikriausiai C-galuose lanksčiomis strypelio pavidalo dalimis, ir yra laikomi multimerizacijos promotoriais. Šie promotoriai yra sujungti didelėmis, tikriausiai N-galinėmis globulinėmis dalimis, susidarant multimerams. Pasirodo, kad VWF yra pagaminamas kaip 260 kD glikozilintas pirmtakas, kuris po to apdirbamas ir sulfatuojamas. Po dimerizacijos, multimerizacijos ir proteolitinio skaldymo, subrendęs baltymas yra maždaug 225 kD. VWF buvo gautas rekombinantiniu būdu. VWF nukleotidų ir aminorūgščių sekos yra žinomos. (Žr. pvz., Sadler et al. 1986. *Cold Spring Harbor Symposium in*

Quantitative Biology 51:515 arba GenBank Accession Nos. L15333 arba K033028). EP 0197592 B1 aprašymas yra pridedamas kaip literatūros šaltinis).

Apart gamtinių VWF faktoriaus formų, terminas "VWF faktorius" taip pat apima negamtines formas, pvz. VEF faktoriaus mutantus, kurie išlaiko terapines savybes, t.y. VWF faktoriaus hemostazę skatinančias savybes. Pavyzdžiui, DNR sekos, galinčios hibridizuotis su žmogaus VWF faktorių koduojančia DNR sąlygomis, kurios leidžia išvengti hibridizacijos su ne-VWF faktoriaus genais (pvz. sąlygomis, kurios yra ekvivalentinės 65 °C temperatūrai 5 x SSC (1 X SSC = 150 mM NaCl/0,15 M Na citratas), arba DNR sekos, išlaikančios sekų identiškumą nukleorūgšties molekulės dalyse, kurios koduoja VWF faktoriaus funkcijai svarbias baltymo sritis, pagal šį išradimą gali būti naudojamos VWF faktoriui gauti.

Viename įgyvendinimo variante agentai, kurie skatina hemostazę, yra žinduolių kilmės. Tinkamesniame įgyvendinimo variante agentai, kurie skatina hemostazę, yra kilę iš kiaulių. Dar kitame tinkamiausiame įgyvendinimo variante agentai, kurie skatina hemostazę, yra žmogiškos kilmės. Dar kitame įgyvendinimo variante agentai, kurie skatina hemostazę, yra hibridinės molekulės.

III. Imunomoduliaciniai agentai

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra gamtinė kostimuliacinės molekulės forma. Gamtinės kostimuliacinių molekulių formos gali būti išskirtos iš ląstelių arba gali būti gautos rekombinantiniu metodu naudojant žinomas metodikas. Pavyzdžiui, kostimuliaciniai baltymai gali būti pagaminti panaudojant kostimuliacinę molekulę koduojančios nukleorūgšties molekulės ekspresiją ląstelėje taip, kad pasigamintų kostimuliacinė molekulė. Kostimuliacinių molekulių nukleotidų sekos yra žinomos ir gali būti rastos literatūroje arba duomenų bazėse, kaip antai GenBank. Žr., pavyzdžiui, B7-2 (Freeman et al. 1993 *Science*, 262:909 arba GenBank Accession Nos. P42081 arba A48754); B7-1 (Freeman et al. *J. Exp. Med.* 1991, 174:625 arba GenBank Accession Nos. P33681 arba A45803); CTLA 4 (žr. pvz., Ginsberg et al. 1985. *Science*, 228:1401; arba

GenBank Accession Nos. P16410 arba 291929); ir CD28 (Aruffo and Seed. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:8573 arba GenBank Accession No. 180091); ICOS (Hutloff et al. 1999, *Nature*, 397:263; WO 98/38216) ir giminingas sekas.

Apart gamtinių kostimuliacinių molekulių formų, terminas "kostimuliacinės molekulės" taip pat apima negamtines formas, pvz. kostimuliacinių molekulių mutantus, kurie išlaiko kostimuliacinės molekulės funkciją, t.y. galimybę prisijungti prie giminingo priešreceptoriaus. Pavyzdžiui, DNR sekos, galinčios hibridizuotis su B7 molekulę, CTLA4 molekulę, CD28 arba ICOS molekulę koduojančia DNR sąlygomis, kurios leidžia išvengti hibridizacijos su ne-kostimuliacinės molekulės genais (pvz. sąlygomis, kurios yra ekvivalentinės 65 °C temperatūrai 5 x SSC (1 X SSC = 150 mM NaCl/0,15 M Na citratas) pagal šį išradimą yra kostimuliacinės molekulės. Kitu atveju, DNR sekos, kurios išlaiko sekų identiškumą nukleorūgšties molekulės srityse, kurios koduoja kostimuliacinės molekulės funkcijai, pvz. susijungimui su kitomis kostimuliacinėmis molekulėmis, svarbias baltymo sritis, taip pat gali būti naudojamos kaip agentai, kurie inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje. Geriau, kai negamtinės kostimuliacinės molekulės turi didelį (pvz. didesnę nei 70 %, geriau - didesnę nei 80 %, o dar geriau – didesnę nei 90-95 %) aminorūgščių identiškumą su gamtine kostimuliacinės molekulės ekstraląstelinės dalies aminorūgščių seka.

Norint nustatyti kostimuliacinės molekulės aminorūgščių sekas, kurios gali būti svarbios rišantis kostimuliacinei molekulei su jos priešreceptoriumi, gali būti gretinamos įvairių rūšių, pvz. pelės ir žmogaus kostimuliacinių molekulių ekstraląstelinės dalis apimančios aminorūgščių sekos ir pažymimos išlaikytos (pvz. identiškos) liekanos. Tai gali būti atliekama, pavyzdžiui, naudojant standartines sugretinimo programas, kaip antai MegAlign (DNA STAR). Tikėtina, kad tokios išlaikytos arba identiškos liekanos yra būtinos tinkamam kostimuliacinės molekulės surišimui su jos receptoriais ir tokiu būdu jos neturėtų būti keičiamos.

Taip pat buvo nustatytos specifinės kostimuliacinių molekulių liekanos, kurios yra svarbios ryšio sudaryme. Pavyzdžiui, CD28 sritis, kuri yra ypatingai svarbi sąveikaujant su B7-1 ir B7-2, buvo nustatyta, panaudojus kryptingą mutagenezę, CD28 monokloninio antikūno epitopų žemėlapiu sudarymą, receptoriumi paremtus adhezijos testus ir tiesioginį Ig-sulietų baltymų

prisijungimą prie paviršiaus receptorių. Buvo nustatyta, kad CD28 daug prolinio turinčios sekos intarpas – MYPPPY – yra labai svarbus šio baltymo funkcijai (Trunch et al. 1996, *Mol. Immunol.* 33:321). Panašiu būdu, panaudojant mutaciją, buvo nustatytos B7-1 molekulės sritys, kurios yra svarbios funkcinėje sąveikoje su CD28 ir CTLA4. Buvo rasta, kad labai svarbios yra dvi hidrofobinės liekanos, įskaitant Y87 liekaną, V-pavidalo B7-1 dalyje, kurios išsilaiko visose B7-1 ir B7-2 molekulėse, klonuotose iš įvairių rūšių (Fargeas et al. 1995, *J. Exp. Med.* 182:667). Naudojant šias arba panašias metodikas, gali būti nustatytos kostimuliacinių molekulių ekstraląstelinių dalių aminorūgščių sekos, kurios yra labai svarbios, ir todėl jos neturi būti keičiamos.

Kostimuliacinės molekulės gali būti ekspresuojamos tirpioje formoje arba naudojamos kaip imunogenai antikūnams gauti. Tokios tirpios kostimuliacinės molekulės arba antikūnai yra tinkami kaip agentai, kurie inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, kaip smulkiai aprašyta toliau.

A. Agentai, kurie ekstraląsteliu būdu inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje.

1. Tirpios kostimuliacinių molekulių formos

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra T ląstelės kostimuliacinės molekulės (pvz. CTLA4, CD28 ir/arba ICOS) tirpi forma, kuri gali blokuoti kostimuliacinio signalo perdavimą T ląstelėje.

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra CTLA4 tirpi forma. DNR sekos, koduojančios žmogaus ir pelės CTLA4 baltymą, yra žinomos; žr. pvz., Dariavich, et al. (1988) *Eur. J. Immunol.* 18(12), 1901-1905; Brunet, J.F., et al. (1987) *supra*; Brunet, J.F. et al. (1988) *Immunol. Rev.* 103:21-36; ir Freeman, G.J. et al. (1992) *J. Immunol.* 149, 3795-3801. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose tirpus CTLA4 baltymas apima visą CTLA4 baltymą. Tinkamesniame įgyvendinimo variante tirpus CTLA4 baltymas apima CTLA4 baltymo ekstraląstelinę dalį. Pavyzdžiui, tirpi CTLA4 ekstraląstelinės dalies rekombinantinė forma buvo ekspresuota mielėse (Gerstmayer et al. 1997. *FEBS Lett.* 407:63). Kituose įgyvendinimo

variantuose tirpūs CTLA4 baltymai apima mažiausiai dalį CTLA4 baltymo ekstraląstelinės dalies, kuri išlaiko sugebėjimą susiristi su B7-1 ir/arba B7-2.

Viename įgyvendinimo variante tirpus CTLA4 baltymas arba jo dalis yra sulietas baltymas, apimantis mažiausiai dalį CTLA4, kuri rišasi su B7-1 ir/arba B7-2, ir mažiausiai dalį antrojo ne-CTLA4 baltymo. Tinkamesniame įgyvendinimo variante CTLA4 sulietas baltymas apima CTLA4 ekstraląstelinę dalį, kuri yra sulietama amino-gale su signaliniu peptidu, pvz. iš onkostatino M (žr. pvz., WO93/00431).

Ypatingai tinkamame įgyvendinimo variante tirpi CTLA4 forma yra sulietas baltymas, apimantis CTLA4 ekstraląstelinę dalį sulietą su dalimi imunoglobulino molekulės. Toks sulietas baltymas – CTLA4Ig – gali būti pagamintas naudojant žinomus būdus (žr. pvz., Linsley 1994. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 2:221; Linsley WO 93/00431 ir U.S. Patent 5,770,197).

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra antigeną pateikiančios ląstelės kostimuliacinės molekulės (pvz. B7 šeimos molekulės, tokios kaip B7-1, B7-2 ir/arba ICOS ligando) tirpi forma. Pavyzdžiui, viename įgyvendinimo variante tirpi kostimuliacinės molekulės forma apima B7-1 tirpią formą arba B7-2 tirpią formą, arba B7-1 tirpios formos ir B7-2 tirpios formos derinį. B7 baltymus koduojančios DNR sekos taip pat yra žinomos; žr. pvz., B7-2 (Freeman et al. 1993, *Science*, 262:909 arba GenBank Accession Nos P42081 arba A48754); B7-1 (Freeman et al. *J. Exp. Med.* 1991. 174:625 arba GenBank Accession Nos P33681 arba A45803). Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose tirpus B7 baltymas apima visą B7 baltymą. Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose tirpus B7 baltymas apima B7 baltymo ekstraląstelinę dalį. Pavyzdžiui, tirpi CTLA4 ekstraląstelinės dalies rekombinantinė forma buvo ekspresuota mielėse (Gerstmayer et al. 1997. *FEBS Lett.* 407:63). Kituose įgyvendinimo variantuose tirpus B7 baltymas apima bent dalį B7 baltymo ekstraląstelinės dalies, kuri išlaiko sugebėjimą susiristi su CTLA4 ir/arba CD28.

Viename įgyvendinimo variante tirpus B7 baltymas arba jo dalis yra sulietas baltymas, apimantis bent dalį B7, kuri rišasi su CD28 ir/arba CTLA4, ir bent dalį antrojo ne-B7 baltymo. Tinkamesniame įgyvendinimo variante B7

sulietas baltymas apima B7 ekstraląstelinę dalį, kuri yra sulietta amino-gale su signaliniu peptidu, pvz. iš onkostatino M (žr. pvz., WO93/00431).

Ypatingai tinkamame įgyvendinimo variante tirpi B7 forma yra sulietas baltymas, apimantis B7 ekstraląstelinę dalį sulietą su dalimi imunoglobulino molekulės. Toks sulietas baltymas – B7Ig – gali būti pagamintas naudojant žinomus būdus (žr. pvz., Linsley 1994. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 2:221; Linsley WO 93/00431 ir U.S. Patent 5,770,197 bei U.S. Patent 5,580,756).

2. Antikūnai, kurie rišasi su kostimuliacinėmis molekulėmis

Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra antikūnas, kuris rišasi su kostimuliacine molekule. Gaminant antikūnus, kurie rišasi su kostimuliacinėmis molekulėmis, kostimuliacinis baltymas, kostimuliacinio baltymo dalis (pvz. peptidas-kostimuliacinio baltymo darinys) arba sulietas baltymas, kuriame yra kostimuliacinės molekulės visa amino rūgščių seka arba jos dalis, gali būti naudojami anti-baltymo ir/arba anti-peptido polikloniniams antiserumams arba monokloniniams antikūnams generuoti, naudojant standartinius metodus. Laikoma, kad čia naudojamas terminas "antikūnas" apima ištikus antikūnus arba jų fragmentus. Antikūnų fragmentai (pvz. Fab' fragmentai, F(ab')₂ fragmentai arba viengrandiniai antikūnai) gali būti pagaminti naudojant gerai žinomus metodus. Terminas "antikūnas" taip pat apima chimerinius ir humanizuotus antikūnus.

Pavyzdžiui, žinduolis (pvz. pelė, žiurkėnas arba triušis) gali būti imunizuoti kostimuliacinio baltymo arba peptido imunogenine forma, kuri sukelia antikūninį atsaką žinduolyje. Imunogenu gali būti, pavyzdžiui, rekombinantinio kostimuliacinio baltymo molekulė arba jos fragmentas, sintetinio peptido fragmentas arba ląstelė, kuri ant savo paviršiaus ekspresuoja kostimuliacinę molekulę. Ši ląstelė gali būti, pavyzdžiui, antigeną pateikianti ląstelė arba T ląstelė, arba ląstelė, transfekuota nukleorūgštimi, koduojančia kostimuliacinę molekulę taip, kad ši kostimuliacinė molekulė yra ekspresuojama ant ląstelės paviršiaus. Šeimininko ląstelėmis, transfekuotomis peptidams ekspresuoti, gali būti bet kokios prokariotinės arba eukariotinės ląstelės. Pavyzdžiui, kostimuliacinės molekulės aktyvumą turintis

peptidas gali būti ekspresuojamas bakterijų ląstelėse, tokiose kaip *E. coli*, vabzdžių ląstelėse (bakuloviruso), mielių arba žinduolių ląstelėse, tokiose kaip kuniškio žiurkėno kiaušidžių ląstelėse (CHO) ir NS0 ląstelėse. Kitos tinkamos šeimininko ląstelės ir ekspresijos vektoriai gali būti rasti Goeddel (1990) *supra* arba yra žinomi specialistams. Vektorių ekspresijai mielėse *S. cerevisiae* pavyzdžiais yra pYepSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123) ir pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Bakulovirusiniais vektoriais, kurie yra tinkami baltymų ekspresijai kultivuojamose vabzdžių ląstelėse (SF 9 ląstelėse), yra pAc serijos (Smith et al., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) ir pVL serijos (Lucklow, V.A., and Summers, M.D., (1989) *Virology* 170:31-39). Bendrai imant, COS ląstelės (Gluzman, Y., (1981) *Cell* 23:175-182) buvo naudojamos kartu su tokiais vektoriais kaip pCDM8 (Seed, B., (1987) *Nature* 329:840) pereinamai amplifikacijai/ekspresijai žinduolių ląstelėse, o CHO (dešifruojama Chinese Hamster Ovary) ląstelės buvo naudojamos kartu su vektoriais, tokiais kaip pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:187-195) stabiliai amplifikacijai/ekspresijai žinduolių ląstelėse. Tinkamiausia ląstelių linija rekombinantiniam baltymui gauti yra NS0 mielomos ląstelių linija, kurią galima gauti iš ECACC (katalogo Nr.85110603); ji aprašyta Galfre, G. and Milstein, C. ((1981) *Methods in Enzymology* 73(13):3-46; ir *Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures*, Academic Press, N.Y., N.Y.). Vektoriaus DNR gali būti įvesta į žinduolių ląsteles pagal įprastas metodikas, tokias kaip konusodinimas su kalcio fosfatu arba kalcio chloridu, DEAE-dekstrano tarpininkaujama transfekcija, lipofektinas arba elektroporacija. Šeimininko ląstelėms transformuoti tinkančius metodus galima rasti Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989) ir kituose laboratorijos vadovėliuose. Naudojant žinduolių ląstelės, ekspresijos vektoriaus kontrolinės funkcijos dažnai yra perduodamos panaudojant virusinę medžiagą. Pavyzdžiui, paprastai naudojami promotoriai yra išvesti iš poliomos, adenoviruso 2, citomegaloviruso ir dažniausiai iš Simian'o viruso 40.

Žinduolių ląstelėse ekspresuoti peptidai, turintys kostimuliacinės molekulės aktyvumą, gali būti išskirti pagal žinomas standartines metodikas,

įskaitant nusodinimą amonio sulfatu, frakcionavimą kolonėlių chromatografijos metodu (pvz. jonų mainų, gel-filtraciją, elektroforezę, giminingumo chromatografiją ir t.t.) ir pagaliau, kristalizaciją (žr. daugiausia "Enzyme Purification and Related Techniques", *Methods in Enzymology*, 22:233-577 (1971)).

Specialistai turėtų suprasti, kad antikūnų prieš žmogaus kostimuliacines molekules generavimas pagal standartines metodikas yra jų įgudimo reikalas. Antikūnais gali būti arba polikloniniai arba monokloniniai antikūnai, arba tokių antikūnų antigeną rišantys fragmentai. Terapiniam panaudojimui ypatingai svarbūs yra antikūnai, kurie inhibuoja kostimuliacinės molekulės susirišimą su jos gamtiniu ligandu(ais) ant imuninių ląstelių paviršiaus, tokiu būdu inhibuojant imuninės ląstelės kostimuliaciją. Tinkamiausi antikūnai prieš kostimuliacinę molekulę yra tie, kurie gali inhibuoti arba slopinti pagal atvirkštinį ryšį T ląstelių tarpininkaujamus imuninius atsakus, surišant B7-2 arba B7-1 ant B limfocitų paviršiaus ir užkertant kelią sąveikai su CTLA4 ir/arba CD28. Kiti tinkamiausi antikūnai prieš kostimuliacinę molekulę yra tie, kurie derinyje su antruoju antikūnu, kuris rišasi su kita kostimuliacine molekule, duoda padidintą T ląstelės kostimuliacijos inhibiciją, lyginant su vienu pirmuoju antikūnu, pvz. anti-B7-1 ir anti-B7-2 antikūnų derinys.

A. Imunogenas

Terminas "imunogenas" čia yra naudojamas aprašyti kompozicijai, į kurią kaip veiklusis ingredientas įeina kostimuliacinės molekulės aktyvumą turintis peptidas, naudojamai antikūnams prieš kostimuliacinę molekulę gauti. Kai antikūnams indukuoti yra naudojamas kostimuliacinės molekulės aktyvumą turintis peptidas, reikia suprasti, kad šis peptidas gali būti naudojamas vienas, prijungtas prie nešiklio kaip konjugatas arba kaip peptidinis polimeras.

Norint generuoti tinkamus antikūnus prieš kostimuliacines molekules, imunogene turi būti efektyvus imunogeninis kiekis peptido, turinčio kostimuliacinės molekulės aktyvumą, paprastai kaip prie nešiklio prijungto konjugato. Efektyvus kiekis peptido dozės vienetu priklauso, tarp kitų dalykų, nuo inokuliuojamo gyvūno rūšies, šio gyvūno kūno masės ir pasirinkto

imunizavimo režimo, kas yra gerai žinoma specialistams. Imunogeniniame preparate paprastai turi būti nuo maždaug 10 mikrogramų iki maždaug 500 miligramų, geriau nuo maždaug 50 mikrogramų iki maždaug 50 miligramų peptido vienoje imunizavimo dozėje. Imunizavimo preparate taip pat gali būti adjuvanto, kaip skiediklio dalis. Adjuvantai, tokie kaip pilnas Freund'o adjuvantas (CFA), nepilnas Freund'o adjuvantas (IFA) ir alūnas, yra specialistams gerai žinomos medžiagos ir jas galima nusipirkti iš keleto šaltinių.

Specialistai turėtų suprasti, kad vietoj gamtinių kostimuliacinių molekulių formų panaudojimo imunizavimui, kitu atveju gali būti naudojami sintetiniai peptidai, prieš kuriuos yra sukeliama tinkama naudoti šiame išradime antikūnai. Ir tirpių, ir prie membranų prijungtų kostimuliacinių molekulių arba peptidų fragmentai taip pat yra tinkami naudoti imunogenais, ir taip pat gali būti išskirti panaudojant imunoafininį gryninimą. Išgryninta kostimuliacinės molekulės baltymo forma, tokia kaip išskirta pagal aukščiau duotą aprašymą, arba žinoma forma gali būti naudojama tiesiogiai kaip imunogenas arba, kitu atveju, gali būti prijungta prie tinkamo baltymo-nešiklio pagal žinomas metodikas, įskaitant cheminio kopuliavimo priemones, bei genų inžinerijos būdu, naudojant kostimuliacinės molekulės klonuotą geną.

Peptidas arba baltymas, pasirinktas imunizacijai, gali būti modifikuojami taip, kad padidėtų jų imunogeniškumas. Pavyzdžiui, į imunogeniškumo suteikimo peptidui metodikas įeina prijungimas prie nešiklių arba kitos gerai žinomos metodikos. Bet kuris imunizavimui pasirinktas peptidas taip pat gali būti susintetintas. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose tokie peptidai gali būti susintetinti kaip šakoti polipeptidai imuniniam atsakui padidinti, kas yra žinoma specialistams (žr. pvz., *Peptides*. Edited by Bernd Gutte Academic Press 1995, pp. 456-493).

Išgrynintas kostimuliacinės molekulės baltymas taip pat gali būti kovalentiškai arba nekovalentiškai modifikuotas nebaltyminėmis medžiagomis, tokiomis kaip lipidai arba karbohidratai, imunogeniškumui arba tirpumui padidinti. Kitu atveju, imunogeniškumui padidinti išgrynintas kostimuliacinės molekulės baltymas gali būti kopuliuotas su virusine dalele arba įterptas į ją (replikacinis virusas) arba kitu mikroorganizmu.

Kostimuliacinės molekulės baltymas, pavyzdžiui, gali būti chemiškai prijungtas prie virusinės dalelės arba mikroorganizmo arba jo imunogeninės dalies.

Iliustraciniame įgyvendinimo variante išgrynintas kostimuliacinės molekulės baltymas arba peptidinis fragmentas, turintis kostimuliacinės molekulės aktyvumą (pvz. gautas panaudojant ribotą proteolizę arba rekombinantines DNR metodikas), yra sujungiamas su nešikliu, kuris yra imunogeninis gyvūnams. Tinkamiausi nešikliai apima baltymus, tokius kaip albuminas, serumo baltymai (pvz. globulinai ir lipoproteinai), ir poliaminorūgštis. Tinkamų baltymų pavyzdžiais yra jaučio serumo albuminas, triušio serumo albuminas, tiroglobulinas, sraigės limfos hemocianinas, kiaušinio ovalbuminas ir jaučio gama-globulinai. Nešikliais taip pat tinka sintetinės poliaminorūgštys, tokios kaip polilizinas arba poliargininas. Kostimuliacinės molekulės baltymo arba peptido fragmentų prijungimui prie tinkamo imunogeninio nešiklio yra daug cheminių skersinius ryšius sudarančių agentų, kurie yra žinomi specialistams. Tinkamiausi skersinius ryšius sudarantys agentai yra heterobifunkciniai skersiniai surišikliai, kurie gali būti naudojami prijungti baltymams laipsnišku būdu. Yra žinoma labai daug heterobifunkcinių skersinių surišiklių, įskaitant sukcinimidilo 4-(N-maleimidometil)cikloheksan-1-karboksilatą (SMCC), m-maleimidobenzoil-N-hidroksisukcinimido esterį (MBS), N-sukcinimidilo (4-jodacetil)aminobenzoatą (SIAB), sukcinimidilo 4-(p-maleimidofenil)butiratą (SMPB), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimido hidrochloridą (EDC), 4-sukcinimidil-oksikarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)-tolueną (SMPT), N-sukcinimidilo 3-(2-piridilditio)propionatą (SPDP), sukcinimidilo 6-[3-(2-piridilditio)propionato heksanoatą (LC-SPDP).

Taip pat gali būti pageidautina paprasčiausiai imunizuoti ištisomis ląstelėmis, kurios ekspresuoja kostimuliacinės molekulės baltymą ant savo paviršiaus. Kaip imunogenai monokloniniams antikūnams prieš kostimuliacinės molekulės antigeną generuoti gali būti naudojamos įvairios ląstelių linijos, įskaitant (bet neapsiribojant) aktyvuotas B ląsteles. Pavyzdžiui, iš subjekto gali būti gautos blūznies B ląstelės ir aktyvuotos anti-imunoglobulinu. Kitu atveju, jeigu ant ląstelės paviršiaus yra ekspresuota kostimuliacinė molekulė, gali būti panaudota B ląstelių linija, tokia kaip Raji

ląstelių linija (B ląstelių Burkett'o limfoma, žr. pvz., Freeman, G.J. et al. (1993) *Science* 262:909-911) arba JY B limfoblastoidinių ląstelių linija (žr. pvz., Azuma, M. et al. (1993) *Nature* 366: 76-79). Ištisos ląstelės, kurios gali būti naudojamos kaip imunogenai kostimuliacinei molekulei specifiniams antikūnams gauti, taip pat apima rekombinantinius transfektantus. Pavyzdžiui, COS ir CHO ląstelės gali būti rekonstruotos transfekuoiant kostimuliacinės molekulės kDNR, tokia kaip aprašyta Knudson et al. (1993, *PNAS* 90:4003-4007); Travernor et al. (1993, *Immunogenetics* 37:474-477); Dougherty et al. (1991, *J. Exp. Med.* 174:1-5); ir Aruffo et al. (1990, *Cell* 61:1303-1313), gaunant nepalietą kostimuliacinę molekulę ant ląstelės paviršiaus. Po to šios transfektantinės ląstelės gali būti naudojamos kaip imunogenas iš anksto parinkto specifiškumo antikūnams prieš kostimuliacinę molekulę gauti. Yra žinomi kiti transfektantinių ląstelių pavyzdžiai, ypač eukariotinės ląstelės, galinčios glikozilinti kostimuliacinės ląstelės baltymą, bet ištisos ląstelės tipo imunogenui gauti gali būti naudojama bet kokia metodika, kuri duoda galimybę ekspresuoti transfekuotus kostimuliacinių molekulių genus ant ląstelės paviršiaus.

B. Polikloniniai antikūnai prieš kostimuliacines molekules

Polikloniniai antikūnai prieš išgrynintą kostimuliacinės molekulės baltymą arba peptidą, turintys kostimuliacinės molekulės aktyvumą, gali pagrindinai būti sukeliama gyvūnuose, panaudojant kostimuliacinės molekulės imunogeno, tokio kaip kostimuliacinės molekulės baltymo ekstraląstelinė dalis, ir adjuvanto daugkartines poodines (sc) arba intraperitonines (ip) injekcijas. Pavyzdžiui, kaip aprašyta aukščiau, gali būti naudinga konjuguoti kostimuliacinę molekulę (įskaitant tam tikrus dominančius epitopus turinčius fragmentus) su baltymu, kuris yra imunogeninis imunizuojamoms rūšims, pvz. sraigės limfos hemocianinu, serumo albuminu.

Gyvūno-šeimininko arba jo kultivuotos antikūnus produkujančios ląstelės imunizavimo būdai ir režimai paprastai gali būti panaudotos nustatytos įprastos metodikos antikūnams stimuliuoti ir gaminti. Ilustraciniame įgyvendinimo variante gyvūnai paprastai yra imunizuojami prieš imunogeninės kostimuliacinės molekulės konjugatus arba darinius, sumaišant maždaug nuo 1 µg iki 1 mg konjugato su Freund'o pilnu adjuvantu ir suleidžiant šį tirpalą į

odą daugelyje vietų. Po vieno mėnesio gyvūnams vėl įvedama 1/5 – 1/10 pradinio kiekio konjugato Freund'o pilname adjuvante (arba kitame tinkamame adjuvante), panaudojant poodines injekcijas daugelyje vietų. Praėjus 7-14 dienų, iš gyvūnų paimamas kraujas ir nustatomas antikostimuliacinės molekulės titras. Gyvūnai vėjami imunogenu tol, kol titras pereina į plato. Tinkamiausia gyvūnus veikti konjugatu tos pačios kostimuliacinės molekulės baltymo, bet konjuguoto su skirtingu baltymu ir/arba per skirtingą skersinio ryšio sudarymo agentą. Konjugatai taip pat gali būti pagaminti rekombinantinėje ląstelių kultūroje, kaip sulieti baltymai. Imuninio atsako sustiprinimui taip pat gali būti panaudoti agreguojantys agentai, tokie kaip alūnas,

Tokios žinduolių pagamintos antikūninių molekulių populiacijos yra vadinamos "polikloninėmis", nes į populiacijas įeina antikūnai, kurių immunospecifiškumai ir giminingumai kostimuliacinei molekulei yra skirtingi. Po to antikūninės molekulės yra paimamos iš žinduolių ir išskiriamos gerai žinomais būdais, tokiais kaip, pavyzdžiui, panaudojant DEAE Sephadex IgG frakcijai gauti. Antikūno specifiškumui padidinti antikūnai gali būti gryninami immunoafininės chromatografijos būdu, naudojant prie kietos fazės pritvirtintą imunogeną. Antikūnas yra suleidžiamas į kontaktą su prie kietos fazės pritvirtintu imunogenu tam tikram laiko tarpui, kurio reikia, kad imunogenas sureaguotų su antikūno molekule, susidarant pritvirtintam prie kietos fazės imuniniam kompleksui. Sujungti antikūnai išskiriami iš komplekso panaudojant standartines metodikas.

C. Monokloniniai antikūnai prieš kostimuliacines molekules

Čia naudojamas terminas "monokloninis antikūnas" arba "monokloninio antikūno kompozicija" reiškia antikūno molekulių populiaciją, kurios turi tik vienos rūgšties antigeną rišančią vietą, galinčią imunoreaguoti su konkrečiu kostimuliacinės molekulės epitopu. Tokiu būdu monokloninio antikūno kompozicija paprastai pasižymi tik vienu rišančiu afiniškumu konkrečios kostimuliacinės molekulės baltymo, su kuriuo jis imunoreaguoja, atžvilgiu. Pageidautina, kad išradimo būde naudojamas monokloninis antikūnas būtų dar apibūdinamas kaip imunoreagujantis su kostimuliacine molekule, gauta iš žmogaus.

Monokloniniai antikūnai, tinkantys šio išradimo kompozicijoms ir būdams, yra nukreipti į kostimuliacinės molekulės antigeno epitopą tokiu būdu, kad komplekso tarp antikūno ir kostimuliacinės molekulės antigeno susidarymas inhibuoja kostimuliacinės molekulės sąveiką su jos gamtiniu ligandu(-ais) ant imuninių ląstelių paviršiaus; tokiu būdu inhibuodami T ląstelės kostimuliaciją per kostimuliacinės molekulės-ligando sąveiką. Monokloninis antikūnas prieš kostimuliacinės molekulės epitopą gali būti pagaminamas naudojant metodikas, kurios duoda galimybę gauti antikūno molekules, panaudojant nepertraukiamas ląstelių linijas kultūroje. Tokiomis metodikomis yra, bet jomis neapsiribojama, hibridomų metodika, kurią pirmiausia aprašė Kohler ir Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), vėliau aprašyta žmogaus B ląstelės hibridomų metodika (Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72), EBV-hibridomų metodika (Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) ir trijų metodikos. Kitais metodais, kurie gali efektyviai duoti šiam išradimui tinkančius monokloninius antikūnus, yra fagų demonstravimo metodikos (Marks et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 16007-16010).

Viename įgyvendinimo variante išradime taikomas antikūninis preparatas yra hibridomos ląstelių linijos produkuotas monokloninis antikūnas. Hibridomų suliejimo metodikas pirmieji įvedė Kohler ir Milstein (Kohler et al. *Nature* (1975) 256:495-97; Brown et al. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et al. (1976) *PNAS* 76:2927-31; ir Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). Tokiu būdu, šio išradimo monokloninio antikūno kompozicijos gali būti pagamintos toliau duodamu būdu, kuris apima tokias stadijas:

(a) Gyvūno imunizavimas kostimuliacine molekule. Imunizavimas paprastai vykdomas įvedant imunologiškai efektyvų kiekį, t.y. kiekį, kurio pakanka imuniniam atsakui gauti, kostimuliacinės molekulės imunogeno imunologiškai imliam žinduoliui. Geriau, kai žinduolis yra graužikas, kaip antai triušis, žiurkė arba pelė. Tada žinduolis yra palaikomas tam tikrą laiką, kad žinduolio organizme prisigamtų ląstelių, iškiriančių antikūno molekules, imunoreaguojančias su kostimuliacinės molekulės imunogenu. Tokia imunoreakcija yra nustatoma, panaudojant taip pagamintų antikūno molekulių atrinkimą pagal imunoreaktingumą su imunogeninio baltymo preparatu. Kitu

atveju, gali būti pageidautina atrinkti antikūno molekulės su baltymo preparatu, esančiu tokioje formoje, kurioje jį turi atpažinti antikūno molekulė teste, pvz. kostimuliacinės molekulės surištoje su membrana formoje. Specialistams yra gerai žinomi tokie atrinkimo būdai.

(b) Po to pagaminama antikūną produkuojančių ląstelių, paimtų iš kiekvieno imunizuoto žinduolio, išskiriančio norimą antikūną, suspensija. Po tam tikro laiko pelės yra numarinamos ir gaunami somatiniai antikūnus gaminantys limfocitai. Antikūnus gaminančios ląstelės gali būti gaunamos iš limfmazgių, blužnies ir primuotų gyvūnų periferinio kraujo. Tinkamiausios yra blužnies ląstelės, ir jos gali būti mechaniškai išskirstytos į atskiras ląsteles fiziologiškai tinkamoje terpėje, naudojant gerai žinomus metodus. Pelės limfocitai duoda didesnį stabilų suliejimų su toliau aprašytais pelės mielomomis procentą. Taip pat gali būti panaudotos žiurkės, triušio ir varlės somatinės ląstelės. Norimus imunoglobulinus koduojančios ląstelių chromosomos yra imortalizuojamos suliejant blužnies ląsteles su mielomos ląstelėmis, paprastai esant suliejimo agento, tokio kaip polietilenglikolis (PEG). Kaip suliejimo partneris, gali būti panaudotos bet kurios iš daugybės mielomos ląstelių linijų, suliejant pagal žinomas metodikas; pavyzdžiui, P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 arba Sp2/O-g14 mielomos ląstelių linijos. Šias mielomos linijas galima gauti iš Amerikos tipinių kultūrų kolekcijos (ATCC), Rockville, Md.

Tada gautos ląstelės, kuriose yra norimos hibridomos, auginamos selektyvioje terpėje, tokioje kaip HAT terpė, kurioje nesulietos pradinės mielomos arba limfocitų ląstelės galų gale žūva. Išgyvena tik hibridomos ląstelės ir jos gali būti auginamos limituojančio praskiedimo sąlygomis, gaunant izoliuotus klonus. Atliekamas hibridomų nuopilų atrinkimas, nustatant ar yra norimo specifiškumo antikūnų, pvz. pagal imunitestų metodikas, naudojant imunizavimui naudotą antigeną. Po to limituojančio praskiedimo sąlygomis gali būti perklonuojami teigiami klonai ir gali būti išskiriamas pagamintas monokloninis antikūnas. Monokloninių antikūnų išskyrimui ir išgryninimui yra įvairių bendrai priimtų metodų, kurie leidžia atskirti juos nuo kitų baltymų ir kitų priemaišų. Tarp monokloniniams antikūnams gryninti paprastai naudojamų metodų yra nusodinimas amonio sulfatu, jonų mainų chromatografija ir giminingumo chromatografija (žr. pvz., Zola et al.

Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, Hurell (ed) pp. 51-52 (CRC Press 1982). Šiais būdais gautos hibridomos gali būti dauginamos *in vitro* arba *in vivo* (ascito skystyje) naudojant žinomas metodikas.

Paprastai atskiros ląstelių linijos gali būti dauginamos *in vitro*, pavyzdžiui laboratoriniuose auginimo induose, o augimo terpė, turinti didelę vieno specifinio monokloninio antikūno koncentraciją, gali būti apdorojama dekantuojant, filtruojant arba centrifuguojant. Kitu atveju, monokloninio antikūno išeiga gali būti padidinama, suleidžiant hibridomos mėginį pradiniam somatinių ir mielomos ląstelių suliejimui gauti naudoto tipo histosuderinamam gyvūnui. Šiame gyvūne atsiranda augliai, išskiriantys specifinį monokloninį antikūną, kurį produkuoja sulietų ląstelių hibridas. Gyvūno kūno skysčiuose, tokiuose kaip ascitų skystis arba serumas, atsiranda didelė monokloninių antikūnų koncentracija. Jeigu yra naudojamos žmogaus hibridomos arba EBV-hibridomos, būtina vengti svetimkūnio, suleisto gyvūnams, tokiems kaip pelės, atmetimo. Gali būti naudojamos imunodeficitinės arba plikosios pelės, arba hibridoma gali būti perkeliama pirmiausia apspinduliuotoms plikosioms pelėms kaip kietas poodinis auglys, išaugintas *in vitro*, po to suleidžiama į pilvaplėvę primuotoms pristanu, apspinduliuotoms plikosioms pelėms, kurioms išsivysto ascitiniai augliai, išskiriantys didelius kiekius specifinių žmogaus monokloninių antikūnų.

Tokioms kompozicijoms pagaminti tinkančios terpės ir gyvūnai yra gerai žinomi specialistams, yra komerciškai prieinami ir apima sintetines auginimo terpes, tam inbredines peles ir pan. Sintetinės terpės pavyzdžiu yra Dulbecco minimali pagrindinė terpė (DMEM; Dulbecco et al. (1959) *Virology* 8:396), papildyta 4,5 gm/l gliukozės, 20 mM gliutamino ir 20 % fetalinio veršiuko serumo. Inbredinės pelės kamieno pavyzdžiu yra Balb/c.

D. Humanizuoti antikūnai prieš kostimuliacines molekules

Kai žmonių gydymui yra naudojami antikūnai, pagaminti nežmonių organizme, jie yra įvairiais laipsniais atpažįstami kaip svetimkūniai ir paciento gali sukelti imuninį atsaką. Viena šios problemos sumažinimo arba eliminavimo strategija, kuri yra tinkamiausia bendrosios imunosupresijos požiūriu, yra pagaminimas chimerinių antikūnų darinių, t.y. antikūnų molekulių,

kuriose yra sujungtos gyvūno-nežmogaus kintamosios sritys ir žmogaus pastoviosios sritys. Tokie antikūnai yra aukščiau aprašytų monokloninių ir polikloninių antikūnų ekvivalentai, bet, įvedus žmonėms, jie gali būti mažiau imunogeniški ir todėl juos tikriausiai geriau perneš pacientas.

Chimeriniai pelės-žmogaus monokloniniai antikūnai (t.y. chimeriniai antikūnai), reaguojantys su kostimuliacine molekule, gali būti pagaminti, pavyzdžiui, pagal neseniai sukurtas chimerinių antikūnų pagaminimo metodikas. Humanizuoti antikūnai gali būti pagaminami, pavyzdžiui, pakeičiant antikūno imunogeninę dalį atitinkama, tačiau neimunogenine dalimi. Šiam tikslui genai, koduojantys pelės (arba kitų rūšių) antikūno prieš kostimuliacinę molekulę molekulės pastoviąsias sritis, yra pakeičiami genais, koduojančiais žmogaus pastoviąsias sritis. (Robinson et al., International Patent Publication PCT/US86/02269; Akira, et al., European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison et al., European Patent Application 173,494; Neuberger et al., PCT Application WO 86/01533; Cabillity et al., European Patent Application 125,023; Better et al. (1988 *Science* 240:1041-1043); Liu et al. (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura et al. (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; ir Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559). Pagrindines "humanizuotų" chimerinių antikūnų apžvalgas pateikė Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207 ir Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214. Tokie metodai apima nukleorūgščių sekų, kurios koduoja imunoglobulino bent vienos iš sunkiosios arba lengvosios grandinės visą kintamąją sritį arba jos dalį, išskyrimą, manipuliacijas su jomis ir ekspresiją. Tokių nukleorūgščių šaltiniai yra gerai žinomi specialistams, ir jos gali būti gaunamos, pavyzdžiui, iš antikūnus prieš kostimuliacines molekules gaminančių hibridomų. Tada chimerinė kDNR gali būti įklonuojama į atitinkamą ekspresijos vektorių.

Kitu atveju, tinkami "humanizuoti" antikūnai gali būti pagaminti panaudojant CDR arba CEA pakeitimą (The Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534; ir Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060).

E. Kombinatoriniai antikūnai prieš kostimuliacines molekules

Šio išradimo ir monokloninių ir polikloninių antikūnų kompozicijos taip pat gali būti gaunamos kitais gerai žinomais rekombinantinės DNR technologijos metodais. Norint identifikuoti ir išskirti ypatingą antigeninį specifiškumą turinčius antikūnų fragmentus, buvo sukurtas kitas metodas, vadinamas "kombinatoriniu antikūnų demonstravimo" metodu, ir jis gali būti panaudotas monokloniniams antikūnams prieš kostimuliacines molekules bei polikloninių antikūnų prieš kostimuliacines molekules populiacijai gauti (Sastry et al. (1989) *PNAS* 86:5728; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275; ir Orlandi et al. (1989) *PNAS* 86:3833). Imunizavus gyvūną kostimuliacinės molekulės imunogenu kaip aprašyta aukščiau, yra klonuojamas gautos B ląstelės telkinio antikūnų repertuaras. Paprastai yra žinomi būdai, kaip tiesiogiai gauti įvairių populiacijų imunoglobulino molekulių kintamųjų sričių DNR sekas, panaudojant ologomerinių pradmenų ir PCR mišinį. Pavyzdžiui, sunkiosios ir lengvosios grandinių iš daugelio pelės antikūnų PCR amplifikacijai gali būti naudojami mišrūs oligonukleotidiniai pradmenys, atitinkantys 5' lyderines (signalinio peptido) sekas ir/arba rėmelio 1 (FR1) sekas, bei pradmuo konservuotai 3' pastoviajai sričiai (Larrick et al. (1991) *Biotechniques* 11:152-156). Panaši strategija taip pat gali būti naudojama žmogaus sunkiosios ir lengvosios grandinės kintamosioms sritims iš žmogaus antikūnų amplifikuoti (Larrick et al. (1991) *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2:106-110). Galimybė klonuoti žmogaus imunoglobulino V-genus turi ypatingą reikšmę žmogaus antikūnų rinkinio transgeniniuose gyvūnuose sukūrimo pasiekimų šviesoje (žr. pavyzdžiui, Bruggeman et al. (1993) *Year Immunol.* 7:33-40; Tuailon et al. (1993) *PNAS* 90:3720-3724; Bruggeman et al. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326; ir Wood et al. PCT publikacija WO 91/00906).

Iliustraciniame įgyvendinimo variante RNR buvo išskirta iš aktyvuotų B ląstelių, pavyzdžiui, periferinio kraujo ląstelių, kaulų čiulpų arba blužnies preparatų, naudojant standartines metodikas (pvz., U.S. Patent No. 4,683,202; Orlandi, et al. *PNAS* (1989) 86:3833-3837; Sastry et al., *PNAS* (1989) 86:5728-5732; ir Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281). Pirmosios grandinės kDNR yra sintezuojama naudojant sunkiosios grandinės(-ių) bei kiekvienos iš κ ir λ lengvųjų grandinių pastoviajai sričiai

būdingus pradmenis, o taip pat pradmenis signalinei sekai. Naudojant kintamosios srities PCR pradmenis, yra amplifikuojamos ir sunkiosios, ir lengvosios grandinės kintamosios sritys (kiekviena atskirai arba derinyje) ir įjungiamos į atitinkamus vektorius tolimesnėms manipuliacijoms, generuojant demonstracines pakuotes. Amplifikacijai tinkami oligonukleotidiniai pradmenys gali būti unikalūs arba išsigimę, arba išsigimimo vietose turi įterptą inoziną. Į pradmenis taip pat gali būti įterptos restriktinės endonukleazės atpažinimo sekos, kad būtų galima įklonuoti amplifikuotą fragmentą į vektorių iš anksto apibrėžtame ekspresijos skaitymo rėmelyje.

Klonuota iš imunizacijoje gautų antikūnų repertuaro V genų biblioteka gali būti ekspresuota, panaudojant demonstracinių paketų populiaciją, geriausia gautą iš filamentinio fago, suformuojant antikūno demonstracinę biblioteką. Idealiu atveju demonstracinis paketas apima sistemą, kuri leidžia gauti labai didelės įvairovės antikūnų demonstracinės bibliotekos mėginius, greitą išrūšiavimą po kiekvieno afininio atskyrimo ciklo ir lengvą antikūno geno išskyrimą iš išgrynintų demonstracinių paketų. Apart iš prekybos gaunamų rinkinių fagų demonstracinėms bibliotekoms generuoti (pvz., the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, katalogo Nr. 27-9400-01; ir Stratagene *SurfZAPTM* fagų demonstracinis rinkinys, katalogo Nr. 240612), ypatingai tinkančių antikūnų prieš kostimuliacines molekules demonstracinių įvairiarūšių bibliotekų generavimo metodų ir reagentų pavyzdžiai gali būti rasti, pavyzdžiui, the Ladner et al. U.S. Patent No. 5,223,409; the Kang et al. International Publication No. WO 92/18619; the Dower et al. International Publication No. WO 91/17271; the Winter et al. International Publication No. WO 92/20791; the Markland et al. International Publication No. WO 92/15679; the Breitling et al. International Publication No. WO 93/01288; the McCafferty et al. International Publication No. WO 92/01047; the Garrard et al. International Publication No. WO 92/09690; the Ladner et al. International Publication No. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991)

Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; ir Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982.

Tam tikruose įgyvendinimo variantuose sunkiosios ir lengvosios grandinių V srities vietos gali būti ekspresuotos tame pačiame polipeptide, prijungtame lanksčia jungė, susidarant viengrandiniam Fv fragmentui, ir po to scFV genas yra įklonuojamas į norimą ekspresijos vektorių arba fago genomą. Kaip bendriausiai aprašyta McCafferty et al. *Nature* (1990) 348:552-554, pilnos antikūno V_H ir V_L dalys, sujungtos lanksčia (Gly₄-Ser)₃ jungė, gali būti naudojamos gauti viengrandiniam antikūnui, kuris gali pateikti demonstracinį paketą, atskiriamą remiantis antigeniniu giminingumu. Išskirti imunoreaguojantys su kostimuliacine molekule scFV antikūnai po to gali būti įvesti į farmacinius preparatus, skirtus panaudoti išradimo būde.

F. Hibridomos ir jų gavimo būdai

Šiam išradimui tinkančios hibridomos yra hibridomos, pasižyminčios sugebėjimu produkuoti monokloninį antikūną, kuris specifiskai imunoreaguos su kostimuliacine molekule. Kaip aprašyta žemiau, norint gauti pastovų antikūnų šaltinį, antikūnus prieš kostimuliacines molekules produkuojančios hibridomos ląstelės gali būti tiesiogiai implantuojamos gyvūnui-recipientui. Izoliacinių įtaisų hibridomos kultūros įkapsuliavimui panaudojimas gali padėti apsaugoti nuo imunogeninio atsako prieš implantuotas ląsteles bei nekontroliuojamos hibridomos ląstelių proliferacijos šeiminingumo su nuslopintu imunitetu organizme. Tinkamiausiomis šio išradimo hibridomomis yra hibridomos, kurios produkuoja antikūnų molekules, specifiskai imunoreaguojančias su ant aktyvuotų žmogaus B ląstelių paviršių ekspresuota kostimuliacine molekule.

Hibridomų, kurios produkuoja, pvz. išskiria, norimą imunospecifiškumą turinčias antikūnų molekules, t.y. galinčias susirišti su konkrečia kostimuliacine molekule ir/arba kostimuliacinės molekulės identifikuojamu epitopu, generavimo metodai yra gerai žinomi. Ypatingai tinkama taikyti yra hibridomų technologija, kurią aprašė Niman et al. (1983) *PNAS* 80:4949-4953; ir Galfre et al. (1981) *Meth. Enzymol.* 73:3-46.

Kitame pavyzdiniame metode gali būti imunizuojamos transgeninės, žmogaus antikūnų rinkinius turinčios pelės žmogaus kostimuliacine molekule.

Tada šių imunizuotų transgeninių pelių splenocitai gali būti panaudoti sukurti hibridomoms, kurios išskiria žmogaus monokloninius antikūnus, specifiskai reaguojančius su žmogaus kostimuliacine molekule (žr. pvz., Wood et al. PCT publication WO 91/00906, Kucherlapti et al. PCT publication WO 91/10741; Lonberg et al. PCT publication WO 92/03918; Kay et al. PCT publication 92/03917; Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368:856-859; Green, L.L. et al. (1994) *Nature Genet.* 7:13-21; Morrison, S.L. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Bruggeman et al. (1993) *Year Immunol* 7:33-40; Tuailon et al. (1993) *PNAS* 90:3720-3724; ir Bruggeman et al. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326).

Laikoma, kad čia naudojamas terminas "antikūnas" apima jų fragmentus, kurie taip pat specifiskai reaguoja su kostimuliacine molekule, kaip čia aprašyta. Antikūnai gali būti fragmentuojami naudojant įprastas metodikas ir atrenkami naudojimui tinkami fragmentai tuo pačiu būdu, kaip ir pilni antikūnai. Pavyzdžiui, $F(ab')_2$ fragmentai gali būti generuojami veikiant antikūną pepsinu. Gautas $F(ab')_2$ fragmentas gali būti apdorojamas redukuojant disulfidinius tiltelius ir gaunami Fab' fragmentai.

Šiais arba kitais būdais pagaminti antikūnai gali būti testuojami, nustatant, ar jie inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, naudojant žemiau aprašytus metodus.

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra antikūnas, kuris rišasi ir su B7-1, ir su B7-2. Gaminat tokį antikūną, pavyzdžiui, imunogenu gali būti panaudotos ekstraląstelinės srities dalys, kurios yra išlaikytos abiejose kostimuliacinėse molekulėse. Žr. pvz., Metzler et al. 1997 *Nat. Struct. Biol.* 4:527).

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra antikūnas, kuris rišasi su B7-1. Tokie antikūnai yra žinomi specialistams arba gali būti pagaminti taip, kaip nurodyta aukščiau, imunogenu naudojant B7-1 molekulę arba jos dalį, ir atrinkti aukščiau nurodytais metodais arba standartiniais metodais. B7-1 antikūnų pavyzdžiais yra antikūnai, aprašyti U.S. Patent 5,747,034 ir McHug et al. 1998, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 87:50 arba Rugtveit et al. 1997, *Clin. Exp. Immunol.* 110:104.

Kitame įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra antikūnas, kuris rišasi su B7-2. Tokie antikūnai yra žinomi specialistams arba gali būti pagaminti taip, kaip nurodyta aukščiau, imunogenu naudojant B7-2 molekulę arba jos dalį, ir atrinkti aukščiau nurodytais metodais arba standartiniais metodais. B7-1 antikūnų pavyzdžiais yra antikūnai, aprašyti Rugtveit et al. 1997, *Clin. Exp. Immunol.* 110:104.

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra antikūno, kuris rišasi su B7-1, ir antikūno, kuris rišasi su B7-2, derinys.

Dar kituose įgyvendinimo variantuose agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra antikūnas, kuris rišasi su CD28, bet neperduoda kostimuliacinio signalo T ląstelei (pvz. anti-CD28 antikūno Fab fragmentas). Tokie antikūnai yra žinomi specialistams arba gali būti pagaminti taip, kaip nurodyta aukščiau, imunogenu naudojant CD28 molekulę arba jos dalį, ir atrinkti aukščiau nurodytais metodais arba standartiniais metodais. Žinomų anti-CD28 antikūnų pavyzdžiais yra antikūnai, aprašyti Darling et al. 1997, *Gene Ther.* 4:1350.

Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose gali būti naudojami antikūno, kuris rišasi su CD28, Fab fragmentai. Buvo rasta, kad tokie antikūno fragmentai, kurie negali skersiniais ryšiais prijungti CD28 ant T ląstelės paviršiaus, blokuoja T ląstelių kostimuliaciją (Walunas et al. 1994, *Immunity* 1:405).

Dar kituose įgyvendinimo variantuose agentas, inhibuojantis kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra su CTLA4 besirišantis antikūnas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, paduodamas neigiamą signalą T ląstelei (t.y. kuris yra CTLA4 agonistas). Pavyzdžiui, buvo parodyta, kad CTLA4 skersinių ryšių sudarymas ant T ląstelės paviršiaus inhibuoja proliferaciją ir IL-2 gaminimąsi (Krummel and Allison, 1996, *J. Exp. Med.* 183:2533). Tokie antikūnai gali būti pagaminti taip, kaip nurodyta aukščiau, imunogenu naudojant CTLA4 molekulę arba jos dalį, ir atrinkti aukščiau nurodytais metodais arba standartiniais metodais. Šių antikūnų pavyzdžiais yra antikūnai, taip pat aprašyti Vandenborre et al. 1998, *Am. J. Pathol.* 152:963.

Dar kitame įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra besirišantis su ICOS antikūnas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje. Tokie antikūnai gali būti pagaminti taip, kaip nurodyta aukščiau, imunogenu naudojant ICOS molekulę arba jos dalį, ir atrinkti aukščiau nurodytais metodais arba standartiniais metodais.

IV. Agentai, kurie reguliuoja kostimuliacinių molekulių ekspresiją

Kitame įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra agentas, kuris trukdo ekspresuoti kostimuliacinę molekulę. Pavyzdžiui, buvo rasta, kad sąveikos tarp CD40 ant antigeną pateikiančių ląstelių ir CD40 ligando (CD40L) ant T ląstelių yra svarbios palaikant, sustiprinant arba pailginant B7-1 arba B7-2 ekspresiją ant antigeną pateikiančių ląstelių, ir jos duoda kostimuliacijos sustiprinimą (Van Gool, et al., 1996, *Immunol. Rev.* 153:47; Klaus et al., 1994, *J. Immunol.* 152:5643).

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinės molekulės ekspresiją, tokiu būdu blokuodamas kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra CD40 arba CD40L tirpi forma. Šias CD40 ir CD40L koduojančios DNR sekos yra žinomos; žr. pvz., GenBank Accession Nos. Y10507 arba Stamenlovic et al., 1988, *EMBO J.* 7:1053-1059 CD40 atveju arba Gauchat et al., 1993, *FEBS* 315(3):259-266; Graf et al., 1992, *Eur. J. Immunol.* 22:3191-3194; Seyama 1996, *Hum. Genet.* 97:180-185 arba GenBank Accessio Nos. L07414, X67878, X96710 CD40L atveju.

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinės molekulės ekspresiją, tokiu būdu blokuodamas kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra CD40 arba CD40L tirpi forma. Viename įgyvendinimo variante tirpus CD40 arba CD40L baltymas yra ištisas baltymas. Tinkamesniuose įgyvendinimo variantuose tirpus CD40 arba CD40L baltymas apima šio baltymo ekstraląstelinę dalį. Pavyzdžiui, CD40 arba CD40L baltymo arba jo dalies ekstraląstelinės dalies tirpi rekombinantinė forma gali būti pagaminta kaip sulietas baltymas, apimantis bent dalį CD40 arba CD40L taip, kad sąveika tarp CD40 ant APC ir CD40L ant T ląstelės yra nutraukiama ir yra inhibuojamas kostimuliacinio signalo perdavimas į T ląstelę. Tokia CD40 arba CD40L baltymo tirpi rekombinantinė forma apima bent dalį molekulės, kurios

pakanka susirišti su jos priešreceptoriumi, ir bent dalį antrojo ne-CD40 arba CD40L baltymo. Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose CD40 arba CD40L sulieti baltymai apima CD40 arba CD40L ekstraląstelinę dalį, kuri amino-gale yra sulieta su signaliniu peptidu, pvz. iš onkostatino M (žr. pvz., WO 93/00431).

Ypatingai tinkamame įgyvendinimo variante CD40 arba CD40L tirpi forma yra sulietas baltymas, apimantis CD40 arba CD40L ekstraląstelinę dalį, sulietą su dalimi imunoglobulino molekulės (pvz. Chen et al., 1995, *J. Immunol.* 155:2833). Toks sulietas baltymas – CD40Ig arba CD40LIg – gali būti pagamintas naudojant žinomus metodus (žr. pvz., Linsley, 1994, *Perspectives in Drug Discovery and Design* 2:221; Linsley WO 93/00431, U.S. Patent 5,770,197 ir U.S. Patent 5,580,756).

Be to, buvo rasta, kad antikūnai prieš CD40 turi sinergetinį poveikį agentams, kurie inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, skatindami svetimkūnio toleravimą (Kirk et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:8789; Larsen et al., 1996, *Nature* 381:434). Todėl viename įgyvendinimo variante antikūnai prieš CD40 arba CD40L, kurie rišasi su šiomis molekulėmis, bet kurie neindukuoja kostimuliacinių molekulių ekspresijos, gali būti naudojami kaip agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje.

V. Agentai, kurie viduląstelinio būdu inhibuoja kostimuliacinį signalą

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra agentas, kuris inhibuoja tokį signalą viduląstelinio būdu. T ląstelės stimuliavimas per CD28 paviršiaus receptorių (t.y. kostimuliacinis signalas) sukelia D-3 fosfoinozitudų produkciją T ląstelėje. Tokiu būdu viename įgyvendinimo variante D-3 fosfoinozitudų produkcija T ląstelėje gali būti inhibuojama, inhibuojant kostimuliacinį signalą ir taip inhibuojant T ląstelės atsaką, matuojamą, pavyzdžiui, pagal T ląstelių proliferaciją arba citokinų gaminimąsi. Laikoma, kad terminas "D-3 fosfoinozitidai" apima fosfatidilinozitolio darinius, kurie yra fosforilunami inozitolio žiedo D-3 padėtyje ir apima fosfatidilinozitol(3)-monofosfatą (PtdIns(3)P), fosfatidilinozitol(3,4)-bisfosfatą (PtdIns(3,4)P₂) ir fosfatidilinozitol(3,4,5)-trisfosfatą (PtdIns(3,4,5)P₃).

D-3 fosfoinozitudai yra generuojami ląstelės viduje veikiant fosfatidilinozitolio 3-kinazei (PI3K). PI3K yra heterodimeras, sudarytas iš 85 kDa subvieneto, kuris riša tirozilfosforilintus baltymus per jo SH2 dalis, ir 110 kDa katalitinio subvieneto. Pirmą kartą PI3K buvo identifikuota kaip lipidkinazė, kuri fosforilina fosfatidilinozitolio (PtdIns(4)P ir PtdIns(4,5)P₂) inozitolio žiedo D-3 padėtį. Du neseni tyrimai parodė, kad PI3K faktiškai yra dvigubo specifiškumo kinazė, kuri pasižymi ir lipidų, ir serino kinazės aktyvumais (Dhand, R. et al. (1994) *EMBO J.* **13**:522 ir Carpenter, C.L. et al. (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**:1657).

Taigi, viename įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra agentas, kuris inhibuoja PI3K aktyvumą. Tinkamiausias agentas, kuris inhibuoja PI3K aktyvumą T ląstelėje, yra grybinis metabolitas vortmaninas, jo dariniai arba analogai. Vortmaninas yra veiksmingas PI3K inhibitorius, gaunamas iš *T. wortmanii* (Kyowa Hakko Kohyo Co. Ltd.) arba iš *P. fumiculosum* (Sigma). Vortmanino dariniai arba analogai apima struktūriniu požiūriu vortmaninui giminingus junginius, kurie išlaiko sugebėjimą inhibuoti PI3K ir T ląstelių atsakus. Vortmanino darinių ir analogų pavyzdžiai yra aprašyti Viesinger, D. et al. (1974) *Experientia* **30**:135-136; Closse, A. et al. (1981) *J. Med. Chem.* **24**:1465-1471; ir Baggiolini, M. et al. (1987) *Exp. Cell Res.* **169**:408-418. Kitas PI3K aktyvumo inhibitorius, kuris gali būti naudojamas, yra bioflavenoidinis kvercetas, jo dariniai arba jo analogai. Kvercetino dariniai arba analogai apima struktūriniu požiūriu kvercetinui giminingus junginius, kurie išlaiko sugebėjimą inhibuoti PI3K ir T ląstelių atsakus. Kvercetino darinių ir analogų pavyzdžiai yra aprašyti Vlahos, C.J. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**:5241-5284. Tinkamiausias kvercetino darinys, kuris inhibuoja PI3K aktyvumą, yra LY294002 (2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-onas, Lilly Indianapolis, IN) (aprašytas Vlahos et al. cituotas *supra*).

Taip pat buvo parodyta, kad CD28 stimuliavimas duoda baltymo tirozinų fosforilinimą T ląstelėje (žr. pvz., Vandenberghe, P. et al. (1992) *J. Exp. Med.* **175**:951-960; Lu, Y. et al. (1992) *J. Immunol.* **149**:24-29). Taigi, viename įgyvendinimo variante agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, inhibuoja tirozino fosforilinimą T ląstelėje. Tinkamiausias proteintirozinkinazės inhibitorius yra inhibitorius, kuris inhibuoja src

proteintirozinkinazės. Viena iš įgyvendinimo variantų yra herbimicinas A, jo darinys arba jo analogas. Herbimicino A dariniai arba analogai apima struktūriniu požiūriu herbimicinui A giminingus junginius, kurie išlaiko sugebėjimą inhibuoti proteintirozinkinazių aktyvumą. Kita įgyvendinimo versija yra agentas, kuris inhibuoja baltymo tirozinų fosforilinimą, yra proteintirozinfosfatazė, arba proteintirozinfosfatazės aktyvatorius. Didinant tirozinfosfatazės aktyvumą T ląstelėje, grynas baltymo tirozino fosforilinimo kiekis sumažėja. Ši proteintirozinfosfatazė gali būti ląstelinė proteintirozinfosfatazė T ląstelės viduje, tokia kaip CD45 arba Hcph. Ląstelių paviršiaus tirozinfosfatazės aktyvumas ant T ląstelių gali būti aktyvuojamas kontaktuojant T ląstelei su molekule, kuri rišasi su šia fosfataze ir stimuliuoja jos aktyvumą. Pavyzdžiui, tirozinfosfatazės aktyvumui T ląstelėje, ant paviršiaus ekspresuojančioje CD45, stimuliuoti gali būti naudojamas antikūnas, nukreiptas prieš CD45. Taigi, viena iš įgyvendinimo versijų yra agentas, kuris inhibuoja baltymo tirozinų fosforilinimą T ląstelėje, yra anti-CD45 antikūnas arba jo fragmentas, kuris išlaiko sugebėjimą stimuliuoti CD45 aktyvumą. Antikūnų fragmentų pavyzdžiais yra Fab ir F(ab')₂ fragmentai. Antikūnai arba jų fragmentai gali būti pateikiami stimulatoriaus formoje, pavyzdžiui, multimerizuoti arba imobilizuoti ir t.t.

Be to, CD28 surišimas buvo susietas su padidėjusiu fosfolipazės C aktyvumu (žr. pvz., Nunes, J. et al. (1993) *Biochem. J.* **293**:835-842) ir padidėjusiais viduląstelinio kalcio kiekiais (žr. pvz. Ledbetter, J.A. et al (1990) *Blood* **75**:1531-1539 ir pavyzdžius). Taigi, agentas, kuris veikia viduląstelinio būdu inhibuodamas kostimuliacinį signalą T ląstelėje, gali veikti inhibuodamas fosfolipazės C aktyvumą ir/arba inhibuodamas viduląstelių kalcio kiekio padidėjimą. Pavyzdžiui, tirozinkinazės inhibitorius herbimicinas A taip pat inhibuoja CD28 sukeltą kalcio išskyrimą T ląstelėse.

Taip pat buvo parodyta, kad proteinserin- ir serintreoninkinazės turi ryšį su signalo perdavimo keliais, susijusiais su CD28 (Siegel, J.N. et al. (1993) *J. Immunol.* **151**: 4116-4127; Pai, S.V. et al. (1994) *J. Immunol.* **24**:2364; Parry et al. 1997, *Eur. J. Immunol.* **27**:2495). Taigi, kita įgyvendinimo versija yra agentas, kuris veikia viduląstelinio būdu inhibuodamas kostimuliacinį signalą T ląstelėje, inhibuoja serin- arba serintreoninkinazės aktyvumą.

VI. Kiti agentai, kurie blokuoja T ląstelių kostimuliavimą

Kiti agentai, kurie blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, gali būti identifikuoti naudojant standartines metodikas. Pavyzdžiui, tokie agentai gali būti identifikuoti pagal jų sugebėjimą inhibuoti T ląstelių proliferaciją arba citokinų produkciją. Pavyzdžiui, gali būti naudojama kostimuliacinio testo sistema. Tokioje sistemoje žmogaus CD28⁺ T ląstelės yra išskiriamos, pavyzdžiui, imunomagnetinių granulių išsisėmimo būdu, naudojant monokloninius antikūnus prieš B ląsteles, natūralias kilių ląsteles ir makrofagus, kaip aprašyta anksčiau (Gimmi, C.D., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6586-6590). Antigenus pateikiančios ląstelės, pvz. pilnos blužnies ląstelės, išgrynintos B ląstelės arba B7-1 arba B7-2 transfekuotos COS ląstelės, gali būti apspinduliuojamos arba veikiamos mitomicinu-C (pvz. esant 25 µg/ml) 1 valandą, po to gausiai plaunamos proliferacijai inhibuoti. 10⁵ CD28⁺ T ląstelių gali būti inkubuojama su, pvz., 10⁵-10⁴ APC (pvz. COS ląstelių, transfekuotų B7 molekule). Šiame pavyzdiniame teste viena T ląstelių populiacija gavo vieną pirminį aktyvavimo signalą (pvz. T ląstelės receptoriaus signalą); kita T ląstelių populiacija gavo vieną kostimuliacinį signalą; dar kita T ląstelių populiacija gavo ir pirminį aktyvavimo signalą, ir kostimuliacinį signalą, o dar viena T ląstelių populiacija gavo ir pirminį aktyvavimo signalą, ir kostimuliacinį signalą esant agentui, kurio sugebėjimas blokuoti T ląstelės kostimuliacinį signalą yra tiriamas. Pirminis aktyvavimo signalas gali būti paduodamas, pvz., panaudojant submitogeninę PMA dozę (pvz., 1 ng/ml), submitogeninę mitogeno dozę, suboptimalią antigeno dozę arba submitogeninę anti-T ląstelių receptoriaus antikūno dozę. Signalas 2 yra paduodamas panaudojant antigenus pateikiančias ląsteles, turinčias B7 molekulę. Potencialūs blokuojantys agentai yra tiriami imant koncentracijų intervalą. Pavyzdžiui, potencialūs blokuojantys antikūnai gali būti naudojami kaip hibridomos nuopilai arba kaip išgrynintas antikūnas (pvz. imant maždaug 10 µg/ml). T ląstelių proliferacija gali būti matuojama pagal ³H-timidino (1 µCi) įsiterpimą per mažiausiai 12-18 valandų 72 valandų inkubacijos metu. Pirminio aktyvavimo signalo padavimas turėtų duoti tam tikrą proliferaciją, bet T ląstelės, gavusios ir pirminį aktyvavimo signalą, ir kostimuliacinį signalą 2,

turėtų proliferuoti maksimaliai. Blokuojantys agentai yra identifikuojami pagal jų sugebėjimą sumažinti maksimalią, kostimuliacinio signalo sukeltą proliferaciją.

Papildomai, arba kaip alternatyva T ląstelių proliferacijos matavimui, gali būti matuojama citokinų produkcija, naudojant gerai žinomas metodikas. Pavyzdžiui, T ląstelių kultūrose produkuoti IL-2 ir IL-4 gali būti nustatomi auginimo nuopiluose, surinktuose praėjus 24-72 valandoms po auginimo iniciacijos, naudojant prekyboje esantį ELISA metodą (R&D Systems, Minneapolis, MN ir BioSource, Camarillo, CA). Kaip nurodyta aukščiau, blokuojantys agentai gali būti identifikuojami pagal jų sugebėjimą sumažinti maksimalią, kostimuliacinio signalo sukeltą citokinų produkciją.

Antikūnų atveju bet kokie "blokuojantys antikūnai", identifikuoti naudojant vieną ar kitą testą, gali būti papildomai ištirti, nustatant kostimuliacinę molekulę, su kuria jie jungiasi, pagal žinomas metodikas. Pavyzdžiui, gali būti matuojama blokuojančio antikūno geba sumažinti žymėto antikūno susirišimą su žinomu ligandu.

VII. Kiti agentai imuninių atsakų supresiniam moduliavimui

Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose į šio išradimo kompozicijas ir būdus gali įeiti papildomi agentai arba būti naudojami papildomi agentai agento, kuris skatina hemostazę, imunotoleravimo stiprinimui. Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris skatina imunotoleravimą, bet neinhibuoja kostimuliacinio signalo T ląstelėje, gali būti pridedamas į šias kompozicijas arba įvedamas šiais būdais. Pavyzdžiui, į kompoziciją gali būti pridėta anti-CD40 ligando (pvz. monokloninio antikūno prieš žmogaus CD40 ligandą, 5C8 (Kirk et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8789). CD40 ir jo T ląstelėse paremtas ligandas – CD40L (CD154) – vaidina svarbų vaidmenį B7 pozityviojoje reguliacijoje ir B ląstelės aktyvumo nustatyme (U.S. Patent 5,683,693, Yang et al., 1996, *Science* 273:1862; Grewal et al., 1996, *Science* 273:1864; Leterman et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175:1091; Lederman et al. 1992, *J. Immunol.* 149:3817). Buvo rasta, kad antikūnai prieš CD40 ligandą sinergetiškai sąveikauja su agentais, kurie inhibuoja kostimuliacinį signalą T

ląstelėje, skatindami svetimkūnio toleravimą (Kirk et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8789; Larsen et al. 1996, *Nature* 381:434). Kitame įgyvendinimo variante išradimo kompozicijoje gali būti naudojamas agentas, kuris veikia viduląsteliniu būdu skatindamas imunotoleravimą, bet jis neinhibuoja kostimuliacinio signalo T ląstelėje. Pavyzdžiui, viename įgyvendinimo variante ciklosporinas A (CSA), FK506, rapamicinas arba kitas agentas, kuris inhibuoja imuninius atsakus, gali įeiti į šias kompozicijas arba būti skiriami kaip šių būdų dalis (Žr. pvz., Sigal et al., 1992, *Annu. Rev. Immunol.* 10:519; Ruhlmann et al. 1997, *Immunobiology*, 198:192; Shaw et al., 1996, *Clin. Chem.* 42:1316).

VIII. Kompozicijų, į kurias įeina terapinis baltymas ir imunotoleranciją suteikiantis agentas, naudojimo būdai

Viename įgyvendinimo variante čia aprašytos šio išradimo kompozicijos ir/arba agentai yra skiriami subjektams, kurie turi hemostazinį sutrikimą ir anksčiau buvo gydyti agentu, kuris skatina hemostazę. Kitame įgyvendinimo variante čia aprašytos šio išradimo kompozicijos ir/arba agentai yra skiriami subjektams, kurie dar nebuvo gydyti agentu, kuris skatina hemostazę.

Dar kitame įgyvendinimo variante čia aprašytos šio išradimo kompozicijos ir/arba agentai yra skiriami subjektui, kuriam dar neišsivystė imuninis atsakas į agentą, kuris skatina hemostazę. Kituose įgyvendinimo variantuose šio išradimo kompozicijos ir/arba agentai yra skiriami subjektams, kurie turi jau esantį imuninį atsaką į agentą, kuris skatina hemostazę. Ar subjektas turi "jau esantį imuninį atsaką", galima nustatyti matuojant subjekto antikūnų, reaguojančių su hemostazę skatinančiu agentu, titrą pagal gerai žinomas metodikas. Jeigu toks subjektas turi išmatuojamą tokių antikūnų titrą (pvz. statistiškai reikšmingą titrą), lyginant su kontrolinių individų titrais, galima sakyti, kad subjektas turi jau esantį imuninį atsaką į agentą, kuris skatina hemostazę. Kitu atveju, ląstelinis imuninis atsakas į agentą, kuris skatina hemostazę, gali būti matuojamas nustatant, ar subjektas turi tebevykstantį imuninį atsaką į agentą, kuris skatina hemostazę. Tokios metodikos yra gerai žinomos specialistams.

Viename įgyvendinimo variante hemostazinio sutrikimo gydymui yra naudojamas pirmasis agentas, kuris skatina hemostazę, ir antrasis agentas, kuris inhibuoja arba blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje. Kitame įgyvendinimo variante hemostazinio sutrikimo gydymui gali būti naudojama kompozicija, apimanti pirmojo agento, kuris skatina hemostazę, ir antrojo agento, kuris inhibuoja arba blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, derinį.

Čia aprašytos kompozicijos ir/arba agentai gali būti vartojami bet kokia farmakologine forma, kuri susideda iš terapiškai efektyvaus kiekio agento ir farmaciškai priimtino nešiklio. Šio išradimo agentų ir/arba kompozicijų terapiškai efektyvaus kiekio vartojimas yra apibrėžiamas kaip kiekis, kuris yra efektyvus, esant tokioms dozėms ir laikui, reikalingam hemostazinio sutrikimo gijimui pasiekti hemostazę skatinančio agento atveju ir imunotolerancijai pasiekti – agento, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje atveju. Agento arba kompozicijos terapiškai efektyvus kiekis gali kisti priklausomai nuo faktorių, tokių kaip ligos būklė, individo amžius, lytis ir masė, ir nuo to, ar individas jau turi ar neturi išvystyto imuninio atsako į agentą, kuris skatina hemostazę. Tokį kiekį gali nesunkiai nustatyti paprastas šios srities specialistas.

Optimalus agentų ir/arba kompozicijų vartojimo kursas taip pat gali kisti priklausomai nuo gydomo subjekto. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose subjektą reikės gydyti abiem agentais vienu metu. Šiuo atveju pageidautina vartoti agentą, kuris skatina hemostazę, ir agentą, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, vienu metu, pavyzdžiui, kompozicijos, kurioje yra abu agentai, formoje.

Kituose įgyvendinimo variantuose pageidautina vartoti agentus atskirai, pvz., norint padidinti agentų stabilumą arba palengvinti agentų vartojimo išdėstymą tam tikra tvarka. Viename įgyvendinimo variante tam tikra tvarka išdėstytas vartojimas gali būti pageidautinas norint pasiekti hemostazę skatinančio agento optimalų terapinį poveikį, optimaliai inhibuojant imuninį atsaką, geriausia antikūninį atsaką į šį agentą. Pavyzdžiui, agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą, gali būti vartojamas vienas prieš hemostazę skatinančio agento vartojimą arba gali būti vartojamas vienas keletą dienų po hemostazę skatinančio agento įvedimo.

Viename įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, gali būti vartojamas nuolat, pvz. kiekvieną kartą, kai įvedamas hemostazę skatinantis agentas. Kitame įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra vartojamas pavieniais atvejais. Pavyzdžiui, subjektą gali reikėti gydyti hemostazę skatinančiu agentu reguliariai, bet gydymą agentu, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, gali būti periodinis. Pavyzdžiui, gydymas hemostazę skatinančiu agentu gali būti tebevykstantis, bet gali pakakti vieno arba dviejų subjekto gydymų agentu, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje; tolimesnis agento, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, įvedimas gali būti nebereikalingas. Tinkamiausiame įgyvendinimo variante agentas, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, yra vartojamas tam tikrais intervalais mažiausiai apie 6 mėnesius.

Viename įgyvendinimo variante šio išradimo agentai arba kompozicijos yra skiriami pacientams, jeigu buvo rasta, kad pacientas turi jau esančių antikūnų. Kitame įgyvendinimo variante šio išradimo agentai arba kompozicijos yra skiriami anksčiau negydytiems pacientams, t.y. neturintiems jau esančių antikūnų. Dar kitame įgyvendinimo variante šio išradimo agentai arba kompozicijos yra skiriami pacientams, kurie anksčiau buvo gydyti, bet jie neturi antikūnų titrų prieš hemostazę skatinantį agentą.

Norint pasiekti optimalų terapinį atsaką kiekvienam subjektui, gali būti pritaikytas dozavimo režimas be didelio eksperimentavimo. Pavyzdžiui, gali būti išmatuojami antikūnų prieš hemostazę skatinantį agentą titrai, norint nustatyti, ar subjekte išsivystė, ar neišsivystė imuninis atsakas į agentą, ir atitinkamai pritaikytas dozavimo režimas. Pavyzdžiui, jei antikūnų prieš hemostazę skatinantį agentą titrai didėja, gali būti skiriamos didesnės agento, kuris blokuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, dozės.

Įvedant subjektui agentus arba kompozicijas ne parenteriniu būdu, gali reikėti jas padengti, arba vartoti jas su medžiaga, kuri apsaugo nuo jų inaktyvacijos. Šio išradimo agentas arba kompozicija gali būti įvedami individui tinkamame nešiklyje arba skiediklyje, įvedami kartu su fermentų inhibitoriais arba atitinkamame nešiklyje, tokiame kaip liposomos. Farmaciškai priimtinais skiedikliais yra fiziologinis druskos tirpalas ir vandeniniai buferių tirpalai. Fermentų inhibitoriais yra kasos tripsino inhibitorius –

diizopropilfluorofosfatas (DEP) ir trafilolis. Liposomomis yra vanduo-alyvoje-vandenyje emulsijos bei įprastos liposomos (Strejan et al., (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Veiklusis agentas arba kompozicija taip pat gali būti įvesta parenteriniu arba intraperitoniniu būdu. Gali būti pagaminamos dispersijos glicerolyje, skystuose polietilenglikoliuose ir jų mišiniuose, bei aliejuose. Esant įprastoms laikymo ir naudojimo sąlygoms, į preparatus gali būti įdėta medžiagos, apsaugančios nuo mikroorganizmų augimo.

Injekcijoms tinkančios farmacinės kompozicijos apima sterlius vandeninius tirpalus (jeigu yra tirpios vandenyje) arba dispersijas ir sterilius miltelius sterilių tirpalų arba injekcinių dispersijų staigiam paruošimui. Visais atvejais agentas arba kompozicija turi būti sterili ir turi būti skysta tokiu laipsniu, kad būtų nesunku ją suleisti švirkštu. Ji turi būti stabili gamybos ir laikymo sąlygomis ir turi būti apsaugota nuo užteršimo mikroorganizmais, tokiais kaip bakterijos arba grybai. Nešikliu gali būti tirpiklis arba disperguojanti terpė, turinti, pavyzdžiui, vandens, etanolio, poliolio (pavyzdžiui, glicerolio, propileglikolio, skysto polietilenglikolio ir pan.) ir tinkamų jų mišinių. Tinkamas skystumas gali būti palaikomas, pavyzdžiui, panaudojant dangą, tokią kaip lecitino, palaikant reikiamą dalelių dydį dispersijų atveju ir naudojant paviršinio aktyvumo medžiagas. Apsaugoti nuo mikroorganizmų poveikio galima įvairiais antibakteriniais ir antigrybeliniais agentais, pavyzdžiui, parabenais, chlorbutanolio, fenolio, askorbo rūgštimi, timerozaliu ir pan. Daugeliu atvejų į kompoziciją pageidautina pridėti izotoninių agentų, pavyzdžiui, cukrų, polialkoholių, kaip antai manitolio, sorbitolio, natrio chlorido. Injekcijoms skirtų kompozicijų prailguota absorbcija gali būti gauta, į kompoziciją pridėdant agento, kuris sulaiko absorbciją, pavyzdžiui aliuminio monostearato ir želatinos.

Sterilūs injekcijoms skirti tirpalai gali būti pagaminami įterpiant reikiamą kiekį veikliosios kompozicijos arba agento į atitinkamą tirpiklį, kuriame yra vienas iš aukščiau išvardintų ingredientų arba, jeigu reikia, jų derinys, o po to steriliai nufiltruojant. Dispersijos paprastai yra gaminamos įterpiant veiklųjį junginį į sterilių tirpiklį, kuriame yra pagrindinė dispersijos terpė ir kiti reikalingi aukščiau išvardinti ingredientai. Sterilių miltelių, skirtų steriliems injekcijų tirpalams paruošti, atveju tinkamiausi pagaminimo būdai yra džiovinimas

vakuume ir liofilizacija, duodantys veikliojo ingrediento (pvz. agento arba kompozicijos) miltelius plius bet kokį norimą ingredientą, iš prieš tai steriliai nufiltruoto jų tirpalo.

Kai veiklusis agentas arba kompozicija yra tinkamai apsaugota, kaip aprašyta aukščiau, baltymas gali būti įvedamas peroraliniu būdu, pavyzdžiui, su inertiniu skiedikliu arba įsisavinamu valgomu nešikliu. Čia naudojamas terminas "farmaciškai priimtinas nešiklis" reiškia bet kurį ir visus tirpiklius, dispergavimo terpes, dangas, antibakterinius ir antigrybelinius agentus, izotoninius ir absorbciją sulaikančius agentus ir pan. Tokių terpių ir agentų panaudojimas farmaciškai veiklioms medžiagoms yra gerai žinomas. Suprantama, kad kai kokia nors įprasta terpė arba agentas yra nesuderinami su veikliuoju junginiu, jų panaudojimas terapinėse kompozicijose yra diskutuotinas. Į šias kompozicijas taip pat gali būti pridedama papildomų veikliųjų junginių.

Ypatingai pageidautina pagaminti parenterines kompozicijas dozuotų vienetų forma, tokiu būdu palengviant vartojimą ir dozavimo vienodumą. Čia naudojamas terminas "dozuoto vieneto forma" reiškia fiziškai atskirus vienetus, tinkančius kaip vienetinės dozės gydomam žinduoliui; kiekviename vienete yra nustatytas veikliojo junginio kiekis, apskaičiuotas taip, kad duotų norimą terapinį efektą, kartu su reikiamu farmaciniu nešikliu. Šio išradimo dozuotų vienetų formų specifikaciją diktuoja ir ji yra tiesiogiai priklausoma nuo (a) veikliojo junginio unikalių charakteristikų ir konkretaus norimo pasiekti efekto ir (b) apribojimų, būdingų tokio veikliojo agento arba kompozicijos, skirtų individų gydymui, sukomponavimui.

Čia naudojamas terminas "farmaciškai priimtinas nešiklis" reiškia bet kurį ir visus tirpiklius, dispergavimo terpes, dangas, antibakterinius ir antigrybelinius agentus, izotoninius ir absorbciją sulaikančius agentus ir pan. Tokių terpių ir agentų panaudojimas farmaciškai veiklioms medžiagoms yra gerai žinomas. Taip pat gali būti pridedama papildomų agentų.

Šio išradimo praktikoje bus naudojamos, jeigu nenurodyta kitaip, įprastos ląstelės biologijos, ląstelių kultūrų, molekulinės biologijos, mikrobiologijos, rekombinantinių DNR ir imunologijos metodikos, kurios yra žinomos specialistams. Tokios metodikos yra pilnai išaiškintos literatūroje. Žr. pavyzdžiui, *Genetics; Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by

Sambrook, J. et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)); *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Ed., ed. by Ausubel, F. et al. (Wiley, NY (1995)); *DNA Cloning*, Volumes I and II (D.N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. (1984)); Mullis et al. U.S. Patent No:4,683,195; *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1984)); traktatas *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London (1987)); *Handbook of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blachwell, eds. (1986)); ir Miller, J. *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972)).

Visų šioje paraiškoje pacituotų literatūros šaltinių, laukiančių sprendimo patentinių paraiškų ir publikuotų patentų tikslus turinys čia pridedamas kaip literatūros šaltiniai.

Išradimas toliau yra iliustruojamas pavyzdžiais, kurie neturėtų būti laikomi jį apribojantys.

PAVYZDŽIAI

Pavyzdžiuose inhibitorių naujųjų prevencijos ir gydymo būdų įvertinimui buvo naudojamas A hemofilijos pelės modelis. A hemofiliją turinčios pelės, kurios gaunamos tikslingai suardžius VIII faktoriaus geno 16 egzoną, plazmoje neturi pastebimo kiekio aktyvaus VIII faktoriaus (Bi L., *Nature Genetics* 10:119, 1995) ir šiuo požiūriu jos yra panašios į pacientus su stipria A hemofilija. Kaip ir galima tikėtis, A hemofiliją turinčios pelės *in vivo* turi koaguliacijos kaskados požymius su mirtį sukeliančiu kraujavimu, jeigu yra joms nupjaunamos uodegos nenaudojant hemostazinių priemonių, ir joms atsiranda poodinis arba raumenyse esantis kraujavimas po palaikymo rankose arba laikino imobilizavimo (Qian J., Borovok M., Bi L., Kazazian H.H., Hoyer L. *Thromb. Haemost.* 81:940, 1999; Evans G.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5734, 1998).

Žmogaus VIII faktoriaus 0,2 µg intraveninė infuzija – dozė, kuri pagal masę yra ekvivalentiška A hemofilija sergantiems pacientams skiriamai dozei

– po vienos injekcijos duoda minimalų arba nesukelia jokio antikūninio atsako šioms A hemofiliją turinčioms pelėms, tačiau pakartotina infuzija duoda didesnį inhibicinio anti-VIII faktoriaus titrą (Qian J. et al. *Thromb. Haemost.* 81:940, 1999). Be to, praėjus trims dienoms po pirmojo žmogaus VIII faktoriaus įvedimo, prieš aptinkant antikūnus, buvo pastebėtas VIII faktoriui būdingas T ląstelių proliferacinis atsakas.

1 pavyzdys. Pirminio imuninio atsako į VIII faktorių inhibavimas

Eksperimento planas šiam pavyzdžiui yra parodytas fig.1. Nulinę dieną trims pelių grupėms į veną buvo suleista VIII faktoriaus. Vienai pelių grupei dieną prieš ir dieną po VIII faktoriaus injekcijos taip pat buvo suleista CTLA4-Ig. Antroji pelių grupė gavo tą patį apdorojimą CTLA4-Ig (intraperitoniniu būdu) po kasdieninių VIII faktoriaus injekcijų nuo 2 iki 12 dienos. Trečioji grupė visai negavo CTLA4-Ig. Iš gyvuliukų buvo paimtas kraujas 20, 37, 58 ir 82 dieną. Pelės, kurios negavo CTLA4-Ig, turėjo didelius antikūnų titrus pradedant jau nuo 20 dienos, o pelės, kurios gavo CTLA4-Ig, antikūnų neatsirado iki 82 dienos (fig.2).

2 pavyzdys. Antrinio imuninio atsako į VIII faktorių inhibavimas

Eksperimento planas šiam pavyzdžiui yra parodytas fig.3. Šiame pavyzdyje pelės gavo daugkartines intravenines VIII faktoriaus injekcijas kas dvi savaitės, o po to buvo padalintos į dvi grupes. Pelėms buvo vėl suleista VIII faktoriaus 1, 20 ir 37 dieną. Vienai pelių grupei buvo suleista CTLA4-Ig -1 ir +1 dieną, skaičiuojant nuo 1, 20 ir 37 dienos, kai buvo duodamos VIII faktoriaus injekcijos. Gyvuliukai, kurie negavo CTLA4-Ig, turėjo didelius anti-VIII faktoriaus titrus, o CTLA4-Ig gavusios pelės (išskyrus vieną) nerodė antrinio imuninio atsako į VIII faktorių (fig.4).

3-6 pavyzdžiuose buvo naudoti tokie metodai ir medžiagos:

Gyvuliukai. Egzon-16 (E-16) kamieno hemofilinių pelių charakteristikos buvo aprašytos Bi L., et al. *Nature Genetics* 10:119, 1995; Bi L., et al. *Blood* 88:3446, 1996. Šiuose tyrimuose buvo naudoti suaugę pelių patinai ir 10-20 savaičių amžiaus homozigotinės E-16 patelės. Kraujo mėginiai buvo paimti iš akiduobės veninio rezginio ir serumas buvo atskirtas centrifuguojant, esant

600g, 3 minutes. Iki tyrimo serumo mėginiai buvo laikomi -20°C temperatūroje. Norint išvengti stipraus nukraujavimo ir gyvuliukų žūties, kai kuriuose eksperimentuose pelėms identifikuoti nebuvo naudojamas ausų žymėjimas. Dėl šios priežasties fig.5 nenurodyti nuoseklūs duomenys atskiroms pelėms.

E-16/B7-1 ir B7-2 dvigubo eliminavimo pelės buvo gautos panaudojant E-16 sukryžminimą su B7-1 ir B7-2 eliminuotomis pelėmis (Borriello F, et al. 1997, *Immunity* 6:303). Homozigotinės E-16/B7-1 ir E-16/B7-2 dvigubo eliminavimo pelės buvo identifikuotos nustatant genotipą (Bi L. et al., *Nature Genetics* 10:119, 1995; Borriello F., et al. *Immunity* 6:303, 1997. Sumažintas VIII faktoriaus aktyvumas buvo tikrintas, panaudojant Coatest chromogeninį biotestą (Chromogenix, Molndal, Sweden) (Bi L., et al. *Blood* 88:3446, 1996). VIII faktoriaus aktyvumas buvo mažesnis už 1 % ir E-16/B7-1, ir E-16/B7-2 deficitą turinčiose pelėse.

Antigenai. Rekombinantinis žmogaus VIII faktorius buvo gautas iš Hyland Division of Baxter Healthcare Corp. (Glendale, CA).

mCTLA-4Ig. Pelės CTLA4-Ig kDNR ekspresijos plazmidė buvo pagaminta prijungiant pelės CTLA4 lyderinę ir ekstraląstelinę dalis prie lanksto, IgHg2a CH2 ir CH3 dalių, kuris buvo mutuotas norint pašalinti efektorines funkcijas, kaip aprašyta Streurer et al. (Streurer, *J. Immunol.* 155:1165, 1995). Šis intarpas buvo įklonuotas į pED ekspresijos vektorių ir pastoviai transfekuotas į CHO ląsteles, kaip aprašyta anksčiau (Lollar P. et al., *J. Clin. Invest.* 93:2497, 1994). Koncentruota kondicionuota terpė buvo supilta į rProtein Aepharose Fast Flow chromatografinę kolonėlę (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Kolonėlė buvo plaunama PBS pH 7,1, o mCTLA4-Ig eliuuotas 20 mM citratu pH 3,0. Smailės frakcija buvo neutralizuota 1M Tris pH 8 iki galutinio pH 7,5 ir sumaišyta su pBS pH 7,1, naudojant Amicon maišomą celę su YM30 membrana. mCTLA4-Ig buvo depirogenintas naudojant Poros PI (Perceptive Biosystems) chromatografijos kolonėlę, ir produktas išplautas iš kolonėlės naudojant tiesinį NaCl gradientą nuo 0 iki 1 M NaCl 25 mM Tris pH 7,5. Po to mCTLA4-Ig buvo sudėtas į pBS pH 7,1 naudojant Amicon maišomą celę su YM30 membrana.

Antikūnų matavimai. Anti-VIII faktoriaus titras buvo nustatytas ELISA (Qian J, et al. Inhibitor antibody development and cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb Haemost.* 81:940, 1999). ELISA testai buvo atlikti naudojant mikrotitro duobutes, padengtas rekombinantiniu žmogaus VIII faktoriumi, 0,8 µg/ml 0,05 mol/ml karbonate-rūgščiame karbonate, pH 9. Palaikius pelės plazmos mėginius duobutėse per naktį 4 °C temperatūroje ir perplovus, pridedama ožkos anti-pelės IgG (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) ir palaikoma 2 val. kambario temperatūroje. Perplovus pridedama p-nitrofenilfosfato (Sigma, St. Louis, MO), 2 mg/ml 100 mmol/l glicino, 1 mmol/l MgCl₂, 2 mmol/l ZnCl₂, pH 10,4 ir matuojamas optinis tankis, esant 410 nm bangos ilgiui, automatiniu mikrotitro plokštelių ELISA skaitikliu. Anti-VIII faktoriaus antikūnų koncentracija įvertinama iš standartinės kreivės, gautos naudojant monokloninį pelės IgG anti-žmogaus VIII faktoriaus antikūną, kuris rišasi prie A2 vietos (Mab 413) (Lollar P. et al., *J. Clin. Invest.* 93:9497, 1994). Titras buvo apskaičiuotas iš taškų, kurie patenka į standartinės kreivės tiesinę dalį.

Anti-VIII faktoriaus inhibitoriaus titrai Bethesda vienetais (BU) buvo išmatuoti panaudojant Bethesda testą (Kasper C.K. *Thromb et Diath Haem* 30:263, 1973).

T ląstelių proliferacijos tyrimai. Proliferacijos bandymams T ląstelių šaltiniu buvo naudojama blužnis. Blužnies ląstelės buvo auginamos (5 x 10⁵/duobutei) 96 duobučių plokščiadugnėse plokštelėse. Į auginimo terpę, susidedančią iš pilnos RPMI-1640, turinčios 0,5 % hemofilinio pelės serumo, pridedami įvairūs kiekiai rekombinantinio VIII faktoriaus. Po 72 val. auginimo 37 °C temperatūroje pridedama 37 kBp ³H-timidino/duobutei (6,7 Ci/mmol, ICN Pharmaceuticals Irvine, CA). Po 16 valandų, kultūros apdorojamos, naudojant Matrix 9600 (Packard, Meriden, CT). Duomenys išreiškiami kaip įsiterpusio į netirpią DNR trijų vienodų duobučių cpm vidurkis.

3 pavyzdys. mCTLA4-Ig blokuoja anti-VIII faktoriaus atsako indukavimą

Anti-VIII faktoriaus inhibiciniai antikūnai buvo indukuoti kontrolinėse pelėse, panaudojant 1 μg rekombinantinio žmogaus VIII faktoriaus pakartotines injekcijas kas trys savaitės. Šiame pavyzdyje keturioms A hemofiliją turinčioms pelių grupėms buvo suleistas rekombinantinis žmogaus VIII faktorius 0, 23, 44 ir 66 dieną (iš pradžių 1 μg i.v., po to 0,2 μg 2, 3 ir 4-os injekcijų atveju). G-3 ir G-4 pelių grupėms 2-12 dienomis taip pat buvo suleista į pilvaplėvę 0,2 μg VIII faktoriaus. Kraujo mėginiai anti-VIII faktoriaus testui buvo paimti 20, 37, 58 ir 82 dieną. Kontrolinėms grupėms (balti apskritimai) buvo suleista tik VIII faktoriaus. G-2 ir G-4 grupėms (juodi apskritimai) taip pat buvo suleista mCTLA4-Ig (250 μg , i.p.) dieną prieš ir dieną po pirmosios VIII faktoriaus injekcijos. Anti-VIII faktoriaus antikūno koncentracija buvo nustatyta ELISA metodu. Anti-VIII faktoriaus testo duomenų taškai, pažymėti <0,16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, buvo panašūs į plazmos mėginių, gautų iš neimunizuotų A hemofiliją turinčių pelių, rezultatus. Šio eksperimento rezultatai yra parodyti fig.5 (atkreipkite dėmesį, kad fig.5 yra kartojami kai kurie fig.2 parodyti rezultatai, bet yra pridėta papildomų duomenų).

Anti-VIII faktorius buvo aptiktas keturiose iš penkių pelių, praėjus 20 dienų po pirmosios injekcijos, ir visoms kontrolinėms pelėms išsivystė didelis anti-VIII faktoriaus titras, kai jos gavo nuo dviejų iki keturių injekcijų. Vidutinis inhibicijos lygis po keturių injekcijų buvo 1860 Bethesda vienetų (BU). Anti-VIII faktoriaus antikūnų susidarymas buvo žymiai sumažintas pelėse, kurioms intraperitoniniu būdu buvo suleista 250 μg pelės CTLA4-Ig dieną prieš ir dieną po pirmosios VIII faktoriaus injekcijos (G-2 grupė, fig.5), net ir tada, kai nebuvo duota mCTLA4-Ig, suleidus tris sekancias VIII faktoriaus porcijas 23, 44 ir 66 dienomis. Anti-VIII faktoriaus nebuvo rasta nei vienoje G-2 grupės pelėje po pirmosios arba antrosios VIII faktoriaus injekcijos. Praėjus trims savaitėms po trečiosios VIII faktoriaus injekcijos, G-2 grupėje silpnas imuninis atsakas buvo rastas dviems iš šešių pelių.

Norint ištirti, ar atsako nebuvimo ribota trukmė yra žmogaus VIII faktoriaus trumpo gyvavimo puslaikio šiose pelėse rezultatas (4-5 valandos pelių A hemofilijos atveju) (Evans G.L. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5734, 1998), kontrolinėms ir mCTLA4-Ig paveiktoms pelėms (G-3 ir G-4 grupės, fig.5) buvo suleista į veną 1 μg VIII faktoriaus 2-12 dienomis.

Kontrolinėse pelėse (G-3 grupė) 20 dieną buvo didelis anti-VIII faktoriaus titras: daugiau nei 350 $\mu\text{g/ml}$ pagal ELISA ir vidutinis 694 BU inhibitoriaus titras. Priešingai, G-4 grupės pelėse, kurioms dieną prieš ir dieną po pirmojo VIII faktoriaus įvedimo buvo suleista mCTLA4-Ig, 20 dieną aptinkamo anti-VIII faktoriaus kiekio nebuvo. Anti-VIII faktoriaus antikūninio atsako uždelsimas po trijų papildomų VIII faktoriaus injekcijų buvo toks pat šioms pelėms, kaip ir G-2 grupės gyvuliukams. Taigi, ribotas VIII faktoriaus stabilumas plazmoje po CTLA4-Ig injekcijos nėra atsako nebuvimo ribotos trukmės CTLA4-Ig gydytose pelėse priežastis.

4 pavyzdys. Pakartoto CTLA4-Ig įvedimo efektai

Kadangi po pakartotinių VIII faktoriaus infuzijų buvo nustatytas uždelstas anti-VIII faktoriaus atsakas, kai mCTLA4-Ig buvo duotas tik pirmojo VIII faktoriaus įvedimo metu, buvo nustatyta, ar mCTLA4-Ig gali apsaugoti nuo anti-VIII faktoriaus atsiradimo, jeigu jis yra duodamas su kiekviena VIII faktoriaus infuzija. Šiame eksperimente (fig.6) A hemofiliją turinčioms pelėms vienu metu buvo įvedamas ir VIII faktorius, ir mCTLA4-Ig šešis kartus kas trys savaitės. A hemofiliją turinčioms pelėms į veną buvo suleista 1 μg VIII faktoriaus ir 250 μg mCTLA4-Ig kas 3 savaitės (juodi apskritimai), arba po pirmosios injekcijos, kurioje buvo ir VIII faktorius, ir mCTLA4-Ig, buv leistas tik vienas VIII faktorius (balti apskritimai). Serumo mėginiai anti-VIII faktoriaus testui buvo paimti praėjus 4 savaitėms po šeštosios VIII faktoriaus injekcijos. Nei vienoje iš dešimties tokiu būdu paveiktų pelių nebuvo aptikta anti-VIII faktoriaus, kai jos buvo tiriamos praėjus keturioms savaitėms po šeštosios VIII faktoriaus injekcijos. Priešingai, pelių, kurios gavo tik vieną mCTLA4-Ig injekciją (pirmojo poveikio VIII faktoriumi metu), o po to buvo veikiamos vien tik VIII faktoriumi, serume buvo didelis anti-VIII faktoriaus titras.

Šios mCTLA4-Ig paveiktos pelės po to buvo tiriamos norint nustatyti, ar jos turės imuninį atsaką po papildomų VIII faktoriaus injekcijų nesant mCTLA4-Ig. Po 2 intraveninių injekcijų kas 3 savaitės nei vienai iš 5 pelių neatsirado anti-VIII faktoriaus, tuo tarpu kai nedidelis anti-VIII faktoriaus kiekis buvo rastas dviejose iš keturių kontrolinių pelių, kurios anksčiau nebuvo veiktos nei VIII faktoriumi, nei mCTLA4-Ig (fig.7). Šiame eksperimente A

hemofiliją turinčios pelės, paveiktos, kaip aprašyta fig.6, šešiomis ir VIII faktoriaus, ir mCTLA4-Ig injekcijomis, po to dar gavo šešias intravenines 0,2 μ g VIII faktoriaus injekcijas kas trys savaitės be papildomo mCTLA4-Ig (juodi apskritimai). Lygiagrečiai buvo imunizuotos kontrolinės pelės, prieš tai negavę VIII faktoriaus (balti apskritimai). Serumo mėginiai anti-VIII faktoriaus testui buvo paimti praėjus 3 savaitėms po 2 ir 6 injekcijų. Po šešių vien tik VIII faktoriaus injekcijų vidutinis VIII faktoriaus titras buvo 93 μ g/ml pelėms, kurios anksčiau gavo ir VIII faktorių, ir mCTLA4-Ig, o kontrolinėms pelėms vidutinis titras buvo 155 μ g/ml. Šie duomenys atspindi antigenui specifinės imuninės supresijos, atsirandančios dėl pakartotino mCTLA4-Ig įvedimo su VIII faktoriumi, ribas.

5 pavyzdys. mCTLA4-Ig slopina antrinį imuninį atsaką į VIII faktorių

Norint nustatyti, ar mCTLA4-Ig modifikuoja antrinį imuninį atsaką į VIII faktorių, mCTLA4-Ig buvo suleistas tuo pačiu metu kaip ir buvo įvestas VIII faktorių A hemofiliją turinčioms pelėms, kuriose jau atsirado anti-VIII faktoriaus. Iš pradžių visoms A hemofiliją turinčioms pelėms tris kartus buvo suleista po 0,2 μ g VIII faktoriaus, ir ELISA buvo nustatytas anti-VIII faktoriaus kiekis. Tada kontrolinės pelės gavo tris papildomas VIII faktoriaus injekcijas, o likusioms pelėms buvo įvestas mCTLA4-Ig tuo pačiu metu, kai jos gavo pirmąją iš trijų papildomų VIII faktoriaus injekcijų. Nors dauguma pelių nugaišo nuo nukraujavimo komplikacijų šio eksperimento metu, atsiradusių dėl pakartotinių injekcijų ir kraujo mėginių paėmimo, rezultatai abiejose grupėse aiškiai skyrėsi.

Šiame pavyzdyje visos pelės iš pradžių gavo 3 intravenines 0,2 μ g VIII faktoriaus injekcijas kas dvi savaitės. Po to kontrolinėms pelėms (balti apskritimai) buvo suleista VIII faktoriaus dar tris kartus ir paimti kraujo mėginiai testui (viršutinė panelė). Kitoms pelėms (juodi apskritimai) buvo duota mCTLA4-Ig (250 μ g, į pilvaolėvę) dieną prieš ir dieną po 4-osios VIII faktoriaus injekcijos (kaip parodyta strėle), po to dar dvi vien tik VIII faktoriaus injekcijos kas 3 savaitės. VIII faktoriaus injekcijų skaičius prieš kraujo mėginio tyrimą, nustatant anti-VIII faktorių, yra parodytas ant horizontaliosios ašies.

Kontrolinėms pelėms po 4-osios VIII faktoriaus injekcijos buvo pastebėtas anti-VIII faktoriaus titro padidėjimas, titro vidurkiui esant nuo 16 iki 230 $\mu\text{g/ml}$ (fig.8A). Po 5-osios VIII faktoriaus injekcijos visi anti-VIII faktoriaus titrai buvo didesni už 350 $\mu\text{g/ml}$ keturioms likusioms pelėms. Priešingai, pelės, paveiktos mCTLA4-Ig 4-osios VIII faktoriaus injekcijos metu, turėjo minimalų arba visai neturėjo anti-VIII faktoriaus kiekio padidėjimo (fig.8B ir C). mCTLA4-Ig įvedimas inhibavo šį antrinį imuninį atsaką į VIII faktorių pelėms, kurioms jau atsirado santykinai dideli anti-VIII faktoriaus kiekiai, atitinkantys 5-90 BU inhibitoriaus titrus (Qian J., et al. *Thromb. Haemost.* 81:940, 1999) (fig.8C), bei pelėms, kurios turėjo minimalų, mažiau nei 5 BU, anti-VIII faktoriaus kiekį po trijų pradinių infekcijų (fig.8B).

6 pavyzdys. B7-1 ir B7-2 vaidmens pirminiame imuniniame atsake į VIII faktorių nustatymas

Tada buvo įvertinti B7-1 ir B7-2 kostimuliacinių ligandų ant antigenus pateikiančių ląstelių vaidmenys, kadangi buvo priimta, kad būtent nuo jų sąveikos su CD28 yra apsaugoma eksperimentuose, kuriuose naudojamas mCTLA4-Ig. Šiam tikslui mes sukryžminome A hemofiliją turinčias peles su B7-1^{-/-} ir B7-2^{-/-} pelėmis (Borriello F., et al. *Immunity* 6:303, 1997; Freeman G.J. et al. *Science* 262:907, 1993) ir pagal genotipo analizę buvo atrinktos ir VII faktoriaus, ir B7-1, arba B7-2 deficita turinčios pelės. Tada A/B7-1^{-/-} hemofiliją ir A/B7-2^{-/-} hemofiliją turinčioms pelėms buvo suleista į veną 0,2 μg žmogaus VIII faktoriaus kas dvi savaites. Praėjus 12 dienų po 2-osios ir 6-osios VIII faktoriaus injekcijos, buvo paimti serumo mėginiai anti-VIII faktoriui nustatyti. Po keturių injekcijų visoms devynioms A/B7-1^{-/-} hemofiliją turinčioms pelėms (balti apskritimai) atsirado anti-VIII faktoriaus, kurio titrai buvo daugiau nei 350 $\mu\text{g/ml}$, o vidutinis inhibicijos lygis 712 BU (fig.9) – reikšmės, panašios į kitu požiūriu normalias A hemofiliją turinčias peles, kurioms buvo suleista VIII faktoriaus (Qian J., et al. *Thromb. Haemost.* 81:940, 1999). Priešingai, nė viena iš aštuonių A/B7-2^{-/-} hemofiliją turinčių pelių (juodi apskritimai) neturėjo aptinkamų anti-VIII faktoriaus kiekių. Panašūs rezultatai buvo gauti ir su A hemofiliją turinčiomis pelėmis, paveiktomis anti-B7-1 ir anti-B7-2 antikūnais.

Norint įvertinti šių B7-1 ir B7-2 deficitinę A hemofiliją turinčių pelių T ląstelių atsaką, praėjus trimis dienoms po penktosios VIII faktoriaus injekcijos, buvo paimtos blužnies ląstelės. Proliferacijos duomenims gauti buvo sumaišytos 3 pelių blužnies ląstelės. Balti ir juodi apskritimai fig.10 atitinkamai rodo nepaveiktų A/B7-1^{-/-} ir B7-2^{-/-} hemofiliją turinčių pelių ląsteles. Balti apskritimai žymi ląsteles iš A/B7-1^{-/-} hemofiliją turinčių pelių, kurios gavo 5 intravenines FVIII injekcijas, o juodi apskritimai - A/B7-2^{-/-} hemofiliją turinčių pelių, kurios gavo 5 intravenines VIII faktoriaus injekcijas. VIII faktoriaus koncentracija kultūrose yra nurodyta ant horizontaliosios ašies. T ląstelių proliferacinis aktyvumas, nustatytas pagal ³H-timidino įsiterpimą, rodo priklausantį nuo VIII faktoriaus dozės atsaką ląstelių iš A/B7-1^{-/-} hemofiliją turinčių pelių atveju. (fig.10). Priešingai, jokio T atsako nebuvo nustatyta, esant bet kokiam VIII faktoriaus kiekiui blužnies ląstelių iš A/B7-2^{-/-} hemofiliją turinčių pelių atveju. Taigi, imuninio atsako į intraveniniu būdu suleistą VIII faktorių palaikyme pagrindinį vaidmenį vaidina B7-2, ir jeigu jo nėra, anti-VIII faktorius nesusidaro.

Ekvivalentai

Specialistai turėtų pripažinti arba gali įsitikinti, naudodami ne daugiau nei įprastus eksperimentus, kad yra galimi įvairūs čia aprašytų konkrečių kompozicijų ir būdų ekvivalentai. Laikoma, kad tokie ekvivalentai patenka į šio išradimo sferą ir juos apima toliau duodama apibrėžtis.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina pirmasis agentas, kuris skatina hemostazę, ir antrasis agentas, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje.
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina dar ir farmaciškai priimtinas nešiklis.
3. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pirmasis agentas yra VIII faktorius.
4. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pirmasis agentas yra VIII faktoriaus variantas, kuriame pašalinta B-dalis.
5. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pirmasis agentas yra IX faktorius.
6. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pirmasis agentas yra von Willebrand'o faktorius.
7. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antrasis agentas yra kostimuliacinės molekulės tirpi forma.
8. Kompozicija pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antrasis agentas yra tirpi CTLA4 forma.
9. Kompozicija pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antrasis agentas yra tirpi B7-1 forma, tirpi B7-2 forma arba minėtos tirpios B7-1 formos ir minėtos tirpios B7-2 formos derinys.
10. Kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antrasis agentas yra CTLA4Ig.
11. Kompozicija pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antrasis agentas yra B7-1Ig arba B7-2Ig.
12. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antrasis agentas yra tirpi CD40 forma arba CD40L.
13. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antrasis agentas yra antikūnas, kuris jungiasi su kostimuliacine molekule.
14. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antrąjį agentą pasirenka iš grupės, susidedančios iš anti-B7-1 antikūno, anti-B7-2 antikūno ir anti-B7-1 antikūno ir anti-B7-2 antikūno derinio.

15. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad antikūnas yra anti-CD28 antikūno neaktyvuojanti forma.
16. Kompozicija pagal bet kurį 1-15 punktą, skirta panaudoti subjekto hemostazinio sutrikimo gydymui.
17. Kompozicija pagal 16 punktą, skirta panaudoti subjekto, turinčio jau egzistuojantį imuninį atsaką į pirmąjį agentą, hemostazinio sutrikimo gydymui.
18. Kompozicija pagal 16 punktą, skirta panaudoti subjekto, neturinčio jau egzistuojančio imuninio atsako į pirmąjį agentą, hemostazinio sutrikimo gydymui.
19. Kompozicija pagal 16 punktą, turinti papildomą imunosupresinį agentą, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
20. Kompozicija pagal 16 punktą, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo, parinkto iš grupės, susidedančios iš A hemofilijos, B hemofilijos ir von Willebrand'o ligos, gydymui.
21. Kompozicija, turinti pirmąjį agentą, kuris skatina hemostazę, ir antrąjį agentą, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, skirta panaudoti subjekto hemostazinio sutrikimo gydymui.
22. Kompozicija, turinti pirmąjį agentą, kuris skatina hemostazę, ir antrąjį agentą, kuris inhibuoja kostimuliacinį signalą T ląstelėje, skirta panaudoti subjekto hemostazinio sutrikimo gydymui, slopinant imuninį atsaką į pirmąjį agentą.
23. Kompozicija pagal 21 arba 22 punktą, kurioje pirmasis agentas yra VIII faktorius, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
24. Kompozicija pagal 21 arba 22 punktą, kurioje pirmasis agentas yra VIII faktoriaus variantas, kuriame yra pašalinta B dalis, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
25. Kompozicija pagal 21 arba 22 punktą, kurioje pirmasis agentas yra IX faktorius, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
26. Kompozicija pagal 21 arba 22 punktą, kurioje pirmasis agentas yra von Willebrand'o faktorius, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
27. Kompozicija pagal 21 arba 22 punktą, kurioje antrasis agentas yra agento, kuris perduoda kostimuliacinį signalą T ląstelei, tirpi forma, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.

28. Kompozicija pagal 27 punktą, kurioje šis agentas yra tirpi CTLA4 forma, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
29. Kompozicija pagal 28 punktą, kurioje šis agentas yra CTLA4Ig, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
30. Kompozicija pagal 27 punktą, kurioje šis agentas yra tirpi B7-1 forma, tirpi B7-2 forma arba tirpios B7-1 formos ir tirpios B7-2 formos derinys, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
31. Kompozicija pagal 30 punktą, kurioje šis agentas yra B7-1Ig, B7-2Ig arba ir B7-1Ig, ir B7-2Ig derinys, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
32. Kompozicija pagal 21 arba 22 punktą, kurioje antrasis agentas yra antikūnas, kuris jungiasi su kostimuliacine molekule, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
33. Kompozicija pagal 32 punktą, kurioje antrasis agentas yra parinktas iš grupės, susidedančios iš anti-B7-1 antikūno, anti-B7-2 antikūno ir anti-B7-1 antikūno ir anti-B7-2 antikūno derinio, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
34. Kompozicija pagal 32 punktą, kurioje antikūnas yra anti-CD28 antikūno neaktyvuojanti forma, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo gydymui.
35. Kompozicija pagal 21 arba 22 punktą, skirta panaudoti hemostazinio sutrikimo, parinkto iš grupės, susidedančios iš A hemofilijos, B hemofilijos ir von Willebrand'o ligos, gydymui.
36. Kompozicija pagal 21 arba 22 punktą, skirta panaudoti subjekto, kuris turi didelį antikūnų, kurie jungiasi su pirmuoju agentu, titrą, hemostazinio sutrikimo gydymui.

1/10

Pirminio imuninio atsako į FVIII inhibavimas

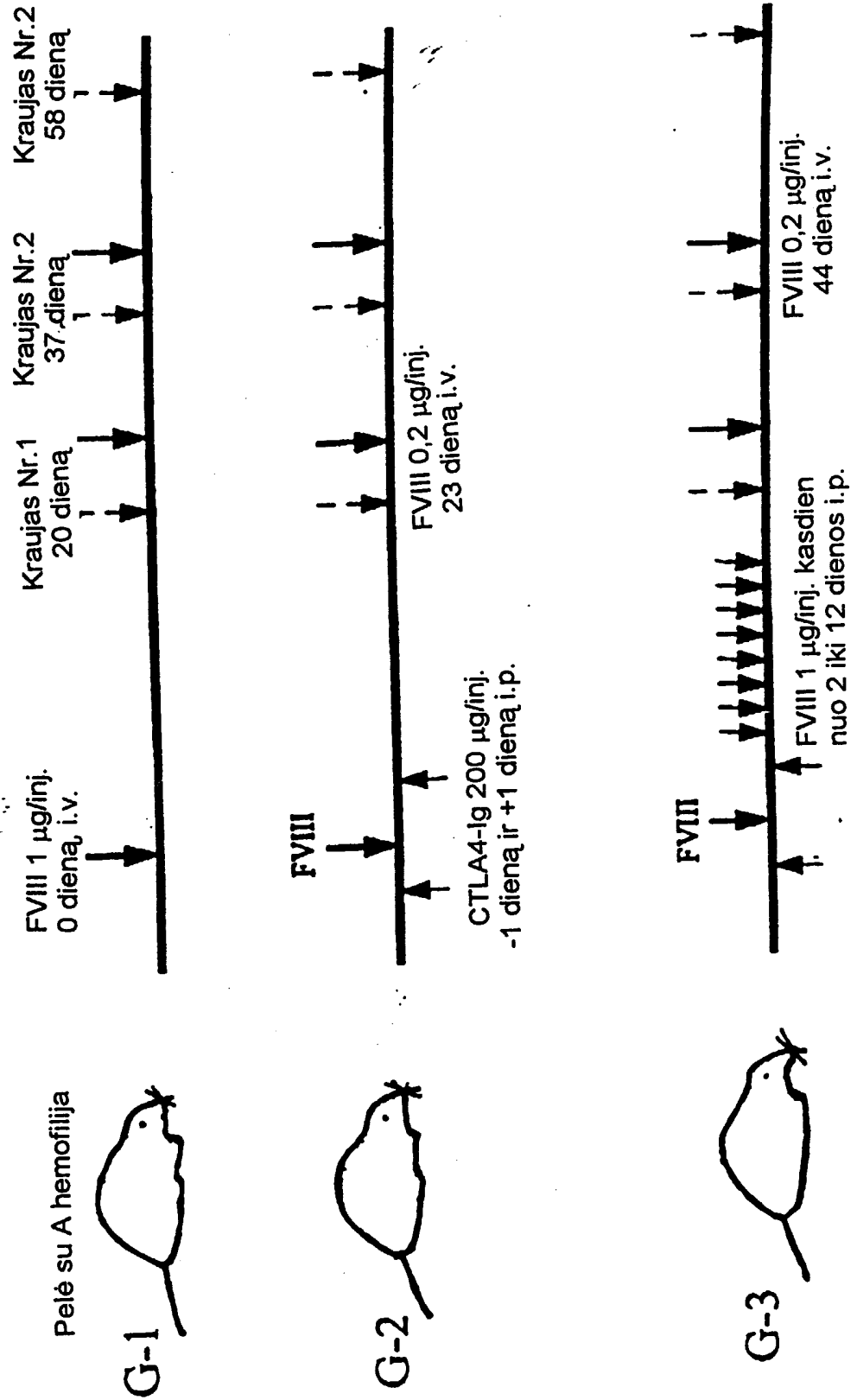


Fig.1.

Imuninio atsako į FVIII inhibavimas mCTLA4-Ig pelių A hemofilijos atveju

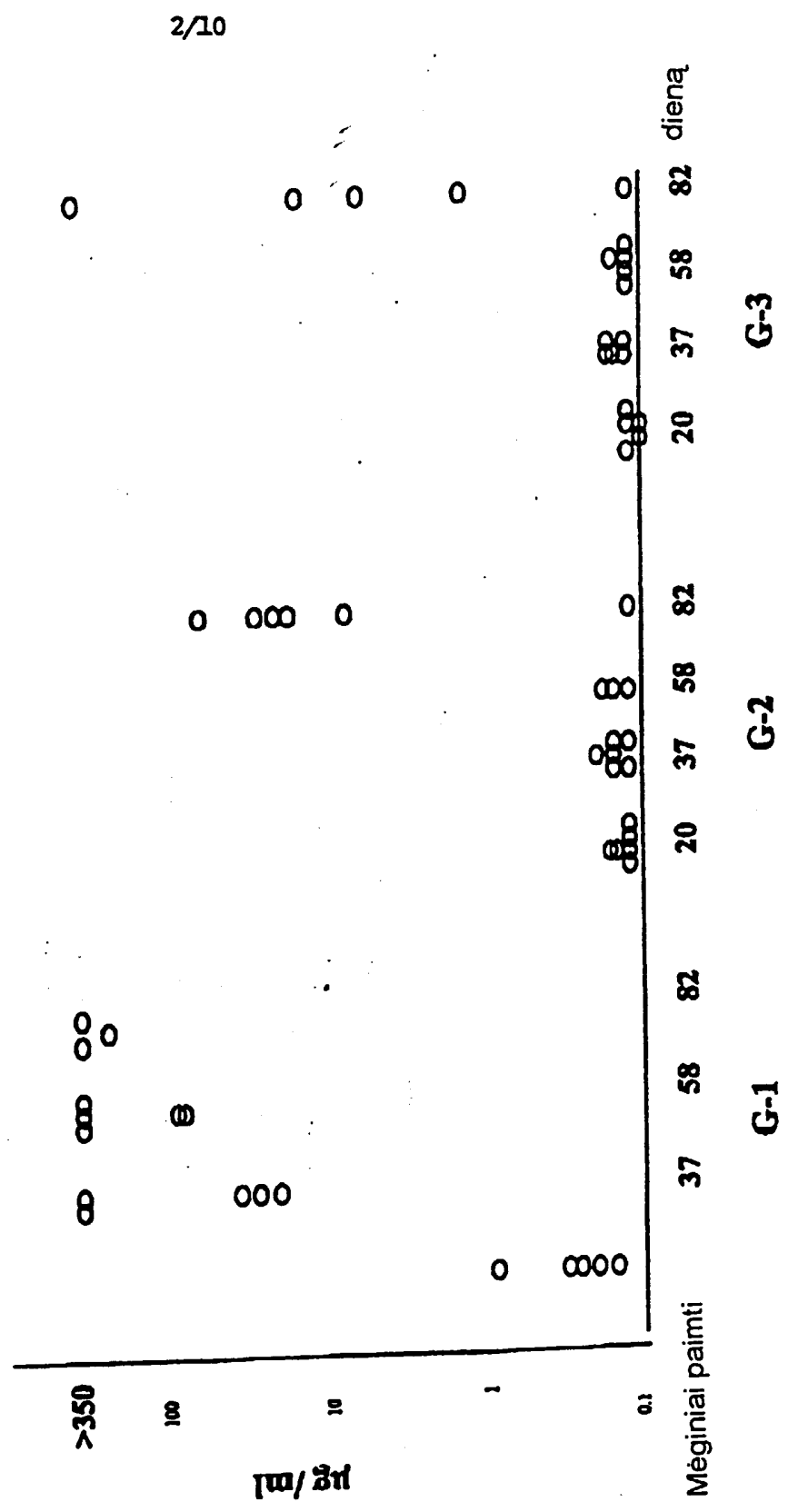


Fig.2

Gydymas inhibitoriumi naudojant CTLA4-Ig

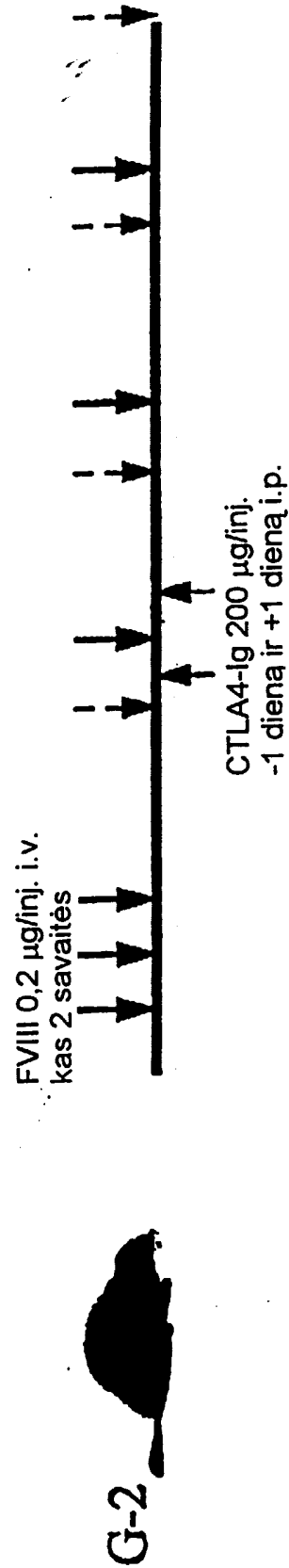
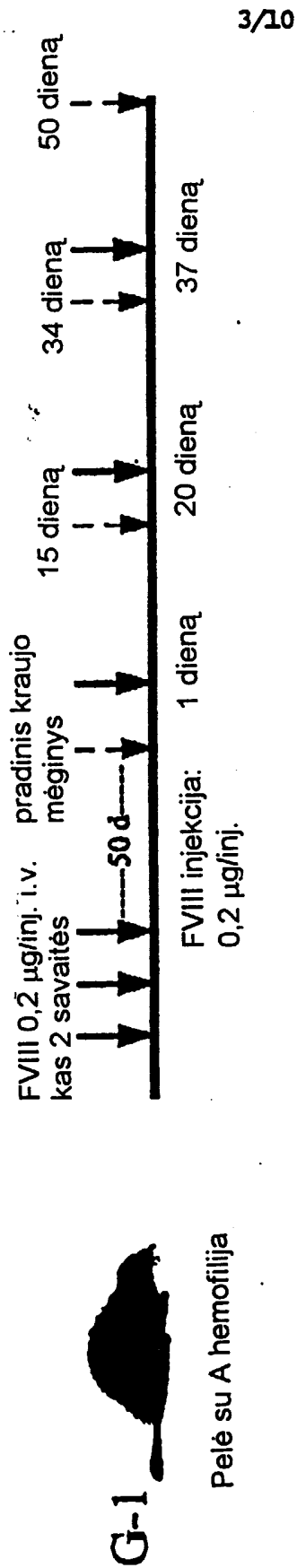


Fig.3

Antrinio imuninio atsako į FVIII inhibavimas mCTLA4-Ig pelių A
hemofilijos atveju

4/10

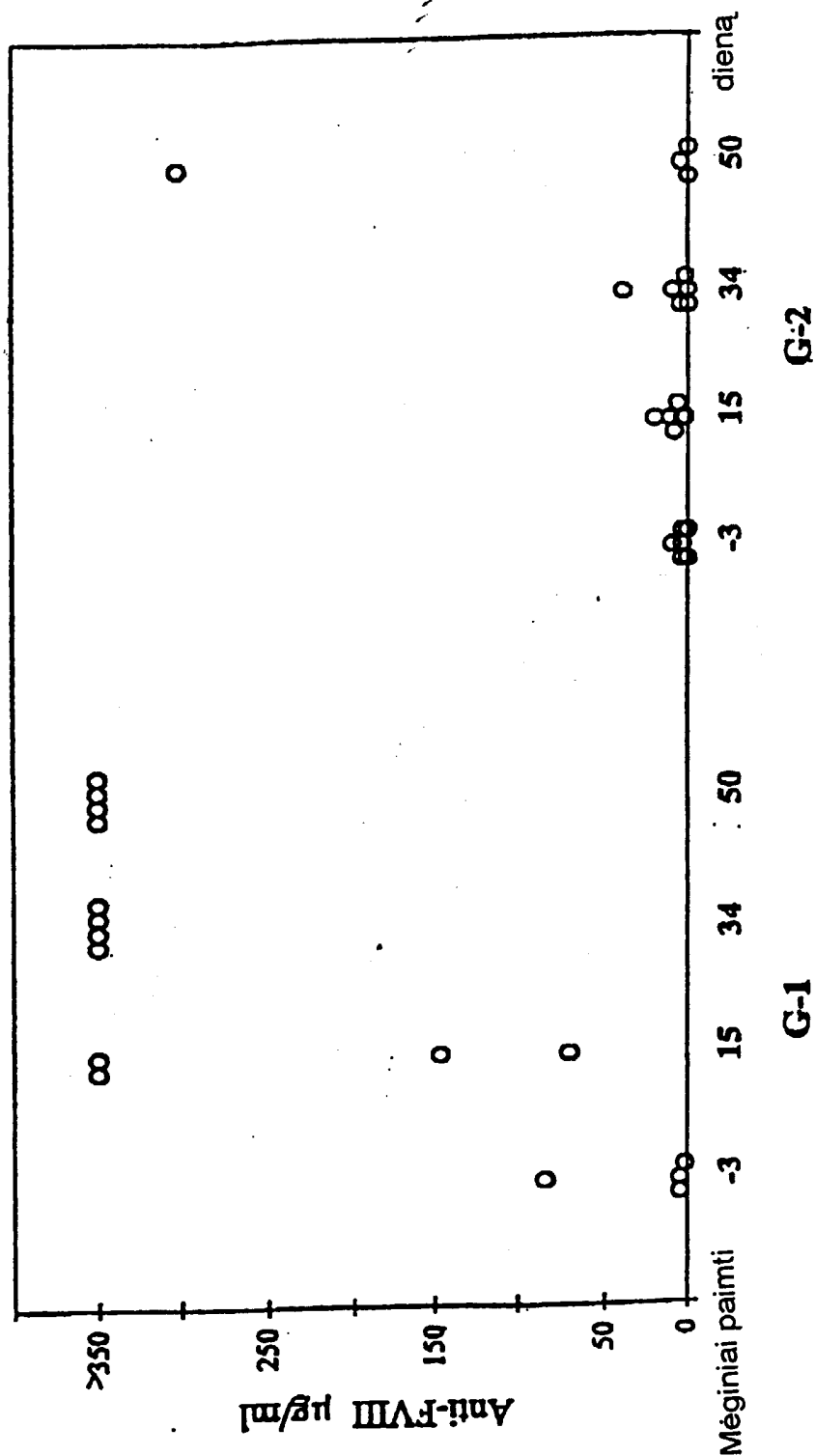


Fig.4

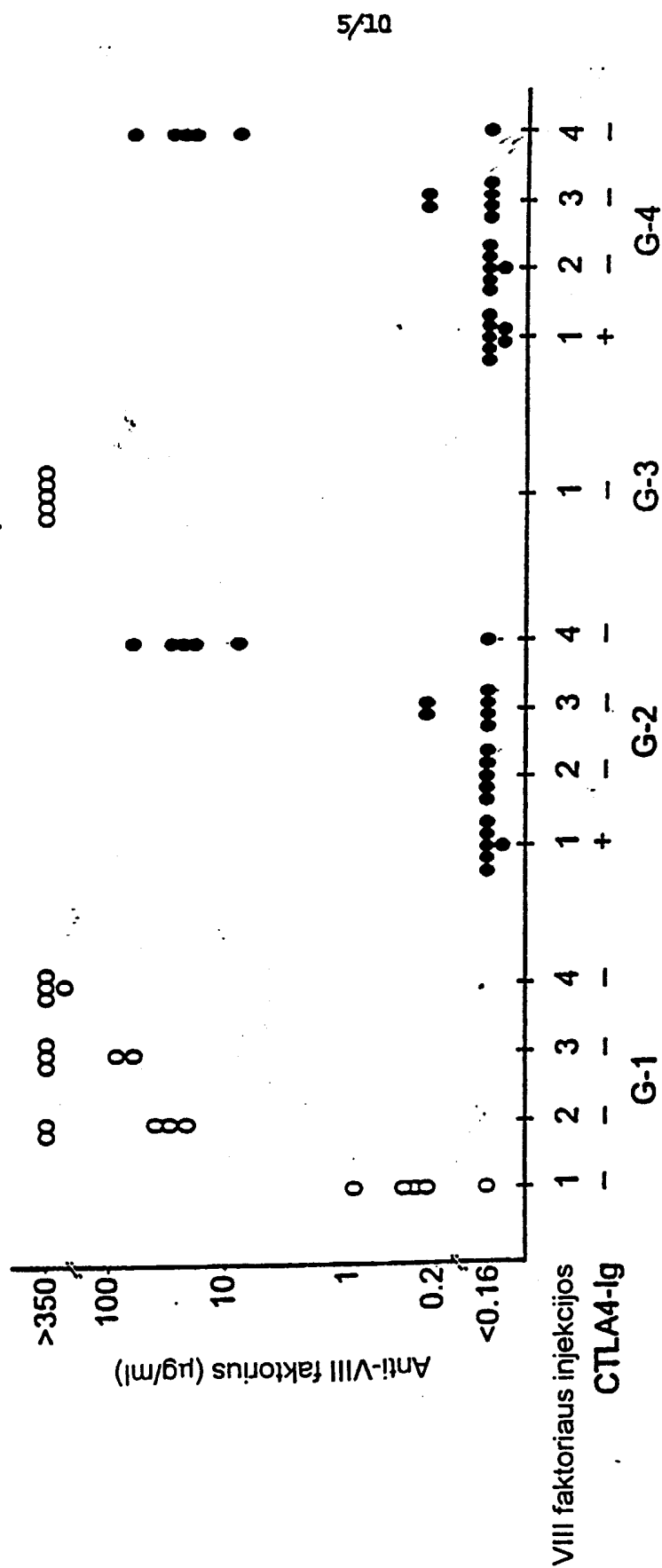


Fig.5

6/10

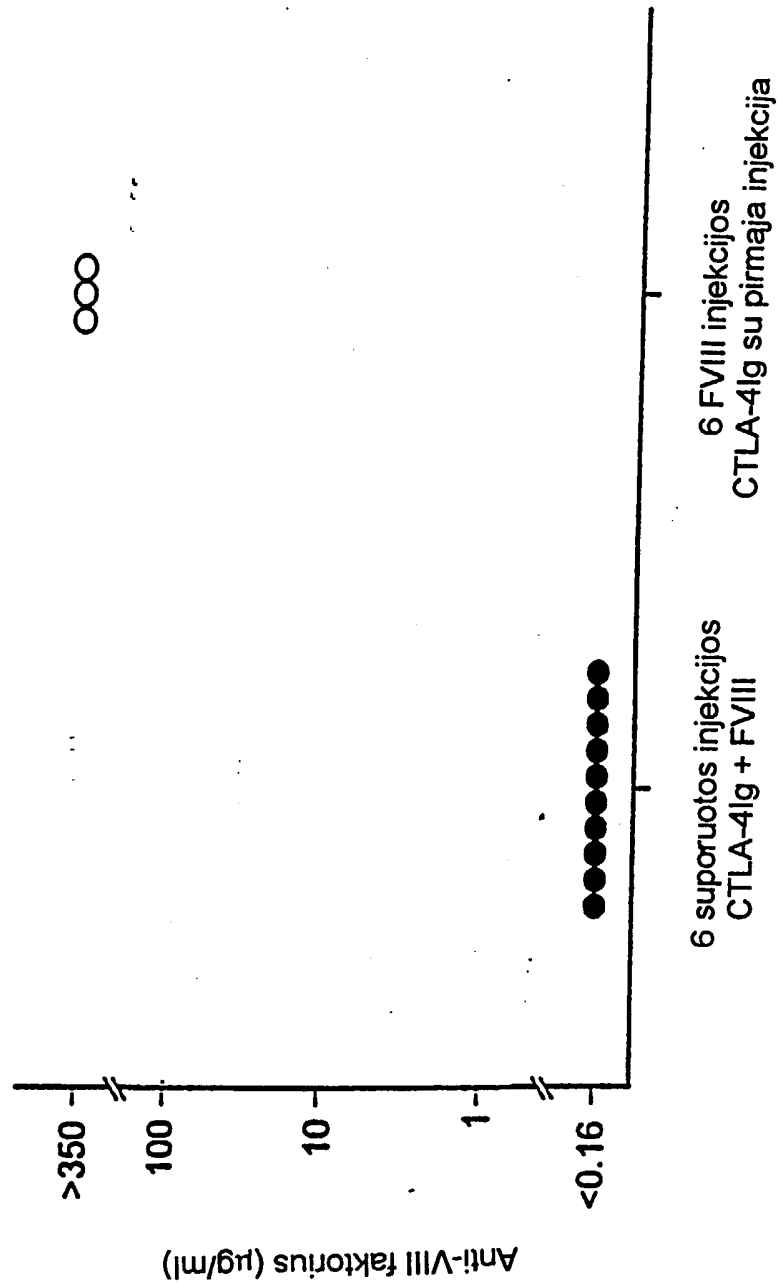


Fig.6

7/10

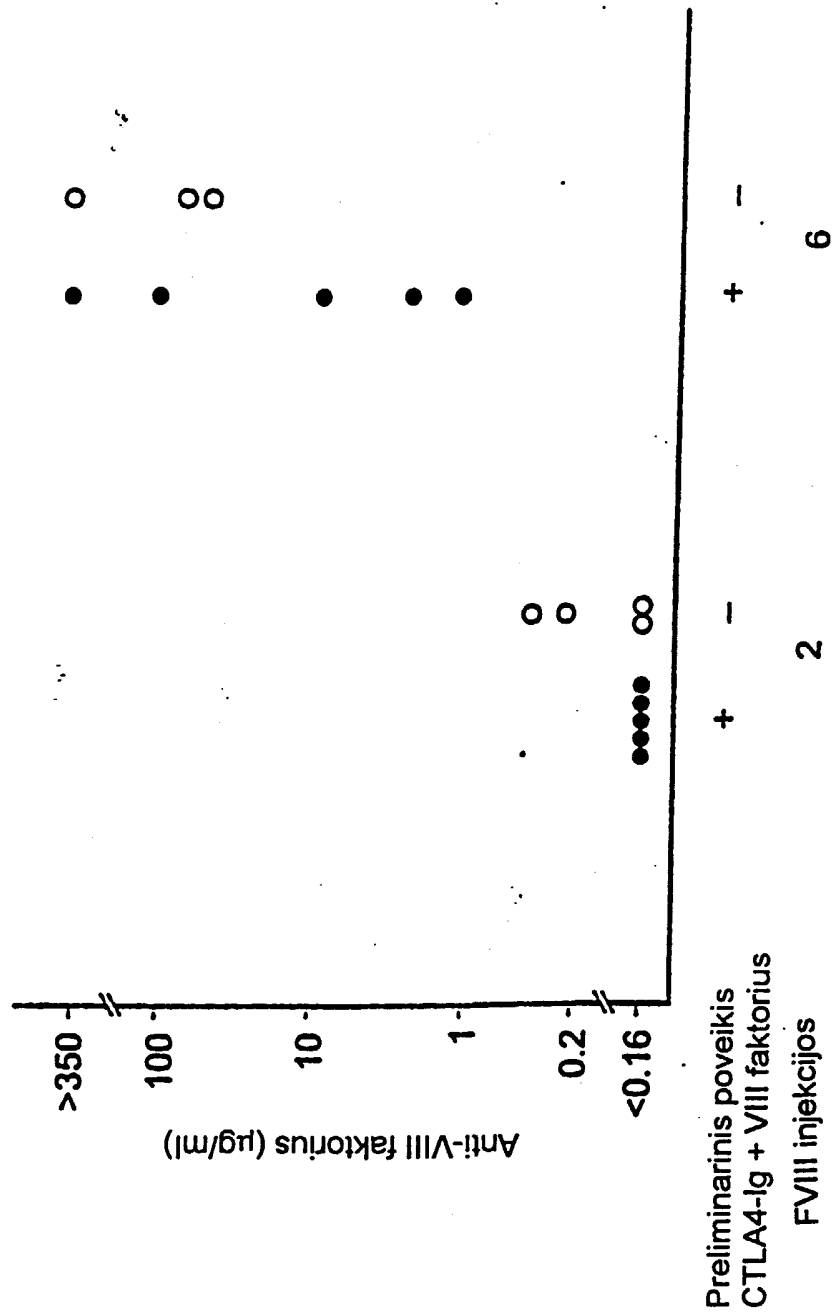


Fig.7

8/10

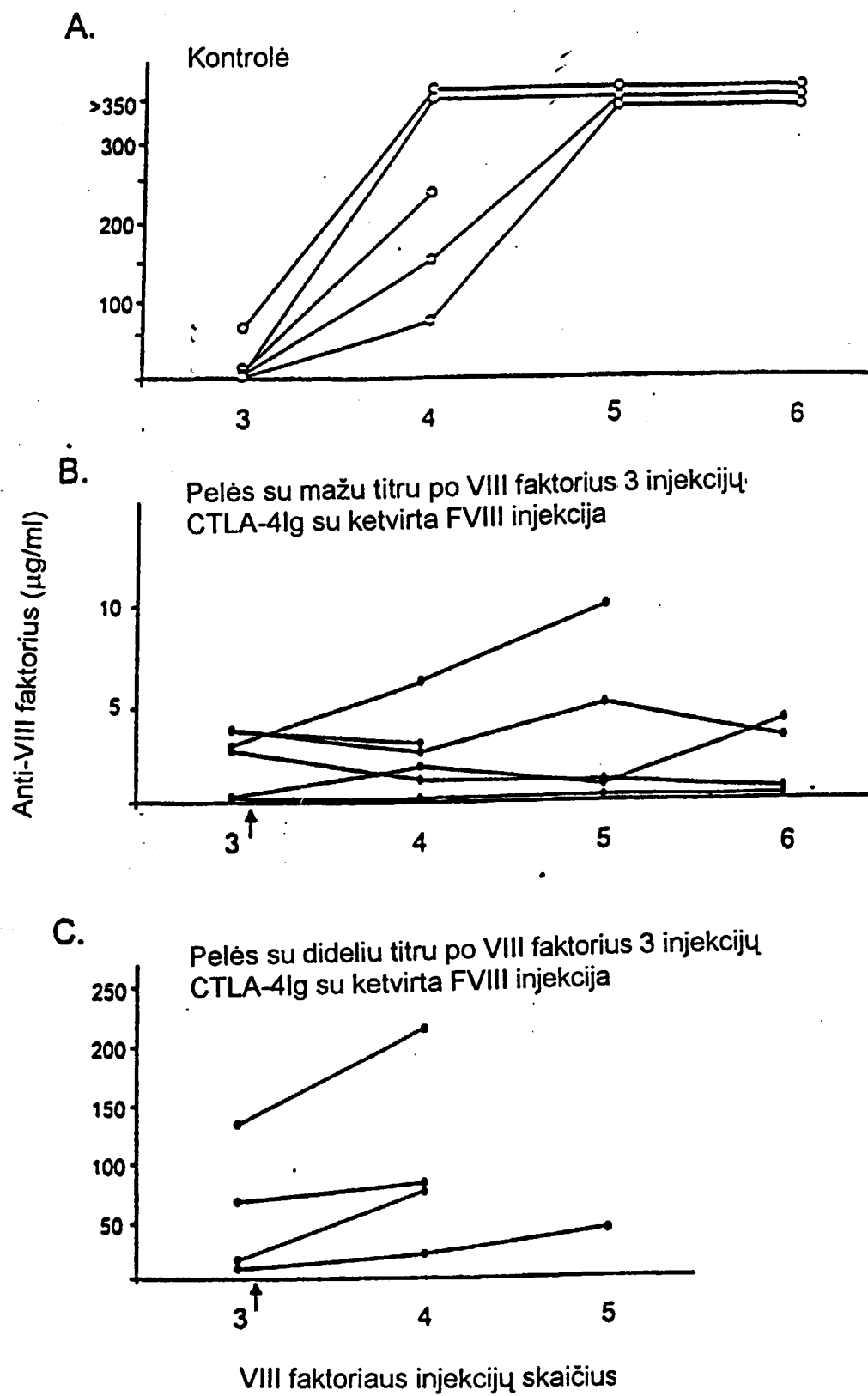


Fig.8

9/10

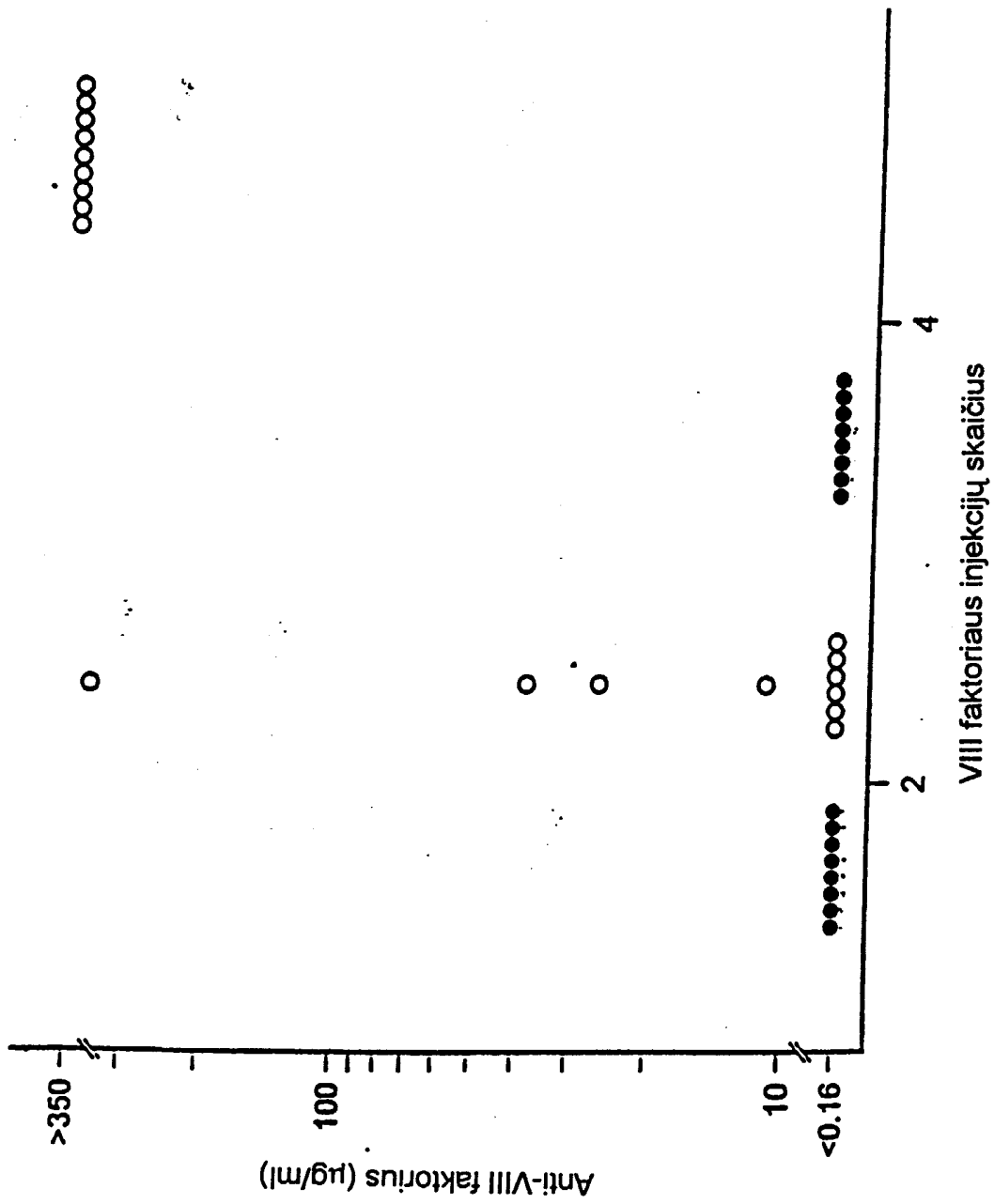


Fig.9

10/10

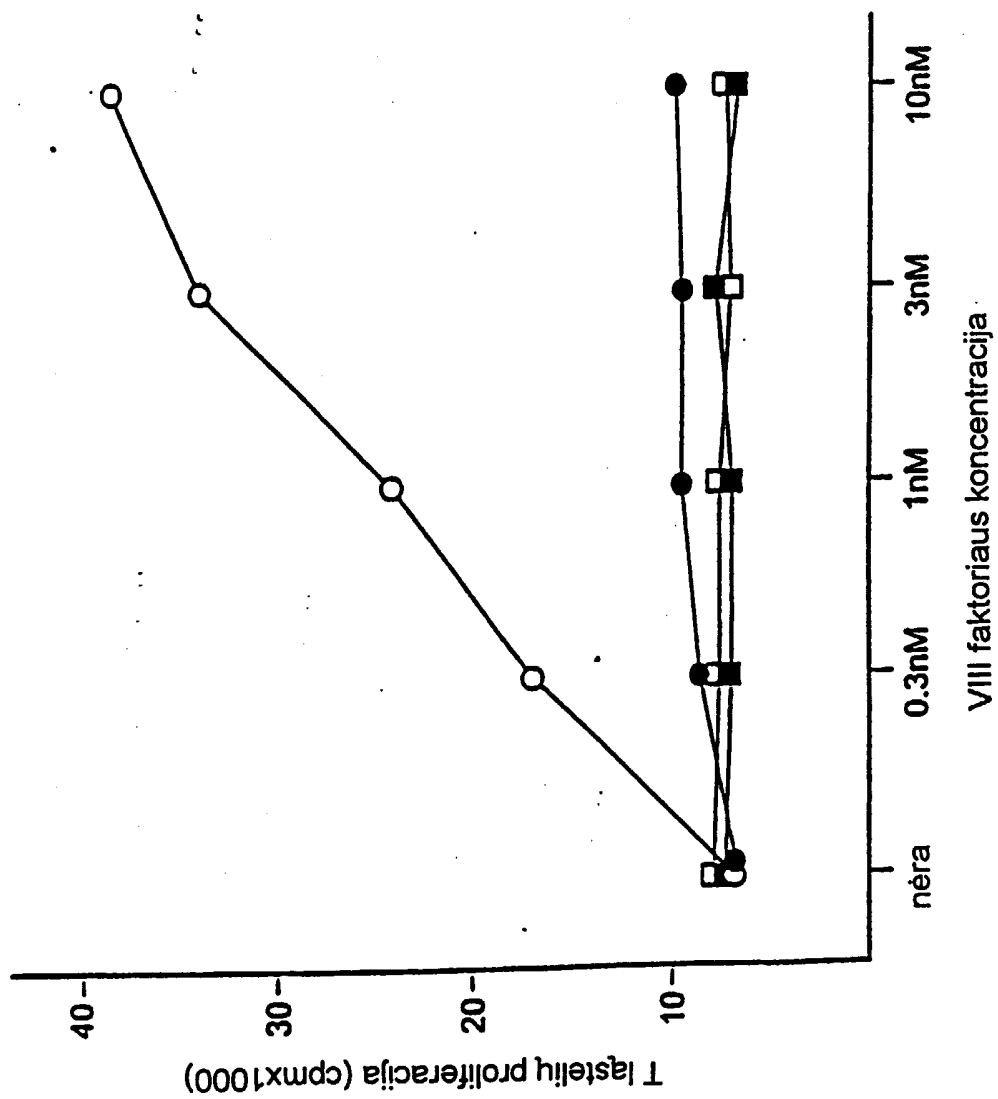


Fig.10