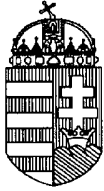




(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

213 576 B

(21) A bejelentés ügyszám: 1607/89

(22) A bejelentés napja: 1989. 03. 31.

(30) Elsőbbségi adatok:

271 934 1988. 11. 14. US

176 825 1988. 04. 04. US

(51) Int. Cl.⁶

C 12 P 21/08

C 07 K 16/28

(40) A közzététel napja: 1990. 04. 30.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1997. 08. 28.

(72) Feltaláló:

Ledbetter, Jeffrey A., Seattle, Washington (US)

(73) Szabadalmas:

ONCOGEN Ltd. Partnership, Seattle, Washing-
ton (US)

(74) Képvisező:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Eljárás antitest heterokonjugátumok előállítására limfocita aktivitás szabályozásában való felhasználásra

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás T limfociták működését szabályozó heterokonjugátumok előállítására, melynek során két, T limfociták sejtfelületén lévő különböző CD-

antigénnel kötődni képes monoklonális antitest molekulát kapcsolnak egymással.

Ugyancsak a találmány tárgya az eljárás T limfociták aktiválására, illetve azok működésének szabályozására fenti heterokonjugátumok alkalmazásával.

A jelen találmány összefüggésben van a 176.825 sorozatszámú az Amerikai Egyesült Államokban 1988. április 4-én benyújtott szabadalmi bejelentéssel; ennek leírása a referenciaként épül be a jelen bejelentésbe.

A jelen találmány új antitest heterokonjugátumokra vonatkozik, valamint ezek alkalmazására limfociták, mint pl. T sejtek és B sejtek, aktivitásának szabályozására. Pontosabban a jelen találmány olyan heterokonjugátumokra vonatkozik, amelyek két antitestből állnak egymáshoz kapcsolva, ahol mindegyik antitest különböző limfocita felületi antigénnel reaktív. Ezek a heterokonjugátumok, úgy tűnik, úgy működnek, hogy limfocitákhoz kötődnek és a megfelelő sejt felületi antigéneket, amelyek reagálnak, egymással fizikai közelségbe hozzák, a limfociták megnövekedett vagy csökkentett szignál-transzdukcióját és burjánzását idézve elő. A jelen találmány egyik előnyös kiviteli módja szerint egy antitestet, amely a T sejtreceptorral vagy társult CD3 komplexével reaktív, keresztkötésbe viszünk egy olyan antitesttel, amely egy második T sejt felületi antigénnel pl. CD2, CD4, CD6 vagy CD8 antigénnel reaktív, hogy növeljük a T sejtek aktiválását és működését. Egy másik előnyös kiviteli mód szerint egy antitestet, amely a CD5 T sejt felületi antigénnel reaktív, keresztkötésbe viszünk egy olyan antitesttel, amely egy második T sejt felületi antigénnel, pl. CD4, CD6 vagy CD8 antigénnel reaktív, hogy növeljük a limfocita-aktiválást és működést. Egy további előnyös kiviteli módban egy antitestet, amely az antigének CD45 családjával reaktív, keresztkötésbe viszünk egy olyan antitesttel, amely egy második T sejt felületi antigénnel, pl. CD2, CD3, CD5 vagy CD28 antigénnel reaktív, hogy gátoljuk a limfocita-aktiválást és működést. Egy még további előnyös kiviteli formában egy antitestet, amely a CD4 antigénnel reaktív, keresztkötésbe viszünk egy olyan antitesttel, amely CD45 antigénnel reaktív, hogy fokozzuk a limfocita-aktiválást és működést. A jelen találmány szerinti antitest-konjugátumok, eljárások és kompozíciók limfociták szabályozásában alkalmazhatók, és megnövekedett celluláris immunválaszokhoz vezetnek olyan betegségek kezelésében, mint a fertőző betegségek, rák, AIDS- és autoimmun-betegségek.

A T limfocitákról, amelyet a szakterületen T sejteknek is neveznek, ismeretes, hogy immunválaszokat közvetítenek legalább két külön úton. A citotoxikus T sejtek a speciális célsejtek lízisében érdekeltek, míg a „segítő” (helper) T sejtek a B sejtek burjánzását és differenciálódását segítik elő, antigén-specifikus antitestek termeléséhez vezetve [lásd pl. Kimball J.W. (szerkesztő): „Introduction To Immunology” című könyvét, 2. kiadás, 11–13. fejezet, Macmillan Publishing Co. (1986)]. A T sejtek mindkét típusa a T sejtreceptor (Ti) vagy a T sejt felületén levő társult CD3 komplexe (amelyet CD3/Ti receptorkomplexnek is neveznek) antigénnel való kölcsönhatása révén aktiválódik egy antigént szolgáltató sejt felületén, és így fejt ki működését [lásd pl. Reinherz és munkatársai: „Clonotypic Surface Structure On Human T Lymphocytes: Functional And Biochemical Analysis Of The Antigen Receptor Complex” (Klóntípusos felületi szerkezet humán T limfocitákban:

az antigén receptorkomplex működési és biokémiai elemzése), *Immunol. Rev.* 81, 95–129 (1984)].

Úgy találták azonban, hogy a T sejtek csak akkor válaszolnak egy antigénre, amikor az antigén egy adott MHC („majorhistocompatibility complex”) – fő hisztokompatibilitási komplex – kódolt antigénnel társult az antigént szolgáltató sejten. A T sejt antigén általi felismeréséről ezért elmondhatjuk, hogy az antigénnel társult MHC-kódolt termék osztályára van korlátozva. Ennek az MHC korlátozásnak az az eredménye, hogy a citotoxikus T sejteket az I. MHC antigének osztályával társult antigének aktiválják, míg a segítő sejteket a II. MHC antigének osztályával társult antigének aktiválják [lásd pl. Kimball J.W. (szerkesztő): *Introduction To Immunology*” (fentebb idézett munka), 286–289. oldal és 348–358 oldal].

Ezenkívül rájöttek arra, hogy a II. MHC-korlátozott T sejtek a CD3/Ti receptor-komplexen kívül egy CD4-nek nevezett sejt felületi antigént is kifejeznek, míg az I. MHC-korlátozott T sejtek CD8 sejt felületi antigént fejeznek ki. Ez a kapcsolat az MHC korlátozás és CD-antigén kifejeződés között ahhoz a hipotézishez vezetett, hogy a T sejt aktiválásában a megfelelő MHC antigének a természetes ligandumok a CD-antigénekhez, azaz a segítő T sejteken levő antigén kölcsönhatásban van az antigént szolgáltató sejteken (pl. makrofágon) levő II. MHC molekulák osztályával, és a citotoxikus T sejteken levő CD8 antigén kölcsönhatásban van a speciális célsejteken (pl. vírussal fertőzött sejteken) levő I. MHC molekulák osztályával [lásd pl. Emmerich F. és munkatársai: *Eur. J. Immunol.* 17, 529–34 (1987)]. Ezenkívül azt is felvették, hogy a T sejtek antigén felismerése egy kvaterner komplex révén megy végbe, ahol a T sejt felületén levő CD3/Ti receptorkomplex egy CD-antigénnel, pl. CD4 vagy CD8 antigénnel társulva „látja” a megfelelő MHC-kódolt antigénnel társult antigént [lásd pl. Anderson P. és munkatársai: „Cross-Linking Of T3 (CD3) With T4 (CD4) Enhances The Proliferation Of Resting T Lymphocytes” (T3/CD3) keresztkötése T4 /CD4/-gyel fokozza a nyugvó T limfociták burjánzását), *J. Immunol.* 139(3), 678–82 (1987)].

Ahogy ebben a bejelentésben alkalmazzuk, a CD-antigének természetben előforduló sejt felületi differenciációs antigének, amelyeket sejtek felületén levő monoklonális antitestek (mAb) reaktivitásával határozzunk meg, amint ezt egy nemzetközi munkacsoport megjelölte, amely munkacsoportnak az a feladata, hogy egységes nomenklatúrát biztosítson ezekhez az antigénekhez [lásd pl. McMichael A.J. (szerkesztő): *Leukocyte Typing III*, Oxford University Press (Oxford, Egyesült Királyság, 1987)]. Nagy számú CD-antigént már molekulárisan klónoztak és ezáltal teljes mértékig jellemeztek (lásd a fentebb idézett munkát). A jól ismert CD-antigének közé tartoznak a pan-T antigének: CD3, CD2, CD5, CD6 és CD7; egy, a segítő T sejtre fajlagos CD-antigén: CD4; és egy, a szuppresszor T sejtre fajlagos CD-antigén: CD8 [lásd pl. Ledbetter J. A. és munkatársai: a „Perspectives In Immunogenetics And Histocompatibility” című kiadványban, 6. kötet; szerkesztő: Heise E., *Lymphocyte Surface Antigens* 1984, 325–40. oldal;

kiadó: American Society for Histocompatibility And Immunogenetics (New York, 1984)]. A CD28 olyan antigén, amely a T sejtek többségén jelen van [Yamada és munkatársai: *Eur. J. Immunol.* 15, 1164–1169 (1985)]. Bár ezekről a differenciációs antigénekről úgy véljük, hogy receptorokként működnek, amint fentebb leírtuk, és szignál transzdukcióval kötődnek T sejtekben, pontos funkciójuk a T sejtaktiválásban nem ismeretes és ez intenzív kutatás tárgya.

Így pl. tanulmányokat végeztek a CD-antigének szerepének meghatározására a T sejtaktiválásban molekuláris szinten. Ismeretes, hogy a CD3/Ti receptorkomplex reakciója mAb-vel vagy antigénnel egy transzmembrán „szignál” kialakulásához vezet a T sejten belül. Ez a szignál gyakran inozit-foszfátok (1, 2 és 3) termelésében és a citoplazma szabad kalcium $[(Ca^{2+})_i]$ koncentrációjának növekedésében jelentkezik [lásd pl. Imboden J. B. és munkatársai: *J. Exp. Med.* 161, 446–456 (1985); és Imboden J. B. és munkatársai: *J. Immunol.* 138(5), 1322–24 (1987)].

Ennek a szignálnak a kialakítása azonban valószínűleg nem elegendő ahhoz, hogy T sejteket stimuláljon burjánzásra (fentebb idézett munka, 873). Kísérleti körülmények között úgy találták, hogy amikor a T sejt felületén levő CD3 antigén kötésben van, pl. a sejtet egy térhálósított antitesttel reagáltatva, ahol az antitest vagy kiegészítő sejtekkel kapcsolt (pl. a monocita Fc receptor kölcsönhatása révén egy CD3-ra vonatkozó antitest Fc részével), vagy szilárd rögzítőanyagon levő antitest immobilizálásával T sejtburjánzás alakul ki.

Így a CD3/Ti receptorkomplexre vonatkozó mAb-k, amelyek szilárd rögzítőanyaghoz vannak kapcsolva, burjánzásra stimulálják a T sejteket [lásd pl. Anderson P. és munkatársai, fentebb idézett munka, és Walker C. és munkatársai: „Activation Of T Cells By Cross-Linking And Anti-CD3 Antibody With A Second Anti-T-Cell Antibody: Mechanism And Subset-Specific Activation” (T sejtek aktiválása anti-CD3 antitest keresztkötése révén egy második anti-T sejt antitesttel: Mechanizmus és rész-halmaz fajlagos aktiválás), *Eur. J. Immunol.* 17, 873–80 (1987)], részben a CD3 antigén keresztkötésének, részben a CD3/Ti receptorkomplex gátlása (internalizálása) következtében, amely arra irányulnak, hogy gátolják a T sejtaktiválást [lásd pl. Ledbetter J. A. és munkatársai: Valency Of CD3 Binding And Internalization Of The CD3 Cell-Surface Complex Control T Cell Responses To Second Signals” (A CD3 kötés értékűsége és a CD3 sejt felületi komplex internalizálása szabályozza a T sejt válaszokat második szignálokhoz), *J. Immunol.* 136, 3945–52 (1986)]. Jelentős nehézségek vannak azonban egy szilárd rögzítőanyagon immobilizált anti-CD3 alkalmazásánál T sejtaktivitás in vivo fokozására gyógyászati alkalmazásokhoz. Ilyen alkalmazások közé értjük pl. szilárd hordozók, általában kis gyöngyök injektálását a betegbe, amely bizonyos veszélyeket vonhat maga után a beteg egészségére, pl. elzárhatja az artériákat vagy csomókat alakíthat ki ezekben.

Ezenkívül azt is felfedezték, hogy fiziológiai körülmények között ez a CD3 antigén-keresztkötés révén elért

CD3/Ti stimulálás is csak minimális jelet ad, amelyet a CD3/Ti és más CD-antigének közti kölcsönhatások kell, hogy fokozzanak (lásd Anderson P. és munkatársai, fentebb idézett munka, 678. oldal).

- 5 Ezenkívül van némi bizonytalanság, ami a CD-antigén pontos hatását illeti a T sejt aktiválásában. Így például a spontán CD4 veszteség [lásd Marrack P. és munkatársai: *J. Exp. Med.* 158, 1077–91 (1983)], valamint a génátviteli kísérletek [lásd például Gay D. és munkatársai: *Nature* 328, 626–629 (1987)] elemzése azt sugallja, hogy a CD4 kifejeződése fokozza a T sejt válaszokat fajlagos antigénre, és hogy a CD4 akkor játszik különösen fontos szerepet, amikor az antigének koncentrációja az optimális alatt van, vagy amikor a T sejt aviditása az antigén/MHC-kódolt antigénhez alacsony [lásd Regnier-Bigoroux A. és munkatársai: *Eur. J. Immunol.* 16, 1385–90 (1986); és Shaw. S. és munkatársai: *J. Immunol.* 134(5), 3019–26 (1985)]. Ezenkívül, amikor a CD3-mal és CD4-geyel reaktív mAb-k azonos rögzítőanyagon vannak immobilizálva, az immobilizált antitesteknek kitett T sejtek burjánzása fokozódik. Hasonlóképpen, amikor a CD3-ra és CD8-ra aktív mAb-k szilárd rögzítőanyaghoz vannak kötve, a T sejtek burjánzása fokozódik azon a mértéken túl, mint amikor egyedül a CD3-ra reaktív antitestet alkalmazzák (lásd Anderson P. és munkatársai, fentebb idézett munka).

- 20 Szolubilis CD4 monoklonális antitestekkel végzett tanulmányok azonban azt jelzik, hogy a szolubilis antitest gátolja a T sejt válaszokat, azt sugallva, hogy a CD4 olyan negatív jelet ad át, amely gátolja a T sejt aktiválását [lásd például Bonk J. P. és munkatársai: *J. Exp. Med.* 163, 1294 (1985); Tite J. P. és munkatársai: *J. Cell. Mol. Immunol.* 2, 179–190 (1986); és Rosoff P. M. és munkatársai: *Cell*, 49, 845–853 (1987)].

- 35 A B limfociták, amelyek B sejtekként is ismeretesek, az antitesttermelő (plazma) sejtek prekursorai. Amikor B sejteket stimulálnak valamely antigénnel, amely a segítő T sejtek és makrofágok együttműködését igényli, B sejtek burjánzanak és plazmasejtekké és „emlékező” B sejtekké differenciálódnak. A B sejteken azonosított CD-antigének között találjuk a CD19, CD20, CDw40, CD45, CD45R és Bgp95 antigéneket (ez utóbbi olyan antigén, amely még nem kapott megfelelő CD jelölést) [McMichael: *Leukocyte Typing III* (fentebb idézett munka)].

- 45 Egy másik érdekes antigén a CD45 leukocita közös antigén (L-CA; ez ismeretes T200-ként vagy Ly-5-ként is). A CD45 180 és 220 kDa molekulatömegű glikoproteineknek felel meg. [Trowbridge és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 157–161 (1975); Komuro és munkatársai: *Immunogenetics* 1, 452–456 (1975); Schied és munkatársai: *Immunogenetics* 9, 423–433 (1979); Dalchan és munkatársai: *Eur. J. Immunol.* 10, 737–744 (1980); és Omary és munkatársai: *J. Exp. Med.* 152, 842–852 (1980)]. A CD45 különböző izo-formái keletkeznek változó mRNS hasadásokból. Ezek az izo-formák különbözőképpen fejeződnek ki T és B-limfociták szubpopulációiban. Bizonyos, humán CD45 elleni monoklonális antitestek (mAb-k) felismernek olyan epitópokat, amelyek az összes 220, 205, 190

és 180 kD-os CD45 izo-formában részt vesznek [Cobold és munkatársai: Leucocyte Typing III, fentebb idézett munka, 15. fejezet, 788–803. oldal]. Más mAb-k viszont a CD45-nek csak a 220 kD-os, CD45R-nek nevezett izo-formáját ismerik fel, amely szelektíven fejeződik ki B limfocitákon és T sejtek egy szubpopulációján [Cobold, fentebb idézett munka; Dalchau és munkatársai: *J. Exp. Med.* 153, 753–765 (1981); Morimoto és munkatársai: *J. Immunol.* 134, 1508–1515 (1985); és Ledbetter és munkatársai: *J. Immunol.* 135, 1819–1825 (1985)]. Egy másik mAb, az UCHL-1, szelektíven kötődik a 180 kDa-os formához, amely kérgi timocitákra és aktivált vagy memória T sejtek alcsoportjára terjed ki [Smith és munkatársai: *Immunology* 58, 63–70 (1986)].

Nemrégiben következtették ki a CD45 (L-CA) primer szerkezeteket a cDNS nukleotid szekvenciákból patkányánál [Thomas és munkatársai: *Cell* 41, 83–93 (1985); Barclay és munkatársai: *EMBO J.* 6, 1259–1264 (1987)], egérnél [Saga és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6940–6944 (1986); Raschke W.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 161–165 (1987); Thomas és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5360–5363 (1987); Saga és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5364–5368 (1987)], és embernél [Ralph és munkatársai: *EMBO J.* 6, 1251–1257 (1987); Streuli és munkatársai: *J. Exp. Med.* 166, 1548–1566 (1987)].

A CD45 integrálódó membránfehérje, mely egy nagy, 705–707 aminosavas citoplazmás szegmenst, egy 22 aminosavas transzmembrán szegmenst és egy 400–550 aminosavval rendelkező extracelluláris tartományt tartalmaz. A CD45 különböző izo-formái, amelyek egy egyedi gén primer transzkriptjeinek különböző mRNS hasadási hoznak létre, eltérő extracelluláris tartománnyal (domain) bírnak, de transzmembrán és citoplazmás szegmenseik azonosak (Barclay, fentebb idézett munka; Ralph, fentebb idézett munka; és Streuli, fentebb idézett munka). A citoplazmás szegmens két homológ, nagy mértékben megőrzött tartománnyal (domain) bír mintegy 300 gyökkel.

A CD45 funkciójának meghatározását megkísérlő tanulmányok ellentmondó eredményeket adnak (Cobold, fentebb idézett munka). A humán vagy egér antigén elleni mAb-ekkel kapcsolatban beszámoltak arról, hogy gátolják a T és B sejtburjánzást [Harp és munkatársai: *J. Immunol.* 133, 10–15 (1984); Bernabeu és munkatársai: *Eur. J. Immunol.* 17, 1461–1466 (1987); és Mittler és munkatársai: *J. Immunol.*, 138, 3159–3166 (1987)], az antitestképző sejtermelést [Yakura: *J. Exp. Med.* 157, 1077–1088 (1983)], és a természetes öltő (NK) sejt és citotoxikus T sejtaktivitást [Seaman és munkatársai: *J. Immunol.* 127, 982–986 (1981); Newman W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3858–3862 (1982); Nakayama és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1977–1981 (1979); Lefrancois és munkatársai: *Nature (London)* 314, 449–452 (1985)]. Az anti-CD45 mAb-ekkel kapcsolatban azonban beszámoltak arról, hogy bizonyos körülmények között fokozzák a T sejtburjánzást [Cobold, fentebb idézett munka; Ledbetter, fentebb idézett munka; és Martorell és munkatársai: *Eur. J. Immunol.* 17, 1447–1451 (1987)].

Thomas (fentebb idézett munka) azt sugallja, hogy a molekula 80 kD-os citoplazmás része a maga két megőrzött homológ tartományával (domain) kritikus szerepet játszhat a CD45 működésében. Nemrégiben ezekről a tartományokról úgy találták, hogy homológok a tirozin--foszfatáz nagyobb kis molekulatömegű fehérjéjével, amelyet a humán méhlepénynek mind solubilis, mind szemcsés frakcióiból izoláltak [Tonks és munkatársai: *J. Biol. Chem.* 263, 6722–6730 (1988); Charbonneau és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182–7186 (1988)]. Ez azt sugallja, hogy a CD45 membránhoz kötött tirozin-foszfatáz fehérje, amely kölcsönhatásban működhet más membránnal társult fehérjékkel.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmányt.

A jelen találmány felderít néhány fentebb tárgyalt bizonytalanságot és olyan antitest-heterokonjugátumokat szolgáltat, amelyek két, különböző T limfocitákon kifejezett felületi antigénnel reaktív, CD-antitestből állnak, ahol az antitestek keresztkötésben vannak (kapcsolódnak) egymással. Ezek közül a heterokonjugátumok közül némelyek fokozzák a jelátvitelt T sejtek aktiválásánál, amint ezt azzal a képességükkel határozzuk meg, hogy növelik a $[(Ca^{2+})_i]$ -t a T sejtekben olyan fehérjekoncentrációknál, amelyek mintegy két nagyságrenddel kisebbek, mint a csak CD3 antigénnel reaktív antitestek esetén.

Ezenkívül a jelen találmány szerinti heterokonjugátumok magukba foglalják azokat a heterokonjugátumokat, amelyek képesek gátolni a T limfociták aktiválását és működését.

A jelen találmány egyik előnyös kiviteli módja szerint egy, a CD3/Ti receptorkomplexszel vagy alkotórészeivel reaktív monoklonális antitestet keresztkötésbe viszünk egy, a T sejt felületén levő második antigénnel, pl. CD2, CD4, CD6 vagy CD8 antigénnel reaktív monoklonális antitesttel, hogy olyan heterokonjugátumokat képezzünk, amelyek fokozzák a jelátvitelt a T sejtek aktiválásában. Egy másik előnyös kiviteli mód szerint egy, a CD5 T sejt felületén levő antigénnel reaktív monoklonális antitestet viszünk keresztkötésbe egy T sejt felületén levő második antigénnel, pl. CD4, CD6 vagy CD8 antigénnel reaktív monoklonális antitesttel. Egy különösen előnyös kiviteli mód olyan heterokonjugátumra vonatkozik, amely CD3 elleni antitestet tartalmaz CD4 elleni antitesttel keresztkötve.

A jelen találmány egy még további kiviteli módja szerint egy, a CD45 T sejt felületén levő antigénnel reaktív monoklonális antitestet viszünk keresztkötésbe, egy, a T sejt felületeken levő második antigénnel, pl. CD2, CD3 vagy CD28 antigénnel reaktív monoklonális antitesttel, hogy olyan heterokonjugátumokat képezzünk, amely gátolja a limfociták aktiválását. Egy különösen előnyös kiviteli mód olyan heterokonjugátumra vonatkozik, amely CD3 antitestet tartalmaz CD45 antigénnel vagy CD45 izo-formáival reaktív antitesttel kapcsolva.

A jelen találmány szerinti heterokonjugátumokkal T limfociták kezelhetők, amely azt a célt szolgálja, hogy fokozzák vagy gátolják a limfociták aktiválását a celluláris immunválaszok kialakításában. A jelen találmány szerinti heterokonjugátumok tehát alkalmazhatók olyan

gyógyászati kompozíciókban, amelyek legalább egy, jelen találmány szerinti heterokonjugátum gyógyászati hatásonnyal és valamely gyógyászati elfogadható hordozóból állnak. Így a jelen találmány szerinti heterokonjugátumok, módszerek és kompozíciók alkalmazhatók az immun-terápiában, hogy fokozzák vagy szabályozzák az immunválaszokat, pl. a fertőző betegségek, rák, AIDS és autoimmun betegségek kezelésében.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1. ábra a citoplazmás szabad kalcium $[(Ca^{2+})_i]$ koncentráció növekedésének összehasonlító ábrázolása az idő függvényében perifériás vér limfociták stimulálása esetén különböző koncentrációkkal (A) a jelen találmány szerinti egyik CD3/CD4 heterokonjugátumával, a G19-4/G17-2-vel vagy (B) a G19-4 anti-CD3 monoklonális antitesttel.

A 2. ábra a $(Ca^{2+})_i$ válasznak és a válaszoló sejtek százalékanak összehasonlító grafikus ábrázolása az idő függvényében vagy perifériás vér limfociták (PBL), vagy CD4⁺ T sejtek stimulálásakor az egyik jelen találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátummal, a G19-4/G17-2-vel. A sejtek előkezelésének gátló hatását a G17-2 nevű anti-CD4 monoklonális antitesttel, amelyet a heterokonjugátummal végzett stimulálás követ, szintén bemutatjuk.

A 3. ábra a jelen találmány szerinti G19-4/G17-2 heterokonjugátum (■) vagy a G19-4 nevű anti-CD3 monoklonális antitest (□) $(Ca^{2+})_i$ aktivitásának összehasonlító titrálásait ábrázolja CD4⁺ T sejteknél 5 mmól/l EGTA jelenlétében.

A 4. ábra az inozit-foszfát növekedés összehasonlító grafikus ábrázolása az idő függvényében CD4⁺ T sejtek stimulálására a G19-4 nevű anti-CD3-mal (●) vagy a jelen találmány szerinti egyik CD3/Cd4 heterokonjugátummal, a G19-4/G17-2-vel (D) 1 µg/ml-nél. Bemutatjuk az inozit-foszfát szinteket a nem stimulált kontrollonál (○), t = 0 és t = 10 percnél. Az A panel ábrázolja a növekedést az 1 inozit-foszfátnál (InsP₁), a B panel ábrázolja a növekedést a 2 inozit-foszfátnál (InsP₂) és a C panel ábrázolja a növekedést a 3 inozit-foszfátnál (InsP₃).

Az 5. ábra két független kísérletet mutat be, ahol a növekedést mérjük az InsP1-ben a biotin-konjugált anti-CD4 (G17-2)-vel előkezelt CD4⁺ T sejtek stimulálását követően vagy anti-CD3(G19-4)-gyel, vagy G17-2-vel, vagy egy CD3/CD4 heterokonjugátummal (G19-4/G17-2); vagy avidinnel, vagy ezek kombinációival, ahogyan az ábrában jelezzük.

A 6. ábra egy anti-CD3 monoklonális antitest (CD3 Mono), egy CD3/CD3 konjugátum (CD3 Homo), egy CD4/CD4 homokonjugátum (CD4 Homo) és egy jelen találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátum (CD3+4 Hetero) hatását ábrázolja a T sejt burjánzásra, amint ezt [³H]-timidin beépítéssel jelezzük, CD4⁺ T sejteken PMA-val (forbol-mirisztát-acetát) vagy a nélkül, és CD28 elleni antitesttel vagy anélkül.

A 7. ábra CD4⁺ T sejtek burjánzási válaszáinak összehasonlító grafikus ábrázolása, ³H-timidin-beépítéssel jelezve vagy G19-4 (CD3 Mono) + PMA (▼ - ▼), vagy G19-4 + anti-CD28 (α-CD28) (∇ - ∇), vagy CD3/CD4

heterokonjugátum (CD3 + 4 Hetero) + PMA (▼ ... ▼), vagy CD3/CD4 heterokonjugátum + α-CD28 (∇ ... ∇), vagy CD3/CD3 homokonjugátum (CD3 Homo) + PMA (▼ - - ▼), vagy CD3/CD3 homokonjugátum + α-CD28 (∇ - - ∇) koncentrációjának függvényében.

A 8. ábra a CD4⁺ T sejtek százalékat mutatja be az első, második, vagy harmadik sejtciklus után, a T sejtek PHA-val (fitohemagglutinin), vagy a találmányunk szerinti CD3/CD4 heterokonjugátummal (G19-4/G17-2), vagy egy CD3/CD3 homokonjugátummal (G19-4/G19-4), vagy egy CD3/CD8 heterokonjugátummal, mint kontrollal (G19-4/G10-1), és egy CD4/CD4 homokonjugátummal (G17-2/G17-2) történő, három napos stimulálást követően.

A 9. ábra az immobilizált anti-CD3 mAb G19-4-gyel indukált T sejtek burjánzási válasza gátlásának összehasonlító grafikus ábrázolása, amint ezt [³H]-timidin beépítéssel jelezzük, vagy egyedül (●), illetve vagy anti-CD45 mAb 9.4 (○), vagy anti-p97 mAb 96.5 (□) koncentrációk függvényében, PMA nélkül (A) vagy PMA-val (B) (összehasonlításként bemutatjuk a burjánzást anti-CD45 mAb 9.4-gyel is oldatban; átlagokat mutatunk be; a standard hiba < 15%).

A 10. ábra grafikonokat mutat be, amelyek a T sejteken a jelátvitel szabályozását ábrázolják CD45 receptor révén, a $(Ca^{2+})_i$ növekedésével kifejezve az idő függvényében a T sejteken levő receptorok kereszt kötése után vagy anti-CD45 mAb 9.4-gyel vagy anti-CD45R mAb 3AC5-tel együtt, amint ezt a későbbi 4. példában leírjuk. (Az átlagos $(Ca^{2+})_i$ -t bal oldalon mutatjuk be, és a válaszoló sejtek számának százalékat a jobb oldalon mutatjuk be az egyes kísérleteknél; nyilak jelzik az mAb-k vagy az avidin hozzáadását.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmányt.

Abból a célból, hogy az itt leírt találmány még teljesebben leírható legyen, az alábbi részletes leírást adjuk meg.

A jelen találmány új antitest-heterokonjugátumokra vonatkozik és ezek alkalmazására a limfocita aktiválás vagy működés fokozására vagy gátlására. Pontosabban a jelen találmány olyan heterokonjugátumokra vonatkozik, amelyek két antitestből állnak egymással kereszt köté, ahol az egyes antitestek eltérő T limfocita-sejtfelületén levő CD-antigénreaktívok. Előnyösen az aktivitás növeléséhez a konjugátum antitestjeinek egyike a T sejt receptorral (Ti) vagy ennek társult CD3 antigén komplexével reaktív, és a másik antitest egy második T sejt felületén levő antigénnel, pl. CD-antigénnel (pl. CD2, CD4, CD6 vagy CD8 antigénnel) reaktív. Egy másik esetben a konjugátum antitestjeinek egyike a CD5 antigénnel reaktív, és a másik antitest egy második T sejt felületi antigénnel, pl. CD4, CD6 vagy CD8 antigénnel reaktív. A CD4/CD45 heterokonjugátum szintén megnövekedett T sejt aktivitáshoz vezet. A gátláshoz a heterokonjugátumok antitestjeinek egyike előnyösen az antigének CD45 családjával (izo-formák) reaktív, és a másik antitest valamely T sejt felületén levő antigénnel, pl. CD2, CD3, CD5 vagy CD28 antigénnel) reaktív.

Anélkül, hogy valamely elmélethez kötődnénk, úgy hisszük, hogy az itt leírt heterokonjugátumok, amikor limfocitákkal reagálnak, úgy működnek, hogy kötődnek

megfelelő antigénjeikhez a sejt felszínén, ezeket az antigéneket szoros közelségbe hozva egymással; ez olyan lépés, amely utánozhatja azt az együttcsomósodást („coclustering”), amely a T sejtreceptor és a CD4 között előfordul, amikor segítő T sejteket érintkezésbe hozunk antigén-prezentáló sejtekkel a T sejtaktiválás során [lásd pl. Kupfer A. és munkatársai: „Co-clustering Of CD4 (L3T4) Molecule With The T-Cell Receptor Is Induced By Specific Direct Interaction Of Helper T Cells And Antigen Presenting Cells” (A CD4(L3T4) molekula együttcsomósodását a T sejtreceptorral a segítő T sejtek és antigénadó sejtek speciális közvetlen kölcsönhatása okozza), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5888–5892 (1987)]. Ez a kölcsönhatás a T sejtantigének között a sejtfelületen, úgy tűnik, fokozza a CD3/Ti által közvetített transzmembrán jelképzést és így a T sejtaktiválást.

Bár a CD45 antigén hatásának mechanizmusát a limfocitákra nem értjük, az itt leírt CD45 heterokonjugátumok úgy működhetnek, hogy funkcionálisan módosítják a többi limfocita receptorokat, amikor közeli fizikai érintkezésbe kerülnek velük; ez pl. gátlást eredményez bizonyos CD-receptorok, pl. a CD3 antigén aggregálása után. A nemrégiben leírt homológia a CD45 citoplazmás tartományai (doménjei) és a humán méhlepény tirozin-foszfátáz fehérjéje között azt sugallja, hogy az előbbi valójában egy membránhoz kötött tirozin-foszfátáz fehérje, amely úgy működik, hogy módosítja a jelátvitelt a leukocitákban úgy, hogy defoszforilezi a kulcs tirozinyököket a többi membránhoz társult molekulákon, pl. a CD3 zéta-láncán [Klausner és munkatársai: J. Biol. Chem. 262, 12654–12659 (1987)]. A CD45 módosíthatja a CD4-gyel társult tirozin-kináz fehérje-aktivitást is, amely normálisan úgy működik, hogy szabályozza az antigénnel hajtott jelátvitelt [Rudd és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5190–5194 (1988)]. Egy másik úton a CD4-gyel társult tirozin-kináz foszforilezheti a CD45 antigént tirozin gyökein és így módosíthatja aktivitását. Ez megmagyarázhatja az egyedi fokozó aktivitást, amelyet a CD4 és CD45 receptorok keresztökötésének eredményeként kapunk, amint ez a későbbi példákban látható. Ez a modell előre várhatóvá tenné, hogy a kalcium mobilizálásához és megelőzi azt. Az enzimnek, amely csak a többi membránhoz társult fehérjével szoros közelségben működik, egy integrális membrán formája szolgálhat a tirozin kináz fehérje/foszfátáz lokalizálására a speciális sejtfelületi molekulákhoz. Így úgy vélhetjük, hogy a jelen találmány szerinti heterokonjugátumok úgy működhetnek, hogy fokozzák vagy gátolják a limfocita aktiválást és működést.

Meg kell jegyeznünk, hogy a T sejt szabályozás, azaz gátlás, a jelen találmány szerint pan-T sejt szabályozás lehet, vagy T sejtek bizonyos alkészletének vagy klónjának szabályozása lehet.

A pan-T sejt szabályozás a T sejtek érintkezésbe hozásának eredménye olyan heterokonjugátumokkal, amelyek szabályozzák a T sejtek teljes készletét vagy populációját. Ezek a heterokonjugátumok olyan antitestekből állnak, amelyek reaktívak az összes T limfocitákon ta-

lálható T sejtantigénekkel. Az egyik ilyen heterokonjugátum a jelen találmány szerinti CD3/CD2 heterokonjugátum, ahol a CD3 és CD2 pan-T sejtantigének [lásd pl. Ledbetter J. A. és munkatársai: „Perspectives In Immunogenetics And Histocompatibility” (Távlatok az immungenetikában és hisztokompatibilitásban), fentebb idézett munka, 1. táblázat].

Megfelelő heterokonjugátum alkalmazásával azonban fajlagosabb szabályozás érhető el. Így pl. olyan esetekben, ahol azt kívánjuk, hogy a T sejteknek csak egy fajlagos alpopulációja aktiválódjék, pl. csak segítő vagy szuppresszor alkészlet, ezt úgy érhetjük el, hogy olyan heterokonjugátumot alkotunk meg, ahol az antitestek egyike az adott T sejt-alpopulációval reaktív, azaz az egyik antitestnek reaktívnak kell lennie egy erre az alpopulációra fajlagos antigénnel. A konjugátum másik antitestje előnyösen egy pan-T sejtantigénre fajlagos. E szerint a kiviteli mód szerint azután a találmány szerinti CD3/CD4 vagy CD5/CD4 heterokonjugátumok fajlagosan fokozzák a segítő (helper) T sejtek aktiválását (a CD4 a segítő T sejtalkészletre fajlagos), míg a CD3/CD8 vagy CD5/CD8 vagy CD5/CD8 heterokonjugátumok fajlagosan fokozzák a szuppresszor T sejt alpopuláció aktiválását (a CD8 fajlagos a szuppresszor T sejtalkészletre).

Egy másik eljárásban egy találmányunk szerinti CD3/CD45 heterokonjugátum fajlagosan gátolja a CD45 antigéneket hordozó T sejtek aktiválását. Mivel a CD45 receptor izo-formái kifejeződnek T sejtek alkészletein is, azok a találmányunk szerinti heterokonjugátumok, amelyek CD45 izo-formákkal reaktív antitestet tartalmaznak, szintén alkalmazhatók T sejtek ezen alkészleteinek szabályozására.

Végül ahol klón-típusos szabályozás kívánatos, azaz fajlagos T sejtklónok szabályozása, a jelen találmány heterokonjugátuma tartalmazhat egy anti-klóntípusos (Ti) antitestet egyik komponensként, azaz egy olyan antitestet, amely a szabályozni kívánt klón T sejtreceptorának változó területével reagál. Így azokban az esetekben, ahol egy klón-típusos T sejt nem képes megfelelően „észrevenni” egy adott antigént vagy válaszolni egy adott antigénre, pl. valamely tumor- vagy vírus antigénre, vagy el van fojtva válaszában, egy jelen találmány szerinti heterokonjugátumot, amely a nevezett T sejt fajlagos anti-klón-típusos antitestet tartalmaz, alkalmazhatunk ezeknek a T sejtklónoknak a szabályozására. Egy másik eljárásban T sejtek egy adott klónjának gátlásához Ti/CD45-ből (vagy Ti/CD45 izo-formából) alkotott heterokonjugátumot alkalmazhatunk. E szerint a kiviteli mód szerint a heterokonjugátum Ti komponensét úgy lehet tekinteni, mint amely lényeges résztvevője az antigénnek a fajlagos T sejt szabályozásában. A heterokonjugátum másik antitestje pan-T-sejt-specifikus vagy alkészlet-specifikus antitest vagy CD45-tel vagy CD45 izoformával reaktív antitest lehet.

Így azok között az antitestek között, amelyek a találmány szerinti heterokonjugátumot tartalmazzák, találunk minden olyan antitestet, amely egy limfocita felületén lévő CD-antigénnel reaktív. Egy előnyös kiviteli mód

szerint a konjugátum antitestjeinek egyike a Ti vagy CD3 T sejt antigénnel reaktív. Egy további előnyös kiviteli mód szerint egy, a CD3 T sejt felületén levő antigénnel reaktív antigént keresztkötünk egy, a T sejt felületén levő CD4 antigénnel.

További antitestek, amelyek tartalmazhatják a találmányunk szerinti heterokonjugátumokat, lehetnek (de nemcsak ezekre korlátozódnak) az egyéb CD-antigénekkel, pl. CD2, CD5, CD6, CD7, CD8, CD28 és limfocitákon levő CD28 antigénnel reaktív antitestek [lásd pl. Bernard A. és munkatársai (szerkesztők): *Leukocyte Typing*, Springer Verlag (kiadó; Heidelberg 1984); és Ledbetter J.A. és munkatársai: a „*Perspectives In Immunogenetics And Histocompatibility*” című, fentebb idézett munkában]. Így egy másik előnyös kiviteli mód szerint egy, a CD5 T sejt felületén levő antigénnel reaktív antitestet keresztkötünk egy, a CD4, CD6 vagy CD8 antigénnel reaktív antitesttel, hogy egy találmányunk szerinti heterokonjugátumot képezzünk. Egy még további előnyös kiviteli forma egy olyan antitest, amely a CD3 T sejt felületén levő antigénnel reaktív, és keresztkötésben van egy CD45 antigénnel vagy a CD45 izoformájával reaktív antitesttel a limfocita sejt felszínén.

Azok az antitestek, amelyek a jelen találmány szerint heterokonjugátumokat tartalmaznak, monoklonálisak; és a szakterületen jól megalapozott technikákat alkalmazva lehet ezeket előállítani [lásd pl. azokat a publikációkat, amelyek az anti-CD3, anti-CD4, anti-CD5 és anti-CD2 monoklonális antitestek előállítását írják le; ezeket a későbbi 1–3. példákban mutatjuk be.]. Ezenkívül sok CD-antigén elleni monoklonális antitest, pl. a CD2, CD3, CD4 és CD5 antigének elleni antitest kereskedelmi forgalomban van (Becton Dickinson, Mountain-view, Kalifornia), vagy az International Leukocyte Typing Workshops-tól szerezhető be. A monoklonális antitestek lehetnek egér vagy humán eredetűek vagy kiméra antitestek [lásd pl. Oi V.T. „Chimeric Antibodies” (Kiméra antitestek), *Bio Techniques* 4(3), 214–221 (1986)]. Ezenkívül a jelen találmány körülöleli a kettős fajlagosságú vagy rekombináns monoklonális antitesteket, ahol az antitest egyik fajlagossága az, hogy egy T sejt antigénnel reaktív, és a másik fajlagossága az, hogy egy második T sejt antigén ellen irányul. Ilyen kettős fajlagosságú antitesteket egy kvadróma vagy trióma sejtől lehet előállítani, amint ezt a 4,474,893 lasjtromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás leírja, vagy kémiai úton lehet előállítani [Brennan és munkatársai: *Science*, 229, 81–83 (1985)].

Azokat az antitesteket, amelyek a jelen találmány heterokonjugátumait alkotják, kovalensen lehet egymáshoz kötni a szakterületen ismert technikákat alkalmazva, pl. hetero-bifunkcionális keresztkötő reagensek, pl. GMBS (maleimido-butiril-oxi-szukcinimid) vagy SPDP [N-szukcilmidil-3-(2-piridil-tio)propionát] segítségével [lásd pl. Hardy R.R. „Purification And Coupling Of Fluorescent Proteins For Use In Flow Cytometry” (Fluoreszcens fehérjék tisztítása és összekapcsolása a folyadék citometriában való felhasználáshoz), *Handbook Of Experimental Immunology*, 1. kötet. *Immunochemistry*; szerkesztők: Weir D.M. és munkatársai, 31.4–31.12 ol-

dal; 4. kiadás (1986); ez tárgyalja a hagyományos antitestkapcsolási technikákat].

Meg lehet érteni tehát, hogy a jelen találmány magában foglal minden heterokonjugátumot, amely legalább két azonos T limfocitán levő különböző limfocita CD-antigénnel reaktív, ahol a heterokonjugátum úgy hat, hogy fokozza vagy gátolja a limfociták aktiválását és működését.

Nyilvánvaló, hogy az antitesteken kívül a jelen találmány heterokonjugátumai beépíthetnek ligandumokat is, amelyek képesek kötődni limfocita-receptorokhoz. Így pl. a CD4 receptorról kimutatták, hogy reaktív a gp 120 ligandummal [ez a Human Immunodeficiency Virus (emberi immunhiány vírus) vagy HIV glikoprotein receptora] [Linsley és munkatársai: *J. Virology* 62, 3695–3702 (1988)]. Így egy heterokonjugátumot, amely anti-CD3 antitestet tartalmaz a gp 120 ligandumhoz keresztkötve, alkalmazhatunk a T sejtaktivitás fokozására a CD3 és DC4 receptorok keresztkötésével. Más ligandum konjugátumok, amelyek egy T sejt receptorral reaktív ligandumot tartalmaznak keresztkötve egy eltérő T sejt receptorral reaktív ligandummal, szintén szóba jönnek.

A jelen találmány szerinti heterokonjugátumokat és alkalmazásukat a T sejtaktiválásban példákban is bemutatjuk egy előnyös kiviteli mód segítségével, amelyben egy, a T sejtek felületén levő CD3 antigénnel reaktív antitestet konjugálunk egy olyan antitesthez, amely a CD4 antigénnel reaktív, így képzünk egy találmányunk szerinti új CD3/CD4 heterokonjugátumot. A CD4⁺ T sejtek kezelése ezzel a heterokonjugátummal megnövelt jelátvitelt eredményez a T sejtek segítő alkészletében, amint ezt az intracelluláris (Ca²⁺)_i mobilizálásban való jelentős növekedés és az 1, 2 és 3 inozit-foszfatok képződésében való jelentős növekedés jelzi, összehasonlítva a sejteknek csak CD3 elleni antitesttel végzett kezelésével. A CD3/CD4 heterokonjugátum jelfokozó aktivitása nem egyszerűen csak az oligomerizálásnak tulajdonítható, mivel a CD3/CD3 és CD4/CD4 homokonjugátumok vagy keverékek nem mutatják ezt a megnövekedett aktivitást, és a szakterületen már korábban demonstrálták, hogy az anti-CD3 és anti-CD4 antitestek keverékei inkább csökkentik, mint növelik ezt az aktivitást (lásd pl. Rosoff P. M. és munkatársai fentebb idézett munkáját). Ezenkívül a heterokonjugátum által demonstrált fokozott aktivitást gátolja a T sejtek előkezelése szolubilis, CD4 elleni monoklonális antitesttel.

Ezenkívül a CD3/CD4 heterokonjugátum új funkcionális aktivitást mutat a T sejtaktiválásában, vagyis a heterokonjugátum indukálja a CD4⁺ T sejtek burjánzását egy CD28-cal reaktív monoklonális antitest jelenlétében, és teljesen ko-mitogén a CD28 stimulálással még alacsony koncentrációknál, pl. 100 ng/ml koncentrációnál is. Az ilyen ko-mitogenicitás nem található meg a CD3-at egyedül, vagy CD3/CD3 vagy CD4/CD4 konjugátumokat alkalmazva. Ezenkívül úgy találjuk, hogy a jelen találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátumok a CD28 monoklonális antitesttel konjugálva képesek jelentősen segíteni a T sejteket a sejtcikluson keresztül, a sejtek jelentős frakciójának belépésével a második

ciklusba a stimulálás első három napján belül. Ezzel ellentétben az egyedül CD3 elleni vagy CD3/CD3 vagy CD4/CD4 homokonjugátumok elleni antitest nem indukál jelentős sejtciklusátmenetet.

Ezenkívül úgy találjuk, hogy a CD3/CD4 heterokonjugátum mind a CD3, mind a CD4 antigének módosulását idézi elő a T sejt felszínén, a CD4 felületi kifejeződését csökkentve. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a heterokonjugátum nemcsak egyszerűen lehorgonyozza a T sejtreceptort a T sejtfelületre, amint ezt korábban bemutatták abban az esetben, amikor CD3 elleni immobilizált antitestet alkalmaztak (lásd pl. Ledbetter J.A. és munkatársai: J. Immunol., fentebb idézett munka).

A CD3/CD4 heterokonjugátummal kapott eredmények azt demonstrálják, hogy a T sejt felületen lévő CD4 antigén aktív, pozitív szerepet játszik a jelátvitelben a CD4⁺ segítő T sejtek T sejtaktiválása során a CD3/Ti receptor komplex és a CD4 antigén közötti fizikai kölcsönhatás révén. A CD3/CD4 heterokonjugátum jelátvitelt fokozó képességének nincs megfelelő molekuláris magyarázata. A CD4 CD3/Ti-vel való kölcsönhatásának legalábbis egyik hatása az inozit-foszfát termelés fokozódása, azt sugallva, hogy a CD4 elősegítheti a membrán-foszfoinozítidek CD3/Ti által indukált hidrolízisét, amely inozit-trifoszfátokhoz vezet. Ezt támasztják alá a mi kísérleti adataink is, jelezve, hogy a CD3/CD4 heterokonjugátum inozit-foszfát kialakító aktivitását gátolja a sejtek reakciója az oldható CD4 monoklonális antitesttel. Ez a gátlás a CD4 és CD3/Ti antitest által indukált disszociációjának következménye lehet, ha a CD3/Ti egyedül kevésbé hatékony jelátvivő. Másik út lehet az, hogy a CD4 független kölcsönhatása antitestével negatív jelet vihet át, amely gátolja inozit-foszfátok kialakulását.

Mivel az inozit-trifoszfát (InsP₃) kialakulásáról úgy véljük, hogy közvetíti a citoplazmás kalcium mobilitását T sejtekben, a CD4 kölcsönhatásáról CD3/Ti-vel szintén úgy tűnik, hogy elősegíti a kalcium kibocsátását az intracelluláris raktárakból. A CD3/CD4 heterokonjugátum és CD3 antitest dózis (Ca²⁺) mobilizálási görbéinek összehasonlítása azt jelzi, hogy kimutatható (Ca²⁺)i választ érünk el sokkal kevesebb receptor kölcsönhatásból T sejteken, amikor a CD4-et és CD3/Ti-t szoros közelségben stimuláljuk, azaz CD3/CD4 heterokonjugátum alkalmazásával, mint amikor a CD3/Ti-t egyedül stimuláljuk (lásd a 3. ábrát). Így a jelen találmány CD3/CD4 heterokonjugátumának egyik tulajdonsága az a képesség, hogy T sejteket aktivál alacsony receptorkötési szintnél.

Mivel ismeretes, hogy az inozit-foszfát kialakulás és a kalciummobilizálás olyan jelek, amelyek a T sejtek T sejtosztódáshoz vezető aktiválásával társulnak, az itt bemutatott adatok világosan demonstrálják, hogy tekintet nélkül a művelet mechanizmusára a jelen találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátum hasznos a T sejtaktiválás és -osztódás fokozásában.

A jelen találmány körülölel más heterokonjugátumokat is, amelyek a CD3/CD4 heterokonjugátumhoz hasonlóan fokozott jelképző képességeket mutatnak a T sejtaktiválásban. Így pl. a jelen találmány szerinti

CD3/CD2 heterokonjugátum, CD3/CD6 heterokonjugátum, CD3/CD7 heterokonjugátum és CD3/CD8 heterokonjugátum szintén fokozott aktivitást mutat a kalcium mobilizálásában. Ezenkívül a jelen találmány szerint számos anti-CD5-tartalmú heterokonjugátumot alkotunk meg (pl. CD5/CD4 heterokonjugátumot, CD5/CD6 heterokonjugátumot), és CD5/CD8 heterokonjugátumot), amelyek fokozott aktivitást mutatnak a (Ca²⁺) mobilizálásában T sejtekben.

A jelen találmány szerinti heterokonjugátumokat, amelyek CD45 antigénnel vagy izo-formáival reaktív antitestet tartalmaznak, és amelyek limfocita-aktiválás és -működés gátlásra vagy T sejtaktiválás és -működés fokozására alkalmasak, olyan előnyös kiviteli módok segítségével példázunk, amelyekben egy CD3 antigénnel reaktív antitest egy CD45 antigénnel reaktív antitesttel van konjugálva, hogy egy új, jelen találmány szerinti CD3/CD45 heterokonjugátum keletkezzék. T sejtek kezelése ezzel a heterokonjugátummal a T sejtek CD3 által közvetített aktiválásának (transzmembránjel) megszűnését eredményezi, melyet az intracelluláris kalcium-mobilizálás jelentős csökkenése jelez.

Ezenkívül különböző CD receptorok közti kölcsönhatás megy végbe T sejtek felületén, pl. CD3, CD2 vagy CD28 és a CD45 receptor között, monoklonális antitesteket alkalmazva a limfocitán levő CD45 receptor keresztkötéséhez egy másik, ugyanazon a limfocitán levő CD receptorral. Ez a keresztkötés a citoplazmás szabad kalciumkoncentráció [(Ca²⁺)_i], növekedésének megszűnését eredményezi, amely a T sejt antigének sejt felületen levő közös receptorok keresztkötsége által indukált homoaggregátumok képződéséből jött létre. Az immobilizált anti-CD3 monoklonális antitest stimulálás által beindított T sejtosztódást az anti-CD45 antitest vagy anti-CD45R antitest gátolja, ha ugyanazon a felületen immobilizálva van, de oldatban nem. Hasonlóképpen a T sejtek osztódása a CD2 és CD28 receptorok stimulálása után anti-CD2, illetve anti-CD28 antitestekkel gátolva van, amikor egy CD45 antitestet keresztkötésbe viszünk vagy anti-CD2 antitesttel vagy anti-CD28 antitesttel, de nincs gátolva, amikor egy anti-CD45 antitestet külön kötöttünk a sejt felülethez. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy azok a heterokonjugátumok, amelyek CD45-tel vagy CD45 izo-formáival, pl. CD45R-rel reaktív antitesteket és T sejteken levő CD-antigénnel reaktív antitesteket tartalmaznak, hasznosak lehetnek a sejtek szabályozásában.

Ezzel ellentétben a T sejteken levő CD4 receptorok homoaggregátumai által indukált (Ca²⁺)_i növekedést nagyon félerősíti, ha a CD4 receptort keresztköttjük a CD45 receptorral, monoklonális antitesteket alkalmazva. Így egy új heterokonjugátum, amely CD45 elleni antitestből és CD45-tel vagy CD45R izo-formáival reaktív antitestből áll, szintén alkalmazható az összes CD4 pozitív sejtek vagy CD4 sejtek alpopulációi (amelyeket CD45 izo-formák kifejeződése határoz meg) T sejt működésének fokozására.

A jelen találmány szerinti heterokonjugátumok alkalmasak limfociták szabályozására, ezért alkalmazhatók

celluláris immunválaszok szabályozására olyan betegségeknel, mint a fertőző betegségek, rák, AIDS és autoimmun rendellenességek. Ezek a heterokonjugátumok különösen hasznosak lehetnek a celluláris immunválaszok szabályozásában olyan betegségek ellen, ahol a T sejtek hiánya vagy hibás szabályozása áll fenn.

Így pl. kimutatták, hogy a CD45 izo-formái abnormálisan fejeződnek ki bizonyos autoimmun betegségekben [Rose és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 7389–7393 (1985)]. Ennek megfelelően ezek a jelen találmány szerinti heterokonjugátumok, amelyek legalább egy, CD45 receptorral vagy CD45 izo-formákkal reaktív molekulát tartalmaznak, hasznosak lehetnek a limfociták működés szabályozásában autoimmun betegségekben.

Ezenkívül a jelen bejelentés heterokonjugátumai hasznosak lehetnek az immunfogékonyság fokozásában a szerzett immunhiányos szindrómában (AIDS) szenvedő betegekben. Ismeretes, hogy a CD4 antigén receptor-ként szolgál a humán immunhiányvírus (HIV), amely vírus az AIDS-ért felelős. Úgy véljük, hogy a CD4 az a receptor, amelyhez a HIV gp120 burok glikoproteinje kötődik a T sejtek vírussal való fertőzése során [lásd pl. Lasky L.A. és munkatársai: Cell 50, 975 (1987); és Kowalski M. és munkatársai: Science 237, 1351 (1987)]. A HIV fertőzés után a CD4 sejtfelületi kifejeződése alulszabályozott és a CD4 mRNS szintek csökkennek [lásd Hoxie és munkatársai: „Alternations In T4(CD4) Protein And mRNA Synthesis In Cells Infected With HIV” (Változások a T4(CD4) fehérje és mRNS szintézisben a HIV-vel fertőzött sejtekben), Science 234, 1123–1127 (1986)]. Azt is jól megalapozottan megállapították, hogy az AIDS-betegek csökkent immunérzékenységet mutatnak a szolubilis antigénekre [lásd pl. Lane H.C. és munkatársai: „Qualitative Analysis Of Immune Function In Patients With The Acquired Immunodeficiency Syndrome” (Az immunfunkciók minőségi elemzése szerzett immunhiány-szindrómában szenvedő betegekben), New Eng. J. Med. 313(2), 79–84 (1985)]. In vitro tanulmányok azt mutatják, hogy a tisztított HIV gp120 gátolhatja a T sejt választékot mitogén stimulálásra; ez az eredmény hasonló ahhoz a hatáshoz, amelyet mi láttunk a CD4 elleni oldható monoklonális antitestet alkalmazva [lásd Mann D. L. és munkatársai: J. Immunol. 138, 2640–2644 (1987)].

Így feltételezhető, hogy az AIDS-betegekben látható immun-visszaszorítás a HIV fertőzés hatásával kapcsolatos a CD4 antigén-kifejeződéssel, vagyis a CD4 alulszabályozása a T sejten, amely HIV fertőzés után történik, hatással lehet az immunérzékenységre, csökkentve a sejt jelfeltevő képességét, csökkentett T sejtaktiváláshoz vezetve az antigénre való válaszbán. Ennek a modellnek az alátámasztására úgy találtuk, hogy a CD3 által stimulált szabad kalciumkoncentráció-növekedés károsodik a HIV-vel fertőzött sejtekben [Linette G. P. és munkatársai: Science 241, 573–576 (1988)]. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a találmány szerinti heterokonjugátumok, főleg a CD3/CD4 heterokonjugátumok hasznosak lehetnek a HIV fertőzés eredménye-

ként létrejövő hibás T sejt működés tanulmányozásához vagy kezeléséhez.

A jelen találmány egyik kiviteli módja szerint a heterokonjugátumokat hasznosíthatjuk a T sejtek in vitro aktiválásához. Ezt az aktiválást úgy hajthatjuk végre, hogy egy betegből vett T limfocitákat érintkezésbe hozunk legalább egy találmányunk szerinti heterokonjugátummal in vitro, amely által a T sejtek aktiválttá válnak, majd ezeket visszajuttathatjuk infúzióval az autológ donorba [lásd pl. Rosenberg S. A. és munkatársai: „Immunotherapy Of Cancer By Systemic Administration Of Lymphoid Cells Plus Interleukin 2” (Rák immunterápiája limfoid sejtek és interleukin-2 szisztematikus beadásával), J. Biol. Resp. Modif. 3, 5501–5511 (1984)]. A kezelésnek ez a módszere magában foglalhatja a T sejtek in vitro együtt-inkubálását vagy előinkubálását más immunmodulátorokkal.

Egy másik kiviteli mód szerint a heterokonjugátumokat a T sejtek in vivo aktiválására lehet alkalmazni a heterokonjugátumot egy betegbe injektálva, esetleg más szerekkel, pl. interleukin-2-vel (IL-2), növekedési faktorokkal vagy agonista antitestekkel együtt, pl. CD5-tel [lásd pl. Clark E.A. és munkatársai: „Amplification Of The Immune Response By Agonistic Antibodies” (Az immunválasz sokszorozása agonista antitestekkel). Immunology Today 7, 267–270 (1986)] és CD28-cal (lásd a későbbi 1. példát).

A jelen találmány szerinti heterokonjugátumokat be lehet adni in vivo is a beadás hagyományos módjait alkalmazva, ezek közé beleértve (de nemcsak ezekre korlátozva) az intravénás, orális, szubkután, intraperitoneális vagy intralimfatikus beadást. Az intravénás beadás az előnyös.

A jelen találmány szerinti gyógyászati kompozíciók, amelyek a heterokonjugátumokat tartalmazzák, sokféle adagolási formában létezhetnek, amelyek között találjuk (de nemcsak ezekre korlátozódnak) a szilárd, félszilárd és folyékony adagolási formákat, pl. tablettákat, pilulákat, porokat, folyékony oldatokat vagy szuszpenziókat, végbélkúpokat, polimer mikrokapszulákat vagy mikro-hólyagocskákat, liposzómákat, és injektálható vagy infúzióban beadható oldatokat. Az előnyös forma függ a beadás módjától és a gyógyászati alkalmazástól.

A heterokonjugátum-kompozíciók magukban foglalnak hagyományos, gyógyászati elfogadható hordozókat, amelyek a szakterületen ismertek; ilyenek pl. a humán szérum albumin, pufferanyagok, mint pl. foszfátok, víz, sók, vagy elektrolitok.

A beadásnak és az adagolási menetrendnek a leghatékonyabb módja a jelen találmány szerinti heterokonjugátum kompozícióknál függ a betegség súlyosságától és lefolyásától, a beteg egészségi állapotától és a kezelésre adott választól, és a kezelőorvos ítéletétől. Következésképpen a heterokonjugátumok adagolását az egyes betegekhez kell beállítani. Általában azonban a jelen találmány heterokonjugátumainak hatékony dózisa 1–100 mg/m² sejtfelület közti tartományban van. A T sejtek in vitro kezelésénél 200 µg–2 mg heterokonjugátum/10⁹ sejt dózist alkalmazhatunk. A találmány szerinti heterokonjugátumokat alkalmazhatjuk diagnosztikai célra is, hogy mérjük egy adott T sejtfelületi antigén, pl. CD antigén receptor funk-

cióját T sejt hiányos vagy hibás T sejtszabályozással rendelkező betegekben. Kalcium- vizsgálatot, amelyet itt leírtunk jelátvitel méréséhez alkalmazott kalcium-vizsgálattal (lásd az 1. példát), és megfelelő kontrollokat alkalmazva a CD funkciók hibák mérhetők a normális, illetve betegdonorból vett T sejtaktiválás összehasonlításával, a találmány szerinti speciális heterokonjugátummal végezve az aktiválást. Így pl. a találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátum fokozza a $[Ca^{2+}]_i$ mobilizálást olyan fehérje-koncentrációknál, amelyek alatta vannak azoknak a koncentrációknak, amelyek az oldható anti-CD3 egyedüli alkalmazásánál láthatók. Így ezeknél a kis adagoknál ténylegesen mérhető a CD4 receptor működése. Ez az oldható anti-CD4-nek azt a képességét tükrözi, hogy blokkolja a CD3/CD4 heterokonjugátum aktivitását ezeknél a dózisoknál (lásd a 2. ábrát).

Hasonlóképpen a CD3/CD4 heterokonjugátumoknál alacsony dózisoknál a CD8 receptor működését mérhetjük. Ezeknél a dózisoknál azután a heterokonjugátumokat alkalmazhatjuk, hogy kimutassuk a hibákat vagy hiányokat egy adott CD receptor funkcióban különböző betegségi állapotokban, pl. rákban és autoimmun betegségeiben. Egy másik módszerben a kalciumvizsgálatok bármilyen dózissal, bármely találmányunk szerinti heterokonjugátummal végezhetők, amíg a megfelelő egyedi-antitestszabályozás végbemegy, vagyis a heterokonjugátum aktivitását össze kell hasonlítani azoknak a nem konjugált antitesteknek az aktivitásával, amelyek a nevezett heterokonjugátum alkotórészeit képezik [lásd pl. a 221,768 számú európai szabadalmi bejelentést, amelyet 1987. május 13-án tettek közzé (Reinherz és munkatársai)]. Abból a célból, hogy az itt leírt találmány jobban megérthető legyen, az alábbi példákat ismertetjük. Érthető azonban, hogy ezek a példák csak bemutatás céljából szolgálnak, és nem azért alkottuk meg ezeket, hogy bármiképpen is korlátozzák a találmány oltalmi körét.

1. PÉLDA

Az alábbi példa a jelen találmány új heterokonjugátumának előállítását és jellemzését írja le. A jelen kiviteli mód szerint egy CD3-mal reaktív antitestet keresztkötünk egy CD4-gyel reaktív antitesttel, így alkotjuk meg a CD3/CD4 heterokonjugátumot, amely membránon keresztüli fokozott jelképzést idéz elő a heterokonjugátummal kezelt CD4⁺ (vagyis segítő) T sejtek aktiválásában.

A találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátum előállítása

A CD3 és CD4 antitestek, amelyeket ebben a kiviteli módban alkalmazunk a heterokonjugátum előállítására, a G19-4 (Balb/c, IgG₁, ATCC 4B 9536, illetve G17-2 (Balb/c, IgG₁). Ezeket az antitesteket úgy állítjuk elő, amint ezt Ledbetter J. A. és Clark E. leírták [„Surface Phenotype And Function Of Tonsillar Germinal Center And Mantle Zone B Cell Subsets” (Mandulacsíra központi és burkolati zóna B sejtalkészletek felületi fenotípusa és működése), *Human Immunology* 15,

30-43 (1986); és Ledbetter és munkatársai: „An Immunoglobulin Light Chain Dimer With CD4 Antigen Specificity” (Immunoglobulin könnyű láncdimer CD4 antigén fajlagossággal), *Molecular Immunology* 24(12), 1255-1261 (1987)]. Ezenkívül más anti-CD3 és anti-CD4 monoklonális antitestek is állnak rendelkezésre kereskedelmi forgalomban [pl. T3 (Coulter Co.), illetve FL és Leu3 (Becton Dickinson, Kalifornia)], amelyek szintén alkalmazhatók jelen találmány szerinti heterokonjugátumok megalkotására. A G19-4 és G17-2 antitesteket aszcitesz folyadékból tisztítjuk sókicsapással és DEAE kromatográfiával, ezt felhasználás előtt dialízis és szűrés követi 0,45 μ-os szűrőn keresztül.

A két monoklonális antitestet konjugáljuk 1:1 molarányban a GMBS heterobifunkcionális keresztkötő reagenssel (Calbiochem, La Jolla, Kalifornia) és 5-immuno-tiolan. HCl-lel (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois), amint ezt Hardy R.R. a fikoeritrinnél fentebb idézett munkájában leírta. A létrejött heterokonjugátumot elkülönítjük a szabad antitesttől Superose 6 (Pharmacia, Uppsala, Svédország) FPLC méretkizárásos kromatográfiával, és vizsgáljuk a reaktivitást mind CD3-mal, mind CD4-gyel, a heterokonjugátumnak azt a képességét vizsgálva, hogy blokkolja a fluorescein-konjugált anti-CD3 és anti-CD4 közvetlen kötését. Ezt a CD3/CD4 konjugátumot G19-4/G17-2-nek nevezzük.

Fokozott kalcium mobilizálódás a találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátum segítségével

A G19-4/G17-2 heterokonjugátumot ezután arra a képességére vizsgáljuk, hogy fokozza-e a sejtekben levő citoplazmás kalcium mobilizálását, összehasonlítva az egyedül alkalmazott G19-4 (anti-CD3) aktivitásával. Az alkalmazott sejtek humán perifériás vérlymfociták, amelyeket perifériás vérből tisztítunk Ficoll-Hypaque-on végzett centrifugálással, majd műanyaghoz kötjük, hogy a monociták nagyobbik részét eltávolítsuk.

A $(Ca^{2+})_i$ növekedését a sejten belül indo-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) és 50HH/2150 modell folyadék citométer (Ortho Diagnostic Systems, Inc., Westwood, Massachusetts) alkalmazásával mérjük, amint ezt korábban Rabinovitch P.S. és munkatársai leírták [„Heterogeneity Among T Cells In Intracellular Free Calcium Responses After Mitogen Stimulation With PHA Or Anti-CD3. Simultaneous Use Of Indo-1 And Immunofluorescence With Flow Cytometry” (Heterogenitás a T sejtek között az intracelluláris szabad kalcium válaszokban PHA-val vagy anti-CD3-mal végzett stimulálás után. Indo-1 és immunfluoreszcencia szimultán alkalmazása folyadék-citometriával), *J. Immunol.* 137(3), 952-961 (1986); ez az irodalmi hely referenciaként van beépítve a jelen bejelentésbe. Röviden ismertetve: sejteket ($5 \cdot 10^7/ml$) kezelünk indo-1-gyel ennek acetoxi-metil észtereivel (Molecular Probes, Junction City, Oregon) végzett inkubálásával; ez az anyag át tud hatolni a sejtmembránon és hidrolizál a citoplazmában át nem hatoló, bezárt formává. Az inkubálást 45 percig végezzük 37 °C hőmérsékleten olyan tápközegben, amely a megadott indo-1 koncentrációt tartalmazza. A sejteket azután mossuk és újra szusz-

pendáljuk friss tápközegben $2,5 \cdot 10^6$ /ml koncentrációban, és sötétben tároljuk szobahőmérsékleten az elemzésig. Az egyes vizsgálatoknál az indo-1-gyel kezelt sejteket tápközeggel $1 \cdot 10^6$ /ml koncentrációra hígítjuk, és ki-egyensúlyozzuk 37°C hőmérsékleten. A méréseket spektrofotometriát és folyadék-citometriát alkalmazva hajtjuk végre, amint ezt Rabinovitch fentebb idézett munkájában leírta. A hisztogramokat olyan program segítségével elemezzük, amely az indo-1 ibolya/kék fluoreszcencia-hányados átlagát számítja ki az idő függvényében.

Ezenkívül a válaszoló sejtek százalékát is elemezzük az idő függvényében olyan programok segítségével, amelyek először meghatározzák az indo-1 hányados értékét, amely két standard deviáció a kontrollsejtekhez tartozó értékeknél, majd a sejtek százalékát ábrázolják e felett a küszöbérték felett, az idő függvényében. 100 adatpont van az x (idő) tengelyen minden folyadék-citometriás adatnál.

Amint az 1. ábrában bemutatjuk, a G19-4/G17-2 koncentrációja, amely ahhoz szükséges, hogy a Ca^{2+} [$(\text{Ca}^{2+})_i$] koncentrációja növekedjék, 1,5–2 nagyságrenddel kisebb, mint az a koncentráció, amely akkor szükséges, amikor G19-4-et alkalmazunk egyedül. Ezenkívül a G19-4/G17-2 heterokonjugátum aktivitása CD4^+ T sejtekre korlátozódik, mivel a CD4^+ sejtekre vonatkozó dúsitás az immunfluoreszcencia szerint megfelelő növekedést eredményez a $(\text{Ca}^{2+})_i$ aktivitásban és a megfelelő sejtek számában. Így, amint a 2. ábra bemutatja, amikor perifériás vérlymfocitákat stimulálunk G19-4/G17-2 heterokonjugátumokkal, az átlagos maximális $(\text{Ca}^{2+})_i$ válasz a sejtek részéről mintegy 1300 nmol/l és a sejtek mintegy 60%-a válaszol. Amikor azonban a sejteknek csak a CD4^+ alkészletét elemezzük, az átlagos maximális $(\text{Ca}^{2+})_i$ válasz $>10\,000 \text{ nmol/l}$ és a sejtek 95%-a válaszol. Ezenkívül a heterokonjugátum aktivitását CD4^+ sejtekben a sejtek előkezelése csaknem teljesen gátolja, az előkezelést -5°C hőmérsékleten végezve $5 \mu\text{g/ml}$ G17-2-vel (anti- CD4), amelyet $0,4 \mu\text{g/ml}$ heterokonjugátum követ.

A CD4^+ sejteket úgy elemezzük, hogy kiszűrjük a CD8 negatív, CD11 negatív, CD16 negatív és CD20 negatív sejteket, amint ezt a 2. ábra beiktatott paneljában bemutatjuk. A CD4^+ sejtekre való negatív szelekciót úgy hajtjuk végre, hogy a perifériás vérlymfocitákat fikoeritrin (PE)-konjugált 2H7-tel, amely CD20-szal reaktív monoklonális antitest [lásd pl. Clark E.A. és munkatársai: „Role Of Bp35 Cell Surface Polypeptide in Human B-Cell Activation” (Bp35 sejtfelületi polipeptid szerepe a humán B sejtaktiválásban), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1766–1770 (1985)], FC-2-vel, amely CD16 elleni monoklonális antitest [lásd pl. Anasetti C. és munkatársai: „Induction Of Calcium Flux And Enhancement Of Cytolytic Activity In Natural Killer Cells By Cross-Linking Of The Sheep Erythrocyte Binding Protein (CD2) And The Fc-Receptor (CD16)” (Kalciumáramlás indukálása és citolitikus aktivitás fokozása természetes ölüsejtekben a juh eritrocita kötő fehérje (CD2) és az Fc-receptor (CD16) keresztkötésével), J. Immunol. 139(6), 1772–1779 (1987)], G10-1-gyel, amely CD8 elleni monoklonális antitest [lásd pl.

Ledbetter J.A. és munkatársai: „Covalent Association Between Human Thymus Leukemia-Like Antigenes And CD8 Molecules” (Kovalens kapcsolat humán timusz leukémia-szerű antigének és CD8 molekulák között) J. Immunol. 134, 4250–4254 (1985)], és 60.1-gyel, amely CD11-gyel reaktív monoklonális antitest [lásd pl. Bunyon J.P. és munkatársai „Differential Participation Of Epitopes On Alpha And Beta Chains Of The LFA Family In Neutrophil Aggregation As Defined By Workshop Monoclonal Antibodies” (Az LFA család alfa- és béta-láncain levő epitópok megkülönböztető részvétele a neutrofil aggregációban, amint ezt monoklonális antitest munkamenettel meghatározzuk); a Leukocyte Typing III. című korábban idézett szakkönyv 844–47. oldalán] festjük, és a nem festett sejteket, amelyek $>95\%$ -ban CD4 pozitív sejtek, kiszűrjük.

A G19-4 összehasonlító titrálását is elvégezzük a G19-4/G17-2 heterokonjugátummal, 5 mmol/l EGTA [etilén-glikol-bisz(β -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav] jelenlétében, amely kelátot képez és így eltávolítja az extracelluláris kalciumot, így megmutatva, hogy a kalcium-mobilizálás citoplazmás forrásokból mennyiben tulajdonítható a heterokonjugátum hatásának. A 3. ábra bemutatja, hogy mintegy két logaritmikusság egység növekedés van a kalcium mobilizálásának képességében G19-4/G17-2 heterokonjugátummal EGTA jelenlétében. Extracelluláris kalcium jelenlétében a végpontra végzett titrálások szintén mintegy két logaritmikusság egység növekedést mutatnak az aktivitásban (adatokat nem mutatunk be).

Abból a célból, hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy a CD3 vagy CD4 antigénekhez való kötődés felelős a CD3/CD4 heterokonjugátumok hatásaiért a $(\text{Ca}^{2+})_i$ -re, CD3/CD3 és CD4/CD4 homokonjugátumokat alkotunk, hogy összehasonlítsuk a CD3/CD4 heterokonjugátummal. A homokonjugátumokat ugyanúgy alkotjuk meg, amint fentebb a CD3/CD4 heterokonjugátumnál leírtuk; ezeket G19-4/G19-4-nek, illetve G17-2/G17-2-nek nevezzük. Amint az alábbi I. táblázatban látható, sem a CD3/CD3 homokonjugátum, sem a CD3/CD3 és CD4/CD4 homokonjugátumok keveréke nem utánozza a CD3/CD4 heterokonjugátum fokozott hatását $(\text{Ca}^{2+})_i$ -re. Ez az adat azt sugallja, hogy a CD3/CD4 heterokonjugátum fokozott aktivitása nem a heterokonjugátum értékűségének a függvénye és ezért valószínűleg a CD3 és CD4 molekulák közelségének eredménye, amely ezeknek az antigéneknek a kölcsönhatása révén áll elő a heterokonjugátummal. Ezenkívül a heterokonjugátumok és homokonjugátumok valamivel kevésbé aktívak, mint a szabad antitestek a kötési vizsgálatokban közvetett festést és folyadék-citometriát alkalmazva (adatokat nem közlünk). Így a CD3/CD4 heterokonjugátum egyedülálló aktivitása nem valószínű, hogy a CD3 -kötő affinitásának hatásával kapcsolatos, amely heterokonjugátum második fajlagosságának lenne tulajdonítható.

I. TÁBLÁZAT

CD4^+ T sejt $(\text{Ca}^{2+})_i$ válaszok CD3/CD4 heterokonjugátumra a CD3/CD3 és CD4/CD4 homokonjugátumokhoz hasonlítva

Stimulálás	Koncentráció µg/ml	Csúcsátlag (Ca ²⁺)i nmól/l	Növekedés az alapértéken felül
Semmi	–	130	1,0
CD3/CD4 hetero- konjugátum	10	15 600	120
	2	10 900	83
	0,4	4140	32
	0,08	810	6,2
CD3/CD3 homo- konjugátum	50	2360	18
	10	559	4,3
	2	301	2,8
CD4/CD4 homo- konjugátum	100	130	1,0
	50	130	1,0
CD3/CD3 homo- konjugátum	25 + 25	590	4,5
	5+5	272	2,1
CD4/CD4 homo- konjugátum	1+1	251	1,93

A (Ca²⁺)i válaszok vizsgálata indo-1-gyel kezelt és PE-vel konjugált anti-CD20-szal, anti-CD8-cal és anti-CD16-tal festett perifériás vérlimfocitákat alkalmaz, amint ezt fentebb leírtuk. A nem festett sejteket, amelyek >95%-ban CD4⁺ sejteket tartalmaznak, elemezzük. A csúcsválasz átlagosan a stimulálástól számított első 5 percben történik.

A találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátum hatásai az inozit-foszfát szintézisre

Mivel úgy véljük, hogy a citoplazmás kalcium-mobilizálását T sejtekben az inozit-trifoszfát (InsP₃) kialakulása közvetíti, az inozit-foszfátok növekedését tisztított CD4⁺ T sejteken mértük, egyedül CD3 elleni monoklonális antitestekkel, vagy CD3/CD4 heterokonjugátum elleni monoklonális antitestekkel végzett stimulálás után.

A CD4⁺ sejteket úgy tisztítjuk, amint ezt June C. H. és munkatársai leírták [„T-Cell Proliferation Involving The CD28 Pathway Is Associated With Cyclosporine-Resistant Interleukin 2 Gene Expression” (A CD28 utat magában foglaló T sejtostódás társul a ciklosporin-rezisztens interleukin-2 gén kifejezéssel), Mol. Cell. Biol. 7(12), 4472–4481 (1987)]. Röviden ismertetve: perifériás vérlimfocitákat nyerünk laboratóriumi személyzet részéről végzett leukoforézissel, ezt követi a Ficoll/hypaque sűrűség-gradiens centrifugálás. Ez után T sejtek CD4⁺ alkészletét izoláljuk negatív szelekcióval mágneses gyöngy immun-abszorpcióval, miután a CD8⁺, CD11⁻, CD16⁺, CD14⁺ és CD20⁺ sejteket beburkoltuk a megfelelő monoklonális antitest telítő mennyiségével [az antitestek legtöbbjéről már korábban megadtuk a referenciát, kivéve az anti-CD14 monoklonális antitestet, a 20.3-at, amelyet úgy készítünk el, ahogyan ezt Kamoun M. és munkatársai leírták: „Human Monocyte-Histiocyte Differentiation Antigens Identified By Monoclonal Antibodies” (Monoklonális antitestek által azonosított humán monocita-hisztocita differenciációs antigének), Clin. Immunology and Immunopathology 29, 181–185 (1983)]. Ez a stratégia kihatással van a CD4 és CD8 felületi antigének reciprok és át nem fedő eloszlását a nyugvó perifériás vér T limfocitákban. A sejteket háromszor mossuk, hogy eltávolítsuk a nem kötött antitesteket, majd inkubáljuk kecske anti-egér immunoglobulinnal fedett mágneses részecskével (Advanced Magnetics Institute, Cambridge, Massachusetts), és a gyöngyökkel burkolt sejteket

mágneses szeparálással eltávolítjuk. Tipikusan mintegy 500.10⁶ CD4⁺ T sejtet nyerünk ki, amelyek >98%-ban CD4⁺ sejtek, amint ezt folyadék-citometriával megbecsüljük, és <0,1%-ban tartalmaznak monocitákat, amint ezt nem fajlagos észterázra való festéssel meghatározzuk.

A tisztított CD4⁺ T sejteket azután újra szuszpendáljuk 2–4.10⁶ sejt/ml koncentrációban 10% hőinaktivált borjúembrió-szérummal kiegészített RPMI 1640-ben (ezt a későbbiekben röviden „tápközeg”-nek nevezzük), ahol ez a tápközeg még 4 µg/ml PHA-val és 40 µCi/ml myo-2³H]-inozittal (37 MBq/ml; Amersham Corp., Arlington Heights, Illinois) is ki van egészítve, és inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten 5% CO₂-t tartalmazó levegőben. 72 óra múlva a sejteket háromszor mossuk és újra szuszpendáljuk 5.10⁶ sejt/ml koncentrációban olyan „tápközeg”-gel, amely 10 mmól/l LiCl-lel van kiegészítve. 20 perces inkubálást követően G19-4-et vagy a G19-4/G17-2 heterokonjugátumot adunk hozzá t=0 időben 1µg/ml végső koncentrációban. Ezután különböző időpontokban 5.10⁶ mennyiségű mintákat veszünk és 10 másodpercig ülepitjük Eppendorf 5414 centrifugában. A közeg leszívása után 1 ml jéghideg 10%-os TCA-t (tömeg/térfogat) adunk a sejtüledékhez. Az oldhatatlan anyagot 900 g-nél végzett 5 perces centrifugálással távolítjuk el, majd a felülúszót 6 térfogat dietil-éterrel extraháljuk, majd semlegesítjük. A [³H]-inozit foszfátokat anioncserélő kromatográfiával különítjük el formiát formában levő Dowex 1-X8-at alkalmazva (100–200 mesh, Bio-Rad, Richmond, Kalifornia), és mennyiségileg értékeljük folyadékszintillációs spektroszkópiával Bio-Safe 2 készülékben (Research Products, Int., Mt. Prospect, Illinois). Ezt a munkamenetet a triciált inozit-foszfátok mérésére Imboden J.B. és munkatársai írják le [„Transmembrane Signalling By The Cell Antigen Receptor” (fentebb idézett munka) és Imboden J.B. és munkatársai: „Antigen Recognition By A Human T Cell Clone Leads To Increases In Inositol Triphosphate” (fentebb idézett munka)].

Amint a 4. ábra bemutatja, 1 µg/ml-nél a stimulált

heterokonjugátum jelentősen fokozza az inozit-foszfát 1, 2 és 3 keletkezését, míg a G19-4 önmagában csak csekély növekedést okoz az inozit-foszfát 1-ben. A tricíált inozit-foszfát szinteket a nem stimulált sejtekben az indulásnál ($t=0$) és a kísérlet végén ($t=10$ perc) egyaránt bemutatjuk.

További kísérletekben, amelyeket az 5. ábrában mutatunk be, megfigyeljük, hogy egy CD4 elleni monoklonális antitest, a G17-2, gátolja a heterokonjugátum által okozott inozit-foszfát választ. A G17-2 nem gátolja az inozit-foszfát választ egy szabad anti-CD3 monoklonális antitestre, a G19-4-re. Ezek szerint a kísérletek szerint a CD4⁺ T sejteket 72 órán inkubáljuk olyan tápközegben, amely [³H]-inozidot (40 μ Ci/ml) és PHA-t (4 μ g/ml) tartalmaz, erőteljesen mossuk, majd újra szuszpendáljuk olyan tápközegben, amely 10 mmól/l LiCl-t is tartalmaz, és 20 percig inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten. A kiválasztott mintákhoz azután G17-2-t adunk [biotinnal konjugált formában, amint ezt Goding J. W. a „Monoclonal Antibodies; Principles And Practices” (Monoklonális antitestek; Elvek és gyakorlat) című szakkönyvében leírja, a 230. oldalon (Academic Press, (1983)]. 5 perc múlva G19-4-et, G19-2-t, G19-4/G17-2 heterokonjugátumot és avidint adunk hozzá, amint jelöljük, és az inkubálást folytatjuk további 10 percen át. A sejtminták (10^7 sejt/minta) 10% TCA-ban végzett lízisét követően a [³H]-inozit-foszfátokat extraháljuk, anion-cserélő kromatográfiával elválasztjuk és mennyiségileg értékeljük, amint ezt fentebb leírtuk. Az 5. ábrában két független kísérletet ábrázolunk. Az átlagot \pm standard hibával három párhuzamos sejt-mintánál mutatjuk be és a monoklonális antitest és avidin végső koncentrációját az ábrában μ g/ml-ben adjuk meg.

Így a kísérleti adatok nemcsak a találmány szerinti heterokonjugátumok fokozott hatását mutatják be az inozit-foszfát-termelésre, hanem bemutatják azt is, hogy a CD4 elleni szolubilis antitest gátolja ezt a T sejt választ. Az adatok tehát azt sugallják, hogy a CD4 antigén fontos szerepet játszik a T sejt választok stimulálásában.

A CD3/CD4 heterokonjugátumnak új aktivitása van a T sejtaktiválásban

Rájöttünk arra, hogy a jelen találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátumnak van egy új funkcionális aktivitása a T sejtaktiválásában, amint ezt a CD3/CD3 és CD4/CD4 homokonjugátumokat, mint kontrollokat alkalmazó sejtosztódási vizsgálatokban bemutatjuk. Ezekben a vizsgálatokban CD4⁺ T sejteket tenyésztünk négy párhuzamos mintában lapos fenekű, 96 üreges mikrotitráló lemezekben $5 \cdot 10^4$ sejt/üreg mennyiségben 5% hőinaktivált borjúembrió-szérumot tartalmazó RPMI 1640 tápközegben (Hyclone, Logan, Utah). A CD4⁺ sejteket 3 napon át tenyésztjük vagy G19-4-gyel (anti-CD3), G19-4/G19-4-gyel (CD3/CD3 homokonjugátum), G19-4/G17-2-vel (CD3/CD4 heterokonjugátum) vagy G17-2/G17-2-vel (C4/CD4 homokonjugátum) PMA-val (forbolmirisztát-acetát) (1 μ g/ml) vagy PMA nélkül, vagy 9.3 monoklonális antitesttel, amely a T sejt felületen levő CD28 antigénnel reaktív antitest [(Balb/cXC57BL/6)FI, IgG_{2a}] [lásd pl. Hansen J.A. és munkatársai: „Monoclonal Antibodies

Identifying A Novel T Cell Antigen And Ia Antigens Of Human Lymphocytes” (Egy új T sejt antigént és humán limfociták Ia antigénjeit azonosító monoklonális antitestek”), Immunogenetics 10, 247–52 (1980)]. Az összes antitesteket és konjugátumokat 1 μ g/ml koncentrációban alkalmazzuk. A timidin beépülést (átlag $\text{cpm} \pm$ standard hiba) a 3. napon határozzuk meg folyadékszintillációs számlálóban a 3 napos tenyészet sejtjeinek legalább 8 órás együttléte után 1 μ Ci/üreg ³H-timidinnel (New England Nuclear Corp., Boston, Massachusetts).

Amint a 6. ábrában bemutatjuk, amikor a tisztított CD4⁺ T sejteket tenyésztjük vagy anti-CD3 reagensekkel vagy csak PMA-val burjánzás nem figyelhető meg. PMA jelenlétében az összes, CD3 elleni monoklonális antitesteket tartalmazó antitestkészítmény hasonló [³H]-timidin beépülési szinteket indukál, míg a CD4 homokonjugátum nem mitogén. Amikor azonban a különböző reagenseket a CD28 elleni monoklonális antitesttel, a 9.3-mal való szinergizmusra vizsgáljuk, jelentős különbségek figyelhetők meg. Csak a CD3/CD4 heterokonjugátum indukál fogékonyságot a CD28 antitestre. Az előzetes vizsgálatok kimutatták, hogy a CD28 stimulálás nem mitogén a tisztított T sejtkenél, bár a CD28 elleni monoklonális antitest a T sejtkenek >95%-ában fejlődést idéz elő a sejtciklus folyamán PMA jelenlétében (lásd pl. June C.H. és munkatársai: Mol. Cell. Biol., fentebb idézett munka). Az a jelenlegi felfedezés, hogy a tisztított T sejt CD28 stimulálása nem ko-mitogén a folyékony fázisú CD3 antitestekkel, igazolja az előzetes tanulmányokat [lásd pl. Weiss A. és munkatársai: Synergy Between The T3/Antigen Receptor Complex And Tp44 In The Activation Of Human T Cells” (Szinergizmus a T3/antigén receptorkomplex és a Tp44 között humán T sejt aktiválásával), J. Immunol. 137(3), 819–825 (1986)].

Abból a célból, hogy meghatározzuk, vajon a különbség a CD3/CD4 heterokonjugátum és a CD3/CD3 homokonjugátum között a CD28 stimulálást illetően minőségi vagy mennyiségi, CD4⁺ T sejteket tenyésztünk G19-4-gyel, G19-4/G17-2 heterokonjugátummal vagy G19-4/G19-4 homokonjugátummal különböző koncentrációknál, vagy PMA-val (1 μ g/ml) vagy egy anti-CD28 monoklonális antitesttel, a 9.3-mal (1 μ g/ml). Amint a 7. ábrában látható, a G19-4/G17-2 heterokonjugátumról úgy találjuk, hogy teljes mértékben ko-mitogén a CD28 stimulálással akár még olyan kis koncentrációknál is, mint 100 ng/ml, míg a CD3/CD3 homokonjugátum nem mitogén 10 μ g/ml-nél. Ezzel ellentétben a sejt ko-mitogén válasza PMA-ra és CD3 stimulálásra hasonló a CD3 antitest konjugátumoknál minden vizsgált koncentrációban. Ezenkívül a kinetikai kísérletek feltárják, hogy a CD3/CD3 homokonjugátum és a CD3/CD4 heterokonjugátum közötti különbség a CD28 stimulálásban nem tulajdonítható a burjánzás időbeli lefolyása eltolódásának (adatokat nem mutatunk be).

Így úgy tűnik, hogy a CD4⁺ sejt, amelyek osztódással nem válaszolnak a CD3-mal reaktív oldható antitestre, válaszolnak a jelen találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátumra a CD28 elleni antitest jelenlétében történő osztódással.

Abból a célból, hogy tovább vizsgáljuk a CD3/CD4 heterokonjugátum hatásait a T sejtosztódásra, vizsgáljuk a sejtciklus kinetikát olyan technikával, amely lehetővé teszi a sejtek megkülönböztetését a három egymást követő sejtciklus mindegyik fázisában stimulálás után. A CD4⁺ T sejteket folyadék-citometriával osztályozzuk Cytofluorograph 50 HH sejtosztályozó berendezéssel (Ortho Diagnostic Systems, Inc., Westwood, Massachusetts), miután a sejteket megfestettük PE-vel konjugált CD8, CD16 és CD20 antitestekkel (amint erre korábban utaltunk). A negatív sejteket kiválasztjuk; ezek 97%-ban CD4 pozitívak a kiválasztott populáció újabb elemzése szerint. Az immunfluoreszcenciás paraméteren kívül mérjük az előre menő szóródást és derékszögű szóródást és ezt használjuk a limfocitapopuláció behatárolására és a monociták, sejtörmelék és elpusztult sejtek kizárására. A sejteket 2000 sejt/másodperc áramlási sebességnél osztályozzuk 20 °C hőmérsékleten.

Az osztályozott tenyészeteket négy párhuzamosban tenyésztjük kerek fenekű, 96 üreges mikrotitráló lemezekben (Nunc, Kampstrip, Dánia) 5.10⁴ sejt/üreg mennyiségben. A G19-4/G17-2 heterokonjugátumot vagy CD3 vagy CD4 homokonjugátumokat 5 µg/ml koncentrációban adjuk a tenyészetbe, vagy PHA-t adunk hozzá 10 µg/ml koncentrációban. A sejteket 10% borjúembriószérummal kiegészített RPMI 1640-ben növesztjük 0,6 µg/ml 9.3 anti-CD28 monoklonális antitest, 1,5.10⁻⁴ mól/l BrdU, 100 egység/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin és 5.10⁻⁵ mól/l 2-merkaptó-etanol jelenlétében. 3 nappal a 37 °C hőmérsékleten (5% CO₂) végzett inkubálás után a tápközeget gyengéden leszívátjuk az üregekről és helyettesítjük 0,2 ml festőoldattal, amely 0,1 mól/l trisz (pH 7,4), 0,9% NaCl-t, 1 mmól/l CaCl₂-t, 1,0 mmól/l MgCl₂-t, 0,2% BSA-t, 0,1% NP40-et, 1 µg/ml Hoechst 33 258-at és 5 µg/ml etidium-bromidot (EB; Calbiochem) tartalmaz. A sejteket 30 percig inkubáljuk 4 °C hőmérsékleten, újra szuszpendáljuk, és áramlásos citometriát végzünk ICP-22 készüléken (Ortho Diagnostic Systems, Inc.), amely egy PDP11/03 számítógéppel van összekapcsolva (Digital Equipment, Maynard, Massachusetts), amint ezt korábban Rabinovitch P.S. leírta [„Detection Of An Unusually Stable Fibrinolytic Inhibitor Produced By Bovine Endothelial Cells” (Egy szarvasmarha-hámsejtek által termelt szokatlanul stabil fibrinolitikus inhibitor kimutatása), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2956–60 (1983)]. Ultraibolya gerjesztést (UG 1 szűrő) alkalmazunk, Hoechst 33 258 emisszióval, amely 425–500 nm-nél mutatható ki, és fluoreszcenciával, amely 600 nm-nél mutatható ki. A mintegy 3–4.103 sejt fluoreszcenciáját Hoechst és EB fluoreszcencia közti

kétváltozós hisztogramként elemezzük és rögzítjük. Az egyes sejtciklusszakasz-méretek meghatározása az elemzés és görbe-illesztés alapján történik, amint erről Rabinovitch P. S. korábban idézett munkájában beszámolt.

A sejtek százalékát az első, második vagy harmadik sejtciklus után a 8. ábrában mutatjuk be. Amint az ábra bemutatja, csak a CD3/CD4 heterokonjugátum képes jelentősen elősegíteni a sejtcikluson való áthaladást, mivel a sejtek 45%-a belép az S fázisba vagy azon túl és a sejtek 39%-a belép az osztódás második sejtciklusába a heterokonjugátummal végzett stimulálás 3. napja után. Így a [³H]-timidin beépülése a tisztított CD4⁺ sejtek révén a CD3/CD4 heterokonjugátum + anti-CD28 stimulálásra való válaszban (amint ez a 6. és 7. ábrákban látható) jelentős sejtosztódást stimuláló választ jelent, amely folytatódik a második és harmadik sejtciklus során is. Ezzel ellentétben a többi antitest-készítmények egyike sem képes jelentős sejtciklus-átmenetet indukálni (lásd a 8. ábrát). A 8. ábra azt is jelzi, hogy – összehasonlítva a PHA + anti-CD28 kontrollal, ahol a kiválasztott sejtek 70%-a S fázisba lép a tenyésztés 3. napja után – míg a CD3/CD4 heterokonjugátummal stimulált sejtek csak 45%-a válaszol. Ez azt jelzi, hogy a CD4⁺ sejteknek jelentős száma áthalad a sejtcikluson a CD3/CD4 heterokonjugátummal végzett stimulálás után.

A CD3/CD4 heterokonjugátum együtt módosítja a CD3 és CD4 T sejtantigéneket

A T sejt felületén levő CD3 és CD4 antigének módosulását mérjük a CD3/CD4 heterokonjugátum, CD3 vagy CD4 homokonjugátumok vagy csak CD4 elleni vagy csak CD3 elleni antitestek révén, olyan módon, hogy meghatározzuk az antitest vagy antitest-konjugátumok sűrűségét a CD4⁺ T sejtek felületén 37 °C hőmérsékleten 18 órán át végzett inkubálás után 10 µg/ml antitest vagy antitest-konjugátum jelenlétében, immunfluoreszcencia módszer alkalmazva anti-egér Ig második lépéssel, és FACS IV áramlási citométeren mérve. Az eredményeket az alábbi II. táblázat mutatja be, ahol a sűrűséget átlagos fluoreszcencia-intenzitás-egységekben fejezzük ki a háttérértékeken felül, lineáris skálán mérve.

II. TÁBLÁZAT

Módosítás konjugátumokkal

Fajlagosság	Felületi sűrűség a módosítás előtt	Felületi sűrűség a módosítás után	Százalékos módosítás
CD4	150	48	68
CD4/CD4 homokonjugátum	226	75	67

II. TÁBLÁZAT folytatása Módosítás konjugátumokkal

Fajlagosság	Felületi sűrűség a módosítás előtt	Felületi sűrűség a módosítás után	Százalékos módosítás
-------------	------------------------------------	-----------------------------------	----------------------

CD3	177	9,0	95
CD3/CD3 homokonjugátum	340	10	99
CD3/CD4 heterokonjugátum	369	19	95

Amint a fenti táblázat jelzi, az egy éjszakán át végzett inkubálás CD3 elleni antitesttel vagy CD3/CD3 homokonjugátummal a CD3 csaknem kimutathatatlan sejtfelszíni kifejeződését eredményezi, míg a CD4 felület jelentős mennyisége még megmarad hasonló, CD4 elleni antitesttel vagy CD4/CD4 homokonjugálással végzett inkubálás után. A CD3/CD4 heterokonjugátum azonban mind a CD3, mind a CD4 módosulását előidézi, és úgy tűnik, hogy csökkenti a CD4 sejtfelszíni kifejeződését. Az ezekben a vizsgálatokban alkalmazott összes antitest- és konjugátumfőlegben van,

mivel sejtfelületi szabad CD3 vagy CD4 antigén (vagyis antitest által nem kötött antigén) a módosítás után nem mutatható ki, amikor anti-CD3 vagy anti-CD4 monoklonális antitestek közvetlen fluoreszcenciás konjugátumait alkalmazva végzünk mérést (adatokat nem mutatunk be). Így a jelen találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátum együtt módosítja a CD3 és CD4 antigéneket a T sejtek felszínén, jelezve, hogy a heterokonjugátum nem egyszerűen csak rögzíti a T sejtreceptort a sejt felszínére, amint ezt korábban javasolták a CD3 elleni immobilizált antitest esetében (lásd pl. Ledbetter és munkatársai: *J. Immunol.*, fentebb idézett munka). Ezenkívül oldható anti-CD3-mal végzett tanulmányok jelzik, hogy amikor a CD3-at módosítjuk a sejtfelszínen, a CD3/Ti receptor belső átrendeződésen megy át (internalizálódik) [lásd pl. Press O.W. és munkatársai: „Evaluation Of Ricin A Chain Immunotoxins Directed Against Human T Cells” (Humán T sejtek ellen irányuló ricin A láncc-immunotoxinok értékelése), *Cellular Immunol.* 102, 10–20 (1986); és Press O.W. és munkatársai: „Endocytosis And Degradation Of Murine Anti-Human CD3 Monoclonal Antibodies By Normal And Malignant T Lymphocytes” (Rágcsáló anti-humán CD3 monoklonális antitestek endocitózisa és elbomlása normális és malignusan transzformált T limfociták révén), *Cancer Research* 48, 2249–2257 (1988)], amely a T sejtaktiválás gátlásához vezet. A jelen találmány szerinti heterokonjugátumok szintén a receptor internalizációjához vezetnek, míg a T sejtaktiválás fokozódik.

Amint ez a példa bemutatja, a jelen találmány szerinti CD3/CD4 heterokonjugátum fokozza mind a Ca^{2+} mobilizációt, mind az inozit-foszfát-termelést a $CD4^+$ T sejtek aktiválásában.

Ezenkívül a heterokonjugátumnak van egy új funkcionális aktivitása is a $CD4^+$ T sejtek burjánzásában CD28 elleni antitest jelenlétében, a sejtek jelentős frakcióját átsegítve a második sejtciklusba a stimulálás első három napján belül. Ezenkívül e heterokonjugátum, úgy tűnik, együtt modulálja azokat az antigéneket, amelyekkel ez reaktív, támogatva azt a hipotézist, hogy ez úgy működik, hogy az antigéneket szoros kapcsolatba hozza a T sejt aktiválása során.

2. PÉLDA

Az alábbi példa egy másik, jelen találmány szerinti heterokonjugátum megalkotását és jellemzését írja le, amely heterokonjugátum a CD3-mal reaktív antitestből

áll keresztkötést alkotva nagyszámú más, CD T sejt-antigénekkal reaktív antitestek bármelyikével.

- 15 Az antitest-heterokonjugátumok, amelyeket úgy alkotunk meg, amint ezt a fenti 1. példában leírtuk, az alábbiak: a) CD3/CD2 heterokonjugátum, amely G19-4(anti-CD3) monoklonális antitestet (amelyről már korábban adtunk meg irodalmi adatokat) és 9.6-ot (anti-CD2) tartalmaz [lásd pl. Martin P.J. és munkatársai: *J. Immunol.* 131, 180 (1983) ATCC HB 10 267]; b)
- 20 CD3/CD5 heterokonjugátum, amely G19-4 monoklonális antitestet és 10.2-t (anti-CD5) tartalmaz [lásd pl. Martin P. J. és munkatársai: „A New Human T-Cell
- 25 Differentiation Antigen; Unexpected Expression On Chronic Lymphocytic Leukemic Cells” (Új humán T-sejt differenciációs antigén; nem várt kifejeződés krónikus limfociták leukémia sejteken), *Immunogenetics* 11, 429 (1980); és Martin P. J. és munkatársai: „Monoclonal
- 30 Antibodies Recognizing Normal Human T Lymphocytes And Malignant B Lymphocytes; A Comparative Study” (Normál humán T-limfocitákat és rosszindulatú B-limfocitákat felismerő monoklonális antitestek; összehasonlító tanulmány), *J. Immunol.* 12, 1920 (1981)
- 35 ATCC HB 10 269]; c) CD3/CD6 heterokonjugátum, amely G19-4 monoklonális antitestet és G3-6-ot (anti-CD6) tartalmaz (a G3-6 IgG izotípusú anti-CD6 monoklonális antitest, amelyet Balb/c egerek immunizálásával állítunk elő HSB2 T-leukémia-sejtvonallal;
- 40 hibridómákat állítunk elő az egerekből nyert lépsejt fúziójával NSI mielóma vonallal, és átvizsgáljuk normál T sejtekhez való kötéssel és 12.1 CD6 referencia-antitesttel való keresztkötéssel, amint ezt pl. Martin P.J. és munkatársai a *J. Immunology* 127 évfolyamának fentebb
- 45 idézett közleményében leírták); d) CD3/CD7 heterokonjugátum, amely G19-4 monoklonális antitestet és G3-7-et (anti-CD7) tartalmaz [a G3-7 IgG₁ izotípusú anti-CD7 monoklonális antitest, amelyet Balb/c egerek immunizálásával állítunk elő HSB2 T-leukémia sejtvonallal; hibridómákat állítunk elő az egerekből nyert lépsejt fúziójával NSI mielóma vonallal, és átvizsgáljuk normál T sejtekhez való kötéssel és 3A1
- 50 CD7 referencia antitesttel való keresztkötéssel, amely antitest rendelkezésre áll az American Type
- 55 Culture Collection-nál; ezenkívül egy anti-CD7 monoklonális antitest kereskedelmi forgalomban is van (Becton Dickinson, Mountainview, Kalifornia); a fentiekkel kapcsolatban lásd még Reinherz E.L. és munkatársai (szerkesztők) szakkönyvét: *Leukocyte Typing* II, 1.

kötet, 3–30 oldal (1986)]; e) CD3/CD8 heterokonjugátum, amely G19–4 monoklonális antitestet és G10–1-et (anti-CD8, amellyel kapcsolatban már adtunk irodalmi utalást, ATCC HB 10 268) tartalmaz; f) CD3/CD28 heterokonjugátum, amely G19–4 monoklonális antitestet és 9.3-at (amellyel kapcsolatban már adtunk irodalmi adatokat, ATCC HB 10 271) tartalmaz.

Ezeket a heterokonjugátumokat arra a képességükre vizsgáljuk, hogy fokozzák-e a citoplazmás Ca^{2+} -mobilizálást T sejtekben, amint az 1. példában leírtuk. Minden heterokonjugátumot 1 $\mu\text{g/ml}$ -nél vizsgálunk, ez olyan koncentráció, amelynél az egyedül CD3 elleni antitest aktivitása az optimum alatti és a konjugátumok fokozott aktivitása kimutatható. Az indo-1-gyel kezelt perifériás vérlymfociták csúcs (Ca^{2+})i válasza az első 5 percben mennek végbe a sejtek heterokonjugátummal végzett stimulálása után. A nem stimulált sejtek 130 nmól/l (Ca^{2+})i-t mutatnak. A CD3/CD4 és CD3/CD8 heterokonjugátumokkal végzett kísérletekben a konjugátum aktivitását $CD4^+$, illetve $CD8^+$ T sejtalcsoportokon mérjük. Ezeknek a heterokonjugátumoknak az aktivitását a kalcium-mobilizálásban az alábbi III. táblázatban mutatjuk be.

III. TÁBLÁZAT

Anti-CD3 heterokonjugátumok aktivitása a kalcium-mobilizálásban

Konjugátum	Csúcs (Ca^{2+}) (nmól/l)
CD3/CD3 (G19–4/G19–4)	186
CD3/CD2 (G19–4/9.6)	2722
CD3/CD4 (G19–4/G17–2)	3349
CD3/CD5 (G19–4/10.2)	155
CD3/CD6 (G19–4/G3–6)	836
CD3/CD7 (G19–4/G3–7)	276
CD3/CD8 (G19–4/G10–1)	2690
CD3/CD28 (G19–4/9.3)	204

Amint a III. táblázat jelzi, a CD3/CD2, CD3/CD6, CD3/CD7 és CD3/CD8 heterokonjugátumok (valamint a CD3/CD4 heterokonjugátum) határozott kalcium-mobilizálást idéznek elő az ezekkel a heterokonjugátumokkal kezelt T sejteken belül, ha összehasonlítjuk a nem stimulált vagy CD3/CD3-mal stimulált sejtekkel. Úgy véljük, hogy ezek a heterokonjugátumok, az 1. példában leírt CD3/CD4 heterokonjugátumokhoz hasonlóan, úgy működnek, hogy a megfelelő reagáló antigéneket szoros közelségbe hozzák; ez a membránon keresztül fokozott jelátvitelt és megnövekedett T sejtaktiválást eredményez.

3. PÉLDA

Ez a példa a találmány egy további heterokonjugátumának megalkotását és jellemzését írja le, amely heterokonjugátum egy CD5 T sejt felületi antigénből áll kereszt kötést alkotva sokféle más T sejt CD-antigénjének bármelyikével.

Ezek az antitest-heterokonjugátumok, amelyeket úgy alkotunk meg, amint fentebb az 1. példában leírtuk, az

alábbiak: a) CD5/CD2 heterokonjugátum, amely a 10.2 és 9.6 monoklonális antitestekből áll; b) CD5/CD28 heterokonjugátum, amely a 10.2 és 9.3 monoklonális antitestekből áll; c) CD5/CD4 heterokonjugátum, mely a 10.2 és G17.2 monoklonális antitestekből áll; d) CD5/CD6 heterokonjugátum, amely a 10.2 és G3–6 monoklonális antitestekből áll; e) CD5/CD7 heterokonjugátum, amely a 10.2 és G3–7 monoklonális antitestekből áll; és f) CD5/CD8 heterokonjugátum, amely a 10.2 és G10–1 monoklonális antitestekből áll. Az összes monoklonális antitestről, amelyet ebben a kiveteli módban megalkotott heterokonjugátumokhoz alkalmazunk, már adtunk irodalmi utalásokat a korábbiakban.

Ezeket a heterokonjugátumokat is megvizsgáljuk arra a képességükre, hogy fokozzák a citoplazmában található Ca^{2+} mobilizálását T sejtekben, amint ezt az 1. példában leírtuk. Ezeknek a kísérleteknek az eredményeit az alábbi IV. táblázatban mutatjuk be. Az ezekben a kísérletekben alkalmazott egyes heterokonjugátumok koncentrációját a táblázatban megjelöljük. Az indo-1-gyel kezelt perifériás vérlymfociták csúcs (Ca^{2+})i válasza a stimulálástól számított első 10 percben belül mennek vége. A nem stimulált sejtek 130 nmól/l (Ca^{2+})i értéket mutatnak. Amint a táblázat mutatja, a CD5/CD5 homokonjugátum 180 nmól/l (Ca^{2+})i értéket mutat. A CD5/CD4 és CD5/CD8 heterokonjugátumokat $CD4^+$, illetve $CD8^+$ sejt alkészleteken vizsgáljuk.

IV. TÁBLÁZAT

Anti-CD5 heterokonjugátumok aktivitása a kalcium-mobilizálásban

Konjugátum	Csúcs (Ca^{2+})i (nmól/l)
CD5/CD5 (10.2/10.2, 20 $\mu\text{g/ml}$)	180
CD5/CD2 (10.2/9.6, 20 $\mu\text{g/ml}$)	204
CD5/CD28 (10.2/9.3, 10 $\mu\text{g/ml}$)	196
CD5/CD4 (10.2/G17–2, 2 $\mu\text{g/ml}$)	640
CD5/CD6 (10.2/G3–6, 2 $\mu\text{g/ml}$)	421
CD5/CD7 (10.2/G3–7, 15 $\mu\text{g/ml}$)	178
CD5/CD8 (10.2/G10–1, 2 $\mu\text{g/ml}$)	546

Amint a IV. táblázat jelzi, a CD5/CD4, CD5/CD6 és CD5/CD8 heterokonjugátumok jelentős növekedést mutatnak a kalciummobilizálásban, összehasonlítva a nem stimulált vagy CD5/CD5 stimulált sejtekkel. Úgy véljük, hogy ezek a heterokonjugátumok, más, itt leírt heterokonjugátumokhoz hasonlóan alkalmazhatók a T sejtek fokozott aktiválásában.

4. PÉLDA

Ebben a példában egy, a T sejt felületen levő CD3 és CD45 antigének közötti mAb által indukált kölcsönhatást alkalmazunk, valamint CD3 és CD45 antigénekkal reaktív antitestek heterokonjugátumát használjuk annak vizsgálatára, hogyan hatnak ezek a munkamenetek a T sejtek aktiválására.

Sejtenyésztés. Perifériás vér mononukleáris sejteket és perifériás vérből nyolcszövethez nem tapadó limfocitákat készítünk olyan módon, ahogyan ezt korábban már leírták [Clark és munkatársai: Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 82, 1766–1770 (1985); Clark és munkatársai: Hum. Immunol. 16, 100–113 (1986); mindkét irodalmi hivatkozás referenciaként van beépítve a jelen bejelentésben]. Röviden ismertette, nyolonszöveghöz nem tapadó limfocitákat kapunk nyolonszövet-szeperálással az alábbiak szerint: nylonoszlopot [amely az Onkogén-nél (Seattle, Washington) készült] 5% borjúembrió-szérumot tartalmazó RPMI közeggel terhelünk, és ezt alkalmazzuk 45 percen át 37 °C hőmérsékleten végzett előinkubálás után. Sejteket viszünk fel az oszlopra, és hagyjuk beáramlani az oszlopba, majd inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten 45 percig. Meleg tápközeget alkalmazva 6 ml-t gyűjtünk össze az oszlopból, kétszer centrifugáljuk 1200 fordulat/perccel, majd újra szuszpendáljuk burjánzási pufferral (15% humán AB-szérum) (mintegy 1,5 ml). A nem tapadó sejteket megszámloljuk és a térfogatot beállítjuk a vizsgálatban való felhasználás szerint.

Az alábbi humán leukocita markerek elleni Balb/c egér-mAb-eket alkalmazzuk: 9.4 (IgG2a), anti-CD45, (Cobold fentebb idézett munkája); G1–15 (IgG1) és 3AC5 (IgG2a), anti-CD45R [Ledbetter fentebb idézett munkája; és Ledbetter és munkatársai: a „Perspectives in Immunogenetics and Histocompatibility” (Távlatok az immunogenetikában és hisztokompatibilitásban) című szakkönyvben, szerkesztő: Heise E., kiadó: ASHI, New York, 325–340. oldal; 96.5 Brown és munkatársai: J. Immunol. 127 (2), 639–646 (1981)]; UHCL–1 (IgG1) anti-CD45 (180. forma), amelyet Dr. Beverley P. volt kedves rendelkezésünkre bocsátani (Smith, fentebb idézett munka); G19–4(IgG1), anti-CD3 (Ledbetter, fentebb idézett munka); 9.6 anti-CD2 (erről korábban már adtunk irodalmi utalásokat); és 9.3 anti-CD28 (erről korábban már adtunk irodalmi utalásokat). A patkány anti-egér kappa (κ)-fajlagos mAb-t [Ware és munkatársai: J. Immunol. Meth. 74, 93–104 (1984)] alkalmazzuk egér mAb keresztökötésére.

mAb heterokonjugátum előállítás. A monoklonális antitest-heterokonjugátumokat 1 : 1 molarányban készíthetjük GMBS heterobifunkcionális keresztökötő reagenssel (Calbiochem, La Jolla, Kalifornia) és 5-iminotiolán.HCl-lel (Pierce Chemical Co. Rockford, Illinois), amint korábban az 1. példában leírtuk. Részletesebben, az antitesteket (1 mg/ml) egy éjszakán át dializáljuk kapcsoló pufferral [0,1 mól/l Na_2HPO_4 (kétbázisú, hét kristályvizes) és 0,1 mól/l NaCl-al (pH 7,5)] szemben. A konjugátum első antitestjét tioláljuk iminotiolán.HCl sóval (2-IT a Pierce Chemical Co.-tól, Rockford, Illinois): 50 μl (0,5 mg) 2-IT oldatot (10 mg/ml, kapcsoló pufferral) adunk hozzá keverés közben. A konjugátum második antitestjét GMBS-sel kezeljük: 5 μl (14 μg) GMBS oldat (1 mg 360 μl dimetil-formamidban). Az oldatokat 1 órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten. Az antitesteket kapcsoló pufferral kiegyenlített PD-10 oszlopokon különítjük el (Pharmacia, Uppsala, Svédország). 2,6 ml összes üres térfogat után az antitesteket az eredeti térfogat kétszeresében összegyűjtjük. Az antitesteket összekeverjük és szobahőmérsékleten inkubáljuk 5 órán át, és a reakciót 1 μl 25 mmól/l-es β -merkaptotanol hozzáadásával állítjuk le (1 μl :560 μl kapcsoló pufferral), 15 percen át inkubálva szobahőmérsékleten. Ezt

a reakciót viszont 11 μl (11 μg) N-etil-maleimid (Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri) hozzáadásával állítjuk le, ahol ez 1 mg/ml-es dimetil-formamid (DMF) oldatban van.

5 A konjugátumokat egy éjszakán át dializáljuk foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldattal (PBS) szemben. Az így létrejövő CD3/CD45 heterokonjugátumot a szabad antitestektől Superose 6 FPLC-vel különítjük el, amint ezt az 1. példában leírjuk, és ezt a heterokonjugátumot G19–4/9.4-nek nevezzük.

10 Az mAb-k konjugálására biotinnal biotin-szukcinimidet alkalmazunk (Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri), amint ezt korábban már leírták [Hardy R.R.: a „Handbook of Experimental Immunology” (A kísérleti immunológia kézikönyve) című szakkönyvben, szerkesztők: Weir és munkatársai; kiadó: Blackwell, Oxford (1986); 31.1–31.2 oldal]; ez az irodalmi hely referenciaként épül be a jelen bejelentésbe. A forbol-12-mirisztát-13-acetátot (PMA) és az avidint a Sigma Chemical Co.-tól (St.Louis, Missouri) szerezzük be. 20 A rekombináns interleukin-2-t (rIL2) a Genzyme-től (Boston, Massachusetts) szerezzük be és ezt alkalmazzuk néhány vizsgálatban a sejtosztódás stimulálására.

A vér T sejtek osztódását (^3H) timidin beépülésével mérjük (New England Nuclear; fajlagos aktivitás 27 Ci/mmól; 1 Ci=37 GBq), amint ezt korábban az 1. példában leírtuk, 10⁶ sejt/ml-t alkalmazva 200 μl -os mikrotitráló üregekben. Részletesebben leírva a burjánzási vizsgálatokban mononukleáris sejteket tenyésztünk, amint ezt Ledbetter és munkatársai leírták [Journal Immunol. 135, 1819–1825 (1985); ez az irodalmi hely referenciaként épül be a jelen bejelentésbe. Röviden: mononukleáris sejteket izolálunk perifériás vérből sűrűség-gradiens centrifugálással Ficoll-Hypaque-on, ezt követi műanyaghoz való tapaszítás, hogy eltávolítsuk a monociták többségét. Sejteket tenyésztünk 2,5.10⁵/ml koncentrációban négy párhuzamos mintában 96 üreges mikrotitráló lemezekben (Falcon, Becton-Dickinson, Oxnard, Kalifornia) penicillint, streptomocint és 15% humán AB-szérumot tartalmazó RPMI tápközegben (Pel Freez Brown Deer, Wisconsin). Vagy a fitohemagglutinin mitogént (PHA; Welcome Diagnostics, Greenville, North Carolina), vagy Sepharose-hoz kötött anti-CD3 mAb-t (G19–4) alkalmazzuk T sejtek stimulálására. 3 vagy 4 nap tenyésztés után az üregeket 6 órán át kezeljük 0,5 μCi [^3H]timidin/üreg koncentrációban (New England Nuclear, Boston, Massachusetts; 6,7 Ci/mmól fajlagos aktivitás). A sejteket azután üvegrost szűrőkön gyűjtjük össze sejt-begyűjtő berendezést alkalmazva, és a radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóberendezésben mérjük. Bizonyos kísérletekben rekombináns IL2-t (rIL–2; Genzyme, Boston, Massachusetts) is alkalmazunk 25 egység/ml koncentrációban. A [^3H]timidin felvétel mérését egy 3 napos kísérlet utolsó hat órája során végezzük, ahol a kísérletben a mikrotitráló lemez üregeit 10 mg/ml koncentrációjú G19–4 mAb-t alkalmazva előburkoljuk a vizsgálat előtt. A 9.4 anti-CD45 mAb koncentrációja az oldatban 1 mg/ml és ezt 10 mg/ml-nél immobilizáljuk a mikrotitráló lemezen. A sejteket négy párhuzamosban tenyésztjük és az átlagokat tüntetjük fel. A standard hiba <11%.

Az eredményeket az V. táblázat foglalja össze.

V. TÁBLÁZAT

Az anti CD45 mAb szabályozza a T sejtburjánzást az anti CD3 mAb stimulálása után

Aktiválás	Burjánzás (^3H) timidin beépülés, cpm. 10^{-3})			+
	PMA (1 ng/ml)	Közeg	Anti-CD45 oldatban	
Közeg	-	0,3	0,4	0,3
	+	0,5	0,5	0,4
Anti-CD3 immobilizált-	-	137,9	143,5	32,3
	+	204,3	198,3	93,2
+ rIL-2 (100 egység/ml)	-	196,3	183,9	67,1

Az V. táblázat azt mutatja, hogy az anti-CD3-mal együtt immobilizált anti-CD45 több, mint 75%-ban gátolja a T sejtburjánzást, míg az oldatban levő anti-CD45 nem gátolja. Az immobilizált anti-CD45 gátlóhatása még a PMA optimum alatti koncentrációja vagy exogén rIL2 jelenlétében is nyilvánvaló.

Mérjük a T sejtek burjánzását anti-CD3 mAb-vel (G19.4) való stimulálás után is, immobilizált anti-CD3 mAb-vel és immobilizált vagy oldatban levő CD45R mAb-ekkel (g1-15 és 3AC5). A burjánzást úgy mérjük, amint ezt fentebb az anti-CD45-nél tettük. A G1-15 és 3AC5 anti-CD45R mAb-eket 1 mg/ml koncentrációban alkalmazzuk oldatban és 10 mg/ml koncentrációban alkalmazzuk immobilizált formában. p97 melanóma antigén elleni kontroll 96.5 IgG2a mAb-t alkalmazunk nem reagáló kontrollként 1 mg/ml koncentrációban oldatban és 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációban immobilizált formában. A VI. táblázat mutatja ennek a kísérletnek az eredményeit.

VI. TÁBLÁZAT

Az anti CD45 mAb szabályozza a T sejtburjánzást az anti CD3 mAb stimulálása után

Aktiválás	Burjánzás (^3H) timidin beépülés, cpm. 10^{-3})		+
	Közeg	PMA (1 ng/ml)	
Közeg	0,1	0,5	0,4
Anti-CD3 Immobilizált + közeg	143,6	281,5	291,8
+ G1-15 anti-CD45R (oldat)	137,5	261,5	309,4
+ 3AC5 anti-CD45R(oldat)	177,8	266,2	294,6
+ 96.5 (oldat)	147,9	262,1	312,4

Aktiválás	Burjánzás (^3H) timidin beépülés, cpm. 10^{-3})		+
	Közeg	PMA (1 ng/ml)	
Anti-CD3 Immobilizált + G1-15 anti-CD45R (Immobilizált) + 3AC5 anti-CD45R(Immobilizált) +86,5(Immobilizált)	0,1	0,7	0,6
	10,1	68,2	95,5
	154,4	247,1	280,4

A gátlás nyilvánvaló, amikor vagy anti CD45R (3AC5)-öt vagy anti CD45R (G1-15)-öt együtt immunizálunk anti-CD3-mal, de nem látszik akkor, amikor a CD45 mAb-k oldatban vannak. Sem a PMA, sem az rIL2 nem győzi le ezt a gátlást. A p97 melanóma-antigén elleni 96.5 kontroll mAb nem gátolja az osztódást az immobilizált anti-CD3-ra adott válaszban, akár oldatban van jelen, akár anti-CD3-mal együtt immobilizált formában.

Hogy biztosak legyünk, hogy az immobilizált CD45 mAb-vel (9.4) látható gátlás nem egyszerűen csak a CD3 mAb (G19-4) kimozdításának következménye a műanyag felületről, a mikrotitráló lemezeket egyedül anti-CD3-mal, anti-CD3 + anti CD45-tel, vagy anti-CD3 + 96.5 kontroll mAb-vel burkoljuk. Perifériás vérmononukleáris sejteket stimulálunk G19-4 anti-CD3 mAb-vel, amely egy mikrotitráló lemez falaihoz van immobilizálva; az immobilizálás úgy történik, hogy szobahőmérsékleten inkubálunk foszfáttal puffertolt fiziológiai konyhasóoldatban 2 órán át 4, 8, 16 és 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációnál, vagy egyedül, vagy 9.4 anti-CD45-tel vagy 96.5 kontroll mAb-vel együtt ugyanolyan koncentrációban, mint az anti-CD3 mAb koncentrációja. Szarvasmarhaszérum-albumint adunk hozzá, hogy lehetővé tegyük a további fehérjekötést. Összehasonlításként az oldatban levő 9.4 CD45 mAb-t alkalmazzuk. A burjánzást mérjük 1 ng/ml PMA jelenlétében és távollétében egyaránt. A sejteket négy párhuzamosban tenyésztjük 3 napon át és ^3H timidinnel kezeljük az utolsó 6 órán át. A 9. ábra mutatja be ezeknek a kísérleteknek az eredményeit (az átlagokat mutatjuk be; az egyes pontoknál a standard hiba az átlagnak kevesebb, mint 15%-a).

A 9. ábra bemutatja, hogy (a) amikor több anti-CD3-at alkalmazunk az üregek burkolására, több lesz a burjánzás; ez egybevág korábbi beszámolókkal [Geppert és munkatársai: J. Immunol. 138, 1660-1666 (1987)]; (b) a 9.4 CD45 mAb jelentős gátlást idéz elő minden koncentrációnál, de csak immobilizált formában; és (c) lényegében nincs olyan gátlás, amelyet a 96.5 mAb izotípus-kontrollal való szimultán burkolás idéz elő, jelezve, hogy az anti-CD45 által előidézett gátlás nem az anti-CD3 kiszorításának az eredménye. 1 ng/ml PMA hozzáadása a tenyészetekhez csak akkor fordítja meg az immobilizált anti-CD45-tel előidézett gátlást, amikor az mAb 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$

vagy kisebb koncentrációban burkol, nagyobb koncentrációkban viszont nem (9B. ábra). Ez azt sugallja, hogy az anti-CD45 kritikus koncentrációja szükséges, hogy szoros közelségben legyen az anti-CD3-hoz a műanyag felületen, és fennmaradjon a gátlás PMA jelenlétében.

A burjánzást előidéző T sejtaktiválás CD28 és CD2 stimulálásával mehet végbe, oldott 9.3, illetve 9.6 mAb-eket alkalmazva, melyeket egy következő lépésben keresztkötésbe hoztunk, 187.1 anti- κ -mAb-t alkalmazva [Van Lier és munkatársai: Eur. J. Immunol. 18, 167–175 (1988); és Ledbetter és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1384–1388 (1987)]. Abból a célból, hogy megvizsgáljuk a CD45 kötés hatásait ebben a rendszerben, anti-CD45-öt adunk az anti-CD28-hoz vagy anti-CD2-höz oldatban, 187.1 mAb-vel való keresztkötéssel vagy a nélkül (Ware és munkatársai, fentebb idézett munka). Az osztódást [3 H] felvétellel mérjük, amint ezt korábban leírtuk. 9.3 anti-CD28 mAb-t és 9.6 anti-CD2 mAb-t alkalmazunk az aktiváláshoz 1–1 μ g/ml koncentrációban. 9.4 anti-CD45 mAb-t alkalmazunk 1 μ g/ml koncentrációban, és 187.1 anti- κ -mAb-t alkalmazunk az antitestek keresztkötéséhez 187.1 mAb 4 : 1 végső hányadossal egér mAb-hez. Az osztódást rIL-2 jelenlétében (100 egység/ml) és távollétében mérjük. A VII. táblázat mutatja be az eredményeket (az egyes pontoknál a standard hiba <12%-a az átlagnak).

VII. TÁBLÁZAT

A CD45 szabályozza a T sejtosztódást CD2 és CD28 stimulálás után

Stimuláló	100 egység/ml	Burjánzás (3 H]timidin beépülés, cpm. 10^3)			
		Közeg	187.1 mAb	Anti-CD45	Anti-CD45 +187.1 mAb
Közeg	–	0,2	0,3	1,6	0,4
	+	6,8	4,2	37,6	2,5
Anti-CD28	–	0,2	4,3	47,4	0,4
	+	12,6	36,1	72,5	9,6
Anti-CD28	–	0,5	0,2	12,7	0,2
	+	4,4	7,0	37,3	4,0

Nyilvánvalóan kitűnik, hogy az anti-CD45 önmagában elősegítheti a sejtosztódást vagy növelheti azt, amelyet vagy a CD2 vagy a CD28 mAb-k indukálnak, anélkül, hogy exogén rIL2-re szükség lenne (VII. táblázat). Az rIL2 hozzáadása minden esetben tovább fokozza a sejtosztódást még más stimulálószer távollétében is. Ezek a tünetek a CD45 kötődés hatásának tulajdoníthatók az IL2 nagy affinitású receptorainak kifejezésére (Ledbetter, fentebb idézett munka).

Ezzel ellentétben CD45 keresztkötése CD2-höz vagy CD28-hoz 187.1 anti- κ -mAb hozzáadásával megfordítja a CD45 önmagában stimuláló hatását és csökkenti a CD2 vagy CD28 által előidézett stimulálást (VII. táblázat) akár rIL2 jelenlétében, akár ennek távollétében. Ez nem tulajdonítható a 187.1 nem fajlagos gátló aktivitásának, mivel mind a CD28, mind a CD2 stimu-

lálást fokozza a 187.1, amikor a 9.4 CD45 mAb nem érdekeltebben.

A CD3, CD2 és CD28 a jelátvivő úthoz kapcsolódik, amely növekedést eredményez a (Ca^{2+})i-ben, amikor ezek a receptorok a sejtfelszínen kötődnek [Ledbetter és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1384–1388 (1987)]. A (Ca^{2+})i-t a CD3, CD2 vagy CD28 receptorok keresztkötése után mérjük 9.4 CD45 mAb jelenlétében vagy távollétében (10. ábra). Ebben a kísérletben biotinnal konjugált mAb-eket kötünk perifériás vér T sejtekhez, majd keresztkötünk a sejt felszínén avidin hozzáadásával. A növekedést a (Ca^{2+})i-ben az indo-1-gyel (Molecular Probes, Junction City, Oregon) kezelt perifériás vérmononukleáris T sejtekben a T sejteken levő receptorok keresztkötése után mérjük vagy saját magával, vagy a 9.4 anti-CD45 mAb-vel együtt vagy 3AC5 anti-CD45R mAb-vel együtt az alábbiak szerint (a körülményeket az alábbiakban adjuk meg a 10. ábrára utalva).

1) A CD3 receptor keresztkötésbe visszük biotin-konjugált G19.4 anti-CD3 mAb-val (2 μ g/ml) az 1,5. perc időpontnál, ezt követi avidin (8 μ g/ml) hozzáadása az 5,5. perc időpontban (—). Ezt összehasonlítjuk a CD3 receptor előzőkkel azonos keresztkötésével 9.4 anti-CD45 mAb jelenlétében (10 μ g/ml) (---), vagy biotinnal konjugált 9.4 anti-CD45 mAb (10 μ g/ml) jelenlétében, amelyet avidin (48 μ g/ml) követ (....). Biotinnal konjugált 9.4 anti-CD45 mAb további kontrollját, amelyet avidin (40 μ g/ml) követ, is alkalmazunk (----) (10A. ábra).

2) 25 μ g/ml G19.4 anti-CD3 mAb (—) hatását összehasonlítjuk G19-4 anti-CD3 mAb és 9.4 anti-CD45 mAb heterokonjugátuma 50 μ g/ml-ének hatásával (....) (10B. ábra).

3) A CD2 receptort keresztkötjük 10 μ g/ml biotin-konjugált 9.6 anti-CD2 mAb-vel a –3. perc időpontban adva, ezt követi 40 μ g/ml avidin hozzáadása az 1,5. perc időpontban (—) (10C. ábra).

4) A CD28 receptort keresztkötjük 10 μ g/ml 9.3 anti-CD28 mAb-vel a –3. perc időpontban adva, ezt követi 40 μ g/ml avidin hozzáadása a –3. perc időpontban (—); ezt összehasonlítjuk CD28 és CD45 receptorok szimultán keresztkötésével, 10 μ g/ml 9.3 anti-CD28 mAb-t és 10 μ g/ml 9.4 anti-CD45 mAb-t alkalmazva és a –3. percben hozzáadva, amelyet 80 μ g/ml avidin hozzáadása követ az 1,5. percben (....) (10D. ábra).

5) A CD4 receptort keresztkötjük 10 μ g/ml biotin-konjugált G17-2 anti-CD4 mAb hozzáadásával a –3. percben, ezt követi 40 μ g/ml avidin hozzáadása az 1,5. percben (—). Ezt összehasonlítjuk CD4 és CD45 receptorok szimultán keresztkötésével 10 μ g/ml biotin-konjugált G17-2 anti CD4 mAb és 10 μ g/ml biotin-konjugált 9.4 anti-CD45 mAb hozzáadásával a –3. percben, ezt követi 80 μ g/ml avidin hozzáadása az 1,5. percben. Bemutatjuk a biotin-konjugált G17-2 anti-CD4 mAb (10 μ g/ml) +9.4 anti-CD5 mAb (10 μ g/ml) (nem konjugált) összehasonlítását is, amelynél 40 μ g/ml avidint is alkalmazunk az 1,5. percben (---) (10E. ábra).

Ezeknek a kísérleteknek az eredményeit a 10E. ábra mutatja be.

Nyilvánvaló, hogy a CD3, CD2 és CD28 keresztkötés után látható növekedést a (Ca^{2+})-ben a biotin-konjugált 9.4 jelenléte gátolja. Amikor a 9.4 nincs biotinezve és így nincs keresztkötve avidinnel, még csekély csökkenés figyelhető meg az anti-CD3 indukált kalciummobilizálás mértékében (10 A. ábra). A teljes gátláshoz azonban, úgy tűnik, az szükséges, hogy a CD45 és CD3 szoros közelségbe legyen hozva. Ezenkívül anti-CD45 és anti-CD3 heterokonjugátuma nem képes közvetlenül növelni a (Ca^{2+})-t (10 B. ábra), pedig immunfluoreszcenciás vizsgálatok anti-egér immunglobulinnal azt demonstrálják, hogy a heterokonjugátum képes kötődni mindkét receptorhoz a sejt felszínén (adatokat nem mutatunk be) és 25 μg anti-CD3 erős kalciumválaszt alakít ki. A CD45R mAb-k, pl. 3AC5 képesek részlegesen gátolni a (Ca^{2+})-i beáramlása következtében bekövetkező sejtválaszokat, amikor a sejtreceptorokkal reaktív mAb-khez vannak kötve, amint ezt a CD2-nél bemutatjuk (10 C. ábra). A CD45R mAb által nyújtott részleges gátlás a CD45R izo-forma kifejeződését tükrözheti bizonyos T sejteken, de nem mindegyiken (Ledbetter, fentebb idézett munka). A CD3, CD2 és CD28-nál levő gátló hatással ellentétben a CD45 kapcsolása CD4-hez a jelátvitel erős és reprodukálható növekedését adja, azzal összehasonlítva, amikor a CD4 önmagával van összekapcsolva (10 E. ábra). Ez úgy történik, hogy nem változik a sejtosztódás üteme azt mutatva, hogy ugyanazok a CD4 pozitív sejtek lettek sokkal válaszképesebbek a CD45 és CD4 kapcsolását követően. Úgy tűnik tehát, hogy a CD45 vagy felfelé, vagy lefelé szabályozza a membránon keresztüli jelátvitelt attól a receptortól függően, amellyel kölcsönhatásban van.

CD45-tel végzett előzetes tanulmányok azt sugallják, hogy működhet a limfocita-aktivitásnak vagy felfelé-, vagy lefelé-szabályozása (Ledbetter, fentebb idézett munka; Harp, fentebb idézett munka, és Martorell, fentebb idézett munka). A CD45 vagy CD45R elleni oldható mAb-k együtt stimulálnak PHA-val vagy gyöngyökhöz rögzített anti-CD3-mal az IL-2 termelés, IL-2 receptor-kifejeződés és T-sejtosztódás növelésében. Az oldható anti-CD45 kooperatíván működhet CD2 vagy CD28 mAb-vel (VI. táblázat). Ezek az együttes stimulációs hatások CD4⁺ sejtekre korlátozódnak és nem láthatók CD8⁺ sejtekkel, amelyek nem fejeznek ki CD4-et. Ez részben annak a ténynek tulajdonítható, hogy a CD45-nek jellegzetes hatása van a CD4-re, amely megkülönböztethető más sejt felületi antigénekre, pl. CD3-ra vagy CD2-re való hatásától; amikor CD45-öt szoros kapcsolatba hozzuk CD4-gyel, ez úgy hat, hogy gyorsítja és növeli a CD4 által átvitt kalciumjelet, miközben gátolja a jelátvitelt, amikor CD3-hoz és CD2-höz van kötve (10. ábra).

A fenti 4. példa azt mutatja be, hogy az anti-CD45 gátló hatása a legvilágosabban olyan körülmények között mutatkozik, amikor a CD45 közeli kapcsolatba kerül jelátvivő elemekkel, pl. CD2, CD3, CD5 vagy CD28 T sejtreceptorokkal, amint ezt a jelen találmány szerinti CD4/CD45 heterokonjugátumok alkalmazásával bemutatjuk. Az anti-CD45 antigén a limfocita-aktiválás kezdeti szakaszában gátolja az intracelluláris szabad kalcium mobilizálását, amely normálisan 30–60 má-

sodpercen belül kimutatható. Az anti-CD45 fokozó hatását szintén kimutatjuk, a CD45 receptort közeli szomszédságba hozva a CD4 receptorral. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a limfocitákon levő receptorokkal reaktív molekulákat tartalmazó heterokonjugátumok más módot nyújtanak kölcsönhatás indukálására a receptorok között, hogy fokozzák vagy gátolják a limfociták, beleértve a T-sejteket és B-sejteket, aktiválását és működését.

- 10 Az eddig leírtakban a jelen találmány számos kiviteli módját ismertettük; nyilvánvaló azonban, hogy a jelen találmány alapvető konstrukciója változtatható úgy, hogy további kiviteli módok jöjjenek létre, amelyek limfociták fokozott aktiválásához vezetnek (pl. más limfocita-antigén heterokonjugátum-kombinációk), vagy a limfociták működésének gátlásához vezetnek. Ennek megfelelően azt kell figyelembe venni, hogy a találmány oltalmi körét nem a példák segítségével bemutatott speciális kiviteli módok, hanem a mellékelt igénypontok szabják meg.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- 30 1. Eljárás T limfociták működését szabályozó heterokonjugátumok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy két, T limfociták sejt felszínén levő különböző CD-antigénekkal kötődni képes monoklonális antitest-molekulát kapcsolunk össze.
- 35 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a heterokonjugátum egyik antitestjeként a T sejt felszínén levő CD5 antigénhez kötődő antitestet alkalmazunk.
- 40 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a CD3 antigénnel és a CD4 antigénnel reakcióba lépő antitest-molekulát kapcsoljuk össze.
- 45 4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a G19-4 és G17-2 antitesteket kapcsoljuk össze.
- 50 5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kapcsolást kémiai térhálósítással végezzük.
- 55 6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kémiai térhálósítást maleimido-butiriloxi-szukcinimiddal vagy N-szukcinimidil-3-(2-piridilditio)-propionáttal végezzük.
- 60 7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a CD3 antigénnel reakcióba lépő antitestet, és egy, ugyanazon a limfocitán elhelyezkedő CD2, CD6, CD7 vagy CD8 antigénnel reakcióba lépő antitestet kapcsolunk össze.
8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a CD5 antigénnel reakcióba lépő antitestet, és egy, ugyanazon a limfocitán elhelyezkedő CD4, CD6 vagy CD8 antigénnel reakcióba lépő antitestet kapcsolunk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a heterokonjugátum egyik elemeként a CD45 antigénnel vagy a CD45 antigén valamely izoformulájával reakcióba lépő antitest-molekulát, másik molekulaként pedig ugyanazon a limfocitán elhelyezkedő másik CD-antigénnel reakcióba lépő antitestet kapcsolunk össze.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a CD3 antigénnel reakcióba lépő antitestet, és egy, ugyanazon a limfocitán elhelyezkedő CD45 antigénnel reakcióba lépő antitestet kapcsolunk össze.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ugyanazon a limfocitán elhelyezkedő, de különböző CD-antigénnel reakcióba lépő G19-4 és 9.4 antitestet kapcsolunk össze.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy, a CD2, CD3, CD4, CD5, CD8 vagy CD28 antigénnel reakcióba lépő antitestet, és egy, ugyanazon a limfocitán elhelyezkedő, a CD45 antigénnel reakcióba lépő antitestet kapcsolunk össze.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy, a CD2, CD3, CD4, CD5, CD8 vagy CD28 antigénnel reakcióba lépő antitestet, és egy, ugyanazon

a limfocitán elhelyezkedő, a CD45R antigénnel reakcióba lépő antitestet kapcsolunk össze.

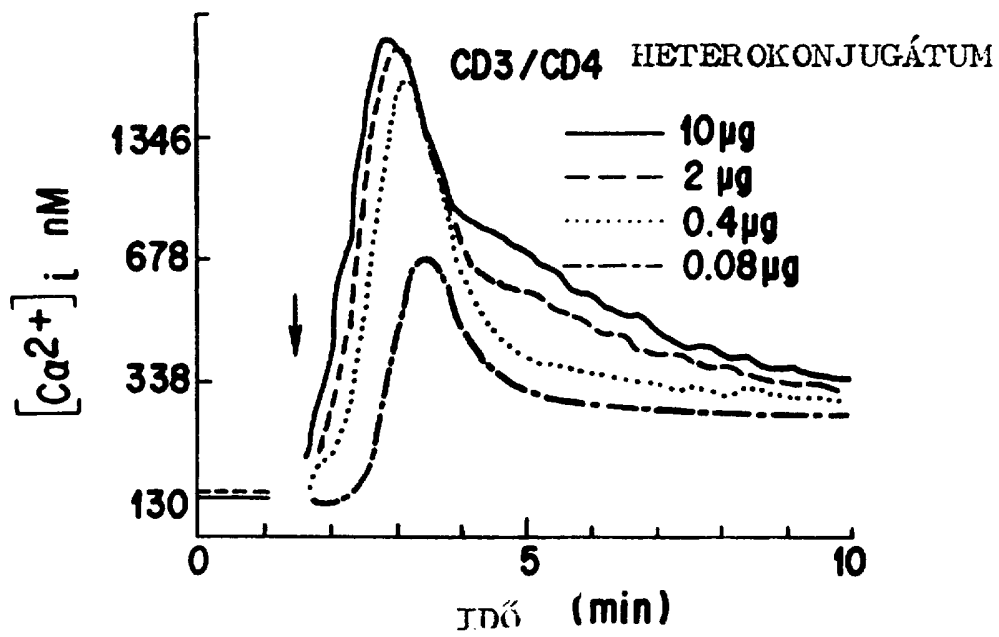
14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ugyanazon a limfocitán elhelyezkedő, de különböző CD-antigénnel reakcióba lépő monoklonális antitest-molekulát kapcsolunk össze.

15. Eljárás T limfocita-aktivitást szabályozó heterokonjugátumok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy két különböző, a T limfociták sejtfelszínén levő CD-antigénnel kötődni képes, a kalciummobilizációt befolyásoló monoklonális antitest-molekulát kapcsolunk össze.

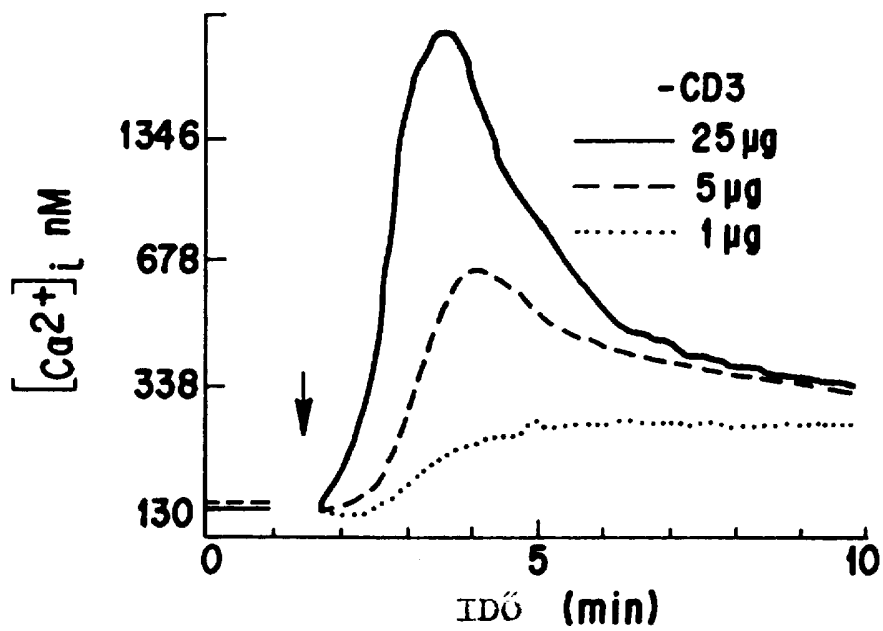
16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a heterokonjugátum egyik elemeként a CD5 T sejtfelszíni antigénnel reakcióba lépő antitest-molekulát alkalmazunk.

17. Eljárás T limfociták in vitro aktiválására, *azzal jellemezve*, hogy a T limfocitákat a kalciummobilizációt növelő, 1. igénypont szerinti heterokonjugátummal kapcsoljuk össze.

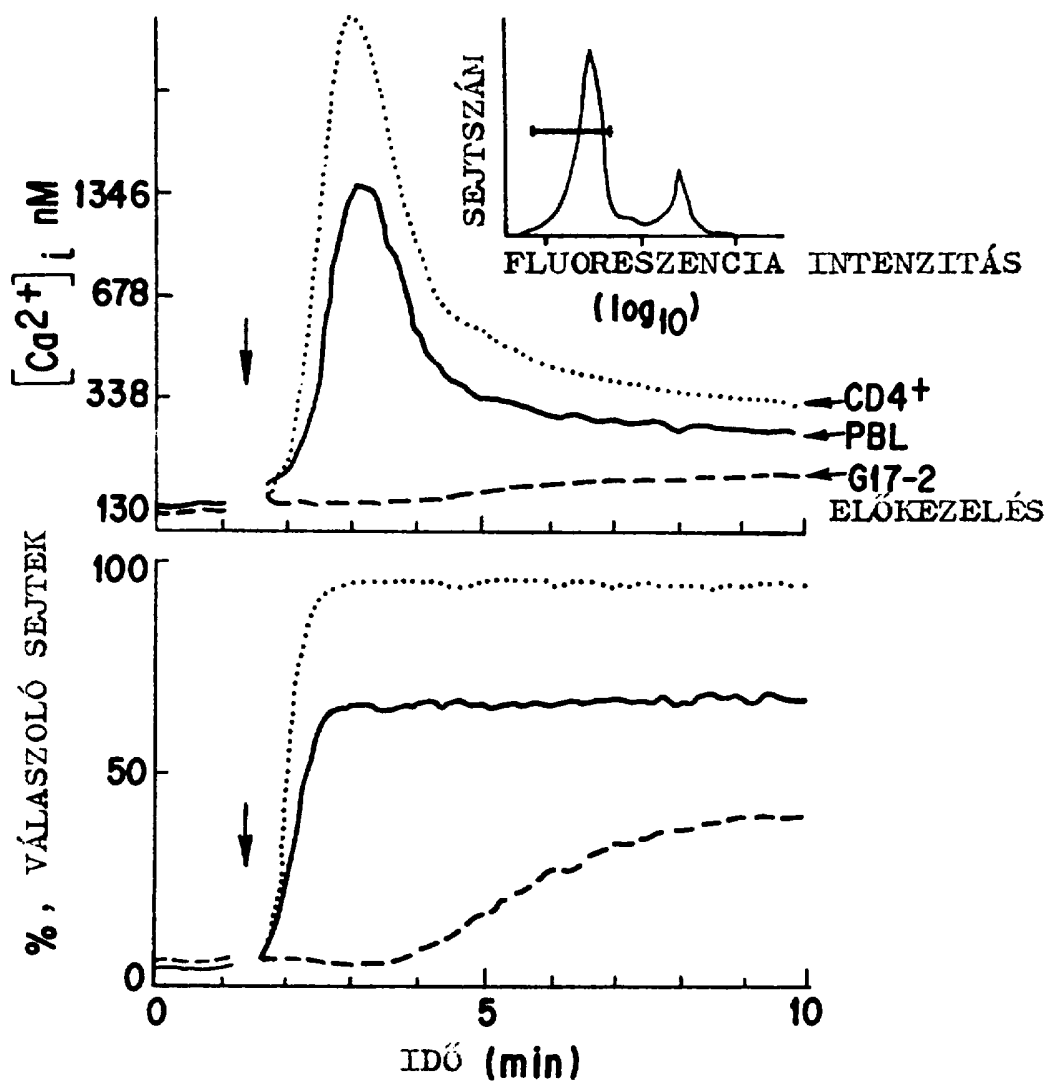
18. Eljárás T limfociták működésének in vitro szabályozására, *azzal jellemezve*, hogy a T limfocitákat az 1. igénypont szerint előállított heterokonjugátummal kapcsoljuk össze.



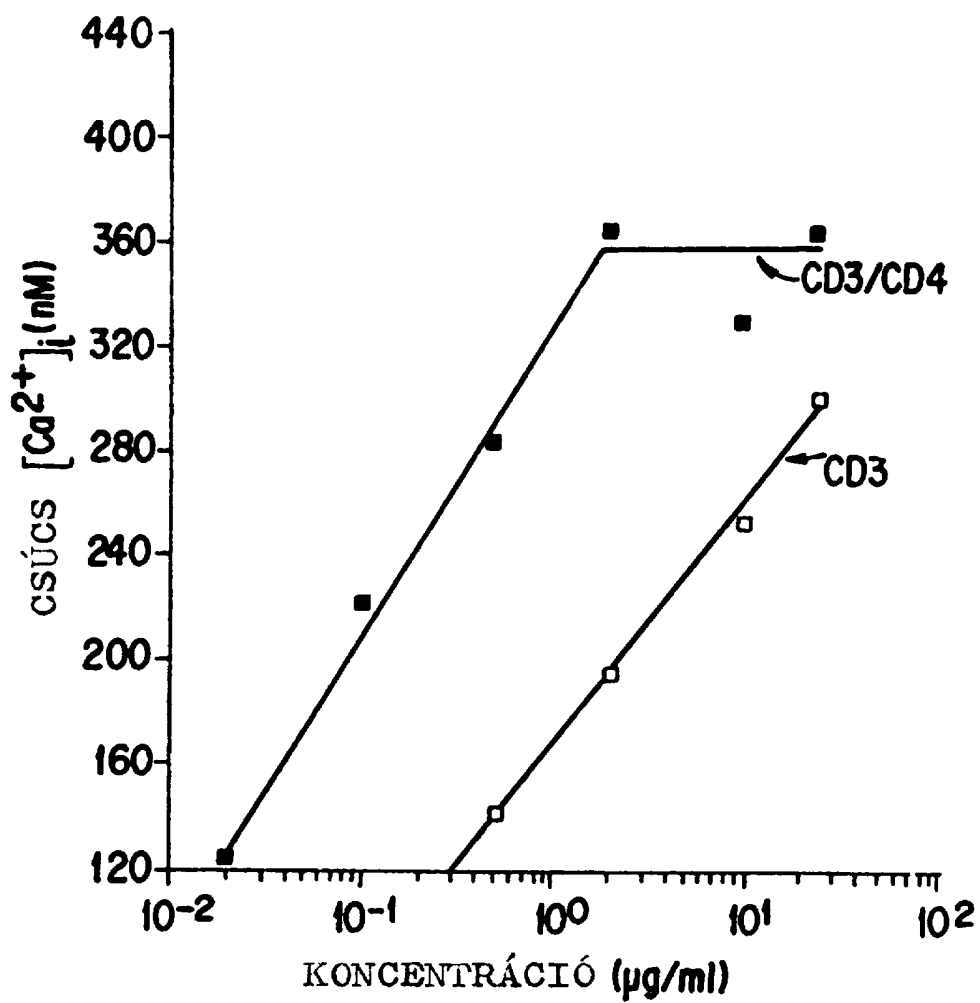
IA. ábra



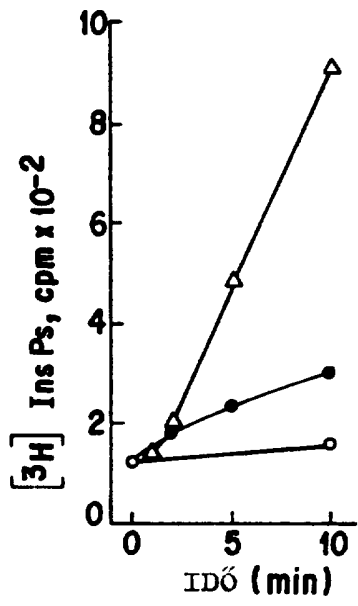
IB. ábra



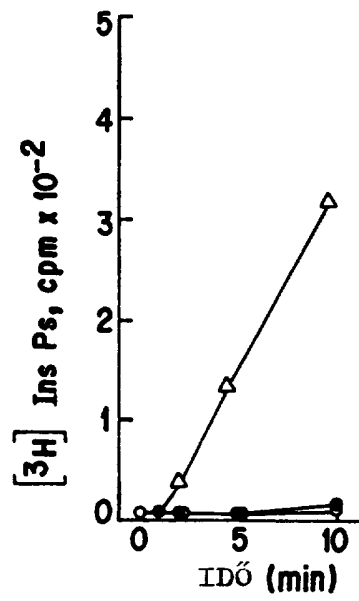
2. ábra



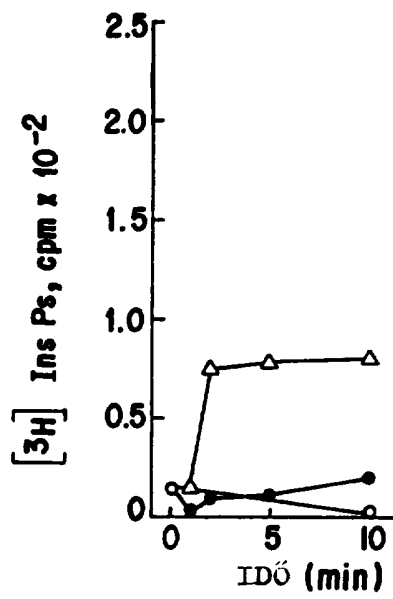
3. ábra



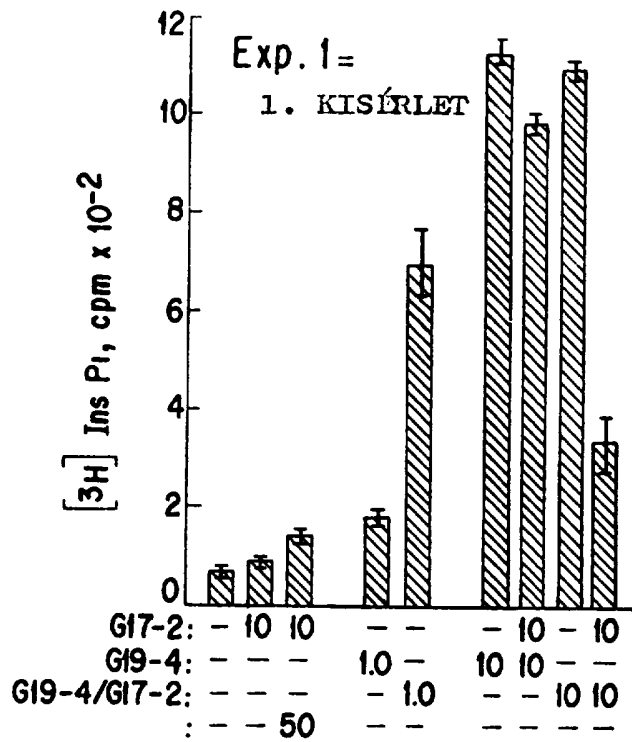
4A. ábra



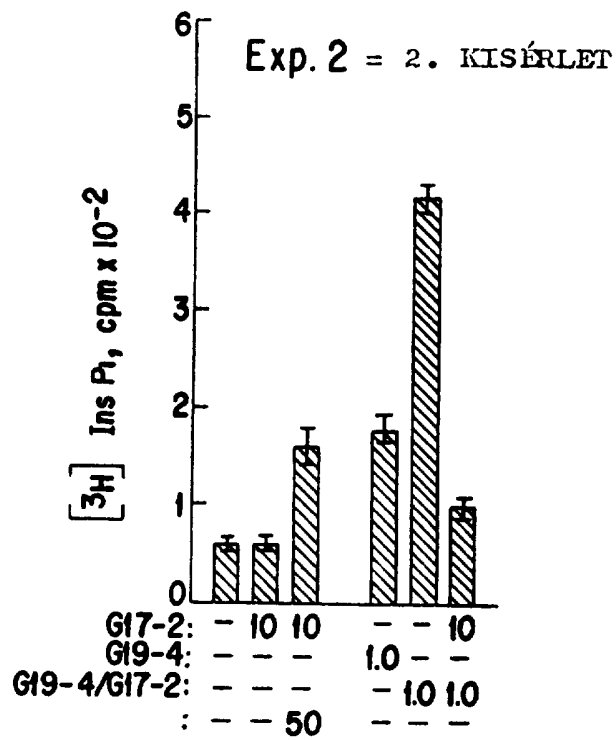
4B. ábra



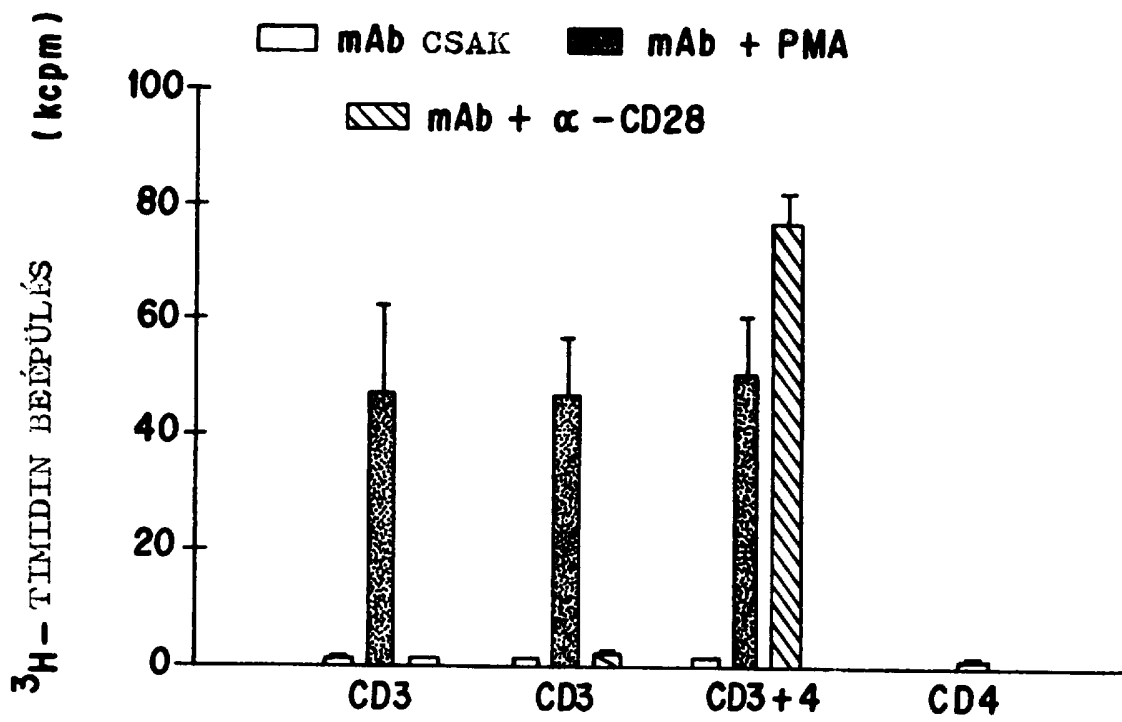
4C. ábra



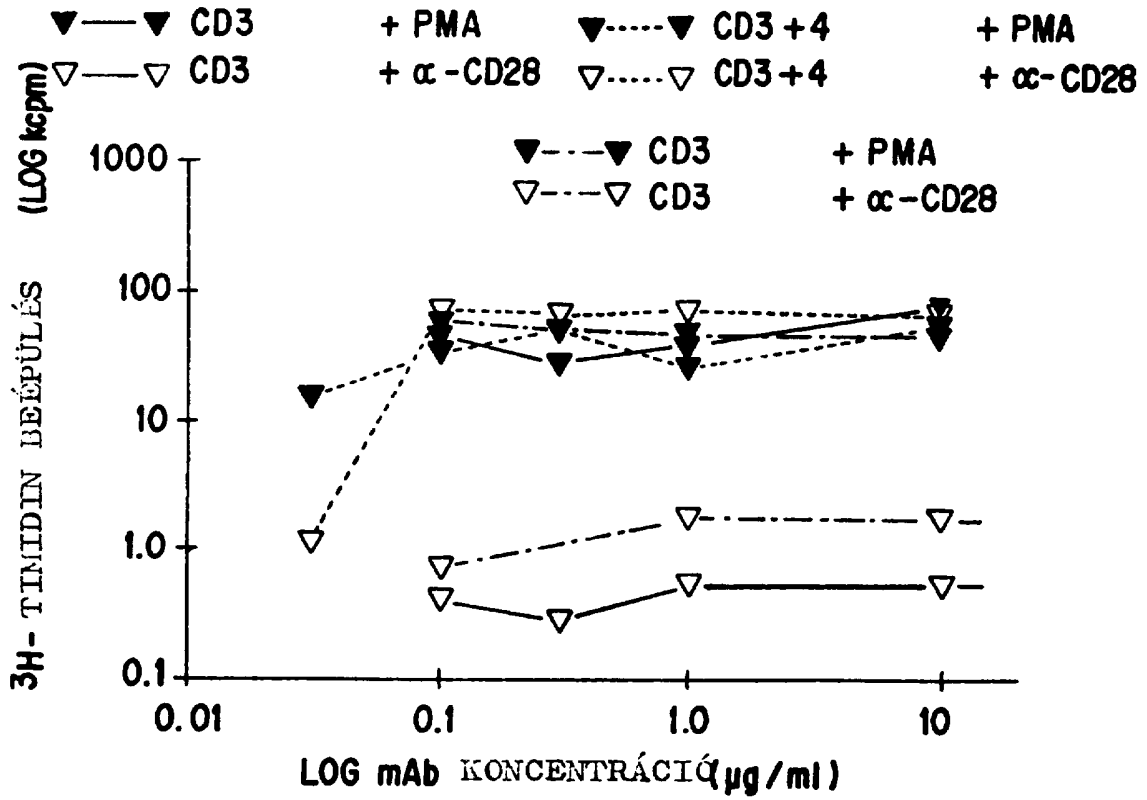
5A. ábra



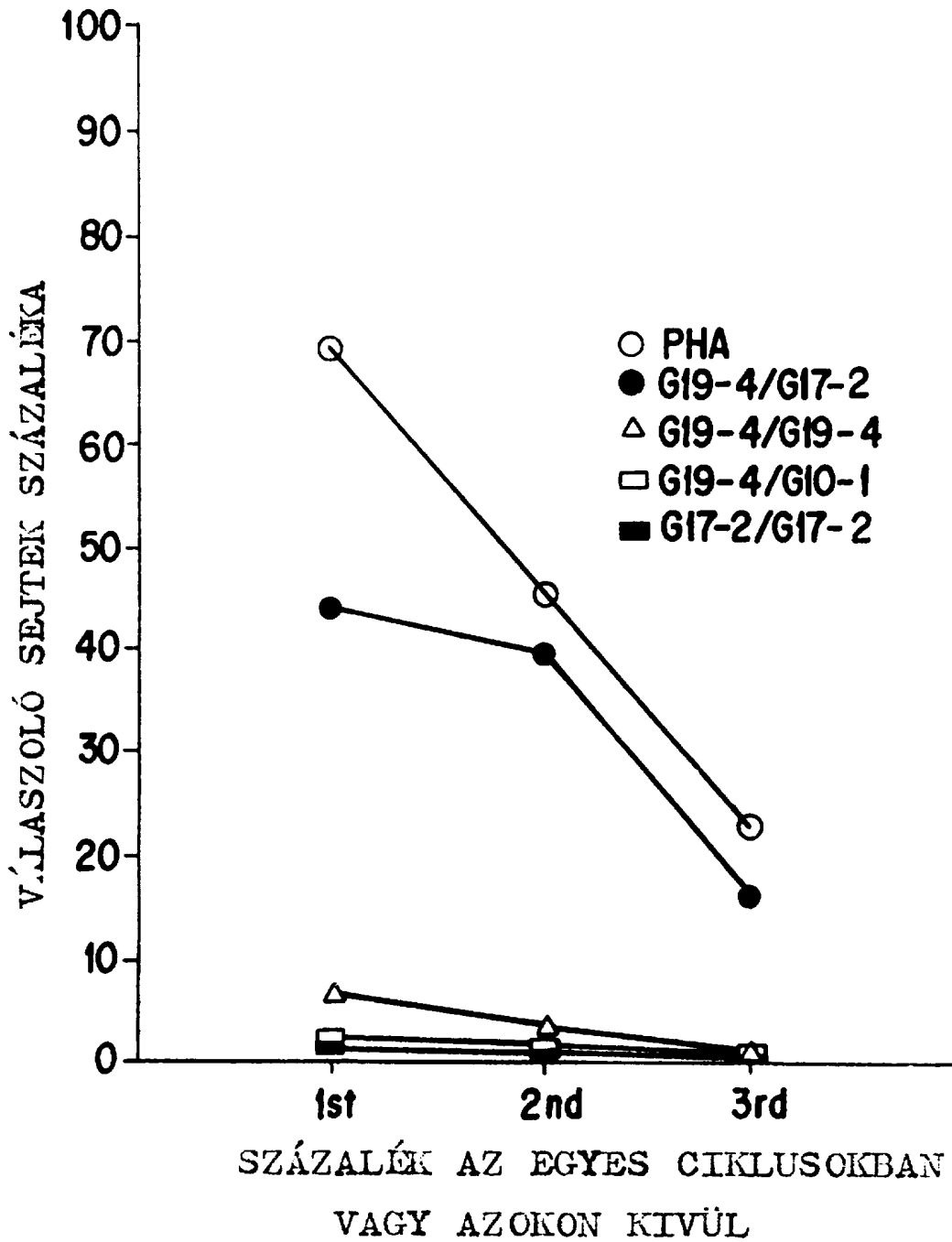
5B. ábra



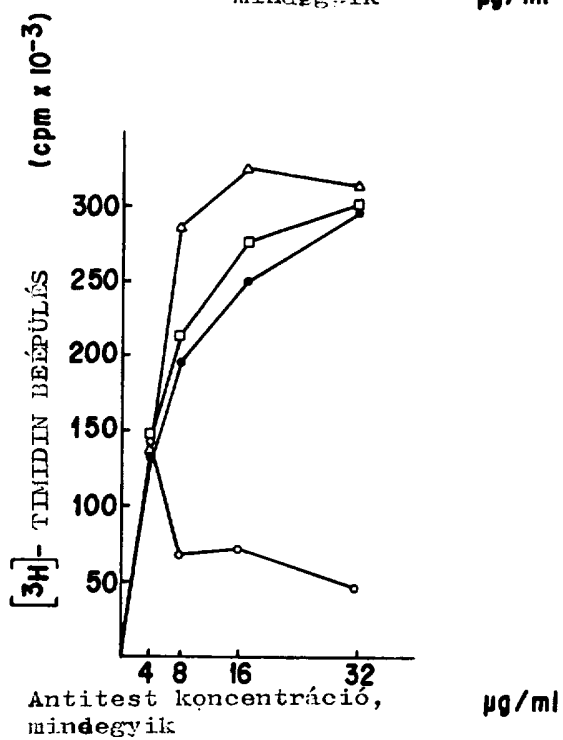
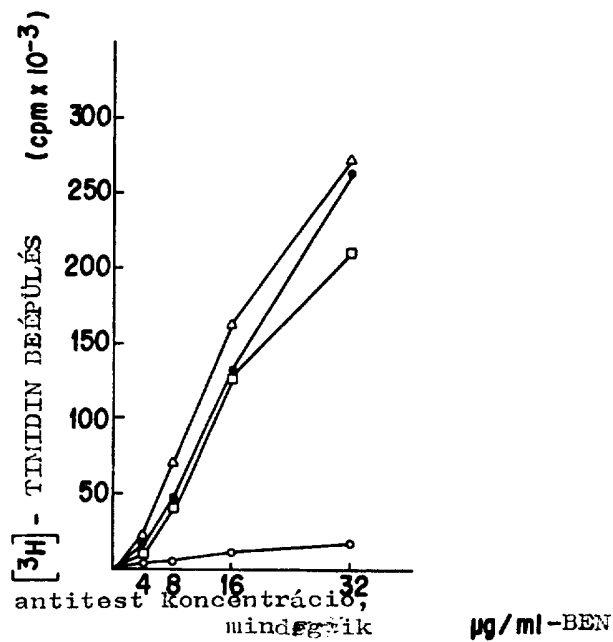
6. ábra

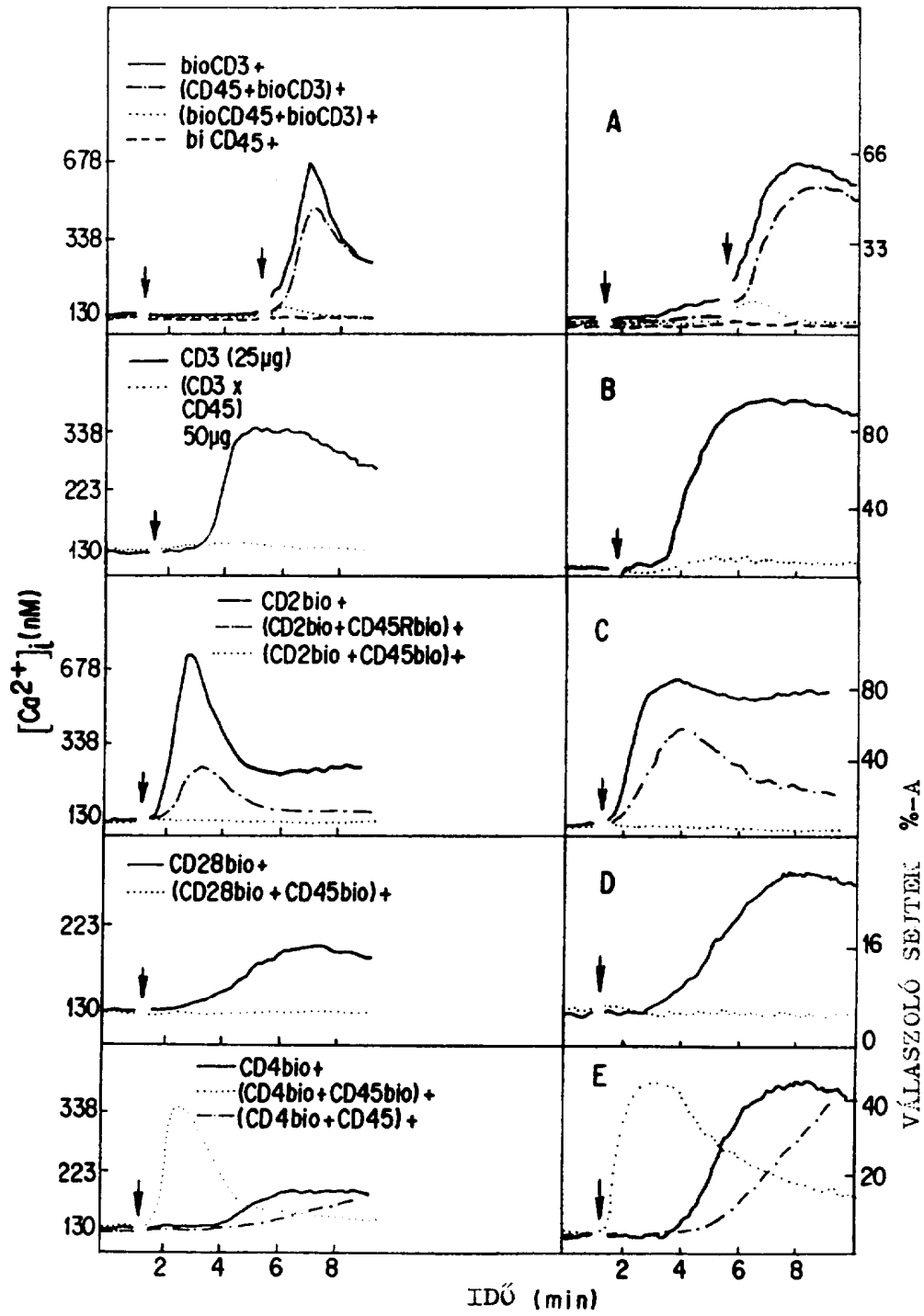


7. ábra



8. ábra





10. ábra