



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 31 836 T2** 2005.12.01

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 922 111 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 836.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL97/00438**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 930 902.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/003670**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **29.01.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.06.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **01.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/86**

C07K 16/46, C07K 19/00, C12N 5/10,

A61K 39/395

(30) Unionspriorität:

22070 P 23.07.1996 US

(73) Patentinhaber:

PanGenetics B.V., Amsterdam, NL

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

DE BOER, Mark, NL-1261 BT Blaricum, NL

(54) Bezeichnung: **INDUZIERUNG VON T ZELL TOLERANZ UNTER VERWENDUNG EINES LÖSLICHEN MOLEKÜLS,
DASS GLEICHZEITIG ZWEI KOSTIMULIERUNGSWEGE BLOCKIEREN KANN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Behandlung von Krankheiten, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Insbesondere bezieht sich diese Erfindung auf Verfahren zur Verhinderung von T-Zell-vermittelten Immunantworten, wie z. B. Transplantatabstoßung, Autoimmunkrankheiten oder Situationen, in denen T-Zell-abhängige Immunantworten gegen ein therapeutisches Molekül oder einen therapeutischen Träger, wie z. B. ein Vehikel für Gentherapie, erzeugt werden.

Hintergrund der Erfindung

Aktivierung von T-Zellen

[0002] Von der Aktivierung von T-Zellen ist bekannt, dass sie mehrere Interaktionen mit Antigen-präsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC) erfordert. Der TcR-CD3-Komplex hat zwei Funktionen in der Antigen-induzierten Aktivierung: eine Erkennungsfunktion, in der ein spezifisches Antigen im Kontext mit dem entsprechenden MHC-Molekül erkannt wird und eine Signalgebungsfunktion, in welcher das Ereignis der Erkennung über die Plasmamembran weitergeleitet wird. Um die Proliferation und Reifung zu Effektorzellen zu induzieren, benötigen T-Zellen jedoch ein zweites Signal zusätzlich zu dem Signal, das durch den TcR-CD3-Komplex vermittelt wird. Dieses kostimulatorische Signal wird normalerweise von der Zelloberfläche von APC zur Verfügung gestellt. Die intrazelluläre Signalgebung nach der TcR/MHC-Peptidinteraktion in Abwesenheit des kostimulatorischen Signals resultiert in einer T-Zellinaktivierung, die als T-Zellanergie oder T-Zell-Unempfindlichkeit (T cell unresponsiveness) bekannt ist. Mehrere akzessorische Moleküle, die auf der Zelloberfläche von T-Zellen vorhanden sind und von denen Liganden auf den APC bekannt sind, wurden mit der Bereitstellung des kostimulatorischen Signals bei der T-Zellaktivierung in Zusammenhang gebracht.

Der B7-CD28-kostimulatorische Weg

[0003] Das beste Kandidaten-kostimulatorische Signal, das zu einer vollständigen T-Zellaktivierung führt, wird durch Interaktion von CD28 auf den T-Zellen mit den B7-kostimulatorischen Molekülen auf APC erzeugt. In vitro-Studien haben gezeigt, dass die Signalgebung über den CD28-kostimulatorischen Weg die Induktion von Anergie verhindern kann.

[0004] Bis heute wurden zwei Mitglieder der B7-Familie molekular kloniert und funktionell charakterisiert: B7.1 (CD80), das ursprünglich B7/BB1 genannt wurde und ein zweites B7-Molekül, genannt B7.2 (CD86). CD80 ist ein monomeres Transmembran-Glycoprotein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 45–65 kDa und ist, wie CD28, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie (Freeman et al., J. Immunol. 143: 2714 (1989)). Ursprünglich wurde berichtet, dass die Expression des CD80-Moleküls auf aktivierte B-Zellen und mit IFN- γ stimulierte Monozyten beschränkt war (Freedman et al., Cell Immunol. 137: 429 (1991)). In jüngerer Zeit wurde CD80-Expression auch auf kultivierten Dendritischen Zellen aus peripherem Blut (Young et al., J. Clin. Invest. 90: 229 (1992)) sowie auf in vitro aktivierten T-Zellen (Azuma et al., J. Exp. Med. 177: 845 (1993)) gefunden. CD86 ist ein Transmembran-Glycoprotein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 70 kDa und ist ebenfalls ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie (Freeman et al., Science 262: 909 (1993)); Azuma et al., Nature 366: 76 (1993)). Das CD86-Molekül scheint ein sehr ähnliches Verteilungsmuster wie CD80 zu haben, mit der Ausnahme, dass die Induktion der Zelloberflächenexpression schneller zu sein scheint und dass es auf frisch isolierten Monozyten vorhanden ist.

[0005] Es ist klar aus der Literatur, dass die ausschließliche Blockierung von CD80 nur in einer teilweisen Inhibition der T-Zell-Aktivierung resultiert. Die Aktivierung von T-Zellen durch Alloantigen-exprimierende Monozyten ist in erster Linie abhängig von der CD86-Kostimulation. Während einer MLC mit Monozyten als Stimulatorzellen konnte anti-CD86 Mab allein die proliferative Antwort stark, aber nicht vollständig inhibieren. Jedoch ergab CTLA4-Ig allein (ein lösliches Fusionsprotein, das aus der extrazellulären Domäne von humanem CTLA4, verbunden mit humanem IgG [CH2- und CH3-Domänen] besteht, das sowohl an CD80 als auch an CD86 binden kann) oder eine Kombination von anti-CD80 plus anti-CD86 Mabs eine maximale Inhibition.

CD40-CD40L-kostimulatorischer Weg

[0006] Aus den oben besprochenen Literaturdaten scheint es, dass weitere kostimulatorische Moleküle von entscheidender Wichtigkeit für die Aktivierung von T-Zellen sein können, wenn die Kostimulation über

CD80/CD86-CD28 blockiert ist. Ein solcher alternativer kostimulatorischer Weg wird über die Interaktion zwischen CD40 auf den APC und CD40L auf den T-Zellen reguliert. Das CD40-Molekül gehört zu der TNF-Rezeptorfamilie der Typ I-Transmembranproteine.

[0007] Die Mitglieder dieser Genfamilie, die einschließt: die beiden Rezeptoren für TNF; den niedrigaffinen Nervenwachstumsfaktorrezeptor (nerve growth factor receptor); das T-Zell-Aktivierungsantigen CD27, CD30 und CD95, sind durch Sequenzhomologie in ihren Cystein-reichen extrazellulären Domänen charakterisiert (Armitage et al., *Current Opinion in Immunology* 6: 407 (1994)). Interessanterweise sind die bekannten Liganden für die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie ebenfalls sehr homolog und bilden eine weitere Genfamilie, die TNF/CD40L-Genfamilie genannt wird. Obwohl TNF- α ein lösliches Cytokin ist, wird es anfangs als ein Membran-assoziiertes Molekül synthetisiert. Die meisten Mitglieder der TNF/CD40L-Rezeptorfamilie sind Typ-II-Transmembranproteine.

[0008] CD40 ist am besten für seine Funktion in der B-Zell-Aktivierung bekannt. Das Molekül wird konstitutiv auf allen B-Zellen exprimiert. CD40L-CD40-Interaktion kann die Proliferation von gereinigten B-Zellen stimulieren und, in Kombination mit Cytokinen, die Immunoglobulinproduktion vermitteln. Jüngere Studien zeigen, dass die Verteilung des CD40-Moleküls nicht so restriktiv wie ursprünglich angenommen ist. Frisch isolierte humane Monozyten exprimieren geringe Mengen des CD40-Moleküls, das durch die Kultivierung in Anwesenheit von IFN- γ hochreguliert werden kann (Alderson et al., *J. Exp. Med.* 178: 669 (1993)). Die Stimulierung von Monozyten über CD40 resultiert in der Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen, wie z. B. IL-1 und TNF- α , von toxischen Zwischenstufen freier Radikale, wie z. B. Stickoxid, und in der Hochregulierung der B7-kostimulatorischen Moleküle. Humane Dendritische Zellen (dendritic cells, DC), die aus peripherem Blut isoliert wurden, können ebenfalls das CD40-Molekül exprimieren (Caux et al., *J. Exp. Med.* 180: 263 (1994)). Das Binden von CD40 auf DC resultiert in einem verstärkten Überleben dieser Zellen, wenn sie in vitro kultiviert werden. Zusätzlich resultiert die Stimulation von DC wie bei Monozyten in der Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen, wie z. B. IL-1 und TNF- α und in der Hochregulierung der CD80/86-kostimulatorischen Moleküle.

[0009] Sämtliche der oben beschriebenen Beobachtungen zeigen deutlich, dass das CD40L-Molekül auf aktivierten T-Zellen ein wichtiges Effektormolekül ist, das stimulatorische Effekte über die Bindung von CD40, das auf einer Vielzahl von Zelltypen, die in immuninflammatorischen Antworten involviert sind, exprimiert ist, vermittelt. Jedoch gibt es auch experimentelle Hinweise, dass das CD40L-Molekül Signale empfangen kann, die in der Kostimulation der T-Zelle selbst resultiert. Unter Verwendung von Maus-P815-Zellen, die humanen T-Zellen anti-CD3 monoklonale Antikörper über die Bindung an Fc-Rezeptoren auf ihren Zelloberflächen präsentieren können, wurde gezeigt, dass CD40-transfizierte P815-Zellen die Proliferation und CTL-Aktivität von kleinen ruhenden humanen T-Zellen wesentlich induzieren konnten (Cayabyab et al., *J. Immunol.* 152: 1523 (1994)). Dies zeigt, dass die CD40L-CD40-Interaktionen klar bidirektional sind.

Verlängerte Transplantatslebensfähigkeit nach Blockierung von CD80/CD86-CD28

[0010] Mehrere jüngere In-vivo-Modelle haben gezeigt, dass die Induktion einer verlängerten Transplantat-akzeptanz durch Unterbrechen des CD80/CD86-CD28-Weges möglich ist. Die Behandlung mit CTLA-4 direkt nach der xenogenen Transplantation von humanen pankreatischen Inselzellen in Mäuse resultierte in einem Langzeitüberleben des Transplantats (Lenschow et al., *Science* 257: 789 (1992)). Jedoch wurden 90% der vollständig nicht übereinstimmenden (fully mismatched) Rattenherz-Allotransplantate in Ratten, die intraperitoneal (i. p.) mit CTLA-41g über eine Dauer von 7 Tagen behandelt wurden, abgestoßen (Turka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11102 (1992)). Die Gabe von CTLA-41g intravenös (i. v.) zum Zeitpunkt der Transplantation und anschließend i. p. jeden zweiten Tag an den Tagen 2 bis 12, verlängerte die Herzallotransplantatsüberlebenszeit in Mäusen, schaffte es jedoch nicht, die Lebensdauer von primären Hauttransplantaten zu verlängern (Pearson et al., *Transplantation* 57: 1701(1994)). Die Blockierung des CD28-Weges mit CTLA-41g resultierte in einer signifikanten Verlängerung der Lebensfähigkeit eines Dünndarmtransplantats in Ratten im Vergleich zu den Kontrollen, obwohl sämtliche Transplantate nach 15 Tagen abgestoßen wurden (Pescovitz et al., *Transplant Proc.* 26: 1618 (1994)). Schließlich konnte die Behandlung mit CTLA-41g die letale murine GVHD in Empfängern mit vollständig allogenem Knochenmark reduzieren und die Überlebensraten von Mäusen, die mehr als 3 Monate nach der Transplantation überlebten, mit bis zu 63% signifikant verlängern (Blazar et al., *Blood* 83: 3815 (1994)). Die Erfolglosigkeit von CTLA-41g allein, Anergie in vitro und in vivo induzieren, kann höchstwahrscheinlich durch eine anhaltende IL-2-Produktion, die durch TCR-Triggerng in Kombinationen mit Signalgebung von anderen akzessorischen Molekülen auf APC induziert wird, erklärt werden.

Verlängertes Überleben des Transplantats nach Blockieren von CD40-CD40L

[0011] Jüngere Arbeiten haben auch gezeigt, dass die Blockierung des CD40-CD40L-Weges in Transplantationsmodellen stark immunsuppressiv wirkt. Die kombinierte Behandlung mit allogenen kleinen Lymphozyten oder T-Zell-depletierten kleinen Lymphozyten plus einem Antikörper gegen Maus-CD40L erlaubte ein unbefristetes Überleben eines pankreatischen Inselzellen-Allotransplantats in 37 von 40 Rezipienten, die sich in Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsloci unterschieden (Parker et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 9560 (1995)). Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass die effektive Blockierung der CD40L-CD40-Interaktion höchstwahrscheinlich in der Verhinderung der Induktion von kostimulatorischen Molekülen auf den kleinen ruhenden Lymphozyten durch die alloreaktiven Wirts-T-Zellen resultierte. In einer weiteren jüngeren Studie wurde gezeigt, dass die Verabreichung eines blockierenden Mab gegen Maus-CD40L zum Zeitpunkt der Transplantation das Überleben von vollständig ungleichen murinen Herz-Allotransplantats sowohl in naiven als auch in sensibilisierten Wirten merklich verlängerte. Jedoch verlängerte anti-CD40L das Überleben des Transplantats nicht, wenn die Anti-CD40L-Therapie bis auf Tag 5 nach der Operation verschoben wurde. Aus dieser Studie wurde geschlossen, dass die Anti-CD40L-Therapie die Allotransplantatsabstoßung in erster Linie durch Interferieren mit der T-Zellhilfe für Effektorfunktionen inhibierte.

Langfristige Annahme von Allotransplantaten ohne Zeichen chronischer Abstoßung nach Blockieren von CD80/CD86-CD28 und CD40-CD40L

[0012] Die Blockierung von einem der beiden T-Zell-kostimulatorischen Hauptwege, CD80/86-CD28 oder CD40-CD40L allein ist nicht ausreichend, um die unbefristete Verpflanzung von hochgradig immunogenen Allotransplantaten zu erlauben. Jedoch wurde kürzlich gezeigt, dass die simultane Blockierung der CD80/CD86-CD28- und CD40-CD40L-Wege die klonale Expansion von T-Zellen in vitro und in vivo effektiv unterdrückt, das langfristige Überleben von vollständig allogenen Hauttransplantaten fördert und die Entwicklung von chronischer vaskulärer Abstoßung primär vaskularisierter Herz-Allotransplantate inhibiert (Larsen et al., Nature 381: 434 (1996)). In dem Modell des vaskularisierten murinen Herz-Allotransplantats zeigten alle C3HJ-Rezipienten, die mit CTLA4-Ig allein (durchschnittliche Überlebenszeit, Mean Survival Time (MST), 50 Tage), mit anti-CD40L Mab allein (MST 70 Tage) oder der Kombination daraus (MST > 70 Tage) behandelt wurden, ein verlängertes Überleben der BALB/c-Herz-Allotransplantate im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (MST 12 Tage). Interessanterweise waren bei der histologischen Untersuchung an Tag 58–62 nach der Transplantation merkliche Unterschiede offensichtlich. Die Allotransplantate von mit CTLA4-Ig-behandelten Mäusen zeigten extensive Lymphozyteninfiltration, interstitielle Fibrose und schwere Verdickung und Fibrose der koronar-arteriellen Intima, alles klare Zeichen eines chronischen Abstoßungsprozesses. Mit anti-CD40L behandelte Rezipienten zeigten eine geringere Lymphozyteninfiltration und interstitielle Fibrose, zeigten jedoch ebenfalls koronarvaskulopathische Kennzeichen einer chronischen Abstoßung. Dagegen waren in Allotransplantaten von Mäusen, in welchen die CD80/86-CD28- und CD40-CD40L-Wege simultan blockiert wurden, die Parenchyme und Blutgefäße nahezu nicht zu unterscheiden von denen, wie sie in normalen bei BALB/c-Herzen vorhanden waren.

In der vorliegenden Erfindung gestellte Aufgaben

[0013] Nach der derzeitigen Auffassung von immunologischer Toleranz ist Anergie das Resultat von interzellulärer Signalgebung nach TcR/MHC-Peptidinteraktion, in Abwesenheit eines so genannten kostimulatorischen Signals. Wie oben beschrieben, sind sowohl der CD80/CD86-CD28-kostimulatorische Weg als auch der CD40L-CD40-kostimulatorische Weg wichtig für die Aktivierung von T-Zellen und spielen eine Rolle bei der Verhinderung von Anergie. Die Stimulation von T-Zellen über den TcR/CD3-Komplex resultiert in einer geringen und transienten Expression von CD40L. Es wurde zuvor gezeigt, dass die Stimulation von T-Zellen über TcR/CD3 und die Kostimulation mit CD80/CD86-CD28 in einer starken und verlängerten Expression des CD40L-Moleküls resultiert. Geringe Mengen an CD86 können konstitutiv auf verschiedenen APC-Populationen gefunden werden. Weiterhin ist die Stimulation von APC über CD40 eines der stärksten Signale, um CD80 und CD86 hoch zu regulieren. Desgleichen werden geringe Level an CD40L auf T-Zellen nach der ersten Begegnung mit Antigen exprimiert (TcR/CD3-Aktivierung), sogar ohne vollständige Kostimulation. Diese CD40L-Expression kann nicht nur ein Signal von der APC über CD40 empfangen, sondern auch die APC stimulieren, die CD86-Expression zu verstärken und – was am Wichtigsten ist – die CD80-Expression hoch zu regulieren. Gleichzeitig können geringe Mengen an CD86-Expression auf professionellen APC die Induktion der T-Zell-Anergie verhindern, und die Hochregulierung der CD80- und CD86-Expression stimuliert die T-Zellen stark, Zytokine zu sezernieren und die CD40L-Expression zu verstärken. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung kommen daher zu dem Schluss, dass diese beiden Interaktionen (CD40L-CD40 und CD80/CD86-CD28) bei der Initiation und Amplifikation von T-Zell-vermittelten Immunantworten in Verbindung

stehen. Dies hat bedeutende Auswirkungen auf die optimale Unterdrückung der Immunantwort, da erwartet werden kann, dass die Blockierung der CD40L-CD40-Interaktion allein die Aktivierung von T-Zellen über CD80/CD86-CD28 nicht vollständig verhindern wird und dass die Blockierung der CD80/CD86-CD8-Interaktion allein die Aktivierung der Effektorfunktionen der APC-Population nicht vollständig verhindern wird. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass für eine optimale Immunsuppression die CD80/CD86-CD8- und die CD40L-CD40-Interaktion simultan blockiert werden muss.

[0014] Es ist jedoch nicht offensichtlich, dass dies über ein einziges pharmazeutisches Mittel erreicht werden kann, da zur Zeit kein solches Reagens zur Verfügung steht. In den oben beschriebenen In-vivo-Experimenten wurde eine Kombination eines monoklonalen Antikörpers gegen CD40L in Kombination mit CTLA4-Ig verwendet, um sowohl CD80 als auch CD86 zu blockieren. Jedoch wird die Herstellung eines einzigen pharmazeutischen Agens durch Kombination der Liganden-bindenden Domänen von CTLA4-Ig und denen eines anti-CD40L-monoklonalen Antikörpers in der Quervernetzung von T-Zellen und APC resultieren. Dies wird ohne Zweifel in der Aktivierung der T-Zellen resultieren, was genau im Gegensatz zu dem gewünschten Effekt steht. Darüber hinaus weisen sämtliche der oben zitierten Publikationen klar darauf hin, dass die Blockierung von sowohl CD80 als auch CD86 in einer besseren Immunsuppression resultiert als die getrennte Blockierung von jedem einzelnen. Auch wurde gezeigt, dass nur die Blockierung von sowohl CD80 als auch CD86 in T-Zell-Anergie resultieren kann. Es war daher überraschend festzustellen, dass, in Kombination mit einem antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörper, die alleinige Blockierung von CD86 in T-Zell-Anergie resultierte, trotz der Tatsache, dass CD80 nicht blockiert wurde. Dieses hat zu der vorliegenden Erfindung geführt, die aus pharmazeutischen Molekülen besteht, welche die Kapazität zur Bindung und Blockierung von sowohl CD40- als auch CD86-Molekülen besitzen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0015] Die Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass eine molekulare Kombination eines antagonistischen Moleküls, das CD40 bindet und einem antagonistischen Molekül, das CD86 bindet, die beide in geringen Mengen auf professionell APC exprimiert werden, die Aktivierung von T-Zellen wirksam inhibieren kann und sogar in T-Zell-Anergie resultieren kann. Dementsprechend kann diese Kombination verwendet werden, um Krankheiten zu verhindern oder zu behandeln, in denen die Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielt.

[0016] Folglich ist es ein Hauptgegenstand dieser Erfindung, eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die eine therapeutisch wirksame Menge eines einzigen löslichen Moleküls umfasst, das fähig ist, die humanen CD40- und CD86-Antigene, die auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen lokalisiert sind, zu binden.

[0017] Es ist ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung, ein Verfahren zur Behandlung von T-Zell-vermittelten Krankheiten wie z. B. Transplantatabstoßung, Multiple Sklerose, Psoriasis, rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes in einem Patienten zur Verfügung zu stellen, wobei das Verfahren die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines einzigen löslichen Liganden, der fähig ist, die humanen CD40- und CD86-Antigene, die auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen lokalisiert sind, zu binden, in einem pharmazeutisch wirksamen Arzneiträger an einen Patienten, der eine solche Behandlung benötigt, umfasst.

[0018] Die bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzung, die in dieser Behandlung verwendet werden soll, ist ein einziges Protein, umfassend eine Kombination aus einem therapeutisch aktiven antagonistischen monoklonalen Antikörper gegen CD40 oder Fragmenten davon und einem therapeutisch aktiven antagonistischen CD86-Liganden, wie z. B. ein monoklonaler Antikörper gegen CD86, das CTLA4-Ig-Molekül oder Fragmente davon.

[0019] Eine bevorzugtere pharmazeutische Zusammensetzung ist ein einziges Protein, umfassend eine Kombination aus einem therapeutisch aktiven antagonistischen monoklonalen Antikörper gegen CD40 oder Fragmenten davon und einem therapeutisch aktiven antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörper Fun-I (Nozawa et al., J. Pathol. 169: 309 (1993)) oder einem therapeutisch aktiven Fragment davon.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0020] Die Erfindung wird in den anhängenden Ansprüchen definiert.

[0021] Wie hierin verwendet, bezeichnet ein Molekül, das fähig ist, an ein Antigen zu binden, typischerweise

einen Antikörper, ist jedoch nicht darauf beschränkt. Weitere Moleküle, die spezifische Bindungsfähigkeiten haben, wie z. B. Liganden, sind ebenfalls eingeschlossen.

[0022] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "Antikörper" auf polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, chimere Antikörper, humanisierte Antikörper, Single-Chain Antikörper und Fragmente davon, wie z. B. F_{ab} , $F_{(ab)2}$, F_v , und weitere Fragmente, welche die Antigen-Bindungsfunktionen des Stammantikörpers beibehalten.

[0023] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "monoklonaler Antikörper" auf eine Antikörperzusammensetzung, die eine homogene Antikörperpopulation hat. Die Bezeichnung ist weder hinsichtlich der Art oder Quelle des Antikörpers beschränkt, noch ist von ihr beabsichtigt, durch die Art und Weise, wie der Antikörper hergestellt wird, limitiert zu sein. Die Bezeichnung umfasst vollständige Immunglobuline ebenso wie Fragmente, wie z. B. F_{ab} , $F_{(ab)2}$, F_v , sowie weitere, welche die Antigenbindungsfunktion des Antikörpers behalten. Monoklonale Antikörper jeder Säugetierspezies können in dieser Erfindung verwendet werden.

[0024] Wie hierin verwendet, bedeutet die Bezeichnung "chimerer Antikörper", dass die konstanten Regionen eines Immunglobulins von humanen Immunglobulinsequenzen stammen.

[0025] Wie hierin verwendet, bedeutet die Bezeichnung "humanisierte Antikörper", dass wenigstens ein Teil der Gerüstregionen eines Immunglobulins von humanen Immunglobulinsequenzen abgeleitet ist.

[0026] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "Single-Chain-Antikörper oder ScFv" auf Antikörper, die durch Bestimmen der Bindungsdomänen (sowohl schwere als auch leichte Ketten) eines Bindungsantikörpers und durch Bereitstellen einer Linking-Komponente, welche die Erhaltung der Bindungsfunktion erlaubt, hergestellt werden. Dieses ergibt im Wesentlichen einen radikal verkürzten Antikörper, der nur den Teil der variablen Domäne aufweist, der für die Bindung an das Antigen ist notwendig. Die Bestimmung und Konstruktion von Single-Chain-Antikörpern wird in dem US-Patent 4,946,778 von Ladner et al. beschrieben.

[0027] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "bi-spezifischer Diabody" auf ein einziges Molekül, in dem sich zwei Single-Chain-Antikörperfragmente mit zwei verschiedenen Bindungsspezifitäten zusammenfalten, um ein Molekül mit der kombinierten Bindungsspezifität der beiden Single-Chain-Antikörperfragmente zu bilden.

[0028] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "bi-spezifischer Triabody" auf ein einziges Molekül, in dem sich zwei Single-Chain-Antikörperfragmente einer Spezifität mit einem Single-Chain-Antikörperfragment einer anderen Spezifität zusammenfalten, um ein Molekül mit der kombinierten Bindungsspezifität der beiden verschiedenen Single-Chain-Antikörperfragmente zu bilden.

[0029] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "tri-spezifischer Triabody" auf ein einziges Molekül, in dem sich drei verschiedene Single-Chain-Antikörperfragmente mit verschiedenen Bindungsspezifitäten zusammenfalten, um ein Molekül mit der kombinierten Bindungsspezifität der drei Single-Chain-Antikörperfragmente zu bilden.

[0030] Wie hierin verwendet, beziehen sich die Bezeichnungen "CD80", "CD86", "CD40" und "CD40L" auf humane Oberflächenmoleküle, wie sie oben ausführlich besprochen werden. Für Immunisierungszwecke kann CD80-, CD86-, CD40- und CD40L-Antigen durch jede auf dem Gebiet bekannte Methode hergestellt werden. Antikörper gegen humanes CD80, CD86, CD40 und CD40L sind auf dem Gebiet bekannt. Die vorliegende Erfindung betrachtet eine neue Verwendung solcher Antikörper wie oben im einzelnen beschrieben.

[0031] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "CTLA4-Ig" auf lösliche Fusionsproteine, die aus der extrazellulären Domäne von humanem CTLA4, verbunden mit humanen IgG [CH2- und CH3-Domänen] bestehen (Linsley et al., J. Exp. Med. 174: 561 (1991)).

[0032] Wie in der vorliegenden Erfindung verwendet, beziehen sich die Bezeichnungen "Konjugat" und "Fusionsprotein" auf das Ergebnis jeglicher Art von Kopplung zwischen zwei löslichen Liganden, die fähig sind, an die humanen CD40- und CD86-Antigene, die auf den Oberflächen von Antigen präsentierenden Zellen lokalisiert sind, zu binden, was durch jegliche auf dem Gebiet bekannte Methoden erreicht werden kann. Solche Methoden schließen die chemische Kopplung durch jegliche der vielfältigen bekannten chemischen Techniken oder die Fusion von zwei löslichen Molekülen zu einem Single-Chain-Molekül durch rekombinante DNA-Technologie ein.

[0033] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "antagonistisch" auf die Eigenschaft eines löslichen Liganden, an ein Antigen zu binden, das auf der Membran einer Zielzelle lokalisiert ist, wobei diese Bindung die Bindung des natürlichen Liganden für das genannte Antigen verhindert, was in der Verhinderung der intrazellulären Signaltransduktion resultiert, die zur Aktivierung der genannten Zielzelle durch den genannten natürlichen Liganden führt. Antagonistische molekulare Antikörper, die an das humane CD40-Molekül, das auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, binden können, sind durch Alderson et al, J. Exp. Med. 198 (1993), 669, beschrieben.

[0034] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "nicht-stimulatorisch antagonistisch" auf die Eigenschaft eines löslichen Liganden, an ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Antigen zu binden, wobei die genannte Bindung die Bindung des natürlichen Liganden für das genannte Antigen verhindert, was zur Verhinderung der intrazellulären Signaltransduktion resultiert, die zur Aktivierung der genannten Zielzelle führt, die durch den genannten natürlichen Liganden induziert wird, und wobei weiterhin die genannte Bindung selbst nicht in einer intrazellulären Signaltransduktion resultiert, die zu der Aktivierung der genannten Zelle führt. Nicht-stimulatorische antagonistische monoklonale Antikörper, die das humane auf der Zelloberfläche lokalisierte CD40-Molekül binden können, sind in WO 94/01547 beschrieben.

[0035] Wie hierin verwendet, bezieht sich die Bezeichnung "Quervernetzung" auf die physische Interaktion von zwei Zellen infolge der Bindung eines Liganden oder Liganden, der/die auf diesen Zellen exprimiert ist/sind, wobei die genannte Bindung in einer intrazellulären Signaltransduktion resultiert, die zu der Aktivierung der genannten Zelle führt.

[0036] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung werden in einer Konzentration verabreicht, die therapeutisch wirksam ist, um Allotransplantatabstoßung zu verhindern, um Xenotransplantatabstoßung zu verhindern, um Autoimmunkrankheiten zu behandeln oder um die Induktion einer T-Zell-abhängigen Immunantwort gegen ein therapeutisches Molekül oder einen therapeutischen Träger, wie z. B. Gentherapievektoren, zu verhindern. Um dieses Ziel zu erreichen, können die aktiven Moleküle unter Verwendung einer Vielzahl von annehmbaren auf dem Gebiet bekannten Hilfsstoffen formuliert werden. Typischerweise wird die pharmazeutische Zusammensetzung durch Injektion, entweder intravenös oder intraperitoneal, verabreicht. Verfahren zur Durchführung dieser Verabreichung sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Es kann auch möglich sein, Zusammensetzungen zu erhalten, die topisch oder oral verabreicht werden können, oder die fähig sein können, über die Schleimhäute übertragen zu werden.

[0037] Vor der Verabreichung an Patienten können der pharmazeutischen Zusammensetzung Formulanten zugesetzt werden. Eine flüssige Formulierung wird bevorzugt. Zum Beispiel können diese Formulanten Öle, Polymere, Vitamine, Kohlenhydrate, Aminosäuren, Salze, Puffer, Albumin, Tenside oder Füllstoffe einschließen. Kohlenhydrate schließen vorzugsweise Zucker oder Zuckeralkohole wie z. B. Mono-, Di- oder Polysaccharide oder wasserlösliche Glucane ein. Die Saccharide oder Glucane können Fructose, Dextrose, Lactose, Glucose, Mannose, Sorbose, Xylose, Maltose, Sucrose, Dextran, Pullulan, Dextrin, Alpha- und Betacyclodextrin, lösliche Stärke, Hydroxyethylstärke und Carboxymethylcellulose oder Mischungen daraus enthalten. Sucrose wird am meisten bevorzugt. "Zuckeralkohol" wird definiert als ein C4- bis C8-Kohlenwasserstoff, der eine -OH-Gruppe aufweist und schließt Galactitol, Inositol, Mannitol, Xylitol, Sorbitol, Glycerol und Arabitol ein. Mannitol wird am meisten bevorzugt. Diese Zucker oder Zuckeralkohole, die oben erwähnt werden, können einzeln oder in Kombination verwendet werden. Es gibt keine festgelegte Beschränkung der Menge, die verwendet wird, solange der Zucker oder Zuckeralkohol in der wässrigen Herstellung löslich ist. Vorzugsweise liegt die Zucker- oder Zuckeralkoholkonzentration zwischen 1,0 Gew./Vol.-% und 7,0 Gew./Vol.-%, bevorzugter zwischen 2,0 und 6,0 Gew./Vol.-%. Vorzugsweise schließen die Aminosäuren linksdrehende (L) Formen von Carnitin, Arginin und Betain ein; jedoch können weitere Aminosäuren zugesetzt werden. Bevorzugte Polymere schließen Polyvinylpyrrolidon (PVP) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 2000 und 3000 oder Polyethylenglycol (PEG) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 3000 und 5000 ein. Es wird weiterhin bevorzugt, einen Puffer in der Zusammensetzung zu verwenden, um pH-Änderungen in der Lösung vor der Lyophilisierung oder nach der Rekonstitution zu minimieren. Die meisten physiologischen Puffer können verwendet werden, jedoch werden Citrat-, Phosphat-, Succinat- und Glutamatpuffer oder Mischungen daraus bevorzugt. Am bevorzugtesten ist ein Citratpuffer. Vorzugsweise liegt die Konzentration im Bereich von 0,01 bis 0,3 molar. Tenside, welche den Formulierungen zugesetzt werden können, werden in EP-A 270,799 und 268,110 gezeigt.

[0038] Zusätzlich können die Bindungsmoleküle durch kovalente Konjugation mit einem Polymer chemisch modifiziert werden, um z. B. ihre Halbwertszeit im Blutkreislauf zu erhöhen. Bevorzugte Polymere und Verfahren, um sie an Peptide anzufügen, sind in den US-Patenten 4,766,106, 4,179,337, 4,495,285 und 4,609,546

gezeigt, die hiermit durch Referenz in ihrer Gesamtheit eingeschlossen werden. Bevorzugte Polymere sind polyoxyethylierte Polyole und Polyethylenglycol (PEG). PEG ist bei Raumtemperatur löslich in Wasser und hat die allgemeine Formel: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, wobei R ein Wasserstoff sein kann oder eine Schutzgruppe, wie z. B. eine Alkyl- oder Alkanolgruppe. Vorzugsweise hat die Schutzgruppe zwischen 1 und 8 Kohlenstoffe, bevorzugter ist sie Methyl. Das Symbol n ist eine positive ganze Zahl, vorzugsweise zwischen 1 und 1000, bevorzugter zwischen 2 und 500. Das PEG hat ein bevorzugtes mittleres Molekulargewicht zwischen 1000 und 40000, bevorzugter zwischen 2000 und 20000, am meisten bevorzugt zwischen 3000 und 12000. Vorzugsweise hat PEG wenigstens eine Hydroxygruppe, bevorzugter ist es eine terminale Hydroxygruppe. Es ist diese Hydroxygruppe, die vorzugsweise aktiviert wird, um mit einer freien Aminogruppe auf den Inhibitor zu reagieren. Wasserlösliche polyoxyethylierte Polyole sind ebenfalls nützlich in der vorliegenden Erfindung. Sie schließen polyoxyethyliertes Sorbitol, polyoxyethylierte Glucose, polyoxyethyliertes Glycerol (POG), etc. ein. POG wird bevorzugt. Ein Grund ist, weil das Glycerolrückgrat von polyoxyethyliertem Glycerol das gleiche Rückgrat ist, das natürlicherweise z. B. in tierischen und menschlichen Mono-, Di- und Triglyceriden vorkommt. Daher würde diese Verzweigung nicht notwendigerweise als ein fremdes Agens im Körper angesehen werden. Das POG hat ein bevorzugtes Molekulargewicht in dem gleichen Bereich wie PEG. Die Struktur für POG wird in Knauf et al. (J. Bio. Chem. 263: 15064, 1988) gezeigt, und eine Erörterung von POG/IL-2-Konjugaten ist in US-Patent 4,766,106 zu finden, die hiermit beide durch Referenz in ihrer Gesamtheit eingeschlossen werden.

[0039] Wie oben angegeben, werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung verwendet, um Allotransplantationsabstoßung zu verhindern, um Xenotransplantatabstoßung zu verhindern oder um Autoimmunkrankheiten zu behandeln. Der bevorzugte Verabreichungsweg ist parenteral. Für die parenterale Verabreichung werden die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung in einer als Einmaldosis injizierbaren Form, wie z. B. einer Lösung, Suspension oder Emulsion, in Verbindung mit einem pharmazeutisch annehmbaren parenteralen Vehikel formuliert. Solche Vehikel sind inhärent nicht-toxisch und nicht-therapeutisch. Beispiele für solche Vehikel sind Saline, Ringerlösung, Dextroselösung und Hank's Lösung. Nicht-wässrige Vehikel, wie z. B. nichtflüssige Öle und Ethyloleat können ebenfalls verwendet werden. Ein bevorzugtes Vehikel ist 5% Dextrose in Saline. Das Vehikel kann geringfügige Mengen an Zusatzstoffen, wie z. B. Substanzen, welche die Isotonie und chemische Stabilität verstärken, enthalten, einschließlich Puffern und Konservierungsmitteln.

[0040] Die Dosierung und Verabreichungsart ist abhängig von dem Individuum. Im Allgemeinen werden die Zusammensetzungen so verabreicht, dass sie in einer Dosis zwischen 0,1 mg/kg und 10 mg/kg gegeben werden. Vorzugsweise werden sie als eine Bolusdosis verabreicht. Fortdauernde Infusion kann ebenfalls verwendet werden. Wenn dies der Fall ist, können die pharmazeutischen Zusammensetzungen mit einer Dosis in einem Bereich zwischen 0,05 und 1 mg/kg/Stunde infundiert werden.

[0041] Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezug auf die folgenden Beispiele veranschaulicht, welche die besonders vorteilhaften Ausführungsformen darstellen. Jedoch sollte beachtet werden, dass diese Ausführungsformen veranschaulichend sind und nicht als in irgendeiner Weise die Erfindung limitierend betrachtet werden sollten.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0042] [Fig. 1](#) zeigt eine schematische Zeichnung des ersten Schrittes in der Diabody-Konstruktion, den Austausch der V-Regionen.

[0043] [Fig. 2](#) zeigt eine schematische Zeichnung des Austauschs des Linkers, den zweiten Schritt in der Herstellung des Diabodys.

[0044] [Fig. 3](#) zeigt eine schematische Zeichnung der Strategie, welche für die Klonierung des Anti-CD40/Anti-CD86-Diabodys angewendet wird.

[0045] [Fig. 4](#) zeigt ein BIAcore-Sensogramm, das die Eigenschaft des Diabodys zeigt, die CD86-Ig- und CD40-Ig-Antigene gleichzeitig zu binden. Aus der periplasmatischen Fraktion, die zum Zeitpunkt $t = 110$ (sec) auf einer Oberfläche, enthaltend 6537 Response Units (RU) CD86-Ig, injiziert wurde, wurden 1300 RU Diabody zum Zeitpunkt $t = 230$ (sec) gebunden, wie sich aus der Differenz in der Antwort nach dem ersten Waschen und dem normalisierten Signal vor der Injektion erkennen lässt. Zum Zeitpunkt $t = 360$ (sec) wurde CD40-Ig über einen Zeitraum von 120 sec injiziert. Der Diabody, der mit einer Bindungsdomäne an dem CD86-Ig gebunden war, reagierte mit der anderen Domäne gegen CD40-Ig, was 550 RU gebundenes Antigen ergab (Differenz im Signal zwischen dem zweiten Waschen zum Zeitpunkt $t = 480$ (sec) und vor der zweiten Injektion).

zum Zeitpunkt $t = 360$ (sec)).

[0046] [Fig. 5](#) zeigt die Ergebnisse eines T-Zell-Aktivierungsexperimentes, in dem T-Zellen mit allogenen Monozyten stimuliert werden. Die T-Zellaktivierung wird teilweise inhibiert durch Blockieren von CD80 und CD86 mit CTLA4-Ig oder einem antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörper M3 allein, wird jedoch fast vollständig blockiert, wenn CTLA4-Ig und der antagonistische anti-CD40 monoklonale Antikörper M3 kombiniert werden.

[0047] [Fig. 6](#) zeigt die Ergebnisse eines T-Zell-Restimulierungsexperimentes, in dem T-Zellen mit allogenen Monozyten in Anwesenheit von Blocking-Mitteln (blocking agents) während der primären Stimulation stimuliert werden und auf ihre proliferative Eigenschaft während der Restimulation in Abwesenheit von Blocking-Mitteln analysiert werden. Die Anwesenheit von CTLA4-Ig allein resultiert nur in einer leichten Alloantigen-spezifischen Hypoansprechempfindlichkeit, während die Kombination von CTLA4-Ig mit CsA oder dem antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörper M3 in T-Zell-Unempfindlichkeit resultiert. T-Zell-Antworten gegen die Kontroll-Drittalloantigen-exprimierenden Monozyten werden nicht beeinträchtigt. Die ausgefüllten Balken sind die T-Zell-Antworten gegen das Alloantigen, das in der Primärkultur verwendet wurde, die offenen Balken repräsentieren die T-Zell-Antworten gegen Dritt-Alloantigen (third party-Alloantigen)-exprimierende Monozyten.

[0048] [Fig. 7](#) zeigt die Ergebnisse eines T-Zell-Restimulierungsexperimentes, in dem T-Zellen mit allogenen PBMC in Anwesenheit von Blocking-Agenzien während der Primärstimulation stimuliert und auf ihre proliferative Eigenschaft während der Restimulation in der Abwesenheit von Blocking-Mitteln analysiert werden. Die Anwesenheit von antagonistischem monoklonalem Antikörper gegen CD40 und antagonistischem monoklonalem Antikörper gegen CD86, mit oder ohne antagonistischem monoklonalem Antikörper gegen CD80, resultiert in einer Alloantigen-spezifischen T-Zell-Unempfindlichkeit. Die Anwesenheit von antagonistischem monoklonalem Antikörper gegen CD40, allein oder in Kombination mit antagonistischem monoklonalem Antikörper gegen CD80, resultiert nur in der teilweisen Inaktivierung der T-Zellen.

Beispiele

Materialien und Methoden

CD40- und CD86-extrazelluläre Domäne-Ig-Fusionsproteine

[0049] In mehreren Experimenten wurden Fusionsproteine der Lymphozytenoberflächenrezeptoren und der Fc-Region von humanem IgG verwendet. Diese extrazelluläre Domäne (ED)-Fusionsproteine (ED-Ig-Fusionsproteine) wurden durch Fusion der Nukleinsäuresequenz, die die extrazelluläre Domäne der Zelloberflächenrezeptoren kodiert und die durch PCR-Amplifikation auf Grundlage publizierter cDNA-Sequenzen erzeugt wurde, mit der CH1/Hinge-CH3-Region (Fc) von humanem IgG1, basierend auf der Sequenz von Ellison et al. (NAR 10: 4071(1982)), hergestellt. ED-Ig-Fusionsproteine wurden in Sf9-Insektenzellen exprimiert und wurde als konditioniertes Medium oder nach Reinigung durch Affinitätschromatografie unter Verwendung von Protein A verwendet.

Zelllinien und Kultivierungsbedingungen

[0050] Die B-Zelllinie JY wurde in T75-Kultivierungskolben routinemäßig (Costar, Cambridge, MA, USA) in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM), dem 50 µg/ml Gentamycin und 10% fötales Kälberserum (FCS) (Hyclone, Logan, Utah, USA) zugesetzt wurde, kultiviert. Die Zellen wurden in einem luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Jede Woche wurden die Zellen geteilt (1/20 bis 1/100). Um die Zelllinien zu lagern, wurden Ampullen hergestellt, welche 5–10 × 10⁶ Zellen/ml Hank's ausgeglichene Salzlösung (Hank's balanced salt solution) HBSS, versetzt mit 20% FCS und 10% DMSO enthielten und in Flüssigstickstoff gelagert.

Lymphozytenisolation und -stimulation

[0051] Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden aus heparinisiertem Blut von gesunden Spendern durch Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation isoliert und in Komplettmedium, bestehend aus RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK), ergänzt mit 2 mM L-Glutamin, Streptomycin (100 mg/ml), Penicillin (100 U/ml) und 5% hitzeinaktiviertem autologem Plasma, resuspendiert. Angereicherte Monozytenpräparationen wurden durch Rosettenbildung (rosetting) von PBMC mit AET-behandelten roten Blutzellen aus dem Schaf und Ent-

fernung der E-Rosettingzellen durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten, gefolgt von Kälteaggregation der Monozyten, wie im Wesentlichen von Zupo et al. beschrieben (Eur. J. Immunol. 21: 351(1991)), hergestellt. T-Zellen wurden weiterhin von den PBMC-Präparationen durch Depletion von Monozyten, B-Zellen und NK-Zellen unter Verwendung von Lympho-Kwik T (One Lambda, Los Angeles, CA, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll gereinigt.

[0052] Für primäre gemischte Lymphozytenkulturen mit angereicherten Monozyten und gereinigten T-Zellen wurden $0,5\text{--}1 \times 10^6/\text{ml}$ gereinigte T-Zellen und $0,1\text{--}0,2 \times 10^6/\text{ml}$ Monozyten in 200 ml Komplettmedium in 96-Well-Platten für 6 Tage in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Blocking-Mitteln in Konzentrationen, die im Bereich von $1\text{--}10 \mu\text{g}/\text{ml}$ lagen, kultiviert. Während der letzten 8 Stunden der Kultivierungszeit wurden die Zellen mit 1 mCi $[3\text{H}]$ -Thymidin (Amersham International, Amersham, UK) gepulst. Die Zellen wurden auf Glasfaserfiltern unter Verwendung eines Skatron automatic cell harvester geerntet, und die Radioaktivität auf dem Papier wurde in einem Flüssigszintillationszähler berechnet. Für Restimulierungsexperimente wurden die T-Zellen ($0,5\text{--}1 \times 10^6/\text{ml}$) und Monozyten von demselben Spender ($0,1$ to $0,2 \times 10^6/\text{ml}$) für 6 Tagen in 1 ml Komplettmedium in 24-Wellplatten in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Blocking-Mitteln in Konzentrationen in einem Bereich von $1\text{--}10 \mu\text{g}/\text{ml}$ und in Anwesenheit oder Abwesenheit von Cyclosporin A (CsA) in einer Konzentration von 400 ng/ml kultiviert. Nach 6 Tagen wurden die übrigbleibenden Zellen gesammelt und für weitere 2 Tage kultiviert, bevor sie für 3 Tage in der Abwesenheit von Blocking-Mitteln restimuliert wurden. Die T-Zellproliferation wurde wie zuvor für die primären gemischten Lymphozytenkulturen beschrieben bestimmt.

[0053] Gemischte Lymphozytenkulturen wurden ebenfalls mit nicht-getrennten PBMC durchgeführt. In diesen Experimenten wurden frische PBMC ($1 \times 10^6/\text{ml}$) als Responderzellen und PBMC, die mit humanem IL-4 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und humanem GM-CSF (100 U/ml) ($0,1 \times 10^6/\text{ml}$) aktiviert wurden, als Stimulatorzellen für 6 Tage in 1 ml Komplettkulturmedium in 24-Well-Platten in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Blocking-Mitteln in einer Konzentration in einem Bereich von $1\text{--}10 \mu\text{g}/\text{ml}$ kultiviert. Nach 6 Tagen wurden die verbleibenden Zellen gesammelt und für weitere 3 Tage kultiviert, bevor die alloreaktiven T-Zellen mit den gleichen PBMC, die mit humanem IL-4 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und humanem GM-CSF (100 U/ml) ($0,1 \times 10^6/\text{ml}$) voraktiviert wurden als Stimulatorzellen für 3 Tage in der Anwesenheit von Blocking-Mitteln restimuliert wurden. Die T-Zellproliferation wurde durch $[3\text{H}]$ -Thymidineinbau wie oben beschrieben untersucht.

Polymerasekettenreaktion

[0054] Um DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurden Polymerasekettenreaktionen (polymerase chain reactions, PCR) durchgeführt.

[0055] Eine typische PCR-Reaktionsmischung enthielt: 0–10 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 1,0% Triton X-100, jeweils 0,25 mM dNTP, 25 pmol Primer/100 μl Reaktionsmischung, 1–1000 ng DNA/100 μl Reaktionsmischung und 2,5 U Taq Polymerase. Die Reaktionen wurden unter Verwendung eines Perkin Elmer Thermocyclers (Perkin Elmer Corp, Norwalk, CT) durchgeführt. Ein Standard-PCR-Schema bestand aus einem Schritt für 2–5 min bei 95°C , um die DNA zu denaturieren, gefolgt von 20–40 Zyklen von 1 min bei 95°C , 1 min bei 55°C und 1–4 min bei 72°C . Nach dem letzten Schritt wurde ein Extensionsschritt für 7 min bei 72°C durchgeführt.

Durchflusszytometrische Analyse (Flow cytometric analysis, FACS)

[0056] Zellen ($0,1\text{--}0,2 \times 10^6/\text{Probe}$) wurden für 20 min bei 4°C mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper ($0,1\text{--}1 \text{ mg}/\text{Probe}$) inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer (PBS pH 7,4 1% BSA 0,1% NaN_3) wurden die Zellen für weitere 20 min bei 4°C mit einem Ziege-Anti-Maus-Antikörper, der mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) konjugiert war, inkubiert. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich in FACS-Puffer enthaltend 0,5% Paraformaldehyd suspendiert und mit einem FACScan-Durchflusszytometer (Becton Dickinson) analysiert. Die spezifische Bindung der monoklonalen Antikörper wird als die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in arbiträren Einheiten ausgedrückt. Ein ähnliches Protokoll wurde verwendet, um die den Single-Chain-Antikörper exprimierenden Phagenpartikel zu testen. In diesem Fall wurde die Detektion unter Verwendung eines unkonjugierten Schaf-anti-M13-Antikörpers (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden), nach dem Waschen gefolgt von einer Inkubation mit Esel-anti-Schaf-Antikörper, konjugiert mit FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), durchgeführt. Ebenso wurde ein ähnliches Protokoll verwendet, um die biologische Aktivität der Diabody- und Triabodykonstrukte zu beweisen. In diesen Experimenten wurde die Detektion durch Inkubation der Zellen mit dem Diabody- oder dem Triabodykonstrukten, gefolgt von einer Inkubation mit einem der ED-Ig-Fusionsproteine, gefolgt von einer Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-humanem IgG-Antiserum, durchgeführt.

SDS-PAGE und Westernblotanalyse

[0057] Um die exprimierten Konstrukte zu analysieren, wurde SDS-PAGE und Westernblotanalyse durchgeführt. Kurz beschrieben, wurden die Proben für 5 min in 0,8% Natriumdodecylsulfat (SDS) und 1 mM Dithiothreitol (DTT) gekocht. Anschließend wurden die Proben auf einer 15% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; 2 Stunden 100 V) laufen gelassen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einen Nitrocellulosefilter elektrogeblottet oder mit 0,1% Coomassieblau in 10% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt. Das Elektroblothing wurde in 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin und 10% Methanol pH 8,3 für 1 Stunde bei 100 V; 4°C durchgeführt. Nach dem Blotten wurde der Nitrocellulosefilter mit 1% BSA in PBS-Tween (0,05%) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der Blot für die Detektion über Nacht bei Raumtemperatur in PBS-Tween mit einem anti-c-myc Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit einem zweiten Antikörper (mit Peroxidase markiert) wurden die Blots durch 4-Chlornaphtol gefärbt.

BIAcore-Analyse

[0058] Die Analysen wurden auf einem Pharmacia Biosensor 2000 durchgeführt. Der CM-Chip wurde mit 0,2 M EDC/0,05 M NHS während eines Zeitraums von 5 min aktiviert. Anschließend wurde die Kopplung des Liganden in 10 mM NaAc pH 5,0 innerhalb von 5 min (0,1 mg Ig-Konstrukt/ml) durchgeführt. Dem folgte die Ladung der ScFv-, Mab- oder Dia/Triabody-Konstrukte in verschiedenen Konzentrationen in PBS-Puffer. Im Fall der Dia/Triabody-Konstrukte wurde der Chip gewaschen und anschließend das zweite Ig-Konstrukt geladen. Die Sensoroberfläche wurde mit 0,1 M NaOH regeneriert.

Beispiel 1

Herstellung eines Phagen, der Single-Chain-Antikörper-Fragmente aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD40 und CD86 exprimiert

[0059] Für die Herstellung eines Single-Chain-Antikörper-Fragmentes (ScFv) des anti-CD40 monoklonalen Antikörpers 5D12 wurden sowohl die VH- als auch die VL-Region durch PCR amplifiziert, gefolgt von einer zweiten Assembly-PCR, um beide Regionen miteinander zu verbinden. Für diesen Zweck wurden 4 Primer entworfen (SEQ ID NR: 1–4). SEQ ID NR: 1 enthält eine HindIII- und SfiI-Restriktionsschnittstelle für Klonierungszwecke, gefolgt von einer degenerierten Sequenz, die an die 5'-VH-Region von 5D12 annealt. SEQ ID NR: 2 enthält eine degenerierte Sequenz für den 3'-Teil der VH-Region, gefolgt von einer Sequenz, die einen ((Gly)₄Ser)₃-Linker und den 5'-Teil der VL-Regionen enthält. SEQ ID NR: 3 ist ein degenerierter Primer, der Homologie mit dem 5'-Teil der VL-Region aufweist, während der letzte Primer (SEQ ID NR: 4) eine NotI-Restriktionsschnittstelle enthält und mit dem 3'-Teil der VL-Region annealt. Kurz beschrieben wurden diese Primer verwendet, um in getrennten PCRs die VH- und VL-Regionen des monoklonalen Antikörpers 5D12 zu amplifizieren. Als Template für diese PCR-Reaktion verwendeten wir ein Plasmid, das die VH- oder VL-Regionen von 5D12 (VH: SEQ ID NR: 5 und VL: SEQ ID NR: 6) enthält. Die cDNA, die in diesem PCR-Schritt erhalten wurde, wurde über ein Gel gereinigt und in einer Assembly-PCR verwendet, die in der Verknüpfung der V-Region über den (Gly₄Ser)₃-Linker resultierte. Anschließend wurde das erhaltene Single-Chain-5D12-Konstrukt mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI verdaut, gefolgt von einer Ligation in pGEM-13Zf (Promega, Madison, USA). Die Ligation wurde in DH5α transformiert und auf LB-Platten ausplattiert. Durch Sequenzieren von mehreren Klonen wurde ein korrekter 5D12 ScFv-Klon gefunden (SEQ ID NR: 7).

[0060] Für die Herstellung von ScFv's, die mit humanem CD86 reaktiv sind, verwendeten wir denselben Primersatz wie für 5D12. Alle Schritte bei der Herstellung des ScFv des anti-CD86 monoklonalen Antikörpers Fun-I wurden wie oben für den 5D12 ScFv, der mit humanem CD40 reaktiv ist, beschrieben, durchgeführt. Die V-Regionen von Fun-I (VH: SEQ ID NR: 8; VL: SEQ ID NR: 9) wurden als Template verwendet, um das anti-CD86 ScFv-Konstrukt (SEQ ID NR: 10) zu erhalten.

Beispiel 2

Konstruktion von bi-spezifischen Diabodymolekülen, die fähig sind, an humanes CD40 und humanes CD86 zu binden

[0061] Bi-spezifische bivalente Moleküle wurden durch Verkürzen der flexiblen Linkersequenz in dem anti-CD40 ScFv und in dem anti-CD86 ScFv von fünfzehn Resten auf fünf (Gly₄Ser) und durch Cross-Pairing der variablen schweren und leichten Ketten-Domänen der beiden Single-Chain-Fv-Fragmente mit der unterschiedlichen Antigen-Erkennung generiert. Die Konstruktion wurde in drei Schritten durchgeführt. Die leichte Kette

variablen Fragmente wurden in den ScFv-Konstrukten von anti-CD86 (aCD86) und anti-CD40 (aCD40) durch Verwendung von Restriktionsenzymststellen, die in dem 5'-Ende (SacI bei Nukleotid Nummer 7 bis 12 von VL) und gerade außerhalb des 3'-Teils der leichten Kette variablen Gens (NotI) lokalisiert sind, ausgetauscht (siehe [Fig. 1](#)). In dem folgenden Schritt wurde der 15 Reste lange Linker der chimären Konstrukte VH-aCD86/15AA-Linker/VL-aCD40 (kodiert 7,2/15/40) und VH-aCD40/15AA-Linker/VL-aCD86 (kodiert 40/15/7,2) durch den 5 Reste langen Linker (Gly₄Ser) unter Verwendung der Schnittstellen, die in dem 3'-Teil von VH (Bsu361 bei Nukleotid Nummer 335 des anti-CD40 VH oder bei 371 des anti-CD86 VH bis Nummer +2 in der Linkersequenz) und dem 5'-Teil des VL-Endes (SacI bei Nukleotid Nummer 7 bis 12, für beide VLs) lokalisiert sind (siehe [Fig. 2](#)) ersetzt. Schließlich wurden beide chimären Kassetten in dem Vektor pUC119-fabsol (ein pUC119-Derivat, das dem pUC119His6mycXba ähnlich ist (Low et al., J. Mol. Biol. 260: 359 (1996), bei dem jedoch alle ApaLI-Stellen in dem Vektorrückgrat in vitro-Mutagenese deletiert wurden), welcher eine bi-cistronische Expressionskassette enthält, kombiniert. Die Subklonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde das aCD86/5AA-Linker/aCD40-Konstrukt in pUC119-fabsol unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen SfiI und NotI kloniert. Anschließend wurde die ScFv-Kassette von aCD40/5AA-Linker/aCD86 mit den folgenden Oligonukleotidprimern amplifiziert: 5'-TCT CAC AGT GCA CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GG-3' (SEQ ID NR: 11) und 5'-CGT GAG AAC ATA TGG CGC GCC TTA TTA CCG TTT GAT TTC CAG GTT GGT GCC-3' (SEQ ID NR: 12). Diese Primer enthalten eine ApaLI- bzw. eine Ascl-Schnittstelle (unterstrichen). Das amplifizierte PCR-Fragment wurde mit ApaLI und Ascl verdaut und in das pUC119-fabsol-Plasmid, enthaltend das aCD86/5AA-Linker/aCD40-Konstrukt, ligiert. Ein Diabody-produzierender Klon, der beide ScFv-Kassetten enthält, wurde identifiziert und für die Expression des rekombinanten Diabodymoleküls verwendet (pUC119-fabsol-CD40/CD86) (5D12VH + FUNVL: SEQ ID NR: 13; FUNVH + 5D12VL: SEQ ID NR: 22).

[0062] Die vollständige Klonierungsstrategie zum Erhalt des bi-spezifischen Diabodymoleküls, basierend auf antagonistischen anti-CD40 Mabs und dem antagonistischen anti-CD86 Mab Fun-I, welches fähig ist, das humane CD40- und das humane CD86-Molekül auf Antigen-präsentierenden Zellen zu binden, ist in [Fig. 3](#) zusammengefasst. Dasselbe Verfahren wird ebenfalls für die Erzeugung eines bi-spezifischen Diabodymoleküls basierend auf antagonistischen anti-CD40-Mabs und antagonistischen Mabs, die sowohl mit CD80 als auch CD86 reaktiv sind und das fähig ist, an humanes CD40-, humanes CD80- und humanes CD86-Molekül auf Antigen-präsentierenden Zellen zu binden, verwendet.

Beispiel 3

Expression, Isolation und Charakterisierung von bi-spezifischen Diabodymolekülen, die fähig sind, an humanes CD40 und humanes CD86 zu binden

[0063] Für die Herstellung des bi-spezifischen Diabodymoleküls, das fähig ist, an humanes CD40 und an humanes CD86 zu binden, wurde das Plasmid, enthaltend die aCD86/aCD40-bi-cistronische Expressionskassette, die in Beispiel 2 oben beschrieben wird, verwendet. Fünfzig ml 2YT-Medium (100 µg/ml amp, 0,1% Glucose) wurde mit einer gesättigten Kultur (16 Stunden Wachstum bei 30°C) inokuliert (1 Vol./Vol.-%). Nach 5 Stunden Wachstum bei 30°C und einer Kultur, die eine optische Dichte von 0,9 bei 600 nm aufwies, wurde die Diabodyherstellung durch Zufügen von IPTG in einer Konzentration von 1 mM induziert. Die Kultivierung wurde für 4 Stunden bei 20°C fortgesetzt, und die Zellen von 15 ml Kultur wurden pelletiert (10 Minuten bei 1100*g bei Raumtemperatur). Der Überstand und die Zellen wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die verbleibenden 35 ml Kultur wurden bei 20°C für weitere 16 Stunden wachsen gelassen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben pelletiert. Periplasmatische Fraktionen wurden durch Resuspendieren der Zellen in 0,53 ml kaltem TES-Puffer (20 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; 0,5 M Sucrose pH 8,0) hergestellt. Die Mischung wurde für 2 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend wurden 0,59 ml kaltes dreifach verdünntes TES dazugegeben, und die Inkubation wurde für 30 Minuten verlängert. Die Sphäroblasten wurden für 15 Minuten bei 1100*g bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand, enthaltend die periplasmatische Proteine, wurde gesammelt. Die Pellet-Fraktion wurde in 0,75 ml TES/MgSO₄ (TES-Puffer; 15 mM MgSO₄) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Sphäroblasten wurden für 15 Minuten bei 1100*g bei 4°C pelletiert, und der Überstand zu der ersten Überstand-Fraktion dazugegeben. Die gesamte periplasmatische Fraktion wurde erneut geklärt (15 Minuten bei 1100*g bei 4°C) und gegen PBS dialysiert. Alle Fraktionen wurden auf PAGE und Westernblot mit dem anti-c-myc-Antikörper für die Detektion analysiert. Die höchste Konzentration an ScFv wurde in der periplasmatischen Fraktion gefunden, die von der Kultur 4 Stunden nach der Induktion hergestellt wurde und in gewissem Maße in der mittleren Fraktion der Kultur, die für 20 Stunden induziert wurde. Die Funktionalität des produzierten Diabody wurde im BIAcore getestet. Gereinigtes CD86-Ig wurde auf der Oberfläche eines CM-Chips immobilisiert, was 6500 RU (Response Units) an gekoppeltem Protein ergab. Die Injektion der periplasmatischen Fraktion über einen Zeitraum von 120 Sekunden mit einer Durchflussrate von 10 µl/min resul-

tierte in dem Binden von etwa 1200 RU Diabody. Anschließend wurde CD40-Ig unter den gleichen Bedingungen wie der Diabody injiziert, was in der Bindung von weiteren 540 RU Antigen resultierte. Dieses Experiment zeigte die Fähigkeit des hergestellten Diabodymoleküls, CD40 und CD86 gleichzeitig zu binden (siehe [Fig. 4](#)).

Beispiel 4

Konstruktion von bi-spezifischen und tri-spezifischen Triabodymolekülen, die fähig sind, an humanes CD40 und CD86 oder humanes CD40, CD80 und CD86 zu binden

[0064] Die Konstruktion von bi-spezifischen und tri-spezifischen Triabodymolekülen ist analog zu dem Schema, das oben für den Diabody beschrieben wurde, mit der Ausnahme, dass der Linker deletiert werden muss (Nullrestelinker). Dies wird erreicht durch In-vitro-Mutagenese unter Verwendung von einzelsträngiger Phagemid-DNA und Oligonukleotiden, welche die Mutation kodieren. Unter Verwendung von ScFv-Konstrukten von antagonistischen monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD40, CD80 und CD86 waren wenigstens zwei Genkonstrukte möglich: (i) VH_{CD40}/0/VL_{CD80}-VH_{CD80}/0/VL_{CD86}-VH_{CD86}/0/VL_{CD40}; und (ii) VH_{CD40}/0/VL_{CD86}-VH_{CD86}/0/VL_{CD80}-VH_{CD80}/0/VL_{CD40}. Alle VH/VL-Kombinationen werden durch Austausch der VH- und VL-Domänen in den Konstrukten, wie oben für bi-spezifische Diabodyantikörper, die die 5AA-Linker haben, beschrieben, unter Verwendung der oben beschriebenen Strategie und unter Verwendung von SfiI und Bsu361, um die VH-Regionen auszutauschen, und SacI und NotI, um die VL-Regionen auszutauschen, hergestellt. Anschließend werden die drei ScFv-Kassetten in ein einziges Expressionsmodul, das eine tricistronische mRNA kodiert, kloniert. Diese DNA wird als Template für ein Oligo-vermitteltes In-vitro-Mutageneseverfahren dienen, um den 5 Reste langen Linker in einem bis zu drei VH-VL-Paaren zu deletieren. Die verschiedenen Triabodies, die hergestellt werden, können sich in ihren Bindungseigenschaften aufgrund anderer Orientierungen der ScFv-Domänen und in ihrer Linkerlänge unterscheiden. Nur eine der drei ScFv-Kassetten wird mit den zuvor erwähnten Tag-Sequenzen versehen. Um sowohl die Triabodybildung voranzutreiben, als auch die Stabilität aufrechtzuerhalten, können Disulfidbrücken durch Zufügen von Cysteinen an dem Carboxyterminus oder innerhalb der V-Regionen eingeführt werden.

Beispiel 5

Konstruktion eines Fusionsmoleküls, bestehend aus einem antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörper, der über seinen C-terminalen Rest mit der extrazellulären Domäne von humanem CTLA4 verbunden ist und der fähig ist, an CD40, CD80 und CD86 zu binden

[0065] Das konzeptionelle therapeutische Agens ist ein Fusionsprotein, das die hohe Affinität und Spezifität von CTLA4 sowohl für CD80 als auch für CD86 mit einem antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörper kombiniert. Dieses Fusionsmolekül wird in einer stabilen, aktiven Form als ein vollständiger anti-CD40 monoklonaler Antikörper hergestellt, an den die extrazelluläre Domäne von humanen CTLA4 (CTLA4ED) C-terminal über einen flexiblen Linker gekoppelt ist. Die Konstruktion des anti-CD40 Antikörpers, der mit seinem Fc-Teil an die extrazelluläre Domäne von CTLA4 angefügt ist, wird durch die folgende PCR und Klonierungsschritte durchgeführt. Die VH- und CH1-Regionen von anti-CD40 werden zusammen mit einer Leadersequenz unter Verwendung der Oligonukleotide 5' GCG CGA ATT CAT GGA CAT GAG GGT CCC CGC 3' (SEQ ID NR: 14) und 5' AGA TTT GGG CTC AAC TTT CTT GTC CAC 3' (SEQ ID NR: 15) amplifiziert. Dem folgt eine Amplifikation der CH2- und CH3-Regionen von humanem IgG unter Verwendung der Oligonukleotide 5'GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT 3' (SEQ ID NR: 16) und 5'GCGC GAA TTC TTA AGC GGC CGC AGA TCC GCC GCC ACC CGA CCC ACC TCC GCC CGA GCC ACC GCC ACC TTT ACC CGG AGA CAG 3' (SEQ ID NR: 17). Nach der Entfernung der Primer wird eine zweite PCR durchgeführt, um beide PCR-Produkte zusammenzufügen, um eine vollständig lange 5D12-schwere Kette zu erhalten. Das erhaltene PCR-Produkt wird über ein Gel gereinigt und in pCR Script unter Verwendung des Stratagene Klonierungskits kloniert. Kurz beschrieben wird das PCR-Produkt mit dem Plasmid zusammen mit T4-Ligase und SrfI 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert, wonach die gesamte Probe in XlI Blue E. coli-Zellen transformiert wird. Die Zellen werden auf LB-Platten, die 100 µg Ampicillin/ml, 20 µg IPTG/ml und 20 µg Xgal/ml enthalten, ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C werden die vermeintlich weißen Klone auf das Vorhandensein eines Inserts analysiert. Klone, die Inserts enthalten, werden durch zyklische Sequenzierung unter Verwendung von M13- und M13-reverse-Primern analysiert. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz wird die anti-CD40 schwere Kette unter Verwendung der EcoRI-Restriktionsschnittstelle in das bi-cistronische Baculovirus-Expressionsplasmid pAcUW51 (Pharmingen) hinter den p10-Promotor kloniert. Das auf diese Art und Weise erhaltene Konstrukt enthält bereits C-terminal einen flexiblen (Gly₄Ser)₃-Linker, hinter welchen der CTLA4ED-Teil kloniert wurde. Daher wird der CTLA4ED-Teil mit den Oligonukleotiden 5' GCGC GCG GCC GCA ATG CAC GTG GCC CAG CCT G 3' (SEQ ID NR: 18) und 5' GCGC GCG GCC GC CTA GTC AGA ATC TGG GCA CGG TTC 3'

(SEQ ID NR: 19) durch PCR amplifiziert, über ein Gel gereinigt und hinter die schwere Kette von 5D12 unter Verwendung der NotI-Klonierungsstelle kloniert. Nach Bestätigung dieses Schrittes durch Sequenzanalysen wird die leichte Kette kloniert. Dieses erfolgt durch Verwendung eines Plasmids, das bereits die VL-Region von 5D12, angefügt an eine humane CL-Region enthält. So wird unter Verwendung der Oligonukleotide 5' GCGC GGATCC ATG GAC ATG AGG GTC CCC GC 3' (SEQ ID NR: 20) und 5'GCGC GGATCC CTA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC 3' (SEQ ID NR: 21) die leichte Kette von 5D12 amplifiziert und unter Verwendung der BamHI-Klonierungsstelle in das konstruierte pAcUW51-Expressionsplasmid hinter den Polyhedrinpromotor kloniert. Nach der DNA-Sequenzanalyse wird ein korrekter Klon erhalten. Nach dieser Bestätigung wird das Expressionsplasmid, welches das 5D12-CTLA4ED-Konstrukt enthält, zusammen mit der viralen AcNPV-Wildtyp-DNA unter Verwendung des BaculoGold-Transfektionssystems von Pharmingen in Sf9-Insektenzellen eingeführt. Rekombinanter Virus wird plaque-gereinigt und die Integrität der Expressionskassette wird durch PCR-Sequenzierung und zyklische Sequenzierung überprüft. Für die Proteinherstellung werden Insektenzellen verwendet. Diese Zellen können in Suspension in serumfreiem Medium wachsen und sind die besten bekannten Sezernierer von heterologen Proteinen. Das Fusionsprotein wird von dem serumfreien konditionierten Medium durch S. aureus-Protein A-Affinitätschromatografie (Harlow and Lane, 1988) gereinigt. Die Reinheit wird durch SDS-PAGE und durch Westernblot unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen überprüft, um das Ausmaß der Dimerisierung festzustellen.

Beispiel 6

Folgen der Blockierung der CD40L-CD40- und/oder CD80/86-CD28-Wege auf die Aktivierung von T-Zellen

[0066] Es wurde ausführlich gezeigt, dass die Blockierung des CD80/86-Weges in einer Inhibition der Aktivierung von T-Zellen resultiert (Überblick in Van Gool et al., Res. in Immunol. 146: 183 (1995)). Jedoch resultiert die Blockierung der CD80/86-Interaktion unter einer Anzahl von Umständen nicht in der vollständigen Verhinderung der T-Zell-Aktivierung. Dieses wird durch [Fig. 5](#) erläutert, in der gereinigte humane T-Zellen mit allogenen Monozyten, wie oben unter Material und Methoden detailliert beschrieben, stimuliert werden. Die Zugabe von CTLA4-Ig (das sowohl CD80 als auch CD86 blockiert) resultiert nur in einer teilweisen Inhibition der Alloantigen-spezifischen T-Zellen. Überraschenderweise resultierte die Zugabe des antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörpers M3 ebenfalls in einer teilweisen Inhibition der T-Zell-Aktivierung in gleichem Ausmaße wie CTLA4-Ig. Noch überraschender resultierte die Kombination des antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörpers M3 mit CTLA4-Ig in einer fast vollständigen Blockierung der T-Zell-Aktivierung.

[0067] Es wurde außerdem gezeigt, dass eine Blockierung von CD80/86 in Kombination mit CsA in einer Antigen-spezifischen T-Zell-Unempfindlichkeit resultiert (Überblick in Van Gool et al., Res. in Immunol. 146: 183 (1995)). Dies wurde in gemischten Lymphozytenkulturen gezeigt, in denen Blocking-Agenzien während einer primären Stimulation mit dem Alloantigen zugegeben wurden, gefolgt von einer kurzen Ruheperiode und anschließender Restimulation mit dem gleichen Alloantigen in der Abwesenheit von Blocking-Agenzien. [Fig. 6](#) zeigt tatsächlich, dass die Zugabe von CTLA4-Ig plus CsA, nicht jedoch CTLA4-Ig allein, zu gereinigten humanen T-Zellen, die mit allogenen Monozyten stimuliert wurden, in einer Alloantigen-spezifischen T-Zell-Unempfindlichkeit resultiert (ausgefüllte Balken). Die Antwort gegenüber nicht-verwandten Drittalloantigen-exprimierenden Monozyten ist unverändert (offene Balken). [Fig. 6](#) zeigt außerdem, dass die Zugabe von CTLA4-Ig plus anti-CD40 monoklonalem Antikörper M3 allein zu den gereinigten humanen T-Zellen, die mit allogenen Monozyten stimuliert wurden, ebenfalls in einer Alloantigen-spezifischen T-Zell-Unempfindlichkeit resultiert (ausgefüllte Balken). Abermals – diese Unempfindlichkeit gegenüber dem Alloantigen der ersten Kultur ist spezifisch, da die Antwort gegenüber unverwandtem Drittalloantigen-exprimierenden Monozyten unverändert ist (offene Balken).

[0068] In einem weiteren Satz von Experimenten ([Fig. 7](#)) wird gezeigt, dass auch eine Kombination aus dem Blockieren von CD40 mit dem antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörper 5D12 und dem Blockieren von CD80 und CD86 mit antagonistischen monoklonalen Antikörpern in einer Alloantigen-spezifischen T-Zell-Unempfindlichkeit resultiert, wenn dies in MLC-Experimenten unter Verwendung von PBMCs, wie oben in dem Abschnitt Materialien und Methoden detailliert beschrieben, getestet wird. Überraschenderweise wurde die Alloantigen-spezifische T-Zell-Unempfindlichkeit auch induziert, wenn der anti-CD40 monoklonale Antikörper mit dem antagonistischen anti-CD86 monoklonalen Antikörper kombiniert wurde, ohne den CD80 kostimulatorischen Rezeptor zu blockieren. Im Gegensatz dazu resultierte die Kombination des anti-CD40 monoklonalen Antikörpers und des anti-CD80 monoklonalen Antikörpers, ohne die Blockierung des CD86-Rezeptors nur in einer T-Zell-Hypo-Ansprechempfindlichkeit auf demselben Niveau wie mit dem antagonistischen anti-CD40 monoklonalen Antikörper allein. Dies war überraschend, da ausführlich gezeigt wurde, dass die Blockierung von sowohl CD80 als auch CD86 immer in einer vollständigeren Inhibition resultiert als mit einem von

beiden allein. Dies zeigt, dass die Blockierung der CD86-CD28-kostimulatorischen Interaktion zusammen mit der Blockierung der CD40L-CD40-kostimulatorischen Interaktion mit einem therapeutischen Molekül, wie in den oben angegebenen Beispielen beschrieben, ein starkes Potenzial für die Immuntherapie von T-Zell-vermittelten Krankheiten besitzt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Panagenetics B.V.
- (B) STRASSE: Paasheuvelweg 15
- (C) STADT: Amsterdam
- (E) LAND: Niederlande
- (F) POSTLEITZAHL: 1105 BE

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Zusammensetzungen und Verfahren für die Induktion von T-Zelltoleranz

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 22

(iv) COMPUTERLESBARE FORM.

- (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 52 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

GCGCAGGCTT GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTSMARCT GCAGSAGTCT GG

52

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 89 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

GTGAGCTCGA TGTCCGATCC GCCACCGCCA GAGCCACCTC CGCCTGAACC GCCTCCACCT
GAGGAGACGG TGACCGTGGT CCCTTGCC

60

89

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

GACATCGAGC TCACYCAGTC TCCA

24

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

GCGCGCGGCC GCCCGTTTCA TTTCCAGSTT GGTGCCTCCA CC

40

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 339 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

CAGGTGCAAC TCGTGGAGTC TGGACCTGGC CTGGTGAAAC CCTCACAGAG CCTGTCCATC	60
ACATGCACTG TCTCTGGGTT CTCATTATCC AGATATAGTG TATACTGGGT TCGCCAGCCT	120
CCAGGAAAGG GTCTGGAGTG GCTGGGAATG ATGTGGGGTG GTGCATCCAC AGACTATAAT	180
TCAGCTCTCA AATCCAGACT GACCATCAGC AAGGACACCT CGAAGAACCA GGTCTTCTTA	240
AAAATGAACA GTCTGCGAGC TGAGGACACA GCCATGTACT ACTGTGTCAG AACCGATGGG	300
GACTACTGGG GTCAAGGAAC CACCGTCACC GTCTCCTCA	339

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 339 Basenpaare
- (D) TYP: Nukleinsäure
- (E) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

```

GACCTCCAGC TGACCCAGTC TCCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTTGGAGA TCGAGCCTCC      60
ATCTCTTGCA GATCTAGTCA GAGCCTTGTA AACAGTAATG GAAACACCTA TTTACATTGG      120
TACCTGCAGA AGCCAGGCCA GTCTCCAAAG CTCCTGATCT ACAAAGTTTC GAACCGATTT      180
TCTGGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGCCAGT GGATCAGGGA CAGATTTTAC ACTCAAGATT      240
AGCAGAGTGC AGCCTGAGGA TGTGGGAGTT TATTACTGCT CTCAAAGTAC ACATGTTCCG      300
TGCACGTTCC CTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAACGA                                339

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 723 Basenpaare
- (D) TYP: Nukleinsäure
- (E) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7:

CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC TGGACCTGGC CTGCTGAAAC CCTCACAGAG CCTGTCCATC	60
ACATGCACTG TCTCTGGGTT CTCATTATCC AGATATAGTG TATACTGGGT TCGCCAGCCT	120
CCAGGAAAGG GTCTGGAGTG GCTGGGAATG ATGTGGGGTG GTGGATCCAC AGACTATAAT	180
TCAGCTCTCA AATCCAGACT GACCATCAGC AAGGACACCT CGAAGAACCA GGTCTTCTTA	240
AAAATGAACA GTCTGGGAGC TGAGGACACA GCCATGTACT ACTGTGTCAG AACCGATGGG	300
GACTACTGGG GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG GTGGAGGCGG TTCAGGCGGA	360
GGTGGCTCTG GCGGTGGCGG ATCGGACATC GAGCTCACTC AGTCTCCACT CTCCCTGCCT	420
GTCAGTCTTG GAGATCGAGC CTCCATCTCT TGCAGATCTA GTCAGAGCCT TGTAACAGT	480
AATGGAAACA CCTATTTACA TTGGTACCTG CAGAAGCCAG GCCAGTCTCC AAAGCTCCTG	540
ATCTACAAAG TTTCCAACCG ATTTTCTGGG GTCCCAGACA GGTTCAGTGG CAGTGGATCA	600
GGGACAGATT TCACACTCAA GATTAGCAGA GTGGAGGCTG AGGATCTGGG AGTTTATTAC	660
 TGCTCTCAAA GTACACATGT TCCGTGGACG TTGGTGGAG GCACCAAGCT GGAAATAAAA	720
CGG	723

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 375 Basenpaare
- (F) TYP: Nukleinsäure
- (G) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

GAGGTCCAAC TGCAGCAGTC TGGACCTGAG CTGGAGAAGC CTGGCGCTTC AGTGAAGATA	60
TCCTGCAAAG CTTCTGGTTA CTCATTCACT GACTACAACA TGAAGTGGGT GAAGCAGAGC	120
AATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGAAAT ATTGATCCTT ACTATGCTGG TACTAGTTAC	180
AATCAGAAAGT TCAAGGGCAA GGCCACATTG ACTGTAGACA AATCCTCCAG CACAGCCTAC	240
ATGCAGCTCA ACAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCAGTCT ATTTCTGTGC AAGATGGGAC	300
TATAGGTACG ACGACGGGAG GGCTTACTAT GTTATGGACT TCTGGGGTCA AGGAACCTCA	360
GTCACCGTCT CCTCA	375

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 339 Basenpaare
- (H) TYP: Nukleinsäure
- (I) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

GAGCTCCAGA TGACCCAGTC TCCATCATCT CTGGCTGCGT CTGCAGGAGA AAAGGTCACT	60
ATGAGCTGTA AGTCCAGTCA AAGTGTITTA TACAGTTCAA ATCAGAAGAA CTACTTGGCC	120
TGGTACCAGC AGAAACCAGG GCAGTCTCCT AAAGTCTGTA TCTACTGGGC ATCCACTAGC	180
GAATCTGGTG TCCCTGATCG CTTACAGGC AGTGGATCTG GGACACATTT TACTCTGACC	240
GTCAGCAGTG TGCAAGCTGA AGACCTGGCA GTTATTACT GTCATCAATA CCTCTACTCG	300
TGGACGTTCT GTGGAGGCAC CAACCTGGAA ATCAAACGG	339

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 759 Basenpaare

(J) TYP: Nukleinsäure

(K) STRANGART: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 10:

CAGGTCCAAC TGCAGCACTC TGGACCTGAG CTGGAGAAGC CTGGCGCTTC AGTGAAGATA	60
TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CTCATTCAC TACTACAACA TGAAGTGGGT GAAGCAGAGC	120
AATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGAAAT ATTGATCCTT ACTATGGTGG TACTAGTTAC	180
AATCAGAAGT TCAAGGGCAA GGCCACATTG ACTGTAGACA AATCCTCCAG CACAGCCTAC	240
ATGCAGCTCA ACAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCAGTCT ATTTCTGTGC AAGATGGGAC	300
TATAGGTACG ACGACGGCAG GGCTTACTAT GTTATGGACT TCTGGGCCCC ACGGACCACG	360
GTCACCGTCT CCTCAGGTGG AGGCGGTTCA GCGGAGGTG GCTCTGGCGG TGGCGGATCG	420
GACATCGAGC TCACCCAGTC TCCATCATCT CTGGCTGCGT CTGCAGGAGA AAAGGTCACT	480
ATGAGCTGTA AGTCCAGTCA AAGTGTTTTA TACAGTTCAA ATCAGAAGAA CTACTTGGCC	540
TGGTACCAGC AGAAACCAGG GCAGTCTCCT AAAGTCTGA TCTACTGGGC ATCCACTAGG	600
GAATCTGGTG TCCCTGATCG CTTACAGGC AGTGGATCTG GGACACATTT TACTCTGACC	660
GTCAGCAGTG TGCAAGCTGA AGACCTGGCA GTTTATTACT GTCATCAATA CCTCTACTCG	720
TGGACGTTCC GTGGAGGCAC CAACCTGGAA ATCAAACCG	759

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (L) TYP: Nukleinsäure
- (M) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 11:

TCTCACACTG CACAGGTGCA GCTCCAGGAG TCTGG

35

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 51 Basenpaare
- (N) TYP: Nukleinsäure
- (O) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 12:

CGTGAGAACA TATGCCCGGC CTTATTACCG TTTGATTTC C AGTTGGTGC C

51

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 764 Basenpaare
- (P) TYP: Nukleinsäure
- (Q) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 13:

```

GTGAAAAAAT TATTATTCGC AATTCCTTTA GTTGITCCIT TCTATTCTCA CAGTGCACAG      60
GTGCAGCTGC AGGAGTCTGG ACCTGGCCTG GTGAAACCCT CACAGAGCCT GTCCATCACA      120
TGCACGTGCT CTGGGTCTC ATTATCCAGA TATAGTGAT ACTGGGTTCC CCAGCCTCCA      180
GGAAAGGGTC TGGAGTGGCT GGGAATGATG TGGGGTGGTG GATCCACAGA CTATAATTCA      240
GCTCTCAAAT CCAGACTGAC CATCAGCAAG GACACCTCGA AGAACCAGGT CTTCTTAAAA      300
ATGAACAATC TCCAGCTGA GGACACAGCC ATGTACTACT GTGTCAGAAC CGATGGGCAC      360
TACTGGGGCC AAGGGACCAC GGTCAACCTC TCCTCAGGTG GAGGGCGTTC AGACATTGAG      420
CTCACCCAGT CTCCATCATC TCTGGCTGCG TCTGCAGGAG AAAAGGTCAC TATGAGCTGT      480
AAGTCCAGTC AAAGTGTTT ATACAGTTCA AATCAGAAGA ACTACTTGGC CTGGTACCAG      540
CAGAAACCAG GGCAGTCTCC TAAACTGCTG ATCTACTGGG CATCCACTAG GGAATCTGGT      600
GTCCCTGATC GCTTCACAGG CAGTGGATCT GGGACACATT TTA CTCTGAC CGTCAGCAGT      660
GTGCAAGCTG AAGACCTGGC AGTTTATTAC TGTCATCAAT ACCTCTACTC GTGGACGTTC      720
GGTGGAGGCA CCAACCTGGA AATCAAACGG TAATAAGGCG CGCC                        764

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (R) TYP: Nukleinsäure
- (S) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 14:

GGCCGAATTC ATGGACATGA GGGTCCCCGC

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (T) TYP: Nukleinsäure
- (U) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 15:

AGATTTGGGC TCAACTTTCT TGTCCAC

27

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (V) TYP: Nukleinsäure
- (W) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 16:

GTGGACAAGA AAGTTGAGCC CAAATCT

27

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 82 Basenpaare
- (X) TYP: Nukleinsäure
- (Y) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 17:

GCGCGAATTC TTAACCGGCC GCAGATCCGC CGCCACCGGA CCCACCTCCG CCCGAGCCAC
CGCCACCTTT ACCCGGAGAC AG

60

82

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 18:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (Z) TYP: Nukleinsäure
- (AA) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 18:

GGCGCGGGCC GCAATCCACG TGGCCCAGCT T

31

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 19:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (BB) TYP: Nukleinsäure
- (CC) STRANGART: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 19:

GGCGCGGGCC GCCTAGTCAG AATCTGGGCA CGGTTC

36

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 20:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(DD) TYP: Nukleinsäure

(EE) STRANGART: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 20:

GCGGCGGATC CATGGACATG AGGGTCCCCG C

31

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 21:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 33 Basenpaare

(FF) TYP: Nukleinsäure

(GG) STRANGART: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 21:

GCGGCGGATCC CTAACACTCT CCCCTGTTGA AGC

33

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NR: 22:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 876 Basenpaare

(HH) TYP: Nukleinsäure

(II) STRANGART: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 22:

```

ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC CCAGCCGGCC      60
ATGGCCCAGG TCCAACGCA GCAGTCTGGA CCTGAGCTGG AGAAGCCTGG CGCTTCAGTG      120
AAGATATCCT CCAAGGCTTC TGGTTACTCA TTCACTGACT ACAACATGAA CTGGGTGAAG      180
CAGAGCAATG GAAAGAGCCT TGAGTGGATT GGAAATATTG ATCCTTACTA TGGTGGTACT      240
AGTTACAATC AGAAGTTCAA GGGCAAGCCC ACATTGACTG TAGACAAATC CTCCAGCACA      300
GCCTACATGC AGCTCAACAG CCTGACATCT GAAGACTCTG CAGTCTATTT CTGTCCAAGA      360
TGGGACTATA GGTACGACGA CGGGAGGGCT TACTATGTTA TGGACTTCTG GGGCCAAGGG      420
ACCACGGTCA CCGTCTCCTC AGCGGGTGGC GGATCGGACA TTGAGCTCAC TCAGTCTCCA      480
CTCTCCCTGC CTGTCACTCT TGGAGATCGA GCCTCCATCT CTTCCAGATC TAGTCAGAGC      540
CTTGTAACA GTAATGGAAA CACCTATTTA CATTGGTACC TGCAGAAGCC AGGCCAGTCT      600
CCAAAGCTCC TGATCTACAA AGTTTCCAAC CGATTTTCTG GGGTCCCAGA CAGGTTCACT      660
GCCAGTGGAT CAGGGACAGA TTTCACACTC AAGATTAGCA CAGTGGAGGC TGAGGATGTG      720
GGAGTTTATT ACTGCTCTCA AAGTACACAT GTTCCGTGGA CGTTCGGTGG AGGCACCAAG      780
CTGGAAATAA AACGGGCGGC CGCAGAACAA AAATCATCT CAGAAGAGGA TCTGAATGGC      840
GCCGCACATC ACCATCATCA CCATTAATAA GAATCC                                876

```

Patentansprüche

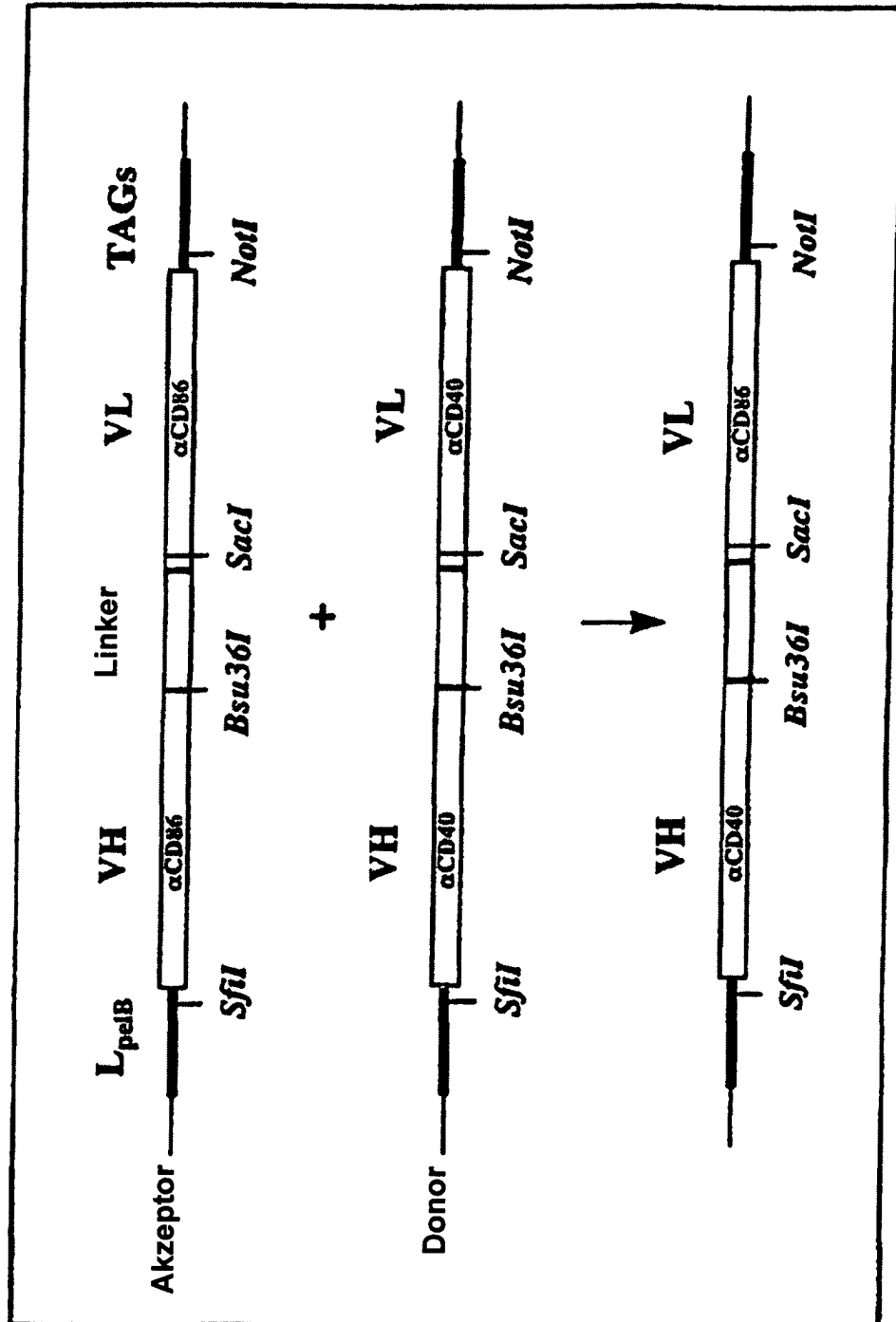
1. Ein lösliches Molekül, welches fähig ist, humanes CD40 Antigen zu binden, indem es wenigstens eine Antigenbindungsstelle eines Antikörpers gegen CD40 enthält und welches fähig ist, humanes CD86 Antigen zu binden, indem es wenigstens eine Antigenbindungsstelle eines Antikörpers gegen CD86 enthält, wobei sich die genannten Antigene auf der Oberfläche von humanen Lymphozyten oder Antigen-präsentierenden Zellen befinden.

2. Ein Molekül gemäß Anspruch 1, welches ein Antikörper ist, der eine Antigenbindungsstelle eines Antikörpers gegen CD40 und eine Antigenbindungsstelle eines Antikörpers gegen CD86 enthält.

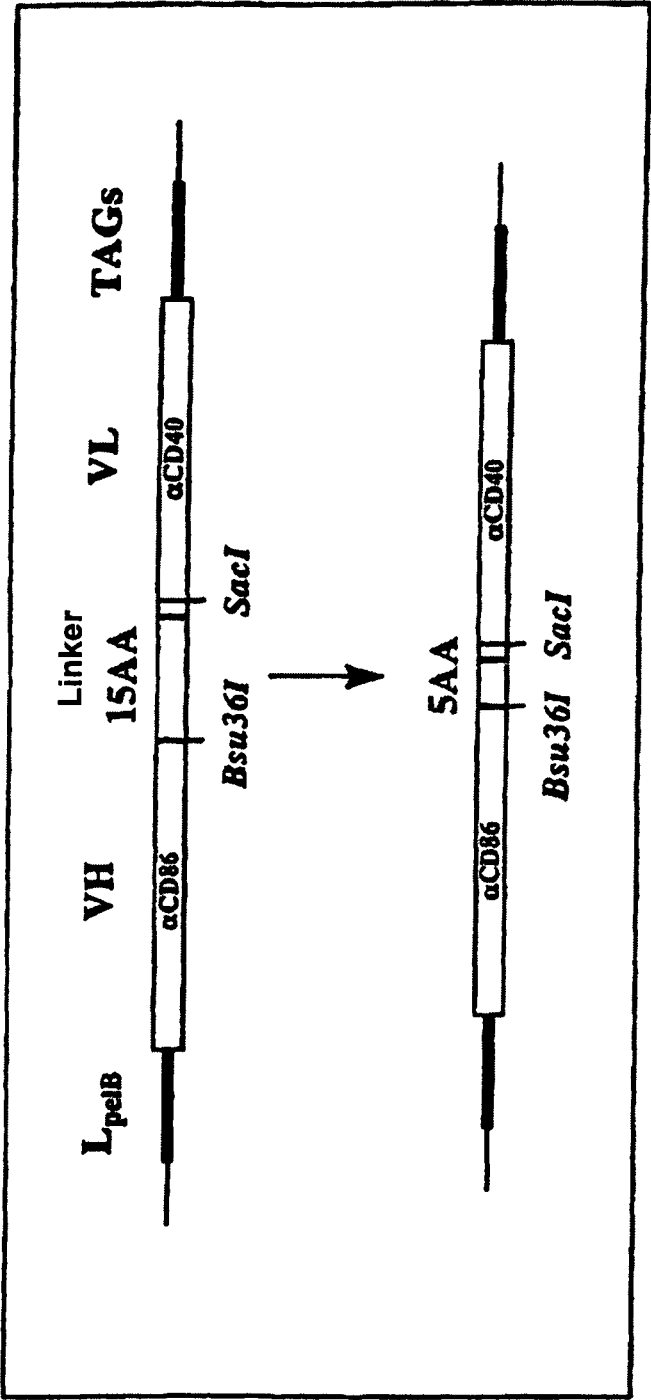
3. Ein Molekül gemäß Anspruch 1, welches außerdem fähig ist, CD80 zu binden und welches die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers enthält, der mit CD80 und CD86 kreuzreagiert.
4. Ein Molekül gemäß Anspruch 1, welches ein bispezifischer Diabody ist, der fähig ist, humanes CD40 und humanes CD86 zu binden.
5. Ein Molekül gemäß Anspruch 1, welches außerdem fähig ist, CD80 zu binden und welches die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers gegen CD80 und die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers gegen CD86 enthält.
6. Ein Molekül gemäß Anspruch 1 oder 3, welches fähig ist, wenigstens CD86 mittels der extrazellulären Domäne von humanem CTLA-4 zu binden.
7. Ein Molekül gemäß einem der Ansprüche 1–5, worin der Antikörper gegen CD86 der Antikörper Fun-1 ist.
8. Ein Molekül gemäß einem der Ansprüche 1–7, worin der Antikörper gegen CD40 ein antagonistischer Antikörper gegen CD40 ist.
9. Ein Molekül gemäß einem der Ansprüche 1–7, worin der Antikörper gegen CD40 ein nicht-stimulatorischer antagonistischer Antikörper gegen CD40 ist.
10. Ein rekombinanter Vektor, welcher die für die bindenden Molekülfragmente gemäß einem der Ansprüche 1–9 kodierenden Nucleotidsequenzen, operativ verbunden mit Regulationssequenzen, die fähig sind, das Antikörpermolekül in einer Wirtszelle zu exprimieren, umfasst.
11. Eine Wirtszelle, welche stabil mit dem Vektor gemäß Anspruch 10 transfomiert ist.
12. Ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Moleküls, welches fähig ist, humanes CD40 Antigen und wenigstens humanes CD86 Antigen zu binden und welches die Kultivierung der Wirtszelle gemäß Anspruch 11 und die Isolierung der bindenden Moleküle aus dem Kulturmedium umfasst.
13. Eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Induktion von T-Zelltoleranz, welche eine therapeutisch wirksame Menge des bindenden Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger enthält.
14. Verwendung eines bindenden Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1–9 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung von T-Zell vermittelten Immunantworten, für die Prävention der Allotransplantat- oder Xenotransplantat-Abstoßung, für die Induktion von T-Zelltoleranz, für die Induktion von Allotransplantat- oder Xenotransplantat-Toleranz, für die Prävention oder Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie z. B. rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose und Psoriasis, oder für die Behandlung von T-Zell vermittelten Immunantworten gegenüber Gentherapievektoren oder -vehikeln oder gegenüber therapeutischen Molekülen.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

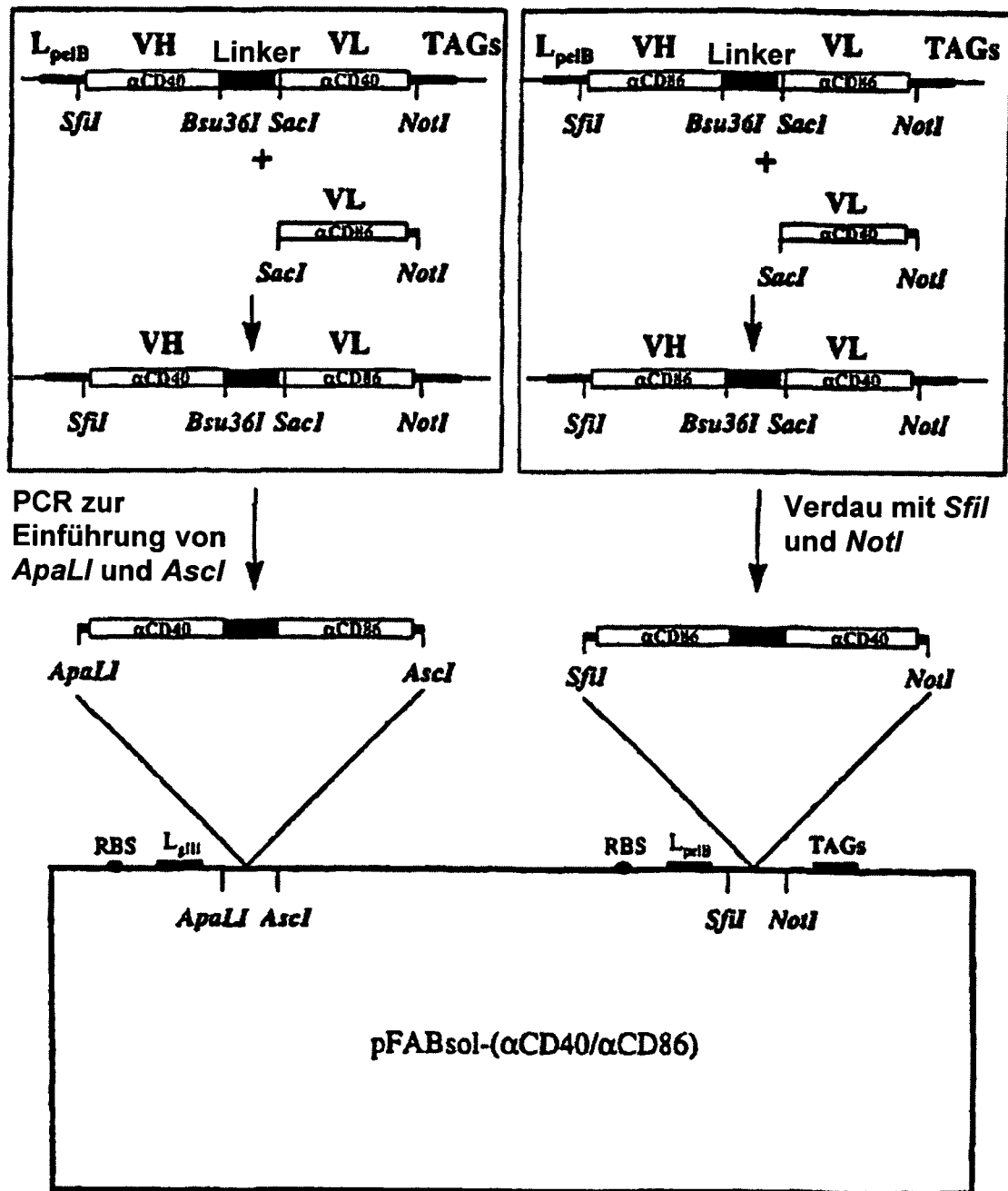
Figur 1



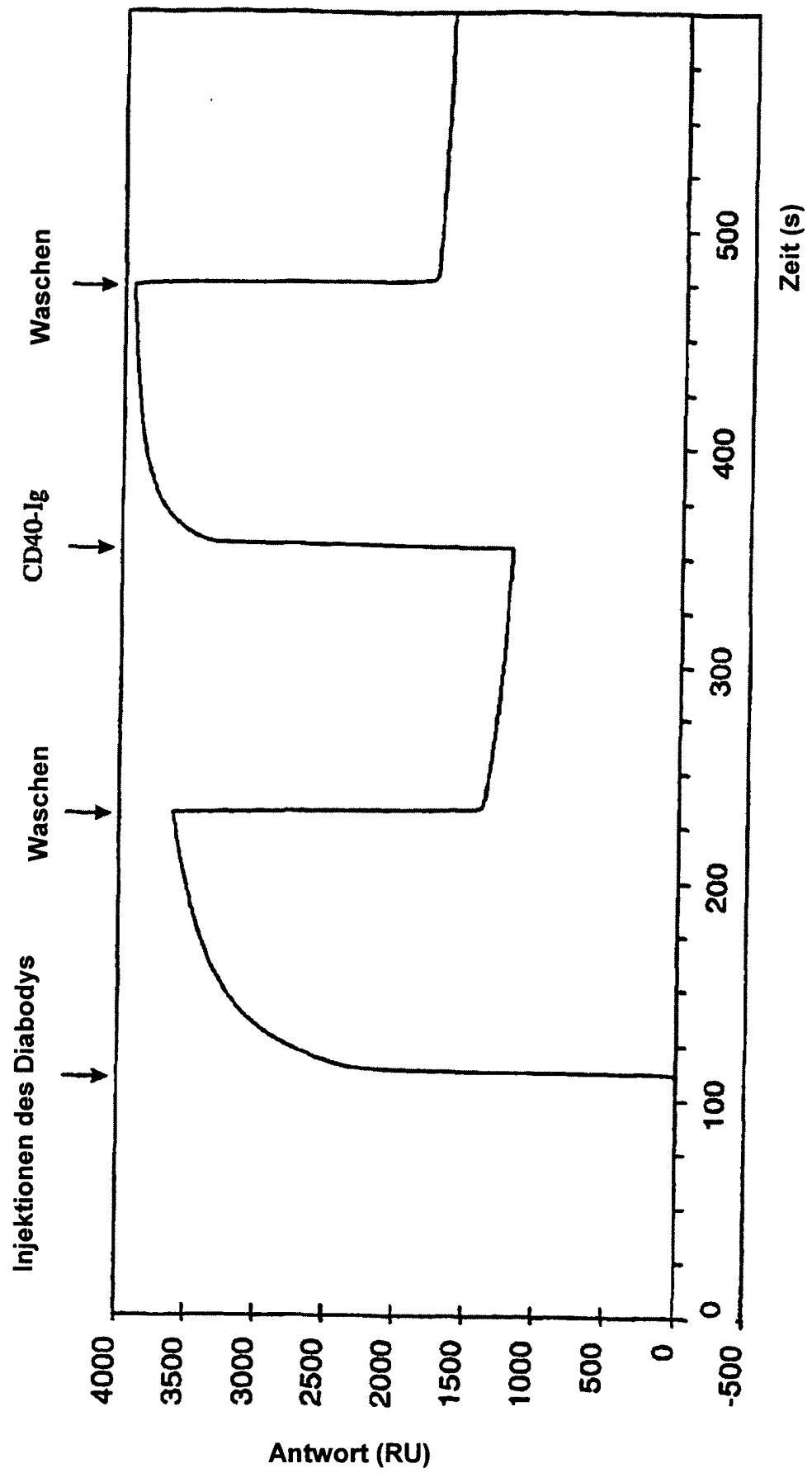
Figur 2



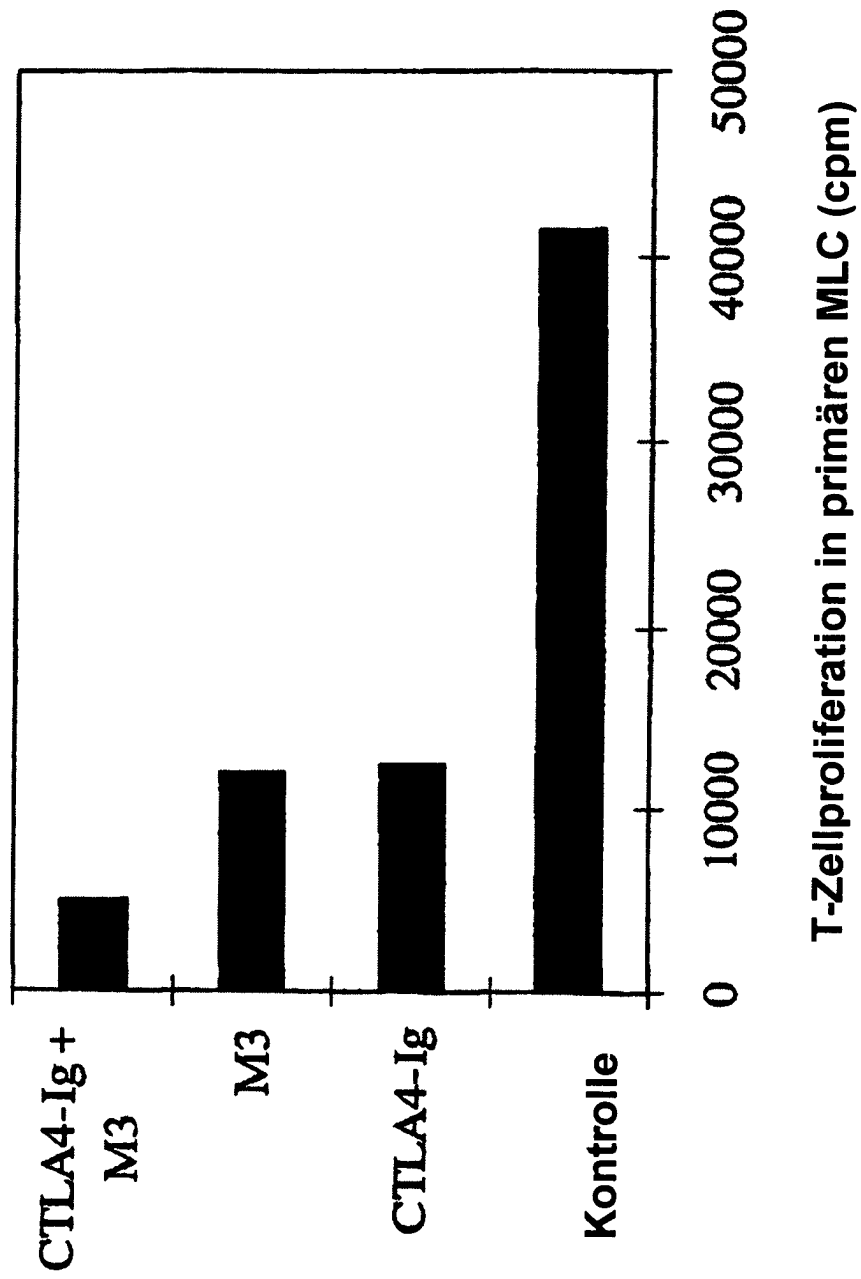
Figur 3



Figur 4

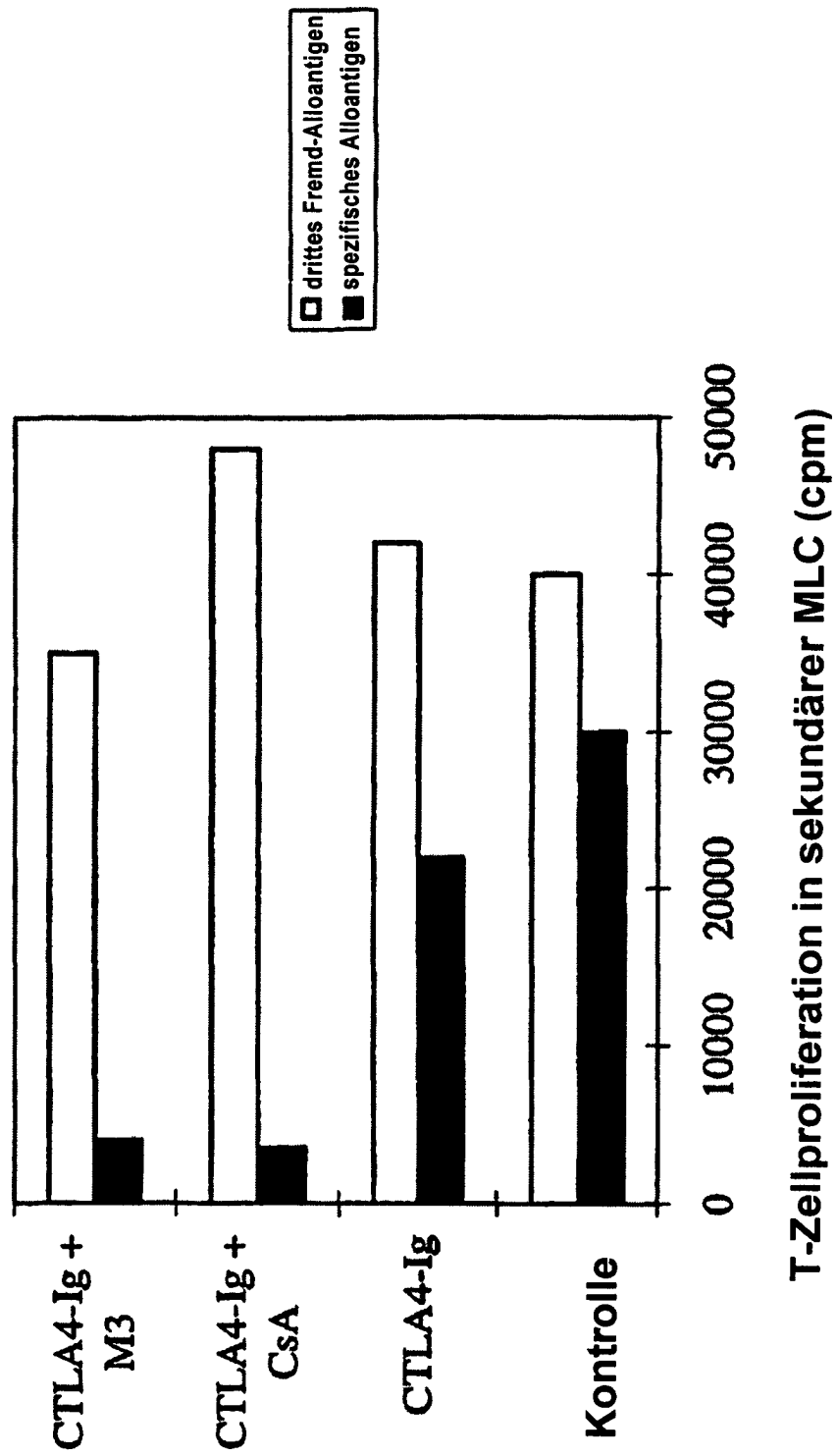


Figur 5



Figur 6

Bedingungen während der primären MLR



Figur 7

Bedingungen während der primären MLR

