

5134/90

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



USZO₅ C12P 21/08
AGIK 09/395

MONOKLONÁLIS ANTITESTEK TOLERANCIA INDUKÁLÁSÁHOZ

61341

COBBOLD Stephen Paul, Cambridge

WALDMANN Herman Cambridge

Nagy-Britannia

A bejelentés napja: 1990. 05. 31.

Elsőbbsége: 1989. 05. 31. (8912497.8) Nagy-Britannia

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB90/00840

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/15152

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás tolerancia kialakítására egy antigénnel szemben. A találmány értelmében nem-kimerítő CD4 monoklonális antitestet és nem-kimerítő CD8 monoklonális antitestet adagolnak a kezelendő személynek, akiben az antigén már megtalálható vagy később fogja kapni. Az antigénnel szembeni tolerancia ezeknek az antitesteknek a jelenlétében alakítható ki. Egy kimerítő CD4 monoklonális antitestet és/vagy egy kimerítő CD8 monoklonális antitestet is adagolhatnak a nem-kimerítő antitestek adagolása előtt.

11 ábraoldal, jelző ábra nincs

And.

5134/80

••••• "A"

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

NSZO₅ C12P 21/08
AGIK 89/885

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEKY IRODA KFT.

61341

MONOKLONÁLIS ANTITESTEK TOLERANCIA INDUKÁLÁSÁHOZ

Bejelentők és feltalálók:

COBBOLD Stephen Paul, Cambridge

WALDMANN Herman Cambridge

Nagy-Britannia

A bejelentés napja: 1990. 05. 31.

Elsőbbsége: 1989. 05. 31. (8912497.8) Nagy-Britannia

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB90/00840

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/15152

A találmány tolerancia indukálására szolgáló monoklonális antitestekre vonatkozik.

73286-881-GI

Az idegen antigénnel vagy szövettel, illetve a saját antigénnel vagy szövettel szembeni tolerancia egy olyan állapot, amelyben egy - egyébként normális, érett - immunrendszer nem reagál specifikusan agresszíven egy általa normális (nem beteg) test-szövetként, -komponensként kezelt antigénre/szövetre, ugyanakkor azonban agresszíven reagál olyan idegen vagy megbetegedett antigénekre/szövetekre, amelyekkel szemben a természetes, önmagával szembeni tolerancia vagy a terápiás toleranciát indukáló eljárások nem tették specifikusan toleránssá. A tolerancia vizsgálata általában annak igazolását igényli, hogy a toleráns egyed nem válik immunissá arra a bizonyos antigénre/szövetre, ha egyszer vagy előnyösen többször immunizálják egy későbbi időpontban, amikor ugyanarról az egyedről kimutatható, hogy egy irreleváns antigénre/szövetre válaszol.

A rágcsáló CD4 (L3T4) antigénnel szembeni monoklonális antitestekről (mAb) igazolták, hogy hatékony immunszuppresszáns anyagok a humorális immunitás, a transzplantáció és az autoimmunitás szabályozásában. Emellett a CD4 monoklonális antitestekről kimutatták, hogy in vivo toleranciát biztosító környezetet hoznak létre, amellyel bizonyos oldható fehérje antigénekkkel, valamint a transzplantációs antigénekkel szembeni tolerancia érhető el. Azok a mechanizmusok azonban nem ismertek, amelyekkel a CD4 monoklonális antitestek ezeket a hatásokat produkálják. A legkorábban megjelent tudósítások szerint az immunszuppressziót olyan körülmények között érték el, amikor a célsejteket in vivo kimerítették. Az egyszerű magyarázat az volt, hogy az így elért immunszup-

presszió a CD4 T-sejtek hiánya miatt következett be.

Másrészt viszont, *in vitro* kutatások azt igazolták, hogy a CD4 (és CD8) monoklonális antitestek képesek befolyásolni a limfocita funkciókat egyszerűen oly módon, hogy a sejt felszínén levő antigénhez kötődnek a sejt lizálása nélkül. Emellett immunszuppressziót és toleranciát indukáltak *in vivo* úgy, hogy a CD4 monoklonális antitestek és a F(ab')₂ CD4 monoklonális fragmentek szublítikus koncentrációját használták, ami arra utal, hogy a monoklonális antitestek által közvetített immunszabályozáshoz nincs feltétlenül szükség a célsejtek kimerítésére.

A korábbi vizsgálatok során olyan antitesteket használtak, amelyek kimerítették a CD4 sejteket. Kísérleteink során úgy találtuk, hogy a nem-kimerítő CD4 és CD8 antitestek is képesek toleranciát biztosítani idegen immunoglobulinokkal, csontvelősejtekkel és átültetett bőrrel szemben. Ez a megfigyelés valójában általánosan alkalmazható az összes antigénre. Emellett úgy találtuk, hogy egy kimerítő CD4 monoklonális antitest és/vagy egy kimerítő CD8 monoklonális antitest adagolása a nem-kimerítő monoklonális antitestek adagolása előtt előnyös lehet a toleranciát biztosító környezet kialakításában.

A találmány tárgya tehát egy nem-kimerítő CD4 monoklonális antitestet és egy nem-kimerítő CD8 monoklonális antitestet tartalmazó készítmény antigén elleni tolerancia kialakítására, kombinált készítmény formájában, egyidejűleg vagy külön-külön történő vagy egymás utáni használatra. A találmány tárgya továbbá eljárás ember vagy állat kezelésére

egy nem-kimerítő CD4 monoklonális antitest alkalmazásával és egy nem-kimerítő CD8 monoklonális antitest alkalmazásával sebészeti vagy más módon. A találmány tárgya továbbá:

- nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestek együtt történő alkalmazása emberi vagy állati test kezelésére sebészeti úton vagy más módon, különösen egy antigén elleni tolerancia indukálására; és

- csomagolási egység, amely külön komponensként tartalmaz nem-kimerítő CD4 monoklonális antitestet és nem-kimerítő CD8 monoklonális antitestet, előnyösen külön tartóedényekben.

A nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestek együtt történő adagolásával egy betegben tolerancia alakítható ki egy primer antitesttel szemben. A CD4 és CD8 monoklonális antitestek alkalmazásával autoimmun betegségek kezelhetők, és segítségükkel meg lehet akadályozni az átültetett szervek kilökődését anélkül, hogy hosszú időn keresztül immunszuppresszív kemoterápiát kellene alkalmazni. A tolerancia elérhető egy átültetett szervvel vagy csontvelővel szemben is.

Vannak előnyei, ha in vivo nem-kimerítő monoklonális antitesteket használunk. Például nem-kimerítő monoklonális antitestek rövid ideig tartó injekciózása lehetővé teszi a kompetens sejtek gyorsabb regenerálódását a blokádnál, és ennél fogva csökkenti az immunhiány következtében beálló ún. opportunista fertőzések és más komplikációk kockázatát a monoklonális antitesttel való kezelést követően (például a leukémiás visszaesés a T-sejtet kimerítő csontvelő átülte-

tésnél). Emellett az is ismert, hogy a CD4 sejtek tovább oszthatók funkcionális alcsoportokra, amelyek közül néhány szerepet játszik az immun-szabályozásban. A T-sejtek tömeges eltávolítása természetesen eredményezheti az immun-szuppressziót, de le is rombolhatja a CD4+ szabályozó sejtek valószínű hatását. Ezért egy kifinomultabb manipuláció előnyösebb lenne az immunrendszer kívánatos állapotba való vezérlésében.

A tolerancia előnyösen úgy érhető el, hogy egy betegnek először kimerítő CD4 és/vagy CD8 monoklonális antitesteket adunk.

A találmány tárgyát tehát az alábbiak képezik:

- nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestek valamint kimerítő CD4 és/vagy CD8 monoklonális antitestek együtt való alkalmazása egy emberi vagy állati test sebészeti vagy más módon történő kezelésére, pontosabban, egy antigénnel szembeni tolerancia indukálására;

- nem-kimerítő CD4 monoklonális antitestet, nem-kimerítő CD8 monoklonális antitestet, emellett kimerítő CD4 monoklonális antitestet és/vagy kimerítő CD8 monoklonális antitestet kombinációban tartalmazó készítmény, egyszerre, külön-külön, vagy egymás után való adagolásra egy antigén elleni tolerancia kialakítása céljából; és

- egy csomagolási egység, amely nem-kimerítő CD4 monoklonális antitestet, nem-kimerítő CD8 monoklonális antitestet, emellett kimerítő CD4 monoklonális antitestet és/vagy kimerítő CD8 monoklonális antitestet tartalmaz, jellemző módon mindegyiket külön tartóedényben.

A nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestek kombinációja használható tolerancia indukálására bármely antigénnel szemben, anélkül hogy más immunszuppresszív anyagra szükség lenne. A nem-kimerítő monoklonális antitest olyan antitest, amely a célsejteknek in vivo kevesebb mint 50%-át, például 10-25%-át, előnyösen 10 %-nál kevesebb részét meríti ki. Ezek használhatók az I-es típusú antigének vagy a II-es típusú antigének elleni tolerancia indukálására. Mindkét antigén elleni tolerancia indukálására is használhatók. Egy transzplantátum esetében például az I-es és II-es típusú fő hisztokompatibilitási (MHC) antigének és nem-MHC vagy minor hisztokompatibilitási antigének (minorok) jöhetnek szóba. A transzplantációs antigének mellett a találmány szerinti megoldás használható globuláris fehérjékkel, glikoproteinekkal, úgymint immunoglobulinokkal, részecskékhez kötött anyagokkal, például virágpor fehérjékkel, gyógyászati felhasználásra szánt fehérjékkel, úgymint interferonnal, interleukin-2-vel vagy tumor nekrozis faktorról vagy hormon helyettesítővel például a leutinizáló hormonnal, ezek analógjaival vagy antagonistáival szembeni tolerancia indukálására. További specifikus antigének, amelyekkel szemben tolerancia indukálható, lehetnek szintetikus fehérje analógok vagy fehérje terápiás anyagok, amelyek receptorblokkoló segítőkként és alloantigénekként használhatók. Az alloantigéneket tartják felelősnek a szövetek vagy bőr átültetések az idegen szövetek kilökéséért.

Monoklonális antitestekként használhatók a CD4 sejt-felszíni antigénre specifikus (CD4 mAb) vagy a CD8 sejtfel-

színi antigénre (CD8 mAb) specifikus monoklonális antitestek. A CD4 és CD8 alatt nem csak azokat a monoklonális antitesteket értjük, amelyek a humán CD4 és CD8 felszíni antigénekre specifikusak, hanem azokat a monoklonális antitesteket is, amelyek más fajban is a megfelelő felületi antigénekre specifikusak, például az L3T4 antigénre egérben, amely az emberi CD4 antigén rágcsáló megfelelője. Tipikusan az IgG₂ osztályba tartozó monoklonális antitesteket használunk, így például patkány IgG_{2a}-t, egér IgG_{2b}-t vagy humán IgG₂-t, de lehet humán IgG₄-t is alkalmazni. Antitest-kötőhelyet tartalmazó monoklonális antitest fragmentek, például a Fab és a F(ab)₂ fragmentek is használhatók.

A CD4 és CD8 monoklonális antitesteket együtt adagoljuk a kezelendő szervezetbe. Beadhatjuk egyetlen készítmény részeként is, de külön készítmény formájában is. A monoklonális antitesteket tipikusan hetente 1-7 alkalommal adjuk be, előnyösen hetente 1-4 alkalommal, például hetente háromszor, 2-4 hétig, előnyösen 3 hétig. A nem-kimerítő monoklonális antitestnek egy hatékony mennyiségét adagoljuk. A szérum vizsgálata az antitest telítettségi értékre nézve jelzi, hogy elegendő antitest van jelen. Minden egyes nem-kimerítő monoklonális antitestből elegendő mennyiséget adunk be rendszeresen, hogy ezzel toleranciát biztosító környezetet teremtsünk a kezelés alatt álló betegben. Így a CD4 és CD8 sejtek blokkolhatók.

Az egy betegnek beadható nem-kimerítő CD4 monoklonális antitest és nem-kimerítő CD8 monoklonális antitest mennyisége számos faktortól függ, beleértve a beteg korát és

testtömegét, a kezelendő állapotot, és az antigén(ek)e)t, amelyekkel szemben toleranciát kívánunk indukálni. Egy egér modell-rendszerben $1\mu\text{g}$ - 2mg -ot, előnyösen $400\mu\text{g}$ - 1mg -ot adunk be egy időpontban. Embereknek 1 - 400 mg-ot, úgymint 3 - 30 mg-ot, előnyösen 5 - 20 mg-ot adunk be az antitestből egy adott időpontban. Egy CD11a monoklonális antitest, amely egy nem-kimerítő monoklonális antitest, használható a CD4 és CD8 monoklonális antitestek mellett, illetve egyik vagy másik vagy mindkettő helyett.

Az idegen antigéneket, amelyekkel szemben toleranciát kívánunk indukálni, egy betegnek egészen öt nappal azelőtt beadhatjuk, mielőtt a nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestekkel való kezelést megkezdjük, és egészen öt nappal vagy 2-3 héttel a kezelés befejezése után is folytathatjuk az adagolást. Általában azonban egy antigént a kezelés megkezdése előtti 14. napon, tipikusan a kezelés megkezdése előtti 7. napon adjuk a betegnek. Az antigént adhatjuk a CD4 és CD8 monoklonális antitest kezelés megkezdésével egyidőben is.

Tehát tolerancia indukálható egy antigén ellen egy betegben oly módon, hogy nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitesteket és a monoklonális antitestek jelenlétében antigént adunk a betegnek. A beteget sebészeti operációnak lehet alávetni a nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestek jelenlétében, szöveti transzplantátumot, azaz átültetett szervet vagy csontvelőt adva a betegnek. Emellett tolerancia indukálható olyan antigén ellen is, amely a kezelendő szervezetben már jelen van. Hosszú időtartamú specifikus to-

lerancia indukálható saját antigének ellen is, hogy az autoimmun betegségeket, úgymint a szklerózis multiplexet vagy az reumás artrítiszt kezeljük. Az autoimmun betegségtől szenvedő beteg állapota így enyhíthető.

A tolerancia fenntartásához tartós antigénre van szükség. Például egy átültetett szövet biztosítja azt az antigént, amely a saját magával szembeni tolerancia fenntartásához kell. Ugyanez igaz a saját (auto) antigénekre is az autoimmun betegségek kezelésében. A külső antigének, például az allergének esetében antigén emlékeztetőket adhatunk be szabályos időközönként.

Előnyös lehet ha egy gazdaszervezetet kimerítő CD4 monoklonális antitesttel és/vagy kimerítő CD8 monoklonális antitesttel kezelünk, mielőtt a nem-kimerítő monoklonális antitest kezelést megkezdjük. A kimerítő monoklonális antitest egy olyan monoklonális antitest, amely *in vivo* a célsejtek több mint 50%-át, például 90-99%-át kimeríti. A kimerítő antitestek közé tartozik a patkány IgG_{2b} vagy IgG₁, az egér IgG_{2a} és az emberi IgG₁ és IgG₃. Kimerítő CD4 monoklonális antitest és/vagy kimerítő CD8 monoklonális antitest használható a T sejtek megfelelő populációjának csökkentésére. A nem-kimerítő monoklonális antitesteknek ezért kevesebb T sejttel kell elbánniuk. A kimerítés egy másik módszer szerint úgy is elérhető, hogy szokványos immunszuppresszív terápiát alkalmazunk, úgymint egy másik monoklonális antitestet, például CAMPATH^R 1-t, szteroidokat, ciklosporint, ALG-t (anti-limfocita-globulint) vagy besugárzást.

A T sejtek populációjának a kimerítő monoklonális

antitest segítségével történő csökkentésének mértéke azoktól az antigénektől függ, amelyekkel szemben toleranciát kívánunk elérni. Előnyös lehet továbbá a T sejt populációt csökkenteni nehéz antigének, rosszul beilleszkedő átültetett szövetek esetén, amikor a befogadót előzőleg a donor antigének hatásának tették ki, és fel vannak töltve (például transzfúziót többször kapott betegek) vagy autoimmun betegségek esetén, amikor a betegek fel vannak töltve, és ugyanakkor az autoimmun állapotuk folyamatosan aktiválódik. Rossz szöveti illeszkedésről beszélünk, ha egy vagy több I-es típusú fő hisztokompatibilitási antigén nem egyezik.

Ezért szükséges lehet a CD4-pozitív segítő T-sejt populáció csökkentése körülbelül 70%-kal, például a normális szintjük 50, 20 vagy éppen 10%-a alá. Minél nehezebb egy tolerancia elérése, annál nagyobb mértékű kimerítésre van szükség. A CD8-pozitív T-sejteket hasonlóképpen lehet kimeríteni.

A kimerítő CD4 monoklonális antitestet és/vagy a kimerítő CD8 monoklonális antitestet tipikusan hetente 1-7 alkalommal adjuk be, előnyösen hetente 2-4 alkalommal, például egyszer, kétszer vagy háromszor egy héten, előnyösen egyszer, a nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitest-kezelés megkezdése előtt 1-7 nappal, például 1-5 nappal. Az antigént, amellyel szemben toleranciát kívánunk indukálni, adagolhatjuk ugyanakkor vagy a kimerítő monoklonális antitest adagolása előtt 5 napon belül. A beadott kimerítő monoklonális antitest mennyisége számos faktortól függ, beleértve a T-sejtek releváns populációja elérendő csökkentésének

szintjét, a beteg korát és testtömegét, a kezelendő állapot súlyosságát és azt, hogy milyen antigén(ek)re kívánunk toleranciát kialakítani. Egér modellrendszerben 1 μ g-2mg-os dózissokat, előnyösen 400 μ g-1mg-os dózissokat adagolunk a kimerítő monoklonális antitestből. Embereknek 1-400 mg, azaz 3-30 mg, például 5-20 mg antitest adagolható.

A kimerítő és nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestek bármilyen ismert módszerrel előállíthatók. Előállíthatók úgy, hogy immunizált patkányok lépsejtjeit fuzionáltatjuk patkány mielóma sejtvonallal, például Y3/Antigén 1.2.3 sejtvonallal [Clark and Waldmann, "Monoclonal Antibodies", 1. fejezet, szerk. P.C.L. Beverley; "Methods in Haematology", Longman (Churchill Livingstone), (1986)]. Bármely más módszer is használható, például immunizált egér lépsejtek fúziója egér mielómával, patkány mielómával vagy humán mielómával, illetve rekombináns DNS módszerrel.

A monoklonális antitesteket parenterálisan, például intravénásan adagoljuk. A monoklonális antitesteket általában injekcióval vagy infúzióval adjuk be. Erre a célra a monoklonális antitestet olyan gyógyászati készítmény formájában készítjük el, amely egy gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy higítóanyagot tartalmaz. Bármely alkalmas hordozó vagy higítóanyag, például izotóniás sóoldat használható. Ha olyan specifikus antigéneket adunk, amelyekre toleranciát akarunk kialakítani, akkor ezeket adhatjuk parenterálisan, például intravénásan, intramuszkulárisan vagy szubkután úton. Az antigént jellemző módon egy gyógyászatilag elfogadható hordozóval vagy higítóanyaggal készítjük el.

Az YTS 177.9, YTS 191.1, YTS 105.18 és YTS 169.4 monoklonális antitesteket termelő megfelelő hibridómákat az European Collection of Animal Cell Cultures-nél helyeztük letétbe (Porton Down, G.B.) 1990. május 30-án ECACC 90053005, ECACC 87072282, ECACC 90053004 és ECACC 87072284 számon.

A találmány szerinti megoldást a következő ábrákkal és példákkal szemléltetjük közelebbről.

Az 1. ábra az rIgG_{2a} és rIgG_{2b} monoklonális antitestek kombinálásával kialakuló komplement lízis szinergens jellegét és interferenciáját mutatja. Az ⁵¹Cr-mal jelzett (30 µCi/ml) CBA/Ca timocitákat monoklonális antitestekkel és 2% aranyhőrcsög szérummal mint komplement forrással együtt inkubáltuk, amint azt az egyes oszlopok alatt jeleztük. A monoklonális antitest koncentráció: (A) 5 µg/ml; (B) 25 µg/ml.

A 2. ábrán az rIgG_{2a} CD4 injekciózásának a T-sejt kimerítés nélküli in vivo eredményeit látjuk. Az említett monoklonális antitestekből egyetlen injekciót adtunk ATx CBA/Ca egereknek (n=3), majd 1, 4 és 8 héttel később elvéreztettük őket. A BPL-eket biotinilezett CD4 elleni monoklonális antitestekkel festettük (YTA 3.1, ●), CD8 (YTS 156.7, ▲) és Thy-1 (YBM 29.2, ▼), majd streptavidin-FITC-t adtunk hozzá. Az eredményeket áramlási citometriával vizsgáltuk, és az egyes populációkat kiszámoltuk, a vizsgálat napján mért kezeletlen kontrollt véve 100%-nak.

A 3. ábrán látható, hogy hogyan indukálódott a HGG-vel szemben tolerancia az IgG_{2a} CD4 YTS 177.9 monoklonális

antitest hatására. Normális CBA/Ca egereknek YTS 177.9 vagy YTS 191.1 monoklonális antitestet adtunk, a jelzett dózisosokban, a kezelés -1., 0., és 1. napján. Az egereknek a 28. és 35. napon újra adtunk HGG-t. A kontroll egerek a többihez hasonlóan 1 mg YTS 191.1-et kaptak, de HGG-vel csak a 28. és 35. napon immunizáltuk őket. A szérum anti-HGG titereket a 45. napon mértük, ELISA módszerrel.

A 4. ábrán láthatók az YTS 177.9 injekció eredményei, amelynek célja a patkány IgG_{2a} elleni specifikus tolerancia indukálása. Normál CBA/Ca egereknek adtunk három YTS 177.9 vagy YTS 191.1 injekciót a jelzett dózisosokban, három egymást követő napon. Hat héttel később heti injekcióban kaptak YTH 35.4-et (IgG_{2a} patkány anti-humán) és Campath^R 2-t (IgG_{2b} patkány anti-humán) először komplett, majd inkomplett Freund-féle adjuvánsban. A tizedik héten elvéreztettük őket, és az anti-IgG_{2a} (üres oszlop) valamint az anti-IgG_{2b} (vonalkázott oszlop) titereket megmértük HPLC-vel tisztított patkány IgG_{2a}-val, illetve IgG_{2b}-vel borított lemezt alkalmazó ELISA módszerrel.

Az 5. ábrán a prolongált allogén bőrátültetés túlélését mutatjuk be IgG_{2a} CD4 és CD8 monoklonális antitest kezelés után. Normális CBA/Ca egereknek (n=6) adtunk három injekciót: YTS 177.9 és YTS 105.18 vagy YTS 191.1 és YTS 169.4 (a teljes antitest mennyiség 3 mg/egér) a 0., 2. és 4. napon. Teljes vastagságú BALB/C farokbőrt ültettünk át a 0. napon. A statisztikai érték Logrank módszerrel: IgG_{2b} monoklonális antitesttel kezelt (▲) a kezeletlen kontrollal (●) szemben, p<0,005; IgG_{2a}-val kezelt (▼) a kontrollal

szemben $p \leq 0,001$; vagy az IgG_{2b} -vel kezelt $p \leq 0,03$.

A 6. ábrán az allogén bőrátültetéssel szembeni, $rIgG_{2a}$ monoklonális antitestekkel kiváltott tolerancia látható. Normál CBA/Ca egerekre ültettünk át B10.BR bőrt, majd (1) YTS 177.9 és YTS 105.18 keveréket a 0. és 2. napon (összesen 2 mg/egér); (2) ugyanazokat a monoklonális antitesteket 3 héttel később (összesen 9 mg/egér). A 89. napon újra átültettünk rájuk B10.BR bőrt (3 és 4), valamint B10.D2 bőrt (pontozott vonalak).

A 7. ábrán a csontvelő és bőrátültetésekre kialakított toleranciára nézve végzett kísérletek eredményei láthatóak.

A: Tolerancia B10.BR-re

A recipiens CBA/Ca egereknek ($n=8$) 1-3 hétig a $rIgG_{2a}$ CD4 és CD8 monoklonális antitestek kombinációját injekcióztuk, ezt követően 10^7 T-ben kimerített lépsejteket és 10^7 csontvelő sejteket. A kontroll egereket ($n=4$) vagy csontvelővel és sóoldattal injekcióztuk, vagy csak csontvelővel kezeltük. Mindegyik csoportra B10.BR bőrt ültettünk át harminc nappal később. Az Ig donor-allotípus kimérizmusát a csontvelő transzplantáció után 24, illetve 60 nappal mértük, ennek értéke $2,6 \pm 1,6$, illetve $1,3 \pm 0,7$ % a csontvelővel, illetve az antitesttel kezelt egerekre (●). Sem a sóoldattal (▲), sem a csak BM-mel (■) kezelt csoport nem mutatott észlelhető kimérizmust.

B: Tolerancia AKR/J-re

Normál CBA/Ca recipiens egereket injekcióztunk 3 hétig $rIgG_{2a}$ CD4 és $rIgG_{2b}$ CD8 monoklonális antitestek kombinációjával. Infúzióban 2×10^7 AKR/J csontvelő sejteket ad-

tunk intravénásan 2 napig, a monoklonális antitest kezelés megkezdése után. 4 héttel később AKR/J bőrt ültettünk át rájuk (●). A kontroll egereket csak antitesttel kezeltük (▲).

A 8. ábrán azt látjuk, hogy bőrátültetéseket lehet létrehozni ATx egerekben. Az ATx egereket (n=9) rIgG_{2a} CD4 és CD8 monoklonális antitestekkel injekcióztuk 2 hétig, minden másnap beadva az injekciót. A monoklonális antitest-kezelés megkezdése után 3 nappal B10.BR bőrt ültettünk át. A 60. napon B10.BR bőrt ültettünk át újra, és a BALB/c átültetések (●) kilöködtek azokban az ATx egerekben, amelyek B10.BR átültetéseket (▲) hordoztak. A kontroll ATx egerekre csak B10.BR bőrt (■) ültettünk át.

A 9. ábra az allogén bőrátültetések túlélését mutatja olyan egerekben, amelyeket CD4 és CD8 antitestek különböző kombinációival kezeltünk. A recipiens CBA/Ca egerekre három 8-14 tagú csoportban BALB/c bőrt ültettünk át a 0. napon, majd monoklonális antitesttel kezeltük a 0-2. napokon, a 2. példában leírtak alapján. Az első csoport (▼) csak patkány IgG_{2a} antitesteket kapott, a második csoport (◆) az IgG_{2b} antitestek keverékét kapta, míg a harmadik csoport (●) a patkány IgG_{2b} kombinációs készítményt kapta, majd patkány IgG_{2a} antitesteket. Ebben a harmadik csoportban mindegyik egér új BALB/c (▲) és B10 (■) bőrátültetést kapott a 94. napon, további antitest nélkül.

Az átültetések túlélésének vizsgálata:

Az IgG_{2a} csoport MST=28 nap az IgG_{2b} csoport MST=55 nappal szemben; p<0,006.

A kombinált kezelést kapott csoport eredeti BALB/c átültetés MST=121 nap, összehasonlítva az IgG_{2a} vagy IgG_{2b} csoportokkal; $p < 0,001$.

A kombinált kezelést kapott csoport második BALB/c átültetés MST=43 nap, összehasonlítva a harmadik B10 átültetés MST=16 nap; $p < 0,04$.

A 10. ábrán a tolerancia indukálását látjuk MHC-re nem illeszkedő bőrátültetéseknel. 8-12 BALB/c egérből álló csoportokba ültettünk át B10 bőrt a 0. napon, majd a 0-21. napon monoklonális antitestekkel kezeltük a 2. példában leírtak alapján.

(a) Az első csoport a kontroll egereké (\blacktriangledown), amelyek nem kaptak antitestet. A második csoportnak (\blacklozenge) csak patkány IgG_{2a} antitesteket adtunk, míg harmadik csoportnak (\bullet) a kombinált IgG_{2b} és IgG_{2a} készítményt. Ennek az utolsó csoportnak adtunk új B10 bőrátültetést (\blacktriangle), és harmadik forrásból származó BALB/c bőrt (\blacksquare), a 119. napon.

Az átültetett bőrök túlélése:

- kontroll (antitestet nem kapott csoport) MST=14 nap, az IgG_{2a} csoporttal (MST=48 nap) összehasonlítva $p < 0,001$;

- kombinált kezelést kapott csoport eredeti B10 átültetések MST>250 nap, a második B10 átültetésekhez hasonlítva (MST=44 nap, a 119. naptól) $p < 0,002$;

- második B10 átültetések harmadik forrásból származó BALB/c átültetésekhez hasonlítva MST=13, $p < 0,003$.

(b) Egy nyolctagú CBA/Ca egércsoportnál B10 bőrátültetést végeztünk, kombinált IgG_{2b}-vel, majd ezt követően

IgG_{2a} antitest kezeléssel (●). Az egereken második B10 átültetést végeztünk a 91. napon (▲) egy harmadik forrásból származó B10.BR bőrrel (■).

Az átültetések túlélésének vizsgálata: mindegyik csoport MST>200 nap.

A 11. ábrán a minor antigénre többszörösen nem egyező bőrrel szembeni tolerancia indukálását látjuk. 2, 8, illetve 10 tagú CBA/Ca egércsoportnak adtunk AKR/J bőrátültetéseket a 0. napon. A kontroll egerek (▼) nem kaptak antitestet. A megmaradó csoport kapta a kombinált patkány IgG_{2b}-t, majd a patkány IgG_{2a} antitest kezelést (●), majd újra átültettük a 122. napon friss AKR/J bőrrel (▲), valamint harmadik forrásból származó minorokban eltérő B10.BR bőrrel (■).

Az átültetett bőrök túlélése: nincs antitest kontroll MST=13, összehasonlítva a kombinált munkamenet AKR/J átültetésekkel MST>250 nap, p<0,001. Második AKR/J átültetés, MST>128 nap, harmadik forrásból származó B10.BR átültetéshez hasonlítva MST=27 nap, p<0,009.

A 12. ábrán a tolerancia indukálását látjuk minor antigénben többszörösen nem illeszkedő bőrre, feltöltött befogadóknak. A recipiens CBA/Ca egereket donor minor antigénekre töltöttük fel úgy, hogy három héttel a bőrátültetés előtt intraperitoneálisan az AKR/J-ből (a,b) vagy B10.BR-ből (c,d) származó 10⁷ besugárzott (2000 rad) lépsejtet adagoltunk. 5-13 egérből álló csoportokra AKR/J (a,b) vagy B10.BR (c,d) bőrt (●) ültettünk át monoklonális antitestek jelenlétében a 0-21. napoktól, a 2. példában leírtak

alapján. Két csoport kapta a kombinált IgG_{2b} és IgG_{2a} kezelést (a,c), két csoport pedig csak az IgG_{2a} antitesteket (b,d). Az egerekre a 89. napon (a,c) vagy a 96. napon (b,d) második donor típusú (▲) bőrt (AKR/J az a és b csoportokban; B10BR a c és d csoportokban) és harmadik forrásból származó minorokban eltérő (■) bőrt (B10.BR az a és b csoportokban; AKR/J a c és d csoportokban) ültettünk át.

Az átültetések túlélésének vizsgálata:

(a) kombinált kezelés, eredeti AKR/J átültetések MST>225 nap, összehasonlítva a harmadik forrásból származó B10.BR átültetésekkel (MST=41 nap, a 89. naptól), p<0,007;

(b) IgG_{2a}-val kezelt eredeti AKR/J átültetések MST>200 nap, összehasonlítva harmadik forrásból származó B10.BR átültetésekkel MST=42 nap (a 96. naptól), p<0,02;

(c) mindegyik MST>225 nap;

(d) mindegyik MST>200 nap.

A 13. ábrán tolerancia kialakítását láthatjuk olyan egerekben, amelyek aktívan kilökik az első átültetett bőrt. 2, 6 és 11 tagú CBA/Ca egércsoportba ültettünk át AKR/J bőrt a 0. napon, monoklonális antitest kezelés nélkül. A 14. napon, amikor az egereknek körülbelül a fele kilökte ezeket az első átültetéseket (●), második AKR/J bőrátültetést hajtottunk végre egy friss átültető-helyre, majd monoklonális antitest kezelést indítottunk (▲). Az egerek ezután vagy a kombinált patkány IgG_{2b}-t, és ezt követően a három hetes IgG_{2a} kezelést kapták (a), vagy csak IgG_{2a} antitesteket (b).

Az átültetések túlélésének vizsgálata:

(a) első AKR/J átültetés MST=12 nap, összehasonlít-

va egy második, kombinált kezelést kapott AKR/J átültetésekkel MST>92 nap, $p < 0,004$.

(b) második IgG_{2a}-val kezelt AKR/J átültetések MST>75 nap, összehasonlítva az összes első átültetéssel az (a)-ban és (b)-ben MST=12 nap; $p < 0,003$.

1. példa

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

A CBA/Ca, B10.BR és BALB/c egereket a szokványos állattartó egységekben szaporítottuk és tartottuk a Department of Pathology, University of Cambridge-ben, ahol kor és nem alapján válogatott csoportokat használtunk.

A monoklonális antitestek azonosítása áramlási citometriával

Egy NB2-6TG patkány T sejt vonalat (beszerezhető Dr. Howard-tól) transzfektáltunk egér CD4 génnel [Gorman et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 84, 7644 (1987)]. Ezt az NB2.L3T4.Hyg/2.1 sejt vonalat használtuk új, patkány anti-egér timocita fúzióból származó monoklonális antitestek átvizsgálására. A sejteket ($1-5 \times 10^6$) együtt inkubáltuk a vizsgált felülúszókkal, majd ezt követően FITC-vel konjugált nyúl anti-patkány Ig szérummal (Dalo, Glostrup, Dánia). A fluoreszcencia festést áramlási citometriával mértük egy Cytofluorográf (50-H modell, Ortho, Westwood, MA, USA), majd az adatokat ORTHO 2150 számítógéppel dolgoztuk fel.

A monoklonális antitestek kompetitív megkötéséhez

L3T4/Hyg 2.1 sejteket inkubáltunk először biotinilezett monoklonális antitestekkel ($1 \mu\text{g}/10^5$ sejt) jégen, $10 \mu\text{g}$ jelöletlen monoklonális antitest jelenlétében 30 percig. Streptavidin-FITC-t (Amersham, UK) adtunk hozzá, majd újabb 15 percig inkubáltuk. Az eredményeket az Ortho Cytofluorograph-fal elemeztük.

Kétszínű fluoreszcencia festést végeztünk oly módon, hogy egymás után inkubáltuk az egér lépsejteket biotinilezett első monoklonális antitesttel, streptavidin-fikocitrinnel (Serotech, Kidlington, UK), második monoklonális antitesttel és FITC-konjugált, izotípus specifikus monoklonális antitesttel. A zöld és vörös fluoreszcenciát logaritmikus skálán detektálja és jelzi az Ortho Cytofluorograph.

A perifériás vér limfociták (PBL) immunfluoreszcens festése

Egér PBL-eket Ficoll-on való centrifugálással választottuk el (specifikus sűrűség $1,079$, Pharmacia, Svédország), $3000 \times g$, 20 perc. A határretegénél levő sejteket összegyűjtöttük, és PBS/BSA/azid oldatban mostuk. Ezután vagy rIgG₂ monoklonális antitestekkel festettük szövettenyészet felülúszójában, majd FITC-vel konjugált NORIG 7.16-ot adtunk hozzá (anti-rIgG_{2b}), vagy biotinilezett monoklonális antitestekkel és azt követően FITC-Streptavidinnel (Amersham). Az eredményeket áramlási citometriával elemeztük, a fentiek szerint.

Komplement lízis

A komplement lízist az előzőekben leírt módon végez-

tük. Röviden, a monoklonális antitesteket hígítottuk, majd ^{51}Cr -mal jelzett egér timocitával inkubáltuk, és 2 %-os aranyhőrcsög szérumot adtunk hozzá komplement forrásként. 45 percig 37°C -on inkubáltuk, majd a felülúszót összegyűjtöttük, és a radioaktivitást Philips Automatic Gamma Counter-rel mértük (Philips, Eindhoven, Hollandia). A specifikus lízist a

$$\text{lízis \%} = \frac{(e-s)}{(t-s)} \times 100$$

képlet alapján számítottuk, ahol e jelentése a minta beütésszáma, s a spontán kibocsátás és t jelentése az összes beütésszám.

Tolerancia indukálása humán gamma globulinra (HGG)

A HGG elleni tolerancia indukálását már korábban közték [Benjamin et al., J.Exp.Med., 163, 1539 (1986)]. A normál CBA/Ca egereket CD4 monoklonális antitestekkel injektáltuk intravénásan (iv) az 1. napon, intraperitonálisán a 0. és 1. napon. A 0. napon 1 mg hővel aggregált HGG-t adtunk intraperitoneálisán. Az egereket újra injektáltuk a 21. és 31. napon 0,5 mg HGG-vel. A 38. napon az IgG anti-HGG választ ELISA-val mértük.

Egér antitest válaszok kimutatása ELISA-val

A rágcsáló antitest válaszok mérésére a minta szérumból sorozathígítást készítettünk laposfenekű flexibilis lemezeken (Becton Dickinson, USA), amelyek tisztított fehérje antigénekkal voltak borítva, és 30 percig inkubáltuk. A lemezeket ezután 30 percig mostuk PBS/0,05 % Tween 20-szal

(Sigma, Poole, UK), majd biotinilezett birka anti-egér IgG-vel (Amersham) inkubáltuk 30 percig, és a fentiek szerint mostuk. Streptavidin-tormaperoxidázt (Amersham) adtunk a lemezekhez 15 percre, és további három mosás után a reakciót előhívtuk, oly módon, hogy 5 mg/ml o-fenilén-diamint és 0,1 % hidrogén-peroxidot adtunk hozzá. A 490 nm-en mért abszorbanciát leolvastuk, és a titereket egy standard pozitív kontrollal összehasonlítva határoztuk meg.

Bőráttetés

Bőráttetésekét Billingham és munkatársai módosított módszerével transzplantáltuk [Billingham et al., Nature, 172, 603 (1953)]. A befogadó egereket 1 μ g/egér Hypnodillal és 0,2 μ g/egér Sublimase-zal (Janssen, Oxford, UK) érzéstelenítettük intraperitoneális injekcióval. A donor farkáról teljes vastagságú bőrdarabot (0,5 cm x 0,5 cm) ültettünk át a laterális torakális falra, vazelinos gézzel, gyapot bandázzsal borítottuk, és ragtapasszal védtük 7 napig. Az áttetés túlélését ezután naponta megfigyeltük, és feljegyeztük, a túlélés végpontja az az utolsó nap, amikor élő áttetett szövet nem látható.

A közepes túlélési időt (MST) Logrank módszerrel számítottuk és analizáltuk [Peto et al., Br. J. Cancer, 35, 1 (1977)]. Az egerek tímuszát 4 hetes korukban eltávolítottuk Monaco és munkatársai módszerével [J. Immunol., 96, 229 (1966)], majd legalább 4 héttel később felhasználtuk. Az egereket megvizsgáltuk leölésükkor, és egyikről sem derült ki, hogy nincs teljesen eltávolítva a tímusza.

Csontvelő sejtek készítése az átültetéshez

Csontvelő sejteket vettünk donor egerektől, amelyeket CD4 és CD8 kimerítő antitestekkel kezeltük a T-sejtek eltávolítása céljából. 2×10^7 élő sejtet vittünk át megfelelően előkészített recipiensekbe, hogy meghatározzuk, indukálódott-e tolerancia. A kimerizmust úgy lehet meghatározni, hogy mérjük a donor allotípusát vagy a donor Thy-1.1 allotípusát, amint azt korábban közölték [Quin et al., J.Exp. Med., 169, 779 (1989)].

A lépsejtek adoptív transzfere

A donor lépsejteket vagy természetes CBA/Ca egerektől vettük, vagy olyan CBA/Ca egerektől, amelyeket B10.BR lépsejtekre és bőrátültetésekre 4-8 korábban érzékenyítettünk. Ezeket vittük át toleráns CBA/Ca recipiensekbe, amelyeket monoklonális antitestekkel kezeltünk, B10.BR bőrt ültettünk át rájuk, és az átültetést több mint 200 napig hordozták. Mindegyik recipiens egeret intravénásan injekcióztuk 5×10^7 lépsejttel. Kontrollként felnőtt, tímusz-irtott (ATx) egereket kezeltünk rIgG_{2b} CD4-gyel és CD8 monoklonális antitesttel, hogy a CD4+ és CD8+ sejteket kimerítsük. Az ilyen egerek nem képesek kivetni az allogén beültetéseket [Cobbold et al., Nature, 312, 548 (1984)], ezért annak igazolására használtuk őket, hogy az átvitt sejtek működőképeseek.

Kevert limfocita tenyészet

Reagáló lépsejteket mostunk és újra szuszpendáltunk Iscove féle módosított Dulbecco táptalajban (IMDM), amelyet

10 %, hővel inaktivált humán AB szérummal egészítettünk ki. A serkentő lépsejteket 25 $\mu\text{g/ml}$ mitomicin-C-vel kezeltük (Sigma, Poole, UK) 37°C-on 30 percig, majd kétszer mostuk IMDM-ben. 3×10^5 reagáló sejtet és 3×10^5 serkentő sejtet tenyésztettünk 96 nyílásos laposfenekű mikrotiter lemezeken 37°C-on 5 % széndioxid-tartalmú légtérben. A 4. napon a sejteket 10 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{125}I -jód-dezoxiuridinnal (Amersham) kezeltük hat óra hosszat. A beépülést gamma számlálóval mértük. A három ismétlés geometriai átlagát számítottuk.

A limfociták serkentése monoklonális antitestekkel

A mitogén anti-V β 6, 46-6B5 monoklonális antitesteket Dr. H. Hengartner-től szereztünk be [Payne et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 85, 7696 (1988)]. A monoklonális antitestet 96 nyílásos laposfenekű lemezekre kötöttük 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban egy éjszaka alatt, majd felhasználás előtt alaposan öblítettük IMDM-mel. 145-2C11 CD3 monoklonális antitesteket (beszerezhetők Dr. J. Bluestone-tól) [Leo et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 84, 1374 (1987)] 1:100 hígításban használtuk szérummentes szövettenyésztés felülúszóban. IMDM-ben $4,5 \times 10^5$ lépsejtet, valamint 10 %, hővel inaktivált humán AB szérumot adtunk az egyes nyílásokhoz. A szaporodást négy napos tenyésztés után vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK

Az rIgG_{2a} monoklonális antitest CD4 molekulához való kötődésének azonosítása

Egy YTS 177.9 monoklonális antitestet immun-fluoreszcens festéssel izoláltunk az L3T4 transzfektált sejtvonalhoz való kötődése alapján (1. táblázat). Izotípusát egy RG 7/1.7 jelű anti-rIgG_{2a} monoklonális antitesttel való reakciója alapján határoztuk meg [Springer et al., Hybridoma, 1, 257 (1982)] ELISA módszerrel (az adatok nincsenek megadva). A további elemzés során ezt a monoklonális antitestet két másik CD4 monoklonális antitesttel hasonlítottuk össze, az előzőekben leírtak alapján. A kötés gátlását vizsgálva úgy találtuk, hogy az YTS 177.9 ugyanahhoz az epitophoz kötődik, mint az YTS 191.1 [Cobbold et al., Nature, 312, 548 (1984)] és a GK 1.5 [Dialyras et al., Imm. Rev., 74, 29-56 (1983)] (mindkettő CD4 monoklonális antitest), és nem ahhoz, mint az YTA 3.1, egy másik CD4 monoklonális antitest [Quin et al., Eur. J. Immunol., 17, 1159 (1987)], amely egy másik epitopot ismer fel. Két szint alkalmazó áramlásos citometriában az YTS 177.9 és az YTA 3.1 az egér lépsejteknek ugyanazt a populációját festette meg, amely eltérő az YTS 169.4, egy CD8 monoklonális antitest által megfestett epitoptól [Cobbold et al., Nature, 312, 548 (1984)].

Az YTS 177.9 specificitását specifikus ⁵¹Cr kibocsátási vizsgálattal is vizsgáltuk. Jóllehet a monoklonális antitest önmagában alkalmazva nem hatékony a lízis során, de a CD4 YTA 3.1 monoklonális antitesttel szinergenciát mutatott (1a ábra). Másrészt az YTS 177.9 interferált az YTS 191.1 rIgG_{2b} monoklonális antitest által közvetített lízissel, amely a fluoreszcencia festés alapján kereszt-gátlónak bizonyult (1b ábra).

Az rIgG_{2a} CD4 monoklonális antitest nem meríti ki a CD4 monoklonális antitesteket in vivo

Az rIgG_{2a} monoklonális antitestnek az in vivo sejt-kimerítésre gyakorolt hatásának meghatározására felnőtt, tímusz-irtott (ATx) egereket használtunk, mivel ezekben az állatokban a monoklonális antitest kimerítést követő T-sejt regenerálódás sokkal kevésbé hatékony, mint a normál egerekben, mert hiányzik a tímusz-függő T-sejt regeneráció. A periferiális T sejteknek a monoklonális antitest injekció utáni követésével lehetővé vált az igazi kimerítés és az időleges antigén moduláció, illetve a limfocita újra-eloszlás megkülönböztetése. Mindegyik egér 2 mg IgG_{2a} vagy IgG_{2b} antitestet kapott, és a periferiás vér limfocitákat áramlási citometriával elemeztük a kezelés előtt, valamint utána különböző időpontokban. Amint a 2. ábrán látható, egy héttel az IgG_{2b} monoklonális antitest terápia befejezése után a perifériáról a CD4+ sejteknek körülbelül 90%-a ki volt mérítve. Ezt kísérte az összes T sejt százalékanak csökkenése, és a CD8+ sejtek százalékanak enyhe emelkedése. Ezzel szemben, jóllehet az IgG_{2a} monoklonális antitest kezelés csökkentette a CD4+ sejtek százalékos arányát, a Thy-1⁺ sejtek százalékos aránya nem változott lényegesen, és a CD8+ sejteké sem. Ezt a CD4 molekulák antigén modulációja eredményének tekinthetjük, az antitest kötődést követően. Négy héttel a kezelés után az IgG_{2b}-vel kezelt csoportokban a T-sejtek száma még alacsony volt, míg az YTS 177.9-cel kezelt csoport normál CD4+ sejt szintet mutatott.

HGG-vel szembeni tolerancia indukálása rIgG_{2a} CD4 monoklonális antitest jelenlétében

A CD4 (ab')₂ monoklonális antitest fragmenteket használó korábbi munkák azt sugallják, hogy a monoklonális antitest által megkönnyített fehérje antigénekkal szembeni tolerancia esetleg nem igényli a CD4+ T sejtek kimerítését. Megvizsgáltuk azt, hogy a nem-kimerítő CD4 monoklonális antitest a F(ab')₂ fragmentekhez hasonlóan rendelkezhet-e ugyanezzel a hatással. Az egereknek YTS 177.9-et vagy YTS 191.1-et adtunk 3-napos sorozatokban, és egy HGG injekciót (0,5 mg/egér) a második napon (0. nap). 4 héttel később HGG₄-gyel provokálva az YTS 191.1-gyel kezelt egerek és a magas YTS 177.9 dózist kapott (1 mg/egér) egerek toleránsak voltak HGG-vel szemben (3. ábra). Azok az egerek azonban, amelyek 0,1 mg vagy ennél kevesebb monoklonális antitestet kaptak, még képesek voltak a HGG-re reagálni.

Az YTS 177.9 képessége tolerancia indukálására rIgG_{2a} monoklonális antitestekkel szemben

Az idegen antitestek in vivo adagolása rendszerint antiglobulin választ kelt a gazdaszervezetben. A CD4 monoklonális antitestek egyik tulajdonsága az, hogy képesek elnyomni ezt az antiglobulin választ, sőt képesek toleranciát indukálni más, ugyanahhoz az izotípushoz tartozó antitestekkel szemben. Vizsgálataink során úgy találtuk, hogy az rIgG_{2a} YTS 177.9 CD4 monoklonális antitest ugyanilyen tulajdonságokkal rendelkezik.

A 0,1-1 mg/egér YTS 177.9-t kapott egerek nem adtnak

primer antiglobulin választ (a titer: <1:20). Azok az egerek azonban, amelyek 0,01 mg/egér YTS 177.9-et kaptak, gyenge választ mutattak (1:160). Az első antitest injekció után hat héttel ezeket az állatokat újra provokáltuk "irreleváns" (patkány-anti-humán) rIgG_{2a} és rIgG_{2b} monoklonális antitestekkel, Freund féle adjuvánsban, hogy a megfelelő serkentést biztosítsuk. rIgG_{2a}-ként YTH 34.5-t használtunk, amely a humán CDw52 elleni monoklonális antitest [Waldmann et al., Adv. Exp. Med. Biol., 186, 869 (1985)]. rIgG_{2b}-ként YTH 12.5-t használtunk, amely a humán CD3 elleni monoklonális antitest [Waldmann et al., Adv. Exp. Med. Biol., 186, 869 (1985)]. Az egereket 4 héttel később kivérettük, és szérumuk anti-patkány Ig titerét ELISA módszerrel mértük. Ugyanúgy, ahogy az rIgG_{2b} monoklonális antitestek toleránssá tették az egereket az rIgG_{2b} immunoglobulinokra, a magas dózisban YTS 177.9-et (1 mg) kapott egerek is teljesen toleránsak lettek rIgG_{2a}-ra, még ismételt erősítések után is (4. ábra). 0,1 mg YTS 177.9 nem bizonyult elegendőnek tolerancia indukálására, jóllehet immunszuppresszív volt az elsődleges válaszokra. A 0,01 mg YTS 177.9-et kapott egerek, illetve a nem kezelt kontroll állatok másodlagos típusú antiglobulin válaszokat mutattak. Az így indukált tolerancia specifikus volt, mivel az YTS 177.9-cel kezelt egerek még képesek voltak reagálni az rIgG_{2b} immunoglobulinra, míg az YTS 191.1 toleráns egerek az rIgG_{2a}-ra képesek reagálni.

Az allogén beültetett szövet kilökésének késleltetése rIgG_{2a} monoklonális antitest kezeléssel

Úgy találtuk, hogy az YTS 177.9 ugyanolyan hatékony mint az rIgG_{2b} CD4 monoklonális antitestek, abból a szempontból, hogy képesek meghosszabbítani a beültetett allogén bőrszövet túlélését egy rövid kezelés után. Az első kísérletben normál CBS/Ca egereknek rIgG_{2a} (YTS 177.9), illetve rIgG_{2b} (YTS 191.1) napi injekciókat adtunk két hétig, az allogén (BALB/C) bőr-transzplantáció előtt 3 nappal kezdődően (körülbelül 7 mg/egér összes monoklonális antitest). Az YTS 177.9-cel kezelt csoportban az MST-t lényegesen meghosszabbította, 20 napra (kezeletlen kontroll: 11,3 nap; $p \leq 0,05$, 2. táblázat). Ez a megnövekedett bőr-túlélés nagyon hasonlít ahhoz, amit az rIgG_{2b} CD4 monoklonális antitestekkel lehetett elérni, ami kimerítette a sejteket (MST 19 nap).

Az I-es és II-es MHC osztályok közötti eltérés miatti beültetett szövet kilökődésnél kimutatták, hogy mind a CD4+, mind a CD8+ alcsoportok kimerítése lényegesen növeli a beültetett szövet túlélését a CD4 monoklonális antitest egyedüli hatása mellett [Cobbold et al., Transplantation, 42, 239 (1986)]. Vizsgálatainkban egy másik rIgG_{2a} CD8 monoklonális antitestet használtunk, amelynek szintén kis hatása volt az in vivo sejt kimerítésre, az rIgG_{2a} CD4 monoklonális antitesttel együtt. Erről az YTS 105.8 CD8 monoklonális antistről kimutattuk, hogy szinergenciát mutat az YTS 177.9 rIgG_{2a} CD4 monoklonális antitesttel, tovább hosszabbítva a teljesen allogén bőrátültetés túlélését. Ösz-

sze hasonlítás céljából azonos mennyiséget adtunk mindkét rIgG_{2b} monoklonális antitestből (YTS 191.1 és YTS 169.4), illetve a két rIgG_{2a} monoklonális antitestet adtuk be. A monoklonális antitestekből összesen 3 mg/egér mennyiséget adtunk be a 0., 2. és 4. napon a bőrátültetéstől számítva. Az rIgG_{2b}-vel kezelt CBA/Ca egerek kivetették a BALB/c bőrt (MST=24 nap, míg a kontroll értéke MST=10,5 nap $p \leq 0,005$, 5. ábra). Meglepő módon a beültetés túlélése az rIgG_{2b} CD4 és CD8 monoklonális antitestekkel kezelt csoportban hosszabb volt, mint abban az egércsoportban, amelyet rIgG_{2b} monoklonális antitestekkel kezeltünk. 4 rIgG_{2a}-val kezelt CBA egér közül 3 nem lökte ki a BALB/c bőrátültetéseket egészen az átültetés utáni 40. napig (MST 46,5 nap; szemben az IgG_{2b}-vel kezelt csoporttal $p \leq 0,03$).

Allogén bőrátültetésekkel szembeni tolerancia

Jóllehet egyes közlemények szerint bizonyos allogén szövetátültetések, például szív vagy hasnyálmirigy, permanens túlélést mutatnak CD4 monoklonális antitest kezelés után, általában bonyolultabbnak találták, hogy bőrátültetést hosszabb ideig fenntartsanak csak monoklonális antitest kezeléssel. Korábban igazoltuk, hogy csak CD4 kimerítő monoklonális antitest kezelés lehetővé tette a többszörös minor eltéréssel rendelkező csontvelő elfogadását, és az ilyen egerek azután toleránsak a donor bőrre. A jelen vizsgálatban CBA/Ca egereknek B10.BR egerek bőrét ültettük át, és a befogadókat YTS 177.9 (CD4) és YTS 105.18 (CD8) monoklonális antitesttel kezeltük. Ebben a H-2 kompatibilis, többszörös

minor eltérést tartalmazó transzplantációs antigén kombinációban az összes háromhetes monoklonális antitest kezelést kapott egér befogadta az első bőrt 90 napra. Ebben az időpontban egy második donortípusú bőrt, egy harmadik forrásból származó (B10.D2) bőrrel együtt transzplantáltunk. A 6. ábrán látható adatok azt mutatják, hogy mind az első, mind a második átültetés végtelen hosszú idejű (>90+ nap), míg a B10.D2 bőr azonnal kilöködött. Azon egerekben, amelyek csak 2 monoklonális antitest injekciót kaptak, 6 közül 3-ban fennmaradt a B10.BR bőr 90 napig, de a második bőrátültetés után lassan kilöködtek.

Tolerancia és allergiás érzéketlenség többszörös minor antigén eltéréssel rendelkező csontvelőt tartalmazó egerekben

IgG_{2a} CD4 és CD8 monoklonális antitestek kombinációjával injekciót kapott CBA/Ca egerekbe csontvelőt lehet átültetni, és toleranciaát mutatnak B10.BR bőrrel szemben (7. ábra). Egy hasonló kísérleti elrendezésben kimérizmus és AKR/J velővel (MIs-1^a) szembeni tolerancia volt lehetséges (7. ábra). Mivel tolerancia elérhető még a CD4 sejtek kimerítése nélkül is, ezért lehetőségünk volt arra, hogy kövessük a VB6⁺ CBA/Ca T sejtek sorsát a recipiens perifériáin. Négy héttel a monoklonális antitest és a velő infúzió után ezeknek az állatoknak a lépsejtjei nem voltak képesek reagálni a MIs-1^a-re in vitro, és gyengén reagáltak a mitogén V 6 monoklonális antitesttel való szilárd fázisú serkentésre (3. táblázat). A FACS analízis kimutatta, hogy a VB6⁺ sejtek

normál számban fordulnak elő a periférián (ezekről kimutattuk, hogy a recipiens Thy1.2 allotípusnak felelnek meg). A V β 6⁺ sejtek allergiás érzéketlenséget mutattak a serkentésre. Mivel a CD4 monoklonális antitest nem meríti ki a T sejteket, ezért ezekről feltételeztük, hogy allergiásan érzéketlenné tett perifériás T sejtek.

Annak megerősítésére, hogy a tímusz nem fontos a toleranciához, ismét perifériás T sejt AKR/J csontvelőt használtunk, ez alkalommal azért, hogy toleranciára bírja az ATx egereket a MIs-1^a-val szemben. A lép T sejtek ismét allergiásan érzéketlenné váltak a MIs-1^a-ra és a V β 6 serkentésre (4. táblázat). Sem a csontvelő, sem az antitest önmagában nem volt képes ezt reprodukálni. Nyilvánvaló, hogy az antitestek és a csontvelő kombinációjára van szükség ahhoz, hogy a perifériás T sejtek allergiásan érzéketlenek legyenek.

A perifériás tolerancia igazolása az allogén
bőráttétetésekre felnőtt, tímusz irtott egerekben

Annak megerősítésére, hogy a bőráttétetések által indukált komoly perifériás toleranciával van dolgunk, a kísérleteket ATx egerekben megismételtük. Mivel az rIgG_{2a} monoklonális antitestek nem pusztítják el a T sejteket, azt vártuk, hogy az immunfunkciók ezekben az egerekben visszatérnek a normális szintre az antitest terápia megszakítása után. Amint azt az eutímuszos egerekben tapasztaltuk, a tolerancia a vizsgált bőrre indukálódott, és a harmadik forrásból származó áttétetések azonnal kilökődtek (8. ábra).

A "perifériás" tolerancia állapot a normál limfociták infúzióját tükrözi

Mindkét fenti allogén bőrátültetés tolerancia modellben azt vizsgáltuk, hogy a normál limfociták adoptív transzfere le tudja-e állítani a toleráns állapotot. 50 millió normál donorokból származó, transzfúzióban beadott lépsejt egyik esetben sem volt képes helyreállítani a kilökődés képességét. Ezekkel a kísérletekkel kapcsolatban állandó probléma az infúzióban beadott sejtek túlélésének és működésének a kimutatása. Ezt részben azzal ellenőriztük, hogy azonos számú lépsejtet vittünk át T sejtekben kimerített ATx egerekbe. Ebben az esetben az átvitt sejtek képesek voltak befolyásolni a bőrátültetés kilökődését. Csak a toleráns egerekbe átvitt "feltöltött sejtek" voltak képesek megtörni a toleráns állapotot (5. táblázat). Hasonló eredményeket kaptunk olyan egerek esetén, amelyek toleránsak a HGG-re, ahol a tolerancia nem törhető meg normál sejtek adoptív transzferével, hacsak a befogadó CD4+ T sejteket előtte ki nem merítettük. Akármilyen nehéz is az ilyen kísérleteket ellenőrizni, arra a következtetésre kellett jutnunk, hogy a toleráns állatok immunrendszere nem teszi lehetővé a normál szűz T sejteknek, hogy kifejezzék immunpotenciáljukat.

2. példa

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Egerek

CBA/Ca, C57BI.10/Pc, BALB/c, B10.BR és AKR/J egereket szaporítottunk és tartottunk szokásos állattartó egységek-

ben a Department of Pathology, University of Cambridge épületeiben. Az egerek nem szempontjából válogatott csoportjait használtuk 6-12 hetes korukban.

Monoklonális antitestek

A kísérletekben használt patkány monoklonális antitesteket az 1. táblázatban soroltuk fel. Az antitesteket Pristannal feltöltött (DAXLOU)F₁ patkányok aszcitesz folyadékából állítottuk elő, 50 %-os telítettségű ammónium-szulfáttal kicsapva, majd foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS; pH=7,2) szemben dializálva. A fehérje koncentrációját 10 mg/ml-re állítottuk be 2-5 mg/ml antitestet tartalmazó oldat OD₂₈₀ értéke alapján. Az összes antitest preparátumot 0,2 µm-es szűrőn bocsátottuk át, mielőtt egereknek beadtuk.

Bőrátültetés

A bőrök átültetését a korábban leírt módon végeztük [Cobbold et al., Transplantation, 41, 634 (1986)]. Röviden, a donor farokbőr transzplantátumot (0,5 - 1 cm-es négyzet) a befogadó egér laterális torakális falára transzplantáltuk érzéstelenítés közben. A transzplantátumokat gézzel és ragtapasszal borítottuk 7 napig. A transzplantátum állapotát az első hónapban hetente háromszor, majd utána hetente ellenőriztük. A túlélési különbségeket a Log-Rank módszer alkalmazásával elemeztük [Peto et al., Br. J. Cancer, 35, 1 (1977)]. Ha különböző donorokból többszörös átültetést végeztünk, akkor ezeket egyetlen preparált helyre transzplantáltuk, rendszerint az eredeti bőrátültetés ellentétes olda-

lán [Cobbold et al., Nature, 323, 164 (1986)]. A transzplantátumokat eleinte hetente háromszor, majd utána hetente figyeltük meg. Az átlagos túlélési időt (MST) azoknak a napoknak a számában adtuk meg, amelyek után a kilökődés teljes volt, de a tolerált, végtelen túlélésű transzplantátumok általában jó állapotban voltak, normális szőrnövekedéssel.

Bőrátültetésekre való tolerancia indukálása

A bőrátültetéseket használtuk egyetlen forrásként az antigén/tolerogéneknél, és a műveletet a fentiek szerint hajtottuk végre, ugyanazon a napon, mint amikor a monoklonális antitest kezelés kezdődött. A monoklonális antitesteket hetente háromszor adtuk be a 0. és 21. nap között, az első két injekciót (a 0. és a 2. napon) intravénásan adtuk be, a többit intraperitoneálisan. Az injekciónként beadott összes antitest teljes dózisa 2 mg aszciteszes immunoglobulin frakció volt 0,2 ml PBS-ben. A patkány IgG_{2b} antitest esetében ez 0,5-0,5 mg YTS 191.1.2, YTA 3.1.2, YTS 169.4.2 és YTS 156.7.7 volt (egy szinergens hatású koktél a CD4 és CD8 monoklonális antitestekből); [Qin et al., Eur. J. Immunol., 17, 1159 (1987)]. A patkány IgG_{2a} antitestek esetében az YTS 177.9.6 (CD4) és az YTS 105.18.10 (CD8) antitestekből 1-1 mg-ot használtunk. A kombinált kimerítő és blokkoló kísérleti felálláshoz a szinergens patkány IgG_{2b} koktélt intravénásan adtuk a 0. és a 2. napon, majd a patkány IgG_{2a} CD4 és CD8 antitestet háromszor adtuk egy héten (intraperitoneálisan) a 21. napig.

Az aktív monoklonális antitest szintje a szérumban

A monoklonális antitest kezelés alatt és után különböző időpontokban az egyes egerektől vett szérum mintákat 1/5 PBS hígításban, amely 1 tömeg/térfogat% borjú szérumalbumint és 5 térfogat% hővel inaktivált normál nyúl-szérumot tartalmazott, hozzáadtuk 5×10^5 CD4 vagy CD8 transzfektált sejtekhez. A CD4 transzfektánsként patkány NB2-6TG sejt vonalat használtunk, amely az egér L3/T4-et fejezi ki (1. példa), míg a CD8 (Lyt-2) gén magas szinten fejeződött ki az egér L-sejtekben [Zamoyska, Cell, 43, 153 (1985)]. A megkötött antitestet monoklonális anti-patkány IgG_{2a} alkalmazásával mutattuk ki, amelyet FITC-hez kötöttünk (MARG2A-FITC; Serotec, Oxford), a gyártó által javasolt hígításban, majd az analízist egy ORTHO 50H Cytofluorographon végeztük, amely egy 1250-es számítógéphez volt kapcsolva (ORTHO, Westwood, MA, USA). Az átlagos fluoreszcenciát tisztított CD4 és CD8 antitestekből készített sorozathígítással hasonlítottuk össze (YTS 177.9.6 vagy YTS 105.18.10) normál egérszérumban, hogy a szérum-mintáknak megfelelő koncentráció értékeket meg tudjuk határozni. Ahol a fluoreszcencia telítő antitestet mutatott, vagy nem mutatott detektálható fluoreszcenciát a háttér felett, az eredményről feltételeztük, hogy kisebb vagy azonos mint a standard görbe titrálható tartománya.

A perifériás vér leukociták előállítása

Az egereket egyenként kivérettük a farokvénán keresztül (körülbelül 0,1 ml), 1 egység heparint tartalmazó

steril csövekbe. A plazmát ezután egy mikrocentrifugában végzett centrifugálás után (6000/perc, 2 perc) eltávolítottuk. A vörös vértesteket kétszer lizáltuk, oly módon, hogy 0,9 ml vizet adtunk hozzájuk 10 másodpercre szobahőmérsékleten, majd 0,1 ml 10x foszfáttal pufferolt sóoldatot adtunk hozzá, és a fehér sejteket centrifugálással nyertük ki (1000/perc, 7 perc) [Chandler et al., J.Immunol. Methods, 34, 341 (1979)].

A T-sejt alcsoportok vizsgálata kimerítésre

Periferiális vér leukocitákat készítettünk az egyenként kezelt egerekből az előzőekben leírt módon. Ezeket vagy CD4 (YTS 191.1.2 plusz YTA 3.1.2), vagy CD8 (YTS 169.1.2 plusz YTS 156.7.7) antigének elleni monoklonális antitesteket tartalmazó felülúszókkal festettük. Más monoklonális antitesteket is használtunk kontrollként. A megkött antitesteket egy keverékkel mutattuk ki, amely monoklonális anti-patkány IgG_{2b}-FITC-t [NORIG-7.16-FITC; Clark, Methods in Enzymology, 121, 548 (1986)] és monoklonális anti-patkány kappa könnyűláncot tartalmazott [MAR-18.5-FITC; Lanier et al., Hybridoma, 1, 125 (1982)]. A fluoreszcenciát ORTHO 50H Cytofluorograph-fal kapcsolt 1250-es számítógéppel és lineáris erősítővel analizáltuk, az előre és kilencven fokos szórásra állított impulzusszűréssel, hogy az élő limfocitákat szelektáljuk.

Kevert limfocita tenyészetek

A válaszoló sejteket az egyes egerek vérmintájából

állítottuk elő (körülbelül 0,2 ml), vizes lízissel, az előzőekben leírt módon. Mindegyik mintának megvizsgáltuk a szaporodóképességét, oly módon, hogy a sejteket három U-fenekű szövettenyésztő mikrotiter nyílásba osztottuk szét (körülbelül 4×10^5 fehér sejt nyílásonként), amelyek 4×10^5 jól mosott, mitomicin-C-vel (Sigma, Poole, UK; 25 $\mu\text{g/ml}$) kezelt serkentő lépsejtet tartalmaztak. Az Iscove féle módosított Dulbecco táptalaj (IMDM), amely 10 %, hővel inaktivált humán AB szérumot tartalmazott, végtérfogata 0,1 ml volt. 3 napig 37 °C-on inkubáltuk 5 %-os CO_2 -t tartalmazó inkubátorban, majd 5 μl ^{125}I -dezoxi-uridinnel (IUDR; 10 $\mu\text{Ci/ml}$, Amersham, UK) kezeltük hat óra hosszat. A ^{125}I beépülését úgy mértük, hogy a sejteket üvegszál as szűrőlapra gyűjtöttük, és Philips Automatic Gamma Counter-en mértük.

A kimerítő és blokkoló CD4 és CD8 antitestek kombinációja lehetővé teszi a toleranciát MHC eltéréseket tartalmazó bőrátültetések esetében

Az 1. példában bemutattuk, hogy a nem-kimerítő CD4 és CD8 antitestekkel végzett háromhetes terápia lehetővé tette a tolerancia kialakulását kisebb eltéréseket tartalmazó bőrátültetésekkel szemben. Egy olyan kezelés munkamenetének kialakítására, amely az erős MHC különbségek tolerálását alakítja ki, összehasonlítottuk a kimerítő (patkány IgG_{2b}), nem-kimerítő (blokkoló patkány IgG_{2a}), valamint a kimerítő és azt követően adagolt blokkoló CD4 és CD8 antitestek kombinációja adagolásának hatását CBA/Ca (H-2^k) egereken, amelyek BALB/c (H-2^d) bőrátültetést kaptak (9.

ábra). Amint azt a korábbiakban említettük, egy szigorúan kimerítő kísérleti munkamenettel lényegesen késleltetni lehet a kilökődést, de az összes egér kilökte a transzplantátumokat 70 nap elteltével (MST=55 nap). A nem-kimerítő antitestek kevésbé voltak hatékonyak (MST=28 nap), de két kimerítő dózis kombinációja, majd egy patkány IgG_{2a} antitesttel végzett blokáda adta a leghosszabb túlélést (MST>100 nap), jöllehet a legtöbb (de nem az összes) transzplantátum kilökődött 200 nap alatt. Ebben a kísérletben második BALB/c teszt-transzplantátumokat adtunk a 94. napon, egy harmadik forrásból származó (B10 (H-2^b)) bőrrel együtt. Ezek a harmadik forrásból származó transzplantátumok azonnal kilökődtek (MST=16 nap), jelezve, hogy az egereknél visszatért az immunkompetencia, míg a második BALB/c transzplantátumok túlélése elérte az átlagos 43 napot. Ez azt mutatja, hogy kell lennie valamennyi specifikus válaszképtelenségnek a BALB/c antigénekre.

Jöllehet nem kaptunk komplett toleranciát ezekben a sejt-kombinációkban, azt találtuk, hogy ugyanez a kombinált munkamenet teljesen tolerancia megengedő, ha B10 (H-2^b) bőrt ültetünk át MHC inkompatibilis CBA/Ca (H-2^k) egerekre. A 10. ábrán látható, hogy 6/8 recipiens egér végtelen hosszú ideig (<250 nap) megtartotta az eredeti bőrtranszplantátumokat, míg az összes egér 15 napon belül kilökte a harmadik forrásból származó BALB/c bőrt, amelyet a 119. napon transzplantáltunk. A második B10 transzplantátumok lényegesen hosszabb túlélési idővel rendelkeztek (MST=44 nap), de végül mindegyik kilökődött, akkor is, ha az első transzplantátu-

mok, amelyekről feltételezzük, hogy genetikailag azonosak, megmaradtak. Ez az eredmény reprodukálható, és világosan mutatja, hogy a tolerált első transzplantátum privilegizált helyzetben van, annak ellenére, hogy a második transzplantátum kilökésére képes effektor sejtek vannak jelen. Akármilyen is a mechanizmus, az eredeti bőrtranszplantátumnak indukálnia kell és fenn kell tartania egy saját magával szembeni válaszképtelen állapotot. Az egereknek az a képessége, hogy képesek különbséget tenni az első és második bőrátültetés között, úgy látszik, hogy a harmadik forrásból származó bőr kilökésétől függ, mivel 5/8, BALB/c transzplantátumok helyett B10.BR-t kapott egér toleráns maradt mind a háromra (10. ábra). Ez azt mutatja, hogy a recipiensek toleránsak voltak a B10 minor antigénekre mind a donor MHC (ami azt jelenti, hogy a transzplantátum képes magát bemutatni a tolerancia céljából), mind a recipiens-típusú MHC szempontjából, ami azon keresztül játszódhatott le, hogy az eredeti transzplantátum antigének reprocesszálódtak, és a recipiens APC-k mutatták be a tolerancia céljából.

Ez az első leírása egy antitest által közvetített toleranciának a teljes MHC korlátokon át, erősen immunogén bőrtranszplantátumok mint a tolerogén egyetlen forrásának alkalmazásával. Hangsúlyozni kell, hogy a transzplantátumnak magának kell tartalmaznia az összes, a tolerancia bekövetkezéséhez szükséges antigén bemutatást.

A kimerítő és blokkoló antitestek kombinációja is lehetővé teszi az MHC szempontjából egyező, de több, nem-MHC minor antigénekre nem egyező bőrrel szembeni toleranciát

Az 1. példában bemutattuk, hogy a CD4-re és CD8-ra monoklonális antitestekkel való blokkolás elég ahhoz, hogy toleranciát kapjunk olyan bőrátültetésekkel szemben, amelyek több minor antigénben különböznek (B10.BR CBA/Ca-ra). A 11. ábrán az látható, hogy a kombinált kimerítés, majd az azt követő blokkoló kezelés is hatásos volt 8/10 CBA/Ca egérben, végtelen hosszú ideig megtartva AKR/J transzplantátumaikat. Ezek közül az egerek közül hat megtartotta a második AKR/J transzplantátumot is (a 122. napon átültetett bőr, további antitest terápia nélkül), míg mindegyik egér kilökte a harmadik forrásból származó, minor különbségeket tartalmazó bőrt (B10.BR). Ennek a harmadik forrásból származó bőrnek a kilökése azonban valamivel lassúbb volt mint a normál CBA kontrolloké [27 nap, a normál 14 nappal szemben; Cobbold et al., Transplantation, 41, 634 (1986)]. A fordított kombináció (B10.BR a CBA/Ca-ra) szintén toleránssá volt tehető, a kimerítés alkalmazásával majd a blokkoló munkamenettel (4/5 transzplantátum >220 nap), de 2/5 egér elfogadta mind a harmadik forrásból származó, minor különbségeket tartalmazó AKR/J bőrt, valamint a második B10.BR transzplantátumot (az adatokat nem mutatjuk be). Ez feltételezhetően a közös antigének nagy számát tükrözi, és emlékeztet a "domináns" toleranciára, amelyet egy eltérő kísérleti modellben találtak [Zamoyska et al., Eur. J. Immunol., 19, 111 (1989)].

Ennek a résznek az összefoglalásaként megállá-

píthatjuk, hogy a CD4 és CD8 antitestek, ha megfelelően alkalmazzuk őket, akkor lehetővé teszik tolerancia indukálását mind MHC, mind nem-MHC antigén különbségekkel szemben, csak bőrtranszplantátumokra, anélkül hogy antigének további hemopoietikus forrására vagy mieloablatív terápiára lenne szükség. Nyilvánvaló, hogy a bőrtranszplantátumok képesek közvetlenül bemutatni az antigént a perifériális T sejteknek, akár aktiválással, ami a kilökődéshez vezet, akár inaktiválással, ami ehelyett elfogadáshoz és toleranciához vezet.

A kombinált patkány IgG_{2b} és IgG_{2a} antitestek hatása a keringő T sejtekre

A fenti kísérletekben megfigyelt jelentős tolerogén hatások fényében fontos volt annak megbecslése, hogy a monoklonális antitestek milyen hatással vannak a keringő CD4⁺ és CD8⁺ T sejtekre. Korábban kimutattuk, hogy mind a CD4, mind a CD8 elleni antitestek kimerítik a megcélzott T-sejteket [Cobbold et al., Nature, 312, 548 (1984)]. Az 1. példában a patkány IgG_{2a} antitestek a beadott dózisban tendenciájukban csak modulálták az antigént a sejt felületéről. A kombinált munkamenet esetében a patkány IgG_{2b} CD4 és CD8 monoklonális antitestek kezdeti dózisa a várt módon a T sejtek számának csökkenését okozta, majd a CD4⁺ és CD8⁺ sejtek aránya kezdett visszaállni az eredeti értékre az IgG_{2a} antitestekkel folytatott további kezelés hatására (7. táblázat), jóllehet a kifejezett antigén mennyisége jóval alacsonyabb volt (az adatokat nem adjuk meg). Reziduális an-

titestek voltak jelen a T sejteken az adagolási periódus során, ezzel a CD4⁺ és CD8⁺ sejtek részletes mérését megnehezítve. Ezután, a perifériális vérben levő T sejtek aránya minimális maradt, legalább egy hónapig az antitest adagolását követően, ez egy olyan hatás, amelyet nem figyeltek meg, ha csak IgG_{2a} antitesteket adtak be azonos dózisokban (az adatokat nem mutatjuk).

A transzplantátum kilökés nem-kimerítő antitestekkel való elnyomásának egyik mechanizmusa a T sejtek felületén levő CD4 és CD8 járulékos molekulák működésének blokkolása az antigén bemutatás során. Ez csak akkor hatásos igazán, ha a szérum antitesttartalmát olyan szinten tartjuk, amely elegendő az antigén pozitív sejtek telítéséhez. A kezelt egerekben mért aktív antitest szint valóban elegendő volt a kiválasztott CD4 és CD8 antigének telítéséhez a kezelés három hete során, és néhány egérben még az antitest adagolás befejezése utáni három hétig (8. táblázat). A 60. napon azonban nem volt kimutatható (<0,5 ng/ml CD4 és <10 ng/ml CD8) monoklonális antitest a szérumban, ami egyébként egy aspecifikus immunszuppressziót tartott volna fenn. Meg kell jegyezni, hogy egyik egér sem termelt kimutatható mennyiségű antiglobulint (sem faj-elleni, sem idiotípus elleni), amint az befogó ELISA-val mérhető volt, jelezve, hogy az egerek ezzel a kísérleti munkamenettel a patkány immunoglobulinra is toleránssá váltak.

A toleráns egerek in vitro még reagálnak

Úgy találtuk, hogy a B10 bőrre az előzőekben leírt

módon toleránssá tett CBA egerek még képesek in vitro B10 serkentő lépsejteket termelni (9. táblázat), jelezve ezzel, hogy jelentős számú alloreaktív sejtet nem távolítottunk el. Valóban, a recipiens immunrendszer toleráns az eredeti transzplantátum által bemutatott antigénekre, de még képes reagálni a lép stimulátor sejtek vagy egy második bőr-transzplantátum in vitro bemutatására.

Tolerancia indukálása minor antigénekre előzetesen feltöltött egerekben

Feltételezve, hogy a perifériás immunrendszerben levő szűz T sejtek tolerálhatók transzplantátumon levő antigénekkkel, megvizsgáltuk, hogy a feltöltött T sejtek is tolerancia érzékenyek-e. Azt találtuk, hogy mind a két kezelési munkamenet (csak blokkolás, illetve kimerítés és utána blokkolás) hatásos a tolerancia indukálására mind AKR/J, mind B10.BR bőr ellenében CBA/Ca egerekben, amelyeket előzetesen besugárzott donor lépsejtekkel töltöttek fel (12a-12d ábrák). Ezzel szemben, korábban kimutattuk, hogy a CD4⁺ és CD8⁺ T sejteket kimerítve, jöllehet mind a kettő egyformán immunszuppresszív a naiv vagy feltöltött egerekben, nem volt tolerancia permisszív a többszörös minor antigén eltérést tartalmazó bőrre, mivel végül az összes transzplantátum kilöködött [Cobbold et al., Transplantation, 41, 634 (1986)]. Az egyedüli különbség a 11. ábrán látható naiv egerek és a 12. ábrán látható feltöltött egerek között az újra provokálásban volt látható. Abban a csoportban, amelyet feltöltöttünk és AKR/J-vel szemben toleránssá tettünk, az ege-

reknek körülbelül a fele végül kilökte mind az első, mind a második AKR/J transzplantátumot, jóllehet jóval lassabban, mint a B10.BR harmadik forrásból származó transzplantátumokat (MST=63 és 21 nap; 12a ábra). Abban a kombinációban, amikor B10.BR-t vittünk CBA egerekre, az egerek többsége végtelen hosszú ideig megtartotta az eredeti transzplantátumokat, míg néhány egerben mind a második B10.BR, mind az AKR/J transzplantátum lassan kilöködött (12c ábra). A törzs-kombinációk viselkedésében megfigyelt ilyen eltérés illeszkedik ahhoz, amit naiv egerekben megfigyeltünk (lásd 11. ábra), és valószínűleg a megosztott és egyedi minor antigének komplex mintázatában található a magyarázata.

Tolerancia indukálása egy bőrtranszplantátum aktív kilökése közben

Az a megfigyelés, hogy még az érzékenyített T sejtek is toleránssá tehetőek, nyilvánvaló klinikai jelentőséggel rendelkezik. Az nyilván nagyon előnyös lenne, ha egy folyamatban levő immunválaszra lehetne toleranciát indukálni, különösen az autoimmunitás során, vagy transzplantáció utáni kilökődési krízisben. A 13. ábrán az látható, hogy valóban lehetséges többszörös minor antigén eltérést tartalmazó bőrtranszplantátumok folyamatban levő kilökődését megakadályozni, és hosszú időtartamú túlélését kialakítani, néhány esetben mind az első, mind a második transzplantátumban. Ebben a kísérletben a kimerítés, majd az azt követő blokádkombinációja volt a leghatékonyabb (13a ábra), de mivel 6 olyan egerből, amelyik blokkoló (nem kimerítő) antitestet kapott,

3 megtartotta a második transzplantátumot is (13b ábra), ezért még az effektor T sejtek is inaktívvá vagy toleránssá tételének is lehetségesnek kell lennie.

1. táblázat

YTS 177.9 kötődése az L3T4 transzfektált sejtekhez

Monoklonális antitest	A pozitív sejtek %-a L3T4 ^a
YTS 177.9 ^b	98,7
YTS 191.1 ^b	99,1
YTS 177.9 ^c és	1,1
YTS 191.1	
YTS 177.9 ^c és	98,1
YTA 3.1	

a: L3/T4 transzfektált sejtvonalak, a megfelelő monoklonális antitestekkel festve és áramlási citometriával analizálva.

b: A monoklonális antitesteket szövettenyészet felülúszó formájában használtuk, majd FITC-konjugált nyúl antipatkány Ig-t használtunk.

c: Biotinilezett monoklonális antitestek, amelyeket főlegben levő, alul megadott "hideg" monoklonális antitestekkel inkubáltunk. A fluoreszcenciát FITC-streptavidinnel fejlesztettük ki.

2. táblázat

A bőrtranszplantátum kilökődésének késleltetése IgG2a és IgG2b monoklonális antitestekkel

Monoklonális antitest kezelése	A sejtek %-a			Transzplantátum túlélése (napok)
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Thy-1 ⁺	B10.BR BALB/C
YTS 191.1	1,9±1.5	17,3±1,7	20,2±4,4	28, 29, 32, 58, 65
YTS 191.1	1,2±1,1	18,1±2,3	24,5±3,6	15, 18, 19, 19, 20, 21
YTS 177.9	28,3±9.8	15,3±0,4	48,8±5,0	15, 20, 22, >120, >120 >120
YTS 177.9	27,5±10,1	16,1±1,2	46,9±4,2	19, 19, 20, 20, 21, 21
semmi	39,8±3,0	12,5±1,5	47,0±2,8	10, 11, 12 9, 10, 10, 12, 13 11, 12, 12

- a: Normál CBA/Ca egereknek két hétig CD4 monoklonális antitesteket adtunk (körülbelül 7 mg/egér dózisban) a bőrátültetés megkezdése előtt 3 nappal.
- b: Az utolsó monoklonális antitest adagolása után négy nappal levett perifériális vért biotinilezett YTA 3.1 (CDA), YTS 156,7 (CD8) és YTS 154.7 (Thy-1) monoklonális antitestekkel festettük, majd streptavidin FITC-t adtunk hozzá. Ezeket az eredményeket áramlási citometriával vizsgáltuk.
- c: A B10.BR transzplantátumok MST-je: nem-kezelt kontroll: 12 nap; YTS 191.1-gyel kezelt: 32 nap (v.s. kontroll: $p \leq 0,005$). YTS 177-tel kezelt: 22 nap (v.s. kontroll $p \leq 0,004$, v.s. YTS 191.1 csoport, $p \leq 0,7$). A BALB/c trtranszplantátumok MST-je: nem-kezelt kontroll: 10,5 nap; YTS 191.1-gyel kezelt 19 nap (v.s. kontroll, $p \leq 0,0006$); YTS 177.9-cel kezelt: 20 nap (v.s. kontroll $p \leq 0,006$, v.s. YTS 191.1 csoport, $p \leq 0,4$).

3. táblázat

Az MIs-1^b egerek toleranciája a MIs-1^a antigénre, a V β 6+ sejtek allergiás érzéketlenségével kapcsolatban

EGEREK	Válaszok: (beütés/perc)					
	AKR/J	BALB/c	anti-V β 6	CD3	-ve	%V β 6+ sejtek
1	772	11117	583	12350	596	10,2
2	439	8964	1173	9879	460	12,1
3	961	6498	1050	7719	703	8,7
4	1203	12866	1163	13496	1082	7,5
5	859	10784	764	11230	977	7,8
Normál egerek	20756	9633	10440	11980	868	7,0
	27529	17253	10530	13291	642	10,2
Csak csontvelő	38264	10042	13950	19087	815	8,1
	15832	8679	7267	13563	976	9,0

A normál CBA/Ca egereket rIgG_{2a} CD4-gyel (YTS 177.9) és rIgG_{2b} CD8-cal (YTS 156,7) kezeltük 3 hétig összesen 10 mg/egér monoklonális antitest mennyiséggel. 2×10^7 csontvelő sejtet injekcióztunk. 4 héttel később az ezekből az egerek-

ből származó lépsejteket MLC-ben vizsgáltuk, és áramlási citometriához fluoreszcencia festéssel jeleztük. A megadott adatok három ismétlés geometriai átlagai.

4. táblázat

Tolerancia és allergiás érzéketlenség MIS-1^a-ra ATx MIS-1^b egerekben^a

EGEREK	VÁLASZOK: (beütés/perc) ^b			% Vβ6+ sejtek ^c
	AKR	BALB/c	Anti-Vβ6	
1	1348	8081	696	2,8
2	1145	10231	812	2,9
3	998	7311	976	3,7
4	1039	6508	793	3,3
Kontroll ^d	12463	10283	7374	3,8
Egerek	15578	8864	5824	2,9

a: Atx CBA egereket injekcióztunk azonos mennyiségű rIgG_{2a} CD4 monoklonális antitesttel (YTS 177.9) és rIgG_{2b} CD8 monoklonális antitesttel (YTS 156.7) 2 hétig (a monoklonális antitestek összmennyisége 7 mg/egér). 2x10⁷ AKR csontvelő sejtet adtunk infúzióban 2 napig a monoklonális antitest kezelés megkezdése után. 8 héttel később lépsejtjeiket in vitro stimuláltuk, a 2. példában leírtak alapján.

b: A számokat beütés/perc formában adjuk meg (három párhu-

zamos kísérlet geometriai átlaga) minden egérre.

c: VB6+ lépsejtek, 44-22-1 monoklonális antitesttel festve [Payne és munkatársai, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 85, 7695 (1988)] és áramlási citometriával analizáltuk.

d: A kontroll egereket csak monoklonális antitestekkel injekcióztuk.

5. táblázat

A normál limfociták átvitele nem töri meg a toleranciát normál egerekben

ÁLLATOK	INJEKTÁLT SEJTEK ^a	A TRANSZPLANTÁTUM TÚLÉLÉSE A TRANSZFER UTÁN
	B10.BR lépsejtek	>100 nap x 4
Toleráns	naiv CBA lépsejtek	>100 nap x 4
CBA	érzékenyített CBA lépsejtek ^c	15, 17, 17, 21
T-sejtben	naiv CBA lépsejt	12, 14, 14, 15
kimerített ^b	érzékenyített CBA lépsejtek	8, 8, 9, 10
ATx CBA	semmi	>100 nap x 4

A CBA/Ca egereket a B10.BR bőrre a 13a ábra magyarázó szövegében leírtak alapján tettük toleránssá.

- a: Azokat az egereket választottuk, amelyek >200 napig hordták a B10.BR bőrt, és 5×10^7 lépsejttel injektáltuk intravénásan.
- b: Az ATx CBA egerekben kimerítettük a T sejteket oly módon, hogy CD4 és CD8 monoklonális antitesteket injektáltunk beléjük, legalább 4 héttel azelőtt, mielőtt a B10.BR bőrt átültettük.
- c: Az érzékenyített lépsejteket CBA egerekből nyertük ki, amelyeket B10.BR lépsejtekkel injektáltunk, és kilökték a B10.BR bőr-átültetéseket.

6. táblázat
A használt monoklonális antitestek

Mono- klonális antitest	Specifitás	Epitóp	Izotípus	Referencia
YTS 191.1.2	egér CD4	a	IgG _{2b}	Cobbold et al. Nature, <u>312</u> , 548 (1984)
YTA 3.1.2	egér CD4	b	IgG _{2b}	Quin et al., Eur. J. Immunol., <u>17</u> , 1159 (1987)
YTS 177.9.6	egér CD4	a	IgG _{2a}	Quin et al, Eur. J. Immunol., <u>17</u> , 1159 (1984)
YTS 169.4.2	egér CD8	Lyt-2 (a)	IgG _{2b}	Cobbold et al., Nature, <u>312</u> , 548 (1984)
YTS 156.7.7	egér CD8	Lyt-3 (b)	IgG _{2b}	Quin et al., J. Exp. Med., <u>169</u> , 779 (1989)
YTS 105.18.10	egér CD8	Lyt-2 (c)	IgG _{2a}	
YTS 154.7.7	egér Thy-1	monomorf	IgG _{2b}	Cobbold et al., Nature, <u>312</u> , 548 (1984)
YTS 121.5.5	egér CD5	Lyt-1	IgG _{2b}	Cobbold et al., Nature, <u>312</u> , 548 (1984)

7. táblázat

A megmaradó T-sejtek a CD4+CD8 antitesttel kezelt egerekben

B10 toleráns CBA					
A pozitívan festődő lépsejtek százaléka					
Idő	CD4+	CD8+	Thy-1+CD5+	anti-patkány Ig*	
Vizsgált					szám
(nap)					
0	34±2	16±1	47±1	0±0	4
5	12±3	12±5	13±4	6±1	8
12	18±4	18±6	18±5	3±1	3
19	27±4	22±3	26±5	3±3	6
45	24±5	11±2	28±4	0±0	8

* Az anti-patkány Ig a MAR-18.5-FITC és a NORIG-7.16-FITC keveréke

Mindegyik egér patkány IgG_{2b} CD4-et és CD8-at kapott, majd patkány IgG_{2a} CD4-et és CD8-at, a 2. példában leírtak alapján, a 0-21. naptól.

8. táblázat

Az aktív IgG_{2a} CD4 és CD8 monoklonális antitestek
szérumszintjei

Idő (nap)	CD4 szérum antitest (ng/ml) [Négy különböző egér]				CD8 szérum antitest (ng/ml) [Négy különböző egér]			
	0.	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<10	<10	<10
12.	>100	>100	>100	>100	>100	120	150	>1000
19.	50	>100	>100	>100	190	>1000	>1000	>1000
29.	50	>100	>100	>100	75	250	>1000	>1000
32.	80	90	>100	>100	500	600	>1000	>1000
36.	5	100	>100	>100	60	85	500	>1000
43.	<0,5	15	70	>100	<10	<10	12	25
46.	<0,5	<0,5	<0,5	1,0	<10	<10	<10	<10
60.	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<10	<10	<10	<10
78.	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<10	<10	<10	<10

A monoklonális antitest kezelés patkány IgG_{2b} CD4 és CD8 kezelést jelent a 0. és 2. napon, ezt követően hetente háromszor patkány IgG_{2a} CD4 és CD8 kezelést a 21. napig (összesen 2 mg/injekció).

9. táblázat

B10 toleráns CBA egerekből származó perifériális vér
limfociták szaporodása

Szaporodás (125 IUDR beépülés) a stimulátorok hatására			
Csoport	CBA	BALB/c	B10
(b e ü t é s / p e r c)			
Normál CBA kontroll	370±236	4952±5236	2210±2622
	-121	-2624	-1285
B10 toleráns CBA	716±800	4952±3470	3592±2875
	-448	-2091	-1656

Az egyes B10 toleráns CBA/Ca egereket vagy normál kontrollokat a 78. napon véreztettük a farki vénából.

A perifériális vérsejtek szaporodását a 2. példában leírtak alapján határoztuk meg.

A számok logaritmikus átlag és standard deviancia formájában vannak megadva, csoportonként hat egérrel.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Antigénnel szembeni tolerancia indukálására szolgáló készítmények szimultán, külön-külön vagy egymás utáni alkalmazáshoz, azzal jellemezve, hogy egy nem-kimerítő CD4 monoklonális antitestet és egy nem-kimerítő CD8 monoklonális antitestet tartalmaznak kombinált készítmény formájában.

2. Az 1. igénypont szerinti termékek, azzal jellemezve, hogy tartalmaznak még egy kimerítő CD4 monoklonális antitestet és/vagy egy kimerítő CD8 monoklonális antitestet.

3. Nem-kimerítő CD4 monoklonális antitest ember vagy állat sebészeti vagy terápiás kezelésére.

4. Nem-kimerítő CD8 monoklonális antitest ember vagy állat sebészeti vagy terápiás kezelésére.

5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti antitest egy antigén elleni tolerancia indukálására.

6. Nem-kimerítő CD4 monoklonális antitest alkalmazása olyan gyógyászati készítmény előállításában, amelyet egy antigén elleni tolerancia kialakítása során alkalmaznak.

7. Nem-kimerítő CD8 monoklonális antitest alkalmazása olyan gyógyászati készítmény előállításában, amelyet egy antigén elleni tolerancia kialakítása során alkalmaznak.

8. Tolerancia indukálására alkalmazott szer, azzal jellemezve, hogy egy nem-kimerítő CD4 monoklonális antitestet és egy nem-kimerítő CD8 monoklonális antitestet tartalmaz.

9. A 8. igénypont szerinti szer, azzal jellemezve, hogy egy kimerítő CD4 monoklonális antitestet és egy

kimerítő CD8 monoklonális antitestet is tartalmaz.

10. Csomagolási egység, azzal jellemezve, hogy külön komponensekként nem-kimerítő CD4 monoklonális antitestet és nem-kimerítő CD8 monoklonális antitestet tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti csomagolási egység, azzal jellemezve, hogy külön komponensekként egy kimerítő CD4 monoklonális antitestet és/vagy egy kimerítő CD8 monoklonális antitestet is tartalmaz.

12. Nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestek emberi vagy állati test sebészeti vagy terápiás kezelésében együtt való felhasználásra.

13. A 12. igénypont szerinti antitestek együttes alkalmazása tolerancia indukálására.

14. A 12. vagy 13. igénypont szerinti antitestek, azzal jellemezve, hogy egy kimerítő CD4 monoklonális antitestet és/vagy egy kimerítő CD8 monoklonális antitestet is tartalmaznak.

15. Eljárás tolerancia kialakítására egy adagolandó antigénnel szemben, azzal jellemezve, hogy nem-kimerítő CD4 monoklonális antitest és nem-kimerítő CD8 monoklonális antitest hatásos mennyiségét, valamint az antigént adagoljuk.



16. Eljárás tolerancia kialakítására egy birtokolt antigénnel szemben, azzal jellemezve, hogy nem-kimerítő CD4 monoklonális antitest és nem-kimerítő CD8 monoklonális antitest hatásos mennyiségét adagoljuk.

17. A 15. vagy 16. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy kimerítő CD4 monoklonális antitest és/vagy kimerítő CD8 monoklonális antitest hatásos mennyiségét is

adagoljuk a nem-kimerítő CD4 és CD8 monoklonális antitestek adagolása előtt.

59 leírásoldal
+11 rajzoldal
70 oldal
Jue

A meghatalmazott:


DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
8. 

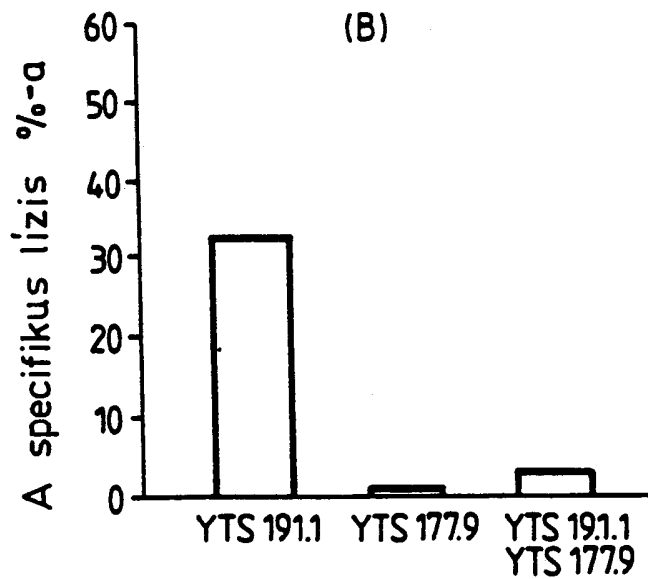
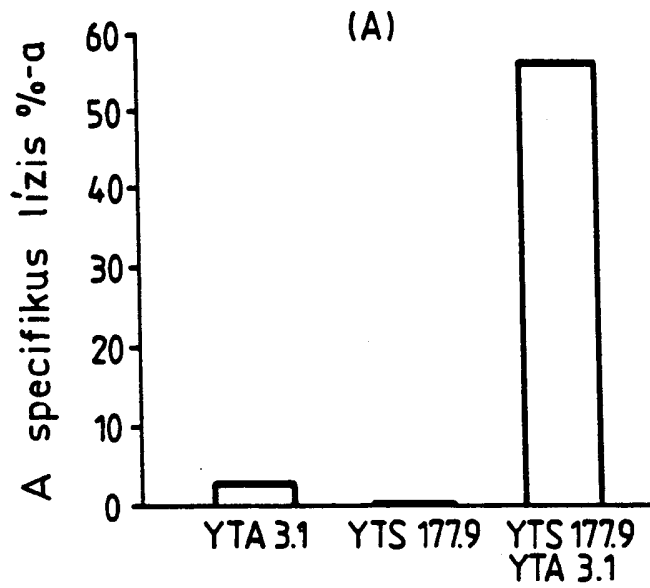
5134/90

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

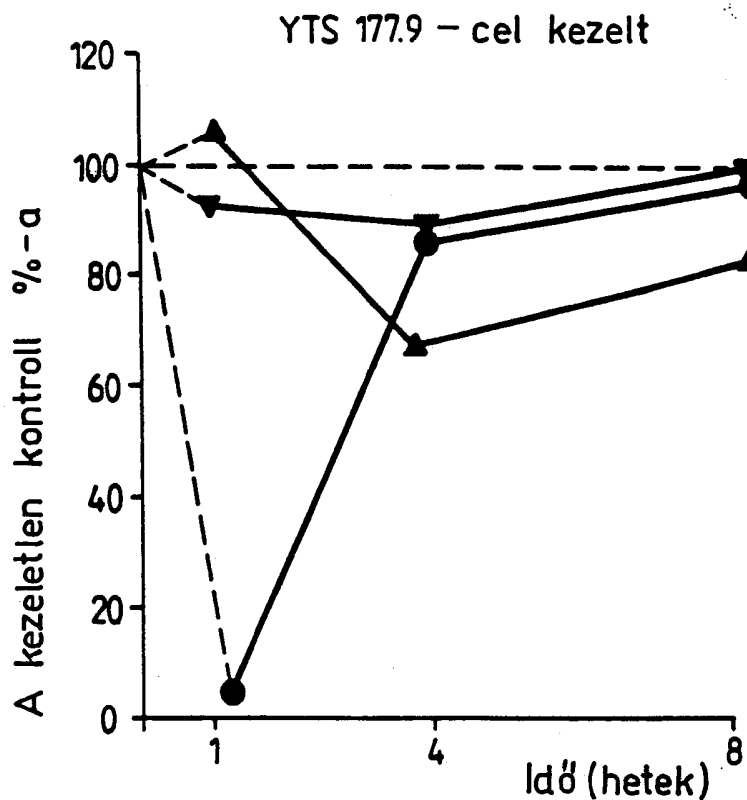
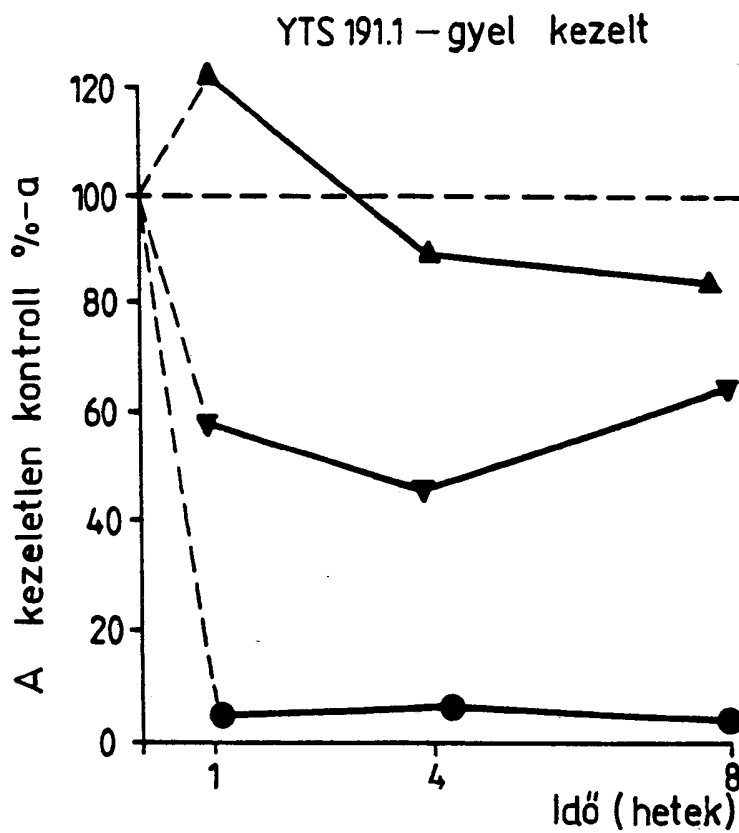
2 1 8 1 9

61341

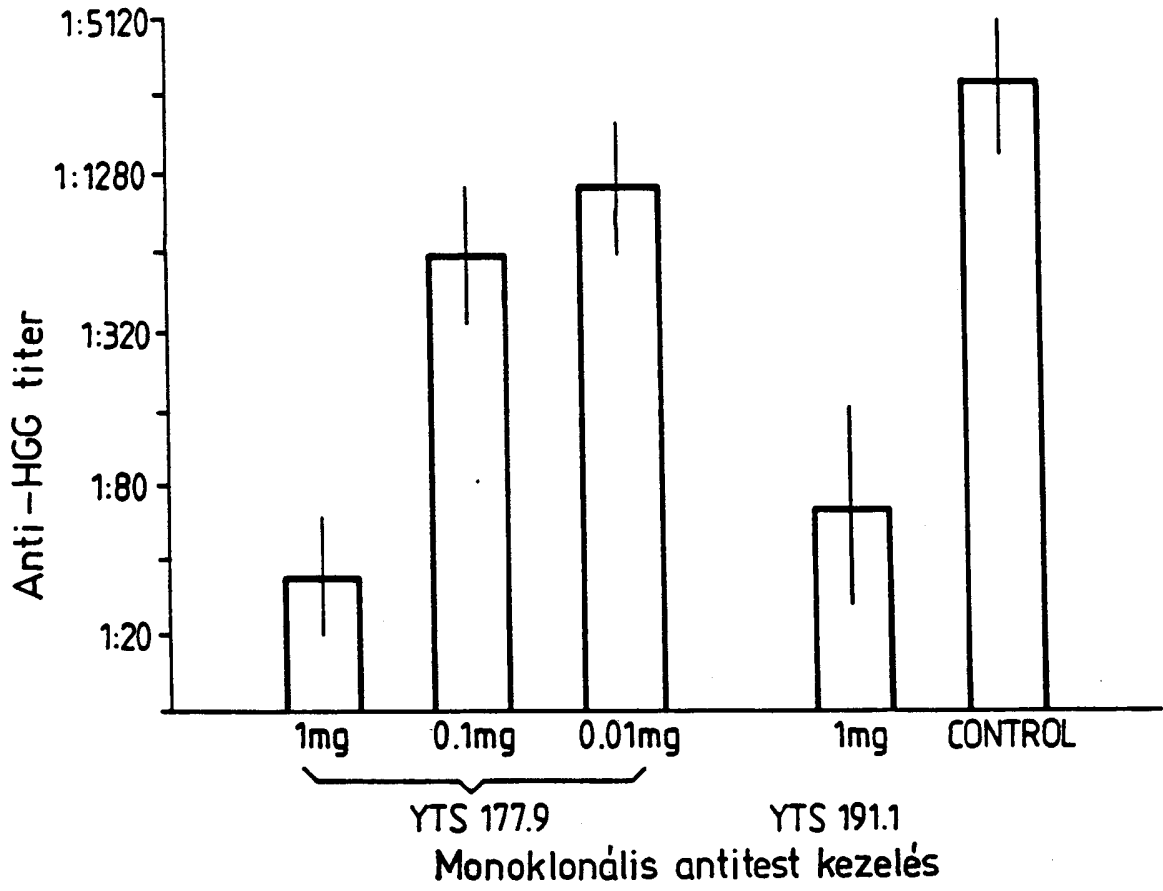
11/1



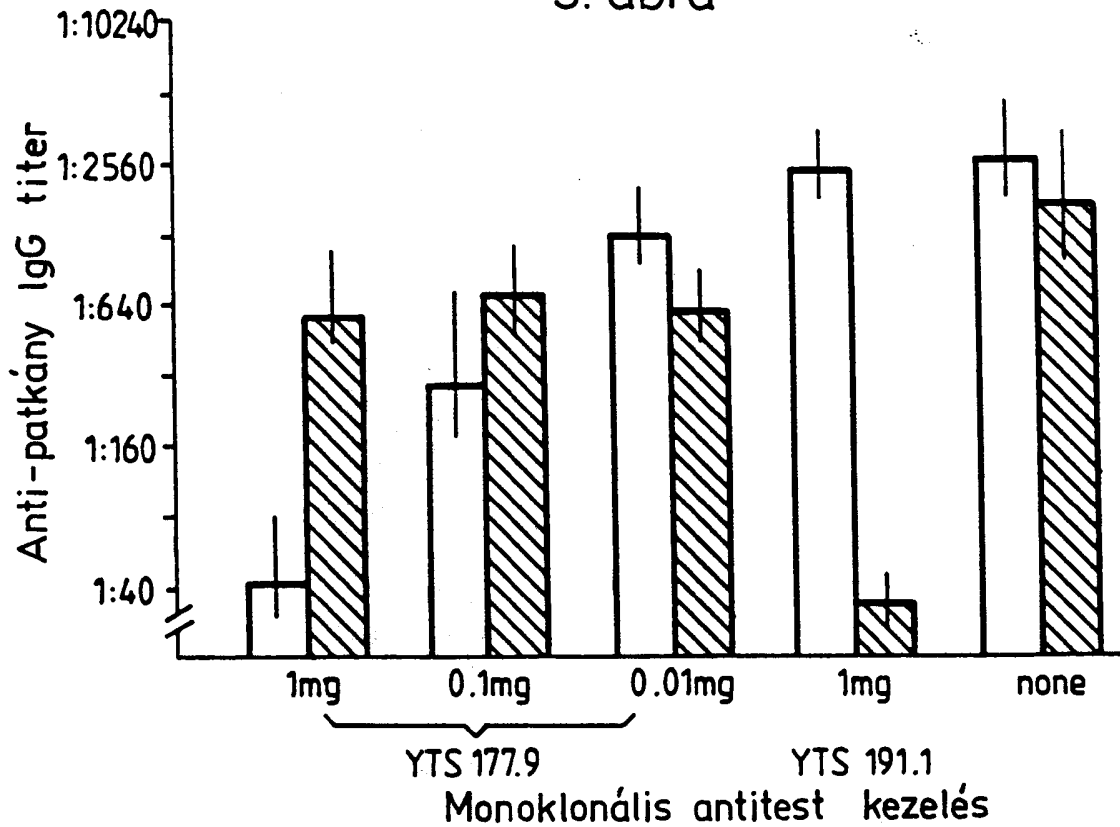
1. ábra



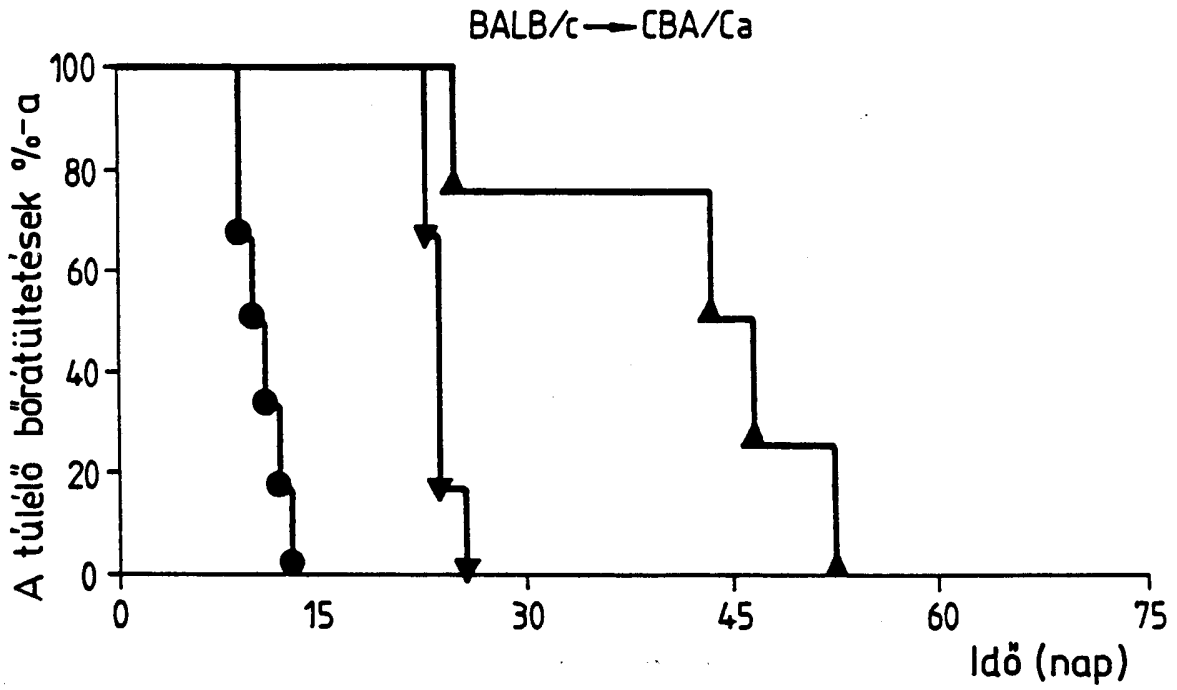
2. ábra



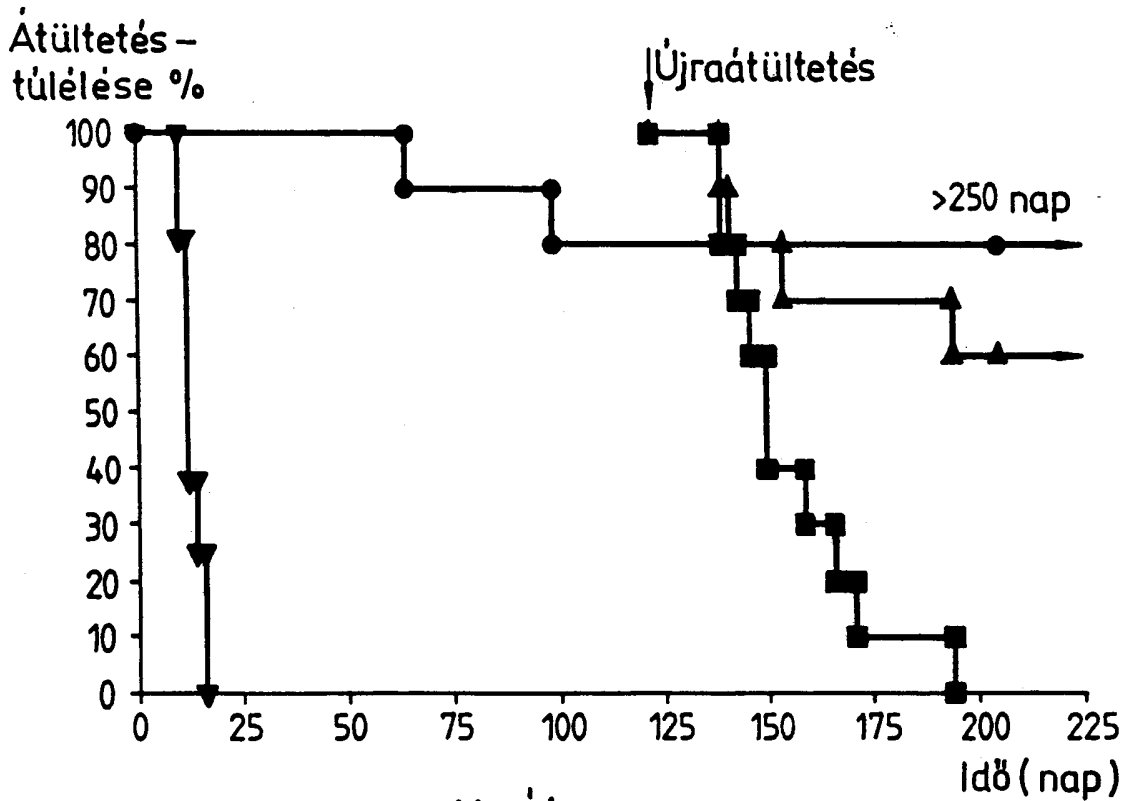
3. ábra



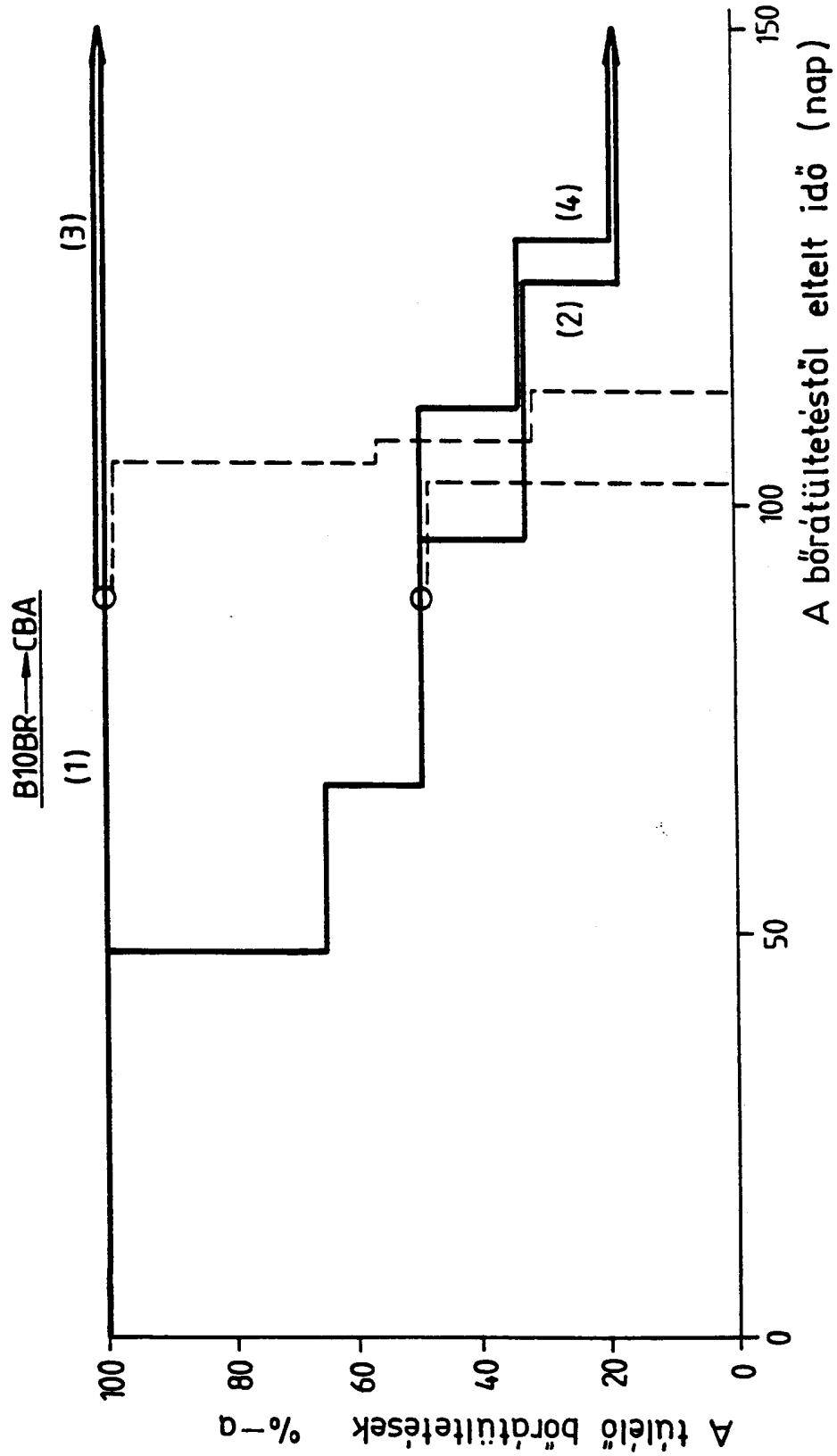
4. ábra



5. ábra

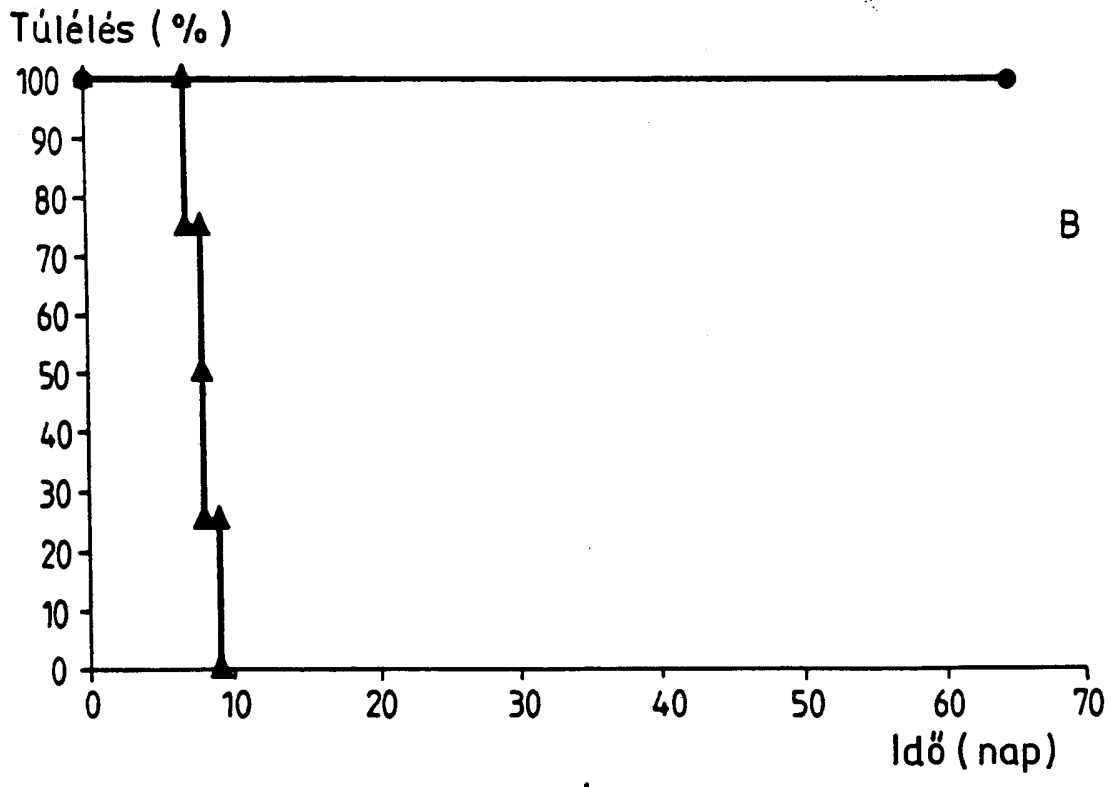
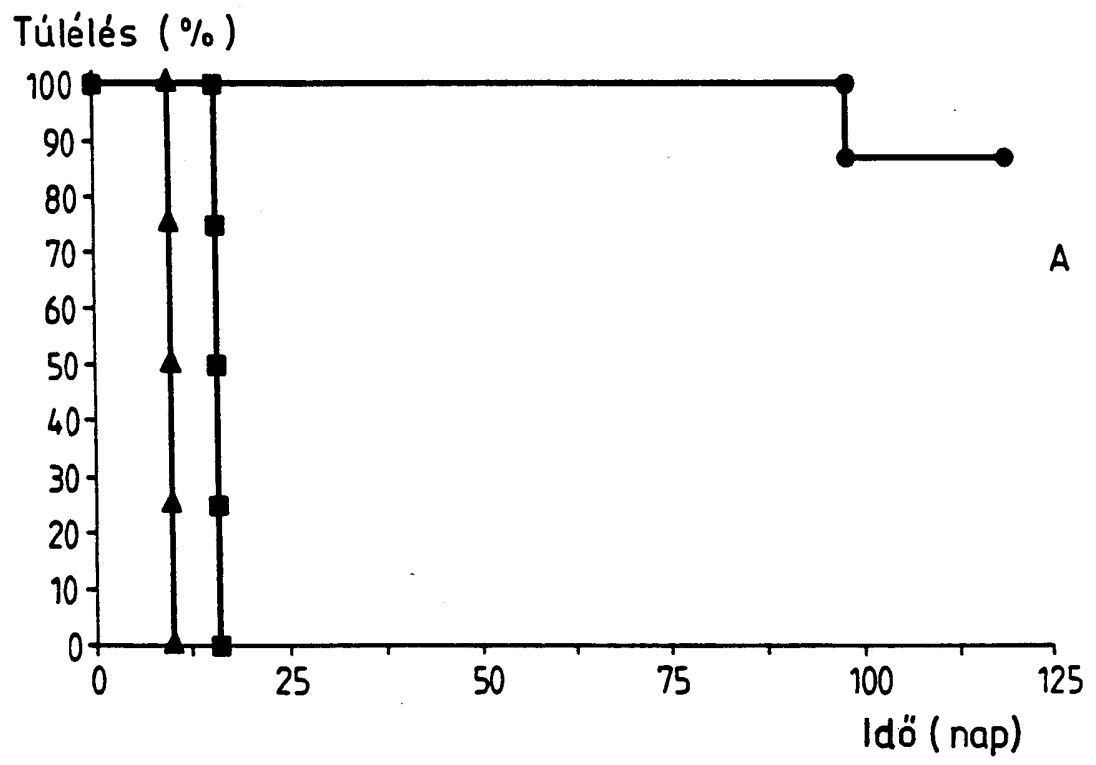


11. ábra

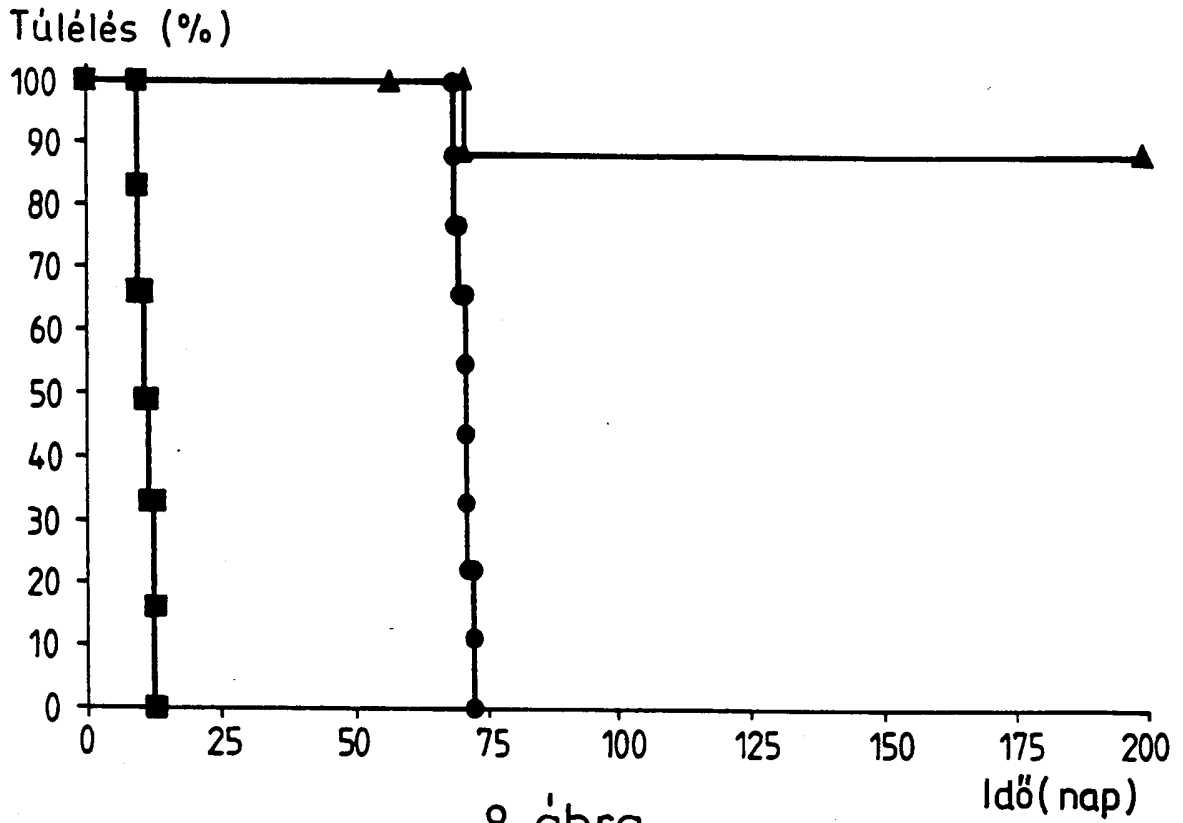


A bőrtünetéstől eltelt idő (nap)

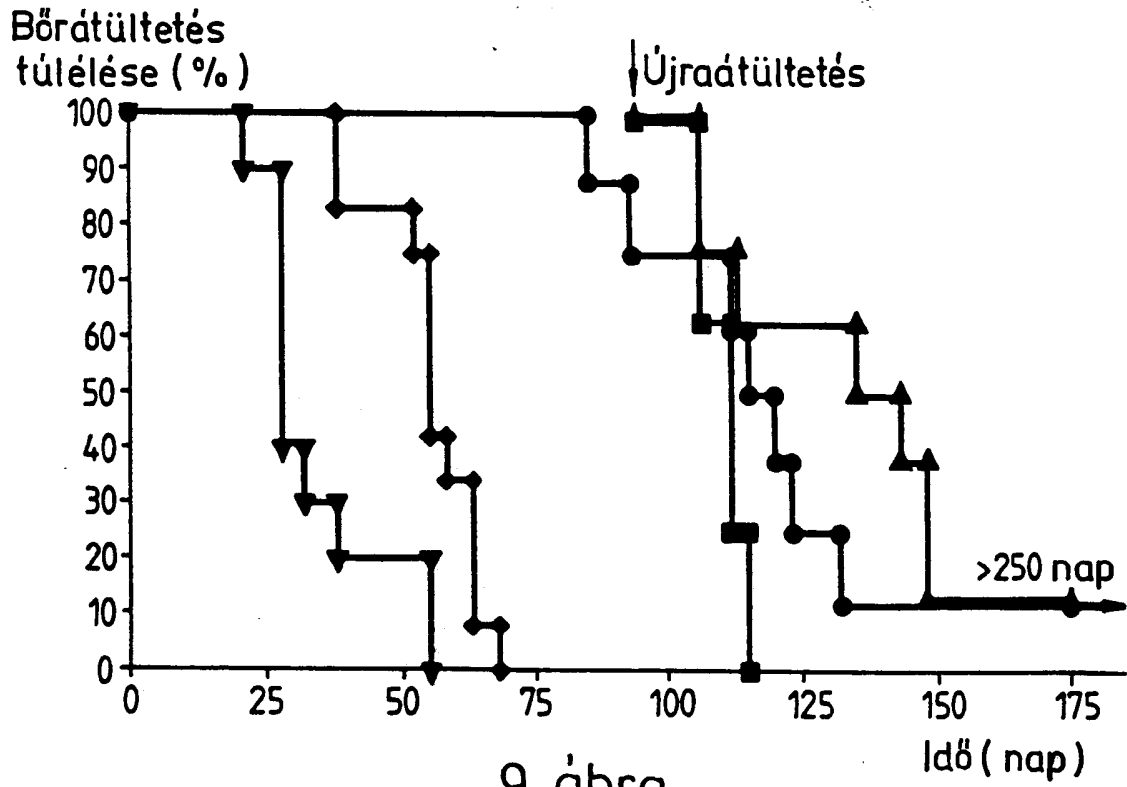
6. ábra



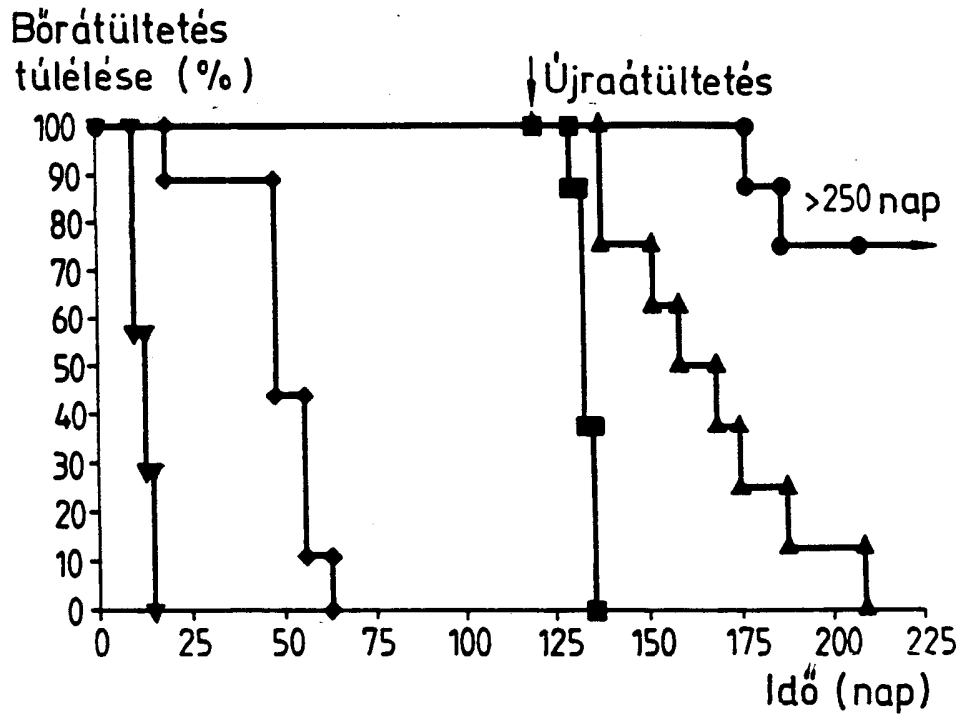
7. ábra



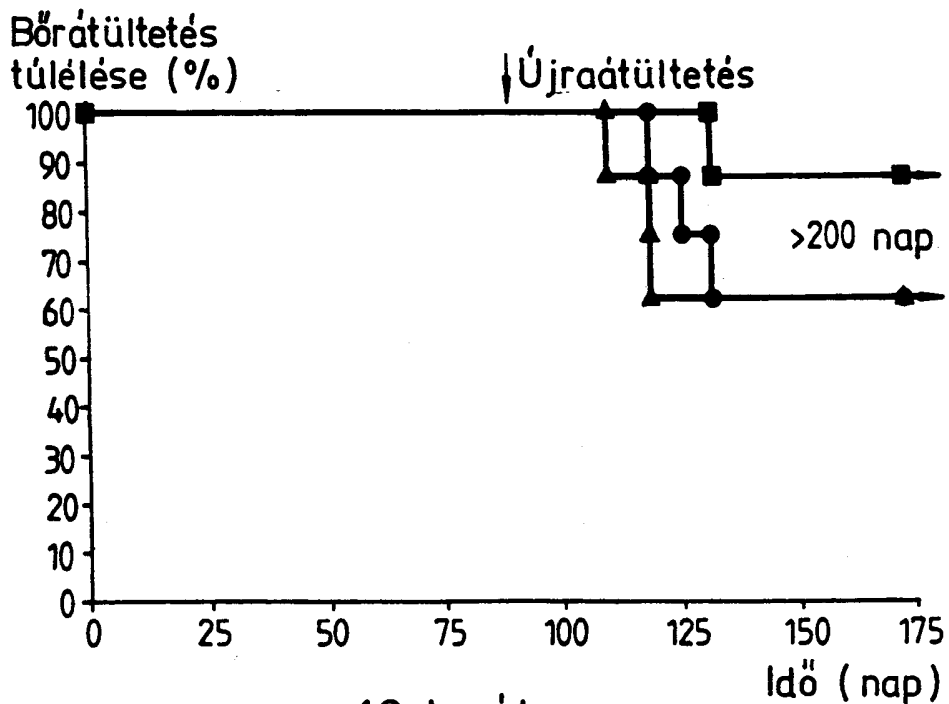
8. ábra



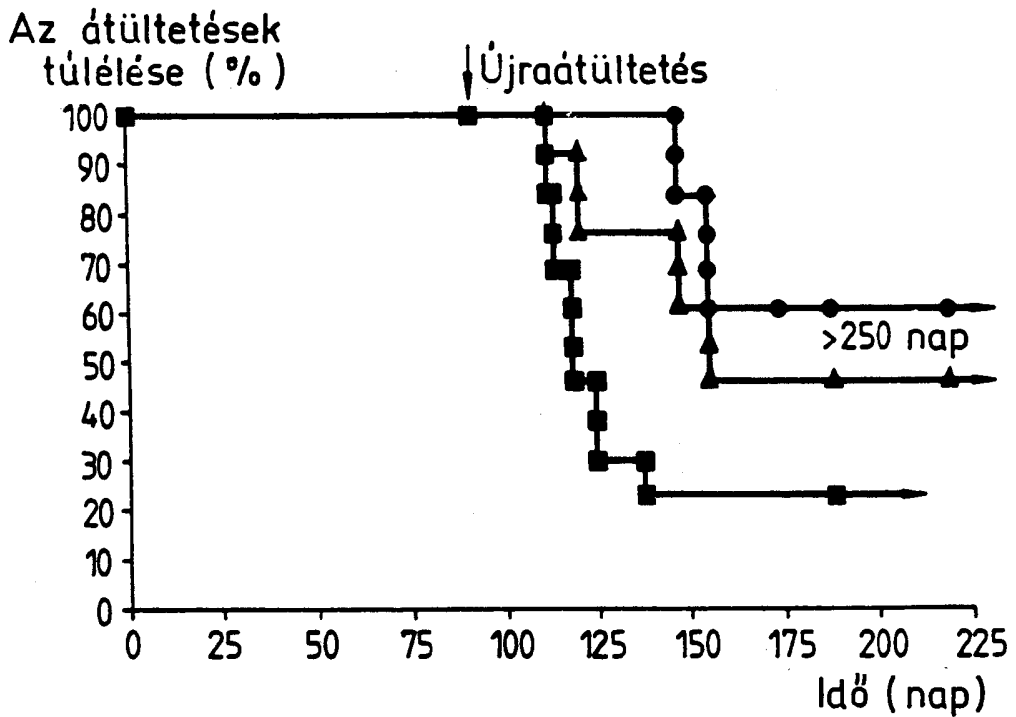
9. ábra



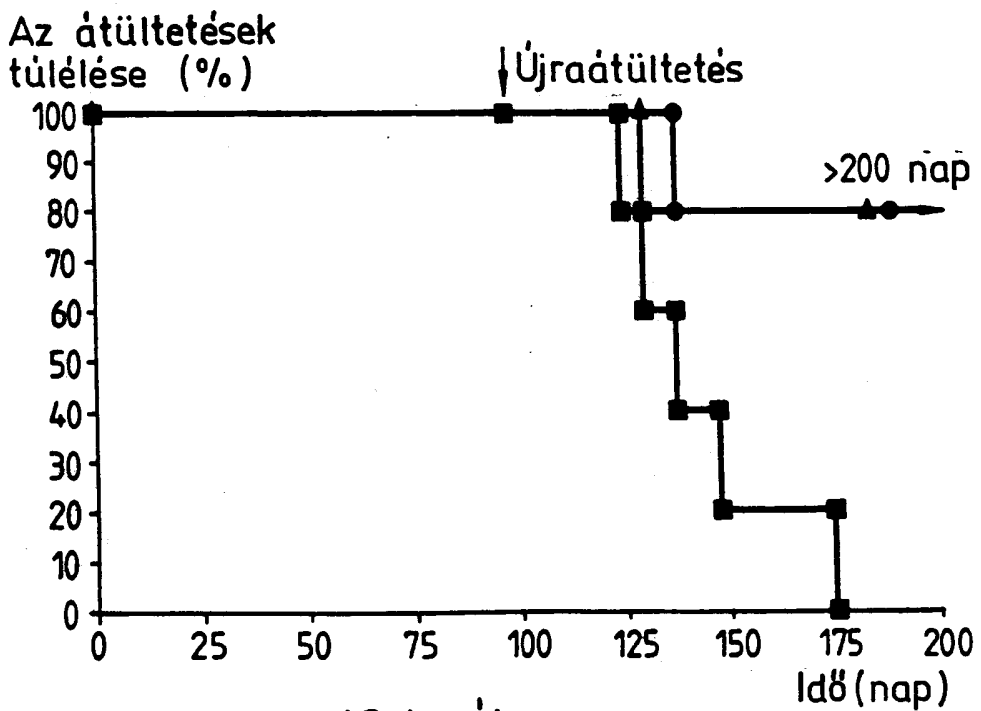
10.a ábra



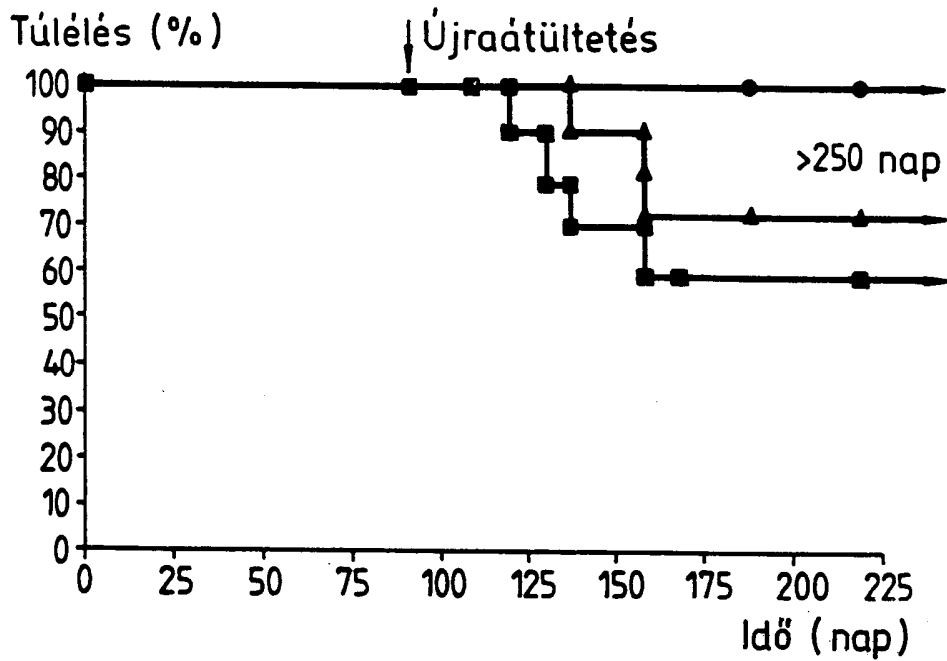
10.b ábra



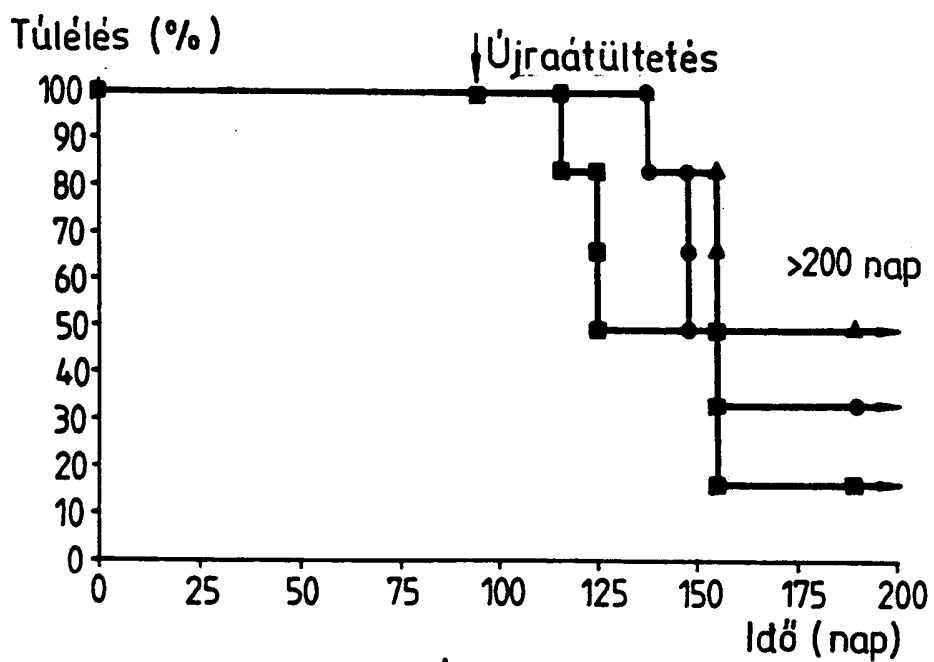
12.a ábra



12.b ábra

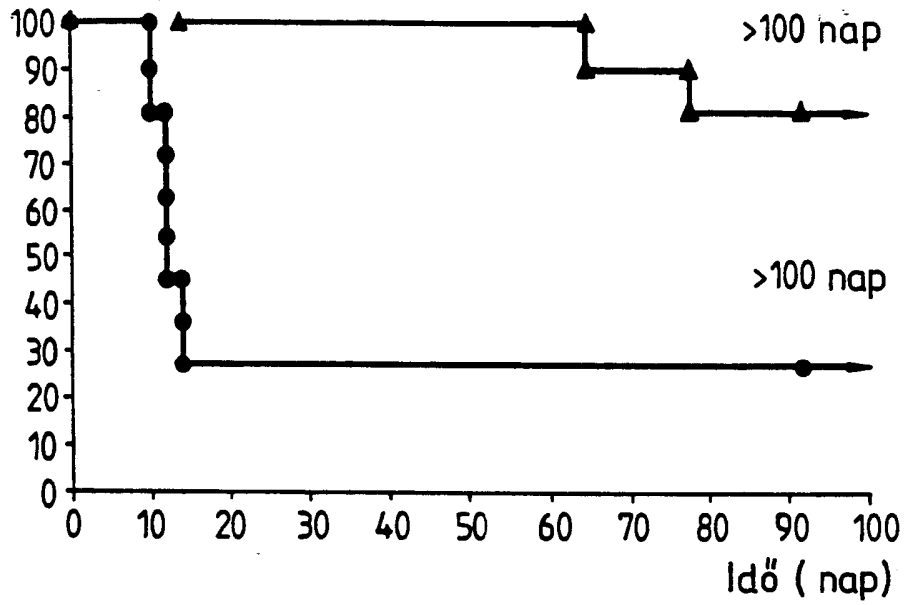


12.c ábra



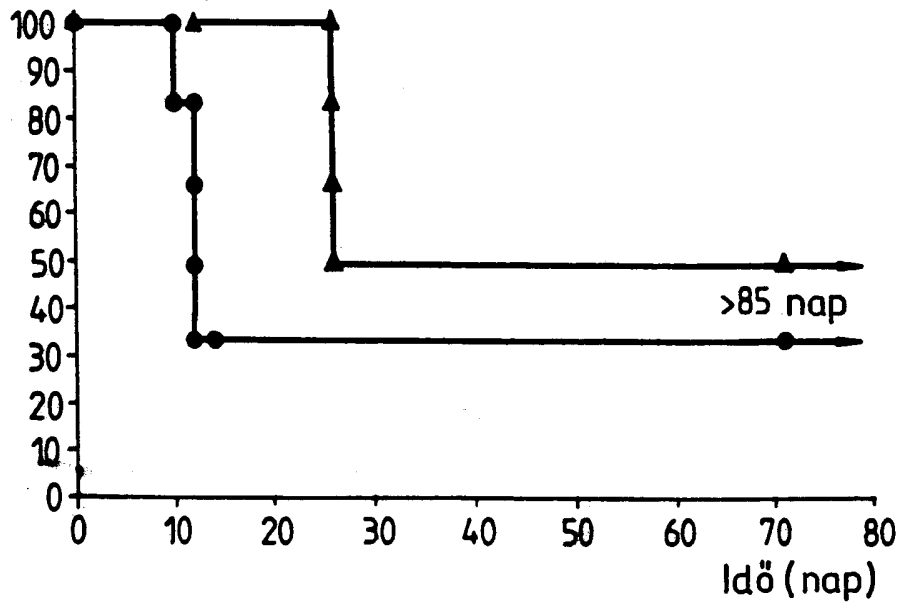
12.d ábra

Az átültetések
túlélése (%)



13.a ábra

Az átültetések
túlélése (%)



13.b ábra