

(19) **DANMARK**

(11)

DK 176020 B1



(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **C 07 K 14/47 C 07 K 16/44**

(21) Patentansøgning nr: **PA 2003 00468**

(22) Indleveringsdag: **2003-03-27**

(24) Løbedag: **1988-05-03**

(41) Alm. tilgængelig: **2003-03-27**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2005-12-12**

(30) Prioritet: **1987-05-04 US 045,963 1987-11-02 US 115,798 1988-02-16 US 155,943**

(73) Patenthaver: **Dana Farber Cancer Institute, 44, Binney Street, Boston, Massachusetts 02115, USA**

(72) Opfinder: **Timothy Alan Springer, 28, Monadnock Road, Chestnut Hill, Massachusetts 02167, USA**
Robert Rothlein, 32, Tamanny Trail, Danbury, Connecticut 06811, USA

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau A/S, Rigersgade 11, 1316 København K, Danmark**

(54) Benævnelse: **Monoklonale antistoffer og fragmenter deraf, hybridomaceller til fremstilling af monoklonale antistoffer, fremgangsmåder til diagnosticering af tumorceller, anvendelse af antistoffer samt farmaceutiske præparater indeholdende samme**

(56) Fremdragne publikationer:

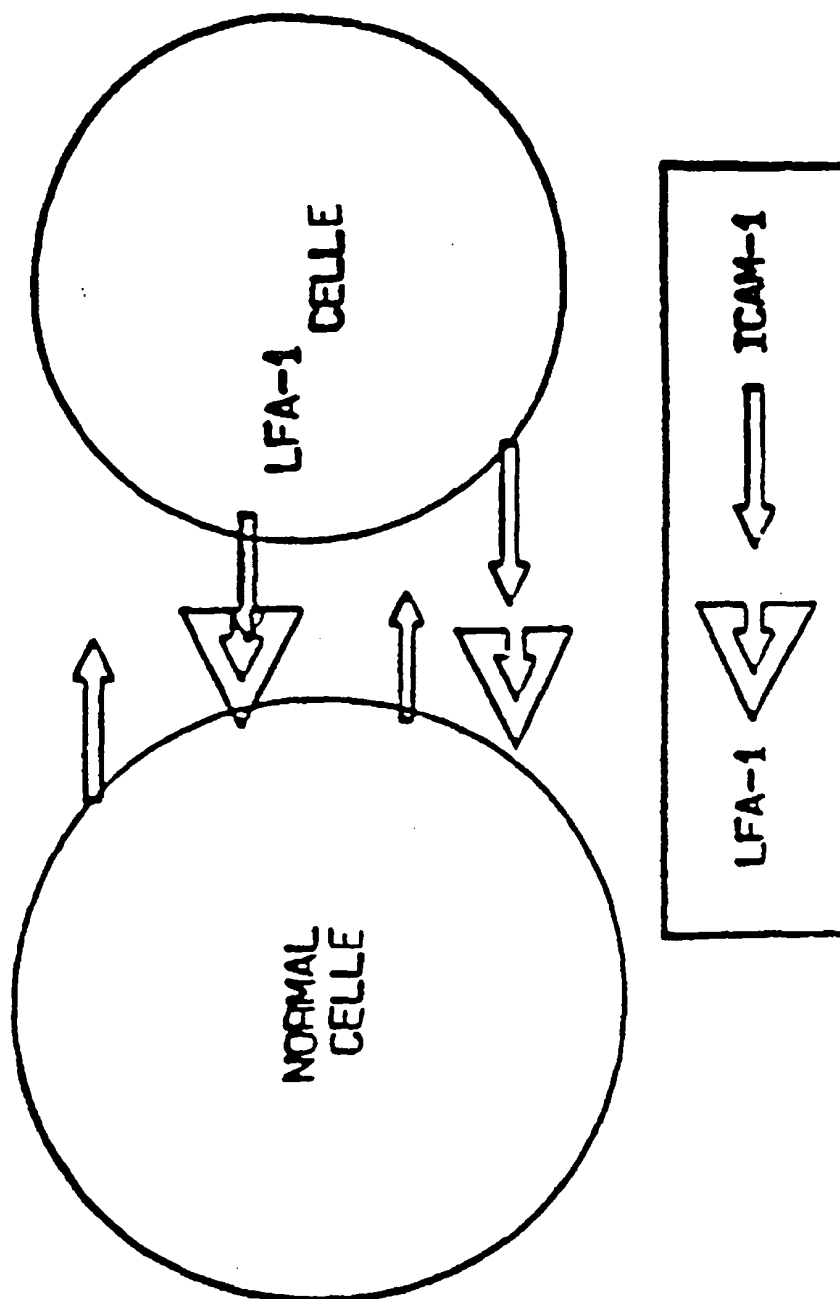
Dustin, Michael J. et al: J. of Immunology, bind 137(1986) side 245-254
Dustin, Michael L. et al: J. of Immunology, vol 137 (1986), p.245 - 254.

(57) Sammendrag:

Intercellulære adhæsionsmolekyler (ICAM-1), som er involveret i processen, gennem hvilken lymfocytter genkender og vandrer til steder med inflammation samt fæstner sig til cellesubstrater under inflammation, og antistoffer, der er i stand til at binde til sådanne intercellulære adhæsionsmolekyler, screeningsprøver til identifikation af disse og deres anvendelse beskrives.

fortsættes

NORMAL/LFA-1 MANGELFULD CELLE- ADHÆSION



1

Den foreliggende opfindelse angår monoklonale antistoffer samt fragmenter deraf, der er i stand til at binde til intercellulære adhæsionsmolekyler. Opfindelsen angår yderligere celler til at producere sådanne antistoffer. I et andet aspekt angår opfindelsen en fremgangsmåde til diagnosticering af tumorceller eksprimerende intercellulære adhæsionsmolekyler, et farmaceutisk præparat indeholdende antistofferne eller fragmenterne deraf samt anvendelse af antistofferne eller fragmenterne til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af inflammation eller undertrykkelse af tumorvækst.

Leukocyttter skal være i stand til at fæstne til cellesubstrater for på rette måde at forsvare værten mod fremmede invaderende, såsom bakterier eller vira. Et udmærket overblik over forsvarssystemet er angivet af Eisen, H.W., (Microbiology, 3. udg., Harper & Row, Philadelphia, PA (1980), s 290-295 og 381-418). De skal kunne fæstnes til endotelceller, således at de kan migrere fra kredsløbet til steder med fortsat inflammation. Yderligere skal de være i stand til at fæstne til antigenpræsenterende celler, således at en normal specifik immunreaktion kan forekomme, og endelig skal de fæstne til egnede målceller, således at lysis af virus-inficerede celler eller tumorceller kan ske.

For nylig identificeredes leukocytoverflademolekyler, som er involveret i formidlingen af sådanne fæstnelser, under anvendelse af hybridoma-teknologi. Kort fortalt identificeredes monoklonale antistoffer rettet mod humane T-celler (Davignon, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4535-4539 (1981)) og musemiltceller (Springer, T. et al. Eur. J. Immunol. 9:301-306

(1979)), hvilke bandt til leukocytoverflader og inhiberede de fæstelsesrelaterede funktioner beskrevet ovenfor (Springer, T. et al., Fed. Proc. 44:2660-2663 (1985)). Molekylerne, der identificeredes med disse antistoffer, kaldtes Mac-1 og lymfocyt-funktions-associeret antigen-1 (LFA-1). Mac-1 er en heterodimer, som findes hos makrofager, granulocytter og store granulære lymfocytter. LFA-1 er en heterodimer, som findes hos de fleste lymfocytter (Springer, T.A., et al. Immunol. Rev. 68: 111-135 (1982)). Disse to molekyler plus et tredje molekyle, p150,95 (som har en vævsfordeling svarende til Mac-1) spiller en rolle ved cellulær adhæsion (Keizer, G. et al., Eur. J. Immunol. 15:1142-1147 (1985)).

Ovennævnte leukocytmolekyler har vist sig at være medlemmer af en beslægtet familie af glycoproteiner (Sanchez-Madrid F. et al., J. Exper. Med. 158:1785-1803 (1983); Keizer, G.D. et al., Eur. J. Immunol. 15:1142-1147 (1985)). Denne glycoproteinfamilie består af heterodimerer med én α -kæde og én β -kæde. Skønt hver af antigenernes α -kæde var forskellige fra hinanden, viste β -kæden sig at være bevaret i høj grad (Sanchez-Madrid, F. et al., J. Exper. Med. 158:1785-1803 (1983)). Glycoproteinfamiliens (sommestider omtalt som "CD18") β -kæde viste sig at have en molekylvægt på 95 kd, hvorimod α -kædernes molekylvægt varierede fra 150 kd til 180 kd (Springer, T., Fed. Proc. 44:2660-2663 (1985)). Skønt membranproteinernes α -underenheder ikke har den samme vidtstrakte homologi som β -underenheder, viste nærmere analyse af glycoproteinernes α -underenheder, at der er væsentlige ligheder mellem dem. Undersøgelser over lighederne mellem α - og β -underenhederne i de LFA-1-relaterede glycoproteiner

er angivet af Sanchez-Madrid, F. et al., (J. Exper. Med. 158:586-602 (1983); J. Exper. Med. 158:1785-1803 (1983)).

Man har identificeret en gruppe af personer,
5 som ikke er i stand til at eksprimere normale mængder af ethvert medlem af denne adhæsionsproteinfamilie på deres leukocytcelleoverflade (Anderson, D.C., et al., Fed. Proc. 44:2671-2677 (1985); Anderson, D.C., et al., J. Infect. Dis. 152:668-689 (1985)). Lymfocytter fra
10 disse patienter udviste in vitro defekter svarende til normale modparter, hvis LFA-1-familie af molekyler var blevet antagoniseret af antistoffer. Disse personer var yderligere ude af stand til at opnå en normal immun-respons på grund af deres cellers manglende evne til
15 at hæfte til cellesubstrater (Anderson, D.C., et al., Fed. Proc. 44:2671-2677 (1985); Anderson, D.C., et al., J. Infect. Dis. 152:668-689 (1985)). Disse data viser at immunreaktioner dæmpes når lymfocytter ikke er i stand til at fæstne på normal måde på grund
20 af de manglende funktionelle adhæsionsmolekyler af LFA-1-familien.

Lymfocytternes evne til at bevare et dyrs helbred og levedygtighed kræver således summarisk at lymfocytterne er i stand til at hæfte til andre celler
25 (såsom endotelceller). Denne hæftning har vist sig at kræve celle-cellekontakter, som involverer specifikke receptormolekyler, der findes på lymfocytternes celleoverflade. Disse receptorer gør det muligt for en lymfocyt at fæstne sig til andre lymfocytter eller til
30 endotelceller, og andre ikke-vaskulære celler. Celleoverfladereceptormolekylerne har vist sig at være yderst beslægtede med hinanden. Personer, hvis lymfocytter mangler disse celleoverfladereceptormolekyler,

udviser kroniske og tilbagevendende infektioner og andre kliniske symptomer, herunder defekte antistofreaktioner.

Da lymfocytadhæsionen er involveret i processen gennem hvilken fremmed væv identificeres og afvises, er en forståelse af denne proces af væsentlig værdi indenfor organtransplantation, vævstransplantation, allergi og onkologi.

Den foreliggende opfindelse angår monoklonale antistoffer og fragmenter af antistoffer, der er i stand til at inhibere funktionen af ICAM-1, og andre inhibitorer af ICAM-1-funktionen. Opfindelsen angår desuden diagnostiske fremgangsmåder for alle de ovennævnte molekyler, samt farmaceutiske præparater indeholdende antistofferne eller fragmenterne deraf, samt anvendelse af disse til fremstilling af farmaceutiske præparater.

Opfindelsen angår nærmere angivet et monoklonalt antistof, R6-5-D6, som er i stand til at binde til et molekyle valgt blandt ICAM-1 og funktionelle derivater af ICAM-1 eller molekyler, der er i stand til at binde til en receptor, der findes på overfladen af en lymfocyt. Opfindelsen omfatter også en hybridoma-celle, der er i stand til at producere et sådant antistof.

Opfindelsen omfatter yderligere fragmenter af antistoffet, der er i stand til at binde til molekylet, og endvidere antistoffet og fragmenter deraf på mærket form.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til diagnostisering og lokalisering af en ICAM-1 eksprimerende tumorcelle i et pattedyr eller menneske, som man formoder indeholder en sådan celle, hvilken fremgangsmåde omfatter:

(a) administrering af et middel indeholdende en detekterbart mærket bindingsligand, der er i stand til at binde til ICAM-1, til individet, idet liganden vælges blandt et antistof og et fragment af et antistof, 5 hvor fragmentet er i stand til at binde til ICAM-1, og

(b) detektering af bindingsliganden.

Endvidere angår opfindelsen et farmaceutisk præparat indeholdende et antistof eller toxinafledt antistof, der er i stand til at binde til et molekyle valgt 10 blandt ICAM-1 og et funktionelt derivat af ICAM-1, eller et fragment af et antistof eller toxin-afledt fragment af et antistof, idet fragmentet er i stand til at binde til et molekyle valgt blandt ICAM-1 og et funktionelt derivat af ICAM-1, sammen med en inert farmaceutisk bærer. 15

Yderligere angår opfindelsen anvendelse af antistoffet eller et fragment deraf, der er i stand til at binde til ICAM-1 og et funktionelt derivat af ICAM-1 til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af inflammation, der stammer fra en reaktion 20 fra det specifikke forsvarssystem hos et pattedyr eller menneske, eller til undertrykkelse af væksten af en ICAM-1-eksprimerende tumor eller en LFA-1-eksprimerende tumor.

25 På tegningen viser:

fig. 1, på diagramform, adhæsionen mellem en normal og en LFA-1 mangelfuld celle.

Fig. 2 viser, på diagramform, normal/normal celle-adhæsion-processen.

30 Fig. 3 viser kinetikken af cellulær aggregation i fravær (X) eller nærværelse af 50 ng/ml PMA (O).

Fig. 4 viser coaggregation mellem LFA-1⁻ og LFA-1⁺-celler. Carboxyfluoresceindiacetatmærkede EBV-

transformerede celler (10^4), som angivet i figuren blandedes med 10^5 umærkede autologe celler (sorte søjler) eller JY-celler (ufarvede søjler) i nærværelse af PMA. Efter 1,5 timer optaltes de mærkede celler, i aggregater eller frie, idet den kvantitative prøve fra eksempel 2 benyttedes. Procentdelen af mærkede celler i aggregater er vist. Et repræsentativt eksperiment ud af to er vist.

Fig. 5 viser immunopræcipitationen af ICAM-1 og LFA-1 fra JY-celler. Triton X-100 lysater fra JY-celler (bane 1 og 2) eller kontrollysispudder (bane 3 og 4) immunopræcipiterede med antistof, der er i stand til at binde til ICAM-1 (bane 1 og 3) eller antistoffer, der er i stand til at binde til LFA-1 (bane 2 og 4). Panel A viser resultater under reducerende betingelser: Panel B viser resultater opnået under ikke-reducerende betingelser. Molekylvægtstandarder bestemtes i bane S.

Fig. 6 viser kinetikken af IL-1 og γ -interferonvirkninger på ICAM-1-ekspression på humane, dermale fibroblaster. Humane, dermale fibroblaster dyrkedes til en tæthed på 8×10^4 celler/ $0,32 \text{ cm}^2$ /brønd. IL-1 (10 U/ml, sorte cirkler) eller rekombinant γ -interferon (10 U/ml, farvede firkanter) tilsattes og på det angivne tidspunkt afkøledes prøven til 4°C og en indirekte bindingsprøve gennemførtes. Standardafvigelsen oversteg ikke 10 procent.

Fig. 7 viser koncentrationsafhængigheden af IL-1- og γ -interferonvirkninger på ICAM-1. Humane, dermale fibroblaster dyrkedes til en tæthed på 8×10^4 celler/ $0,32 \text{ cm}^2$ /brønd. IL-2 (ufarvede cirkler), rekombinant human IL-1 (ufarvede firkanter), rekombinant muse IL-1 (sorte firkanter), rekombinant human γ -interferon (sorte cirkler), og rekombinant β -interferon

(ufarvede trekanter) tilsattes ved den angivne fortynding og inkuberedes i 4 timer (IL-1) eller 16 timer (β - og γ -interferon). De viste resultater er middelværdier fra firedobbelte bestemmelser; standardafvigelsen
5 overskred ikke 10%.

Fig. 8 viser nukleotid- og aminosyresekvensen af ICAM-1-cDNA. Det første ATG er ved position 58. Translaterede sekvenser svarende til ICAM-1 tryptiske peptider er understreget. Det hydrofobe putative
10 signalpeptid og transmembransekvenser har en kraftig understregning. N-koblede glycosyleringssteder er indrammet. Polyadenyleringssignalet AATAAA ved position 2976 er angivet ved en streg ovenover signalet. Den viste sekvens er for HL-60 cDNA-klonen. Endotelcelle-
15 cDNA'en sekvensbestemtes over det meste af dens længde og viste kun mindre forskelle.

Fig. 9 viser de ICAM-1 homologe domæner og forbindelse til den immunoglobuline supergene familie. (A) opstilling af 5 homologe domæner (D1-5). To eller flere
20 identiske rester, som er opstillet er indrammet. Rester bevaret to eller flere gange i NCAM-domæner samt rester bevaret i domæner af sættene C2 og C1 opstilledes sammen med de ICMA-1 interne gentagelsesenheder. Lokaliseringen af de forudsagte β -strenger i ICAM-1-domænet er
25 markeret med kraftige streger og små bokstaver ovenover opstillingerne og den kendte lokalisering af β -strenger i immunoglobulin C domæner er markeret med kraftig streger og store bokstaver nedenunder opstillingen. Positionen af den putative disulfidbro indenfor ICAM-1-
30 domæner er angivet med S-S. (B-D) optilling af protein-domæner homologe til ICAM-1 domæner; proteiner opstilledes til at begynde med ved søgning i NBRF-databaser under anvendelse af FASTP-programmet. Proteinsekvenser-

ne er MAG, NACM, T-cellereceptor- α -underenhed-V-domæne, IgM μ -kæde og α -1-B-glycoprotein.

Fig. 10 er en skematisk sammenligning mellem de sekundære strukturer af ICAM-1 og MAG.

5 Fig. 11 viser LFA-1-positive EBV-transformerede B-lymfoblastoide cellers binding til ICAM-1 i plane membraner.

10 Fig. 12 viser LFA-1-positive T-lymfoblaster og T-lymfomacellers binding til ICAM-1 i plast-bundne vesikler.

Fig. 13 viser inhiberingen af binding af JY B-lymfoblastoidcellebinding til ICAM-1 i plast-bundne vesikler ved prebehandling af celler eller vesikler med monoklonale antistoffer.

15 Fig. 14 viser virkningen af temperatur på binding af T-lymfoblaster til ICAM-1 i plast-bundne vesikler.

20 Fig. 15 viser nødvendigheden af divalente kationer til binding af T-lymfoblaster til ICAM-1 i plast-bundne vesikler.

25 Fig. 16 viser anti-adhæsion-antistoffers virkning på perifere mononukleære blodcellers evne til proliferation som svar på genkendelsen af det T-celle-associerede antigen OKT3. "OKT3" angiver tilsætningen til antigen.

30 Fig. 17 viser anti-adhæsion-antistoffers virkning på perifere mononukleære blodcellers evne til proliferation som svar på genkendelsen af det ikke-specifikke T-cellemitogen, concanavalin A. "CONA" angiver tilsætningen af concanavalin A.

Fig. 18 viser anti-adhæsion-antistoffers virkning på perifere mononukleære blodcellers evne til proliferation som svar på genkendelsen af det "keyhole

limpet-"hæmocyaninantigen. Tilsætningen af "keyhole limpet-"hæmocyanin til cellerne er angivet ved "KLH".

Fig. 19 viser anti-adhæsion-antistoffers virkning på perifere mononukleære blodcellers evne til proliferation som svar på genkendelsen af tetanustoxoidantigenet. Tilsætningen af tetanustoxoidantigen til cellerne er angivet ved "AGN".

Fig. 20 viser ekspressionen af ICAM-1 på humane, perifere monocytter. (A) ikke dyrkede responderceller; (B) ikke dyrkede responder X stimulatorceller; (C) responderceller dyrker i 24 timer; (D) responder X stimulator celler dyrket i 24 timer.

(Tekst:- - - - Intet monoclonalt antistof; Muse-immunoglobulin; _____ Muse-anti-ICAM-1).

Molekyler, såsom dem i LFA-1-familien, der er involveret i cellulær adhæsionsprocessen omtales som "adhæsionsmolekyler".

Den omhandlede naturlige bindingsligand betegnes "intercellulær Adhæsionsmolekyle-1" eller "ICAM-1". ICAM-1 er et 76-97 Kd glycoprotein. ICAM-1 er ikke en heterodimer. Et "funktionelt derivat af" ICAM-1 er en forbindelse, som har en biologisk aktivitet (enten funktionelt eller strukturelt) som i det væsentlige er lig en biologisk aktivitet af ICAM-1. Udtrykket "funktionelle derivater" har til hensigt at omfatte "fragmenter", "varianter", "analoge" eller "kemiske derivater" af et molekyle. Et "fragment" af et molekyle, såsom ICAM-1 har til hensigt at betegne enhver polypeptiddel af molekylet. En "variant" af et molekyle, såsom ICAM-1 har til hensigt at betegne et molekyle, der i det væsentlige har samme struktur og funktion som enten hele molekylet eller et fragment deraf. Et molekyle siges at være "i det væsentlige lig med" et andet moleky-

le, hvis begge molekyler har i det væsentlige ens strukturer, eller hvis begge molekyler har omtrent samme biologiske aktivitet. Forudsat at to molekyler har omtrent samme aktivitet betragtes de således som varianter, sådan som udtrykket benyttes heri, selvom strukturen af et af molekylerne ikke findes i det andet, eller hvis aminosyresekvensresterne ikke er identiske. En "analog" af et molekyle, såsom ICAM-1, har til hensigt at betegne et molekyle, der i det væsentlige er ens i funktionen enten til hele molekylet eller til et fragment deraf. Sådan som det benyttes heri, siges et molekyle at være et "kemisk derivat" af et andet molekyle, når det indeholder yderligere kemiske dele, som normalt ikke er en del af molekylet. Sådanne dele kan forbedre molekylets opløselighed, absorption og biologisk halveringstid, osv. Delene kan alternativt mindske molekylets toxicitet, eliminere eller dæmpe enhver uønsket bivirkning hos molekylet, osv. Dele, der i stand til at mediere sådanne virkninger er angivet i Reminton's Pharmaceutical Sciences (1980). "Toxin-afledte"-molekyler udgør en speciel klasse af "kemiske derivater". Et "toxin-afledte" molekyle er et molekyle (såsom ICAM-1 eller et anti-stof), som indeholder en toxindel. Bindingen af et sådant molekyle til en celle bringer toxindelen i umiddelbar nærhed med cellen og fremmer derved celledød. Enhver egnet toxindel kan anvendes; det foretrækkes imidlertid at anvende toxiner, såsom ricintoxinet, diehtheriatoxinet, radioisotope toxiner, membran-kanal-formende toxiner, osv. Fremgangsmåder til kobling af sådanne dele til et molekyle er velkendt indenfor teknikken.

Et antigent molekyle, såsom ICAM-1 eller medlemmer af LFA-1-familien af molekyler eksprimeres natur-

ligvis på overfladen af lymfocytter. Introduktionen af sådanne celler i egnede dyr, som ved intraperitoneal injektion, osv., vil således resultere i produktionen af antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1
5 eller medlemmer af LFA-1-familien af molekyler. Serummet fra et sådant dyr kan, om ønsket, fjernes og benyttes som en kilde for polyklonale antistoffer, der er i stand til at binde til disse molekyler. Det foretrækkes imidlertid at fjernes splenocytter fra sådanne dyr, at
10 sammensmelte sådanne miltceller med en myelomacellelinie og lade sådanne fusionsceller danne en hybridomacelle som secernerer monoklonale antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1 eller medlemmer af LFA-1 familien af molekyler.

15 Hybridomacellerne, opnået på samme måde som beskrevet ovenfor kan underkastes screening ved en række fremgangsmåder til identificering af ønskede hybridomaceller, som sekreterer antistof, der er i stand til at binde enten til ICAM-1 eller til medlemmer af LFA-1-
20 familien af molekyler. Ved en foretrukket screeningsprøve, identificeres sådanne molekyler ved deres evne til at inhibere aggregationen af Epstein-Barr virus-transformerede celler. Antistoffer, der er i stand til at inhibere sådanne aggregationer, underkastes dernæst
25 yderligere screening for at bestemme hvorvidt de inhiberer sådan aggregation ved binding til ICAM-1, eller ved at binde til et medlem af LFA-1-familien af molekyler. Ethver middel, der er i stand til at skelne ICAM-1 fra LFA-1-familien af molekyler kan anvendes i
30 en sådan screening. Antigenet bundet af antistoffet kan således f.eks. analyseres ved immunfældning og polyacrylamidgelelektroforese. Hvis det bundne antigen er et medlem af LFA-1-familien af molekyler vil det

immunofældede antigen således vise sig at være en dimer, hvorimod en enkelt molekylvægt del vil være blevet immunofældet, hvis det bundne antigen er ICAM-1. Det er desuden muligt at skelne mellem disse antistoffer, som
5 binder til medlemmer af LFA-1-familien af molekyler fra dem som binder til ICAM-1 ved screening for antistoffets evne til at binde til celler, såsom granulocytter, som eksprimerer LFA-1, men ikke ICAM-1. Et antistofs (som vides at inhibere cellulær aggregation) evne til
10 at binde til granulocytter indikerer, at antistoffet er i stand til at binde til LFA-1. Fraværet af sådan binding viser, at et antistof er i stand til at genkende ICAM-1. Et antistofs evne til at binde til en celle, såsom en granulocyt, kan påvises ved metoder, der
15 sædvanligvis anvendes af en fagmand. Sådanne metoder omfatter immunoassays, cellulær agglutination, filterbindingsstudier, antistoffældning, osv.

De omhandlede anti-aggregationsantistoffer kan alternativt identificeres ved måling af deres evne til
20 differentielt at binde til celler, som eksprimerer ICAM-1 (såsom aktiverede endotelceller), og deres manglende evne til at binde til celler, som ikke eksprimerer ICAM-1. Som det vil være klart for en fagmand, kan ovennævnte prøver modificeres, eller udføres
25 i en anden rækkefølge til opnåelse af en række potentielle screeningsprøver, som hver er i stand til at identificere og skelne mellem antistoffer, der er i stand til at binde til ICMA-1 kontra medlemmer af LFA-1-familien af molekyler.

30 De omhandlede anti-inflammatoriske midler kan opnås ved naturlige (såsom ved at få et dyr, en plante, svamp, bakterie, osv. til at producere en ikke-immunoglobulin antagonist af ICAM-1, eller ved at få et

dyr til at producere polyklonale antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1); ved syntetiske metoder (såsom under anvendelse af Merrifield's metode til syntetisering af polypeptider til syntetisering af ICAM-1, funktionelle derivater af ICAM-1, eller proteinantagonister af ICAM-1 (enten immunoglobulin eller ikke-immunoglobulin)); ved hybridomateknologi (såsom fremstilling af monoklonale antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1); eller ved rekombinantteknologi (såsom fremstilling af de omhandlede antiinflammatoriske midler i forskellige værter (dvs. gær, bakterier, svampe, dyrkede pattedyrsceller, osv.), eller fra rekombinante plasmider eller virusvektorer). Valget af den fremgangsmåde, der skal benyttes vil afhænge af faktorer, såsom anvendelighed, ønsket udbytte, osv. Det er ikke nødvendigt kun at benytte én af ovennævnte fremgangsmåder, metoder eller teknologier til fremstilling af et særligt antiinflammatorisk middel; de ovennævnte metoder, fremgangsmåder og teknologier kan kombineres for at opnå et særligt antiinflammatorisk middel.

A. Identifikation af LFA-1-bindingspartneren (ICAM-1).

25 1. Prøver for LFA-1-afhængig aggregation.

Mange Epstein-Barr virustransformererede celler udviser aggregation. Denne aggregation kan øges i nærværelse af phorbolestere. En sådan homotype aggregation (dvs. aggregation, der kun involverer en cellype) har vist sig at blive blokeret af anti-LFA-1-antistoffer (Rothlein, R. et al., J. Exper. Med. 163: 1132-1149 (1986)), hvilken reference er inkorporeret

heri ved henvisningen dertil). Udstrækningen af LFA-1-afhængig binding kan således bestemmes ved at prøve udstrækningen af spontan eller phorbol-ester-afhængig aggregatdannelse.

- 5 Et middel som interfererer med LFA-1-afhængig aggregation kan identificeres ved anvendelsen af en prøve, der er i stand til at bestemme hvorvidt et middel interfererer med den spontane eller den phorbol-ster-afhængige aggregation af Epstein-Barr virus-
10 transformerede celler. De fleste Epstein-Barr virus-transformerede celler kan anvendes i en sådan prøve så længe cellerne er i stand til at eksprimere LFA-1-receptormolekylet. Sådanne celler kan fremstilles i overensstemmelse med teknikken angivet af Springer,
15 T.A. et al., J. Exper. Med. 160:1901-1918 (1984), hvilken reference er inkorporeret heri i kraft af henvisninger dertil. Skønt enhver sådan celle kan anvendes i den LFA-1-afhængige bindingsprøve ifølge opfindelsen, foretrækkes det at benytte celler fra JY cellelinien
20 (Terhost, C.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:910 (1976)). Cellerne kan dyrkes i enhver egnet dyrkningsmedium; det foretrækkes imidlertid at dyrke cellerne i RMPI 1640 dyrkningsmedium suppleret med 10% fetal kalveserum og 50 µg/ml gentamycin (Gibco Laboratories, NY). Cellerne bør dyrkes under betingelser, der
25 er egnet for pattedyrcelleproliferation (dvs. ved en temperatur på sædvanligvis 37°C og i en atmosfære med 5% CO₂, ved en relativ fugtighed på 95%, osv.).

2. LFA-1 binding til ICAM-1.

Man har fundet mennesker, hvis lymfocytter mangler familien af LFA-1-receptormolekyler (Anderson, D.C. et al., Fed. Proc. 44:2671-2677 (1985); Anderson, D.C. et al., J. Infect. Dis. 152:668-689 (1985)). Sådanne mennesker siges at lide af leukocytaadhæsionsmangel (LAD). EBV-transformerede celler fra sådanne mennesker samles hverken spontant eller i nærværelse af phorbol-
5 etere i ovennævnte aggregationsprøve. Når sådanne celler blandes med LFA-1-eksprimerende celler observeredes aggregation (Rothlein, R. et al., J. Exper. Med. 163:1132-1149 (1986)) (fig. 1). Det er af stor
10 vigtighed, at disse aggregater ikke dannes, hvis disse celler inkuberedes i nærværelse af anti-LFA-1 antistoffer. Skønt aggregationen krævede LFA-1 indikerede LFA-1-mangelfulde cellers evne til at danne aggregater
15 med LFA-1-holdige celler således at LFA-1 bindingspartneren ikke var LFA-1, men snarere et hidtil ukendt celleadhæsionsmolekyle. Fig. 1 viser den cellulære
20 adhæsionsmekanisme.

B. Intercellulær adhæsionsmolekyle-1 (ICAM-1).

25

Det omhandlede intercellulære adhæsionsmolekyle ICAM-1 blev først identificeret og delvis beskrevet i overensstemmelse med fremgangsmåden af Rothlein, R. et al. (J. Immunol. 137:1270-1274 (1986)). Til påvisning
30 af ICAM-1-molekylet fremstilledes monoklonale antistoffer ud fra miltceller fra mus, immuniseret med celler

fra mennesker med genetisk defekt i LFA-1-ekspression. De opnåede antistoffer underkastedes screening for deres evne til at inhibere aggregationen af LFA-1-eksprimerende celler (fig. 2). Nærmere angivet immuniseredes

5 mus med EBV-transformerede B-celler fra LAD-patienter, som ikke eksprimerer LFA-1-antigenet. Milceller fra disse dyr fjernedes dernæst, sammensmeltedes med myelomaceller og fik lov til at blive monoklonale antistofproducerende hybridomaceller. EBV-transformerede B-

10 celler fra normale mennesker, som eksprimerer LFA-1, inkuberedes dernæst i nærværelse af det monoklonale antistof fra hybridomacellen til identificering af ethvert monoklonalt antistof, som var i stand til at inhibere den phorbolster-medierede, LFA-1-afhængige,

15 spontane aggregation af de EBV-transformerede B-celler. Eftersom hybridomacellerne stammede fra celler, som aldrig havde støt på LFA-1-antigenet, produceredes der intet monoklonalt antistof mod LFA-1. Ethvert antistof, som viste sig at inhibere aggregation må således være i

20 stand til at binde til et antigen som, skønt det ikke er LFA-1, deltager i LFA-1-adhæsiionsprocessen. Skønt enhver fremgangsmåde til opnåelse af sådanne monoklonale antistoffer kan benyttes, foretrækkes det at opnå ICAM-1-bindingsmonoklonale antistoffer ved immunisering

25 af BALB/C-mus, idet metoder og planer beskrevet af Rothlein, R. et al., (J. Immunol. 137: 1270-1274 (1986)) benyttes med Epstein-Barr virustransformerede, perifere mononukleære blodceller fra mennesker med en LFA-1-defekt. Sådanne celler er angivet af Springer,

30 T.A., et al., (J. Exper. Med. 160: 1901-1918 (1984)).

Ved en fremgangsmåde til frembringelse og påvisning af antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1, immuniseres mus med enten EBV-transformerede B-

celler, som eksprimerer både ICAM-1 og LFA-1 eller flere, fortrinsvis med TNF-aktiverede endotelceller, der eksprimerer ICAM-1, men ikke LFA-1. Ved den mest foretrukne fremgangsmåde til frembringelse af hybridomaceller, som producerer anti-ICAM-1-antistoffer, sekvensimmuniseredes en Balb/C-mus med JYceller og med differentierede U937-celler (ATCC CRL1593). Miltcellerne fra sådanne dyr fjernedes, sammensmeltedes med myelomaceller og fik lov til at udvikle i antistofproducerende hybridomaceller. Antistofferne underkastes screening for deres evne til at inhibere den LFA-1-afhængige, phorbolster-inducerede aggregation af en EBV-transformeret celleline, såsom JY-celler, der eksprimerer både LFA-1-receptoren og ICAM-1. Som vist af Rothlein, R., et al., (J. Immunol. 137: 1270-274 (1987)), testes antistoffer, der er i stand til at inhibere en sådan aggregation, dernæst for deres evne til at inhibere den phorbolsterinducerede aggregation af en cellelinie, såsom SKW3 (Dustin, M., et al., J. Exper. Med. 165:672-692 (1987)) hvis evne til spontan aggregation i nærværelse af en phorbolster inhiberes af antistof, der er i stand til at binde LFA-1, men inhiberes ikke af anti-ICAM-1-antistoffer. Antistoffer, der er i stand til at inhibere den phorbolster-inducerede aggregation af celler, såsom JY-celler, men som ikke er i stand til at inhibere den phorbolsterinducerede aggregation af celler, såsom SKW3 celler er sandsynligvis anti-ICAM-1-antistoffer. Alternativt kan antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1 identificeres ved screening for antistoffer, som er i stand til at inhibere den LFA-1-afhængige aggregation af LFA-ekspressionsceller (såsom JY-celler), men som ikke er i stand til at binde til celler, der eksprimerer LFA-1, men lidt

eller intet ICAM-1 (såsom normale granulocytter), eller som er i stand til at binde til celler, som eksprimerer ICAM-1, men ikke LFA-1 (såsom TNF-aktiverede endotelceller). Et andet alternativ er immunofældning
5 fra celler, der eksprimerer ICAM-1, LFA-1, eller begge, under anvendelse af antistoffer, der inhiberer den LFA-1-afhængige aggregation af celler, såsom JY-celler, og bestemmelse af nogle molekylegenskaber af molekylet, der udfældede med antistoffet gennem SDS-PAGE eller en
10 ækvivalent metode. Hvis egenskaberne er de samme som for ICAM-1, formodes det, at antistoffet er et anti-ICAM-1-antistof.

Idet man benytter monoklonale antistoffer, der er fremstillet analogt med ovennævnte, rensedes ICAM-
15 1-celleoverflademolekylet, og dets egenskaber bestemtes. ICAM-1 rensedes fra humane celler eller væv, idet monoklonal antistof affinitetschromatografi benyttedes. Ved en sådan fremgangsmåde kobles et monoklonalt antistof, der er reaktivt med ICAM-1 til en
20 inert kolonnematrix. Enhver fremgangsmåde til opnåelse af en sådan kobling kan benyttes; det foretrækkes imidlertid at benytte fremgangsmåden beskrevet af Oettgen, H.C. et al., J. Biol. Chem. 259:12034 (1984)). Når et cellelysat passerer gennem matrixen adsorberes det til-
25 stedevarende ICAM-1-molekyle og tilbageholdes af matrixen. Ved at ændre pH-værdien eller ionkoncentrationen i kolonnen kan de bundne ICAM-1-molekyler elueres fra kolonnen. Skønt enhver egnet matrix kan benyttes, foretrækkes det, at anvende sepharose (Pharmacia) som ma-
30 trixmaterialet. Fremstillingen af kolonnematricer, og deres anvendelse indenfor proteinrensning er velkendt indenfor teknikken.

På en måde som forstås af en fagmand, kan ovennævnte prøver benyttes til identificering af forbindel-

ser, der er i stand til at dæmpe eller inhibere graden eller udstrækningen af cellulær adhæsion.

ICAM-1 er et celleoverfladeglycoprotein eksprimeret på ikke-hematopoietiske celler, såsom vaskulære
5 endotelceller, thymusepitelceller, visse andre epitelceller, og fibroblaster, og på hematopoietiske celler, såsom vævsmakrofager, mitogen-stimulerede T-lymfocytblaster, og germinale, centrerede B-celler og dendritceller i tonsiler, lymfeknuder og "Peyer's-patches".
10 ICAM-1 eksprimeres stærkt på vaskulære endotelceller i T-celleområder i lymfeknuder og tonsiler, hvilken udviser reaktiv hyperplasia. ICAM-1 eksprimeres i små mængder på perifere blodlymfocytter. Phorbolesterstimuleret differentiering af nogle myelomonocytiske
15 cellelinier øger ICAM-1-ekspressionen kraftigt. ICAM-1 eksprimeres således fortrinsvis på steder med inflammation og eksprimeres generelt ikke af passive celler. ICAM-1-ekspression på dermale fibroblaster øges 3-5 gange med enten interleukin 1 eller γ -interferon i
20 koncentrationer på 10 U/ml i løbet af henholdsvis 4 eller 10 timer. Induktionen er afhængig af protein- og mRNA-syntese og er reversibel.

ICAM-1 udviser molekylvægtuensartethed i forskellige celletyper med en molekylvægt på 97 kd i fibroblaster, 114 kd i den myelomonocytiske celleline U937
25 og 90 kd i B-lymfoblastoidcellen JY. ICAM-1-biosyntese har vist sig at involvere en ca. 73 kd intercellulær precursor. Den ikke-N-glycosylerede form, der stammer fra tunicamycinbehandling (som inhiberer glycosylering)
30 har en molekylvægt på 55 kd.

ICAM-1 isoleret fra phorbolesterstimulerede U937-celler eller fra fibroblastceller giver et tilsvarende stort produkt med en molekylvægt på 60 kd ef-

ter kemisk deglycosylering. ICAM-1 monoklonale antistoffer interfererer med adhæsionen af phytohemagglutininblaster til LFA-1-mangelfulde cellelinier. Prebehandling af fibroblaster, men ikke lymfocytter, med monoklonale antistoffer, der er i stand til at binde ICAM-1, inhiberer lymfocyt-fibroblastadhæsion. Prebehandling af lymfocytter, men ikke fibroblaster, med antistoffer mod LFA-1 har desuden vist sig at inhibere lymfocyt-fibroblastadhæsion.

10 ICAM-1 er således CD 18 kompleksets bindingsligand på leukocytter. Det er inducerbart på fibroblaster og endotelceller in vitro ved inflammatoriske mediatorer, såsom IL-1, γ -interferon og tumornecrosisfaktor indenfor en tidsramme, der er i overensstemmelse med infiltrationen af lymfocytter i inflammatoriske læsioner in vivo (Dustin, M.L., et al., J. Immunol 137:245-254, (1986); Prober, J.S., et al., J. Immunol 137:1893-1896, (1986)). ICMA-1 eksprimeres yderligere på ikke-hæmatopoietiske celler, såsom vaskulære endotelceller, thymusepitelceller, andre epitelceller, og fibroblaster og på hæmatopoietiske celler, såsom vævsmakrofager, mitogen-stimulerede T-lymfocytblaster, og germinalcenter-B-celler og dendritceller i tonsiler, lymfeknuder og "Peyer's patches" (Dustin, M.L. et al., J. Immunol 137:245-254, (1986)). ICAM-1 eksprime-
25 res på keratinocytter i godartede inflammationsskader såsom allergisk eksem, lichen ruber, exanthema, urticaria og sygdomme med blæredannelse. Allergiske hudreaktioner, provokeret ved påførsel af et haptent på huden overfor hvilket patienten er allergisk, viste også en kraftig ICAM-1-ekspression på keratinocytter. På den anden side viste toxiske lapper på huden ikke ICAM-1-ekspression på keratinocytterne. ICAM-1 findes på kera-

tinocytter fra biopsier af hudskader fra forskellige dermatologiske sygdomme og ICAM-1-ekspression induceres på skader fra allergiske laptests, medens keratinocytter fra toxiske laptestskader ikke eksprimerede ICAM-1.

ICAM-1 er derfor et cellesubstrat til hvilket lymfocytter kan fæstnes, således at lymfocytterne kan migrere til steder med en inflammation og/eller gennemføre forskellige effektorfunktioner som bidrager til denne inflammation. Sådanne funktioner omfatter produktionen af antistof, lysis af virusinficerede målceller, osv. Udtrykket "inflammation", sådan som det benyttes heri, har til hensigt kun at omfatte reaktioner fra det specifikke forsvarssystem. Sådanne som det benyttes heri har udtrykket "specifikt forsvarssystem" til hensigt at referere til den bestanddel i immunsystemet, som reagerer i nærværelse af specifikke antigener. Inflammation siges at opstå som en reaktion fra det specifikke forsvarssystem, hvis inflammationen er forårsaget af, medieret af, eller knyttet til en reaktion fra det specifikke forsvarssystem. Eksempler på inflammationer, som opstår fra en reaktion fra det specifikke forsvarssystem omfatter reaktionen overfor antigener, såsom rubellavirus, autoimmunsygdomme, forsinket type af hypersensitivitetsreaktion medieret af T-celler (som det f.eks. ses hos mennesker, hvis test er "positiv" i Mantoux-testen), osv.

C. Kloning af ICAM-1-genet.

Enhver af en række forskellige metoder kan benyttes til kloning til ICAM-1-genet. En sådan fremgangsmåde medfører analyse af et shuttelvektorbibliotek af cDNA-indføjelser (stammende fra en ICAM-1-eksprimerende celle) for tilstedeværelsen af en indføjelser, som indeholder ICAM-1-genet. En sådan analyse kan gennemføres ved transfektions af celler med vektoren og dernæst prøvning for ICAM-1-ekspression. Den foretrukne fremgangsmåde til kloning af dette gen medfører bestemmelse af ICAM-1-molekylets aminosyresekvens. Til gennemførelse af denne opgave skal ICAM-1-protein renses og analyseres af automatiserede sekvenatorer. Molekylet kan alternativt underkastes fragmentering med cyanogenbromid eller med proteaser, såsom papain, chymotrypsin eller trypsin (Oike, Y. et al., J. Biol. Chem. 257:9751-9758 (1982); Liu, C. et al., Int. J. Pept. Protein Res. 21:209-215 (1983)).

Skønt det er muligt at bestemme ICAM-1's hele aminosyresekvens, foretrækkes det at bestemme molekylets peptidfragmentsekvens. Hvis peptidet er mere end 10 aminosyrer lang, er sekvensinformationen sædvanligvis tilstrækkelig til at man kan kloner et gen, såsom genet for ICAM-1.

Sekvensen af aminosyrerester i et peptid betegnes heri enten gennem anvendelsen af deres sædvanlige anvendte 3-bogstavsbetegnelser eller ved deres enkelt-bogstavsbetegnelser. En liste af disse 3-bogstavs- og 1-bogstavsbetegnelser kan findes i tekstbøger såsom Biochemistry, Lehninger, A., Worth Publishers, New York, NY (1970). Når en sådan sekvens opføres lodret, er det hensigten at amino-terminal-resten skal

stå øverst på listen og carboxy-terminal-resten af peptidet skal stå nederst på listen. Når sekvensen opføres vandret er det på samme måde hensigten at aminosyre-terminal-resten skal stå til venstre, hvorimod
5 carboxy-terminal-resten skal stå til højre. Aminosyre-resterne i et peptid kan adskilles med bindestreger. Sådanne bindestreger har alene til hensigt at lette en sekvenspræsentation. Som et rent illustrativt eksempel indikerer aminosyresekvensen betegnet:

10

-Gly-Ala-Ser-Phe-

at en Ala-rest er bundet til Gly's carboxygruppe, og at en Ser-rest er bundet til Ala-restens carboxygruppe og
15 til en Phe-rests aminogruppe. Betegnelsen indikerer yderligere at aminosyresekvensen indeholder tetrapeptidet Gly-Ala-Ser-Phe. Det er ikke hensigten at betegnelsen skal begrænse aminosyresekvensen til dette ene tetrapeptid, men det er hensigten at inkludere (1) tetrapeptidet indeholdende en eller flere aminosyrerester,
20 bundet til enten dets amino- eller carboxyende, (2) tetrapeptidet indeholdende en eller flere aminosyre-rester, bundet til begge dets amino- og carboxyender, (3) tetrapeptidet, som ikke indeholder yderligere aminosyrerester.
25

Når et eller flere egnede peptidfragmenter er blevet sekvenseret, undersøges DNA-sekvenser, der er i stand til at kode for dem. Fordi den genetiske kode er degenereret, kan mere end et codon benyttes til at
30 kode for en bestemt aminosyre (Watson, J.D., I: Molecular Biology of the Gene, 3. udg., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977), s. 356-357). Peptidfragmenterne analyseres til identificering af sekvenser

af aminosyrer, som kan kodes af oligonukleotider med den laveste grad af degenerering. Dette gennemføres fortrinsvis ved identificering af sekvenser, som indeholder aminosyrer, der kun kodes af et enkelt codon.

5 Skønt sådanne aminosyresekvenser en gang imellem kan kodes af kun et enkelt oligonucleotid kan aminosyresekvensen ofte kodes af et vilkårlig nucleotid fra et sæt af lignende oligonucleotider. Medens alle medlemmer af sættet indeholder oligonucleotider, som

10 er i stand til at kode for peptidfragmentet, og således potentielt indeholder den samme nucleotidsekvens som genet, der koder for peptidfragmentet, er det væsentligt at kun et medlem af sættet indholder en nucleotidsekvens, der er identisk med dette gens nukleotid-

15 sekvens. Fordi dette medlem findes i sættet og er i stand til at hybridisere til DNA, selv i nærværelse af andre medlemmer i sættet, er det muligt at benytte det ufraktionerede sæt af oligonucleotider på samme måde som man ville anvende en enkelt oligonucleotid til

20 kloning af genet, som koder for peptidet.

På en måde analogt med ovennævnte kan man anvende et oligonucleotid (eller sæt af oligonucleotider), som indeholder en nucleotidsekvens, som er komplementær til oligonucleotidsekvensen eller sættet

25 af sekvenser, der er i stand til at kode for peptidfragmentet.

Et egnet oligonucleotid eller sæt af oligonucleotider, som er i stand til at kode for et fragment af ICAM-1-genet (eller som er komplementær til

30 et sådant oligonucleotid, eller sæt af oligonucleotider) identificeres (idet ovennævnte fremgangsmåde benyttes), syntetiseres og hybridiseres, ved metoder der er velkendte indenfor teknikken, overfor et DNA eller,

- mere foretrukket, et cDNA-præparat, som stammer fra humane celler, der er i stand til at eksprimere ICAM-1-gensekvenser. Metoder til nucleinsyrehybridisering er angivet af Maniatis, T. et al., I: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Coldspring Harbor, NY (1982), og af Haymes, B.D. et al., I: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985), hvilke referencer er inkorporeret heri ved henvisning. Den benyttede DNA eller cDNA kilde vil fortrinsvis være blevet beriget for ICAM-1-sekvenser. En sådan berigeles kan meget nemt opnås ud fra cDNA opnået ved ekstraktion af RNA fra celler dyrket under betingelser som inducerer ICAM-1-syntese (såsom U937 dyrket i nærværelse af phorbolestere, osv.).
- 15 Teknikker såsom, eller svarende til dem, der er beskrevet ovenfor, har med succes muliggjort kloning af gener til human aldehyd-dehydrogenaser (Hsu, L.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3771-3775 (1985)), fibronectin (Suzuki, S. et al., Eur. Mol. Biol. Organ. J. 4:2519-2524 (1985)), det humane estrogen-receptorgen (Walter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7889-7893 (1985)), vævstype plasminogen-aktivator (Pennica, D. et al., Nature 301:214-221 (1983)) og humant ende-placentar-basisk-phosphatase-
- 25 komplementært-DNA (Kam, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8715-8719 (1985)).

Ved en foretrukken alternativ fremgangsmåde til kloning af ICAM-1-genet fremstilles et bibliotek af ekspressionsvektorer ved kloning af DNA eller, mere fore-

30 trukket cDNA, fra en celle, der er i stand til at eksprimere ICAM-1 ind i en ekspressionsvektor. Biblioteket screenes dernæst for medlemmer, der er i stand til at eksprimere et protein, som binder til anti-

ICAM-1-antistof, og som har en nucleotidsekvens, der er i stand til at kode for polypeptider, som har den samme aminosyresekvens som ICAM-1 eller fragmenter af ICAM-1.

- 5 Det klonede ICAM-1-gen, opnået gennem ovennævnte fremgangsmåder, kan operabelt bindes til en ekspressionsvektor og introduceres i bakterie- eller eukaryotiske celler til produktion af ICAM-1-protein. Teknikker for sådanne manipulationer er angivet af
10 Maniatis. T. et al., supra, og er velkendte indenfor teknikken.

D. Anvendelser af LFA-1-afhængige aggregationsprøver.

15

- Ovennævnte prøve, hvor man er i stand til at måle LFA-1-afhængig aggregation kan benyttes til identifikation af midler, der virker som antagonist til inhibering af omfanget af LFA-1-afhængig aggregation.
20 Sådanne antagonist kan virke ved at svække LFA-1 eller ICAM-1's evne til at formidle aggregation. Sådanne midler omfatter således immunoglobuliner, såsom et antistof der er i stand til at binde til enten LFA-1 eller ICAM-1. Ikke-immunoglobuline (dvs. kemiske) midler
25 kan yderligere undersøges under anvendelse af ovennævnte prøve, for at bestemme om de er antagonist til LFA-1-aggregation.

E. Anvendelser af antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1 receptorproteiner.

I. Anti-inflammatoriske midler.

5

Monoklonale antistoffer til medlemmer af CD 18-komplekset inhiberer mange leukocytters adhæsionsafhængige funktioner, herunder binding til endothelium (Haskard, D., et al., J. Immunol. 137:2901-2906 (1986)), homotypiske adhæsioner (Rothlein, R., et al., J. Exp. Med. 163:1132-1149 (1986)), antigen- og mitogeninduceret proliferation af lymfocytter (Davignon, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78:4535-4539 (1981)), antistofdannelse (Fischer, A., et al., J. Immunol. 136:3198-3203 (1986)), og alle leukocytters effektorfunktioner, såsom cytotoxiske T-cellers lytiske aktivitet (Krensky, A.M., et al., J. Immunol. 132:2180-2182 (1984)), makrofager (Strassman, G., et al., J. Immunol. 136:4328-4333 (1986)), og alle celler involveret i antistof-afhængige cellecytotoxiske reaktioner (Kohl, S., et al., J. Immunol. 133:2972-2978 (1984)). I alle ovennævnte funktioner inhiberer antistofferne leukocyttens evne til at hæfte til det passende cellesubstrat, som på sin side inhiberer det endelige resultat.

25

Som omtalt ovenfor er bindingen af ICAM-1-molekyler til medlemmer af LFA-1-familien af molekyler af stor vigtighed ved cellulær adhæsion. Gennem adhæsionsprocessen er lymfocytter i stand til kontinuert at undersøge et dyr for nærværelsen af fremmede antigener. Skønt disse processer normalt er ønskelige, er de også årsagen til organtransplantationafvisning, vævstransplantationafvisning og mange autoimmune sygdomme. Et-

30

hvert middel, der er i stand til at dæmpe eller inhibere cellulær adhæsion, vil således være meget ønskværdigt hos patienter, der underkastes organtransplantationer, vævstransplantationer eller hos autoimmune patienter.

Monoklonale antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1 er særdeles egnede som anti-inflammatoriske midler hos et pattedyr. Sådanne midler adskiller sig i væsentlig grad fra sædvanlige anti-inflammatoriske midler, idet de er i stand til selektivt inhiberende adhæsion og ikke giver andre bivirkninger såsom nephrotoxicitet, som findes hos sædvanlige midler. Monoklonale antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1 kan derfor benyttes til at hindre organ- eller vævsafvisning, eller modificere autoimmune reaktioner uden frygt for sådanne bivirkninger hos pattedyret.

Det er af stor vigtighed, at anvendelsen af monoklonale antistoffer, der er i stand til at genkende ICAM-1 muliggør gennemførsel af organtransplantationer selv mellem individer med stort HLA-uensartethed.

2. Suppressorer af forsinket-type-hypersensitivitetsreaktion.

Da ICAM-1-molekyler oftest eksprimeres på
5 steder med inflammation, såsom de steder, der er in-
volveret i forsinket-type-hypersensitivitetsreaktion
har antistoffer (især monoklonale antistoffer), der er
i stand til at binde til ICAM-1-molekyler tera-
peutisk mulighed for at dæmpe eller eliminere sådanne
10 reaktioner. Denne mulige terapeutiske anvendelse kan
udnyttes på to måder. For det første kan et middel in-
deholdende et monoklonalt antistof overfor ICAM-1 admi-
nistreres til en patient, der lider af forsinket-
type-hypersensitivitetsreaktion. Sådanne midler kan
15 f.eks. gives til et individ, som har været i kontakt
med antigener såsom giftig efeu, giftig eg, osv. Ved en
anden udførelsesform administreres det monoklonale an-
tistof, der er i stand til at binde til ICAM-1, til
en patient sammen med et antigen, for at hindre en
20 efterfølgende inflammationsreaktion. Denne co-
administrering af et antigen og et ICAM-1-bindende
monoklonalt antistof kan således midlertidigt få et in-
divid til i det efterfølgende at tolerere udsættelse
for dette gen.

25

3. Behandling af kronisk inflammationssygdom.

Eftersom LAD-patienter som mangler LFA-1 ikke
30 opnår en inflammatorisk reaktion, formodes det at anta-
gonisme af LFA-1's naturlige ligand, ICAM-1 også vil
inhibere inflammatorisk reaktion. Antistoffers evne til
overfor ICAM-1 at inhibere inflammation tilvejebringer

det grundlæggende for deres terapeutiske anvendelse ved behandlingen af kroniske inflammationssygdomme og autoimmune sygdomme, såsom lupus erythematosus, autoimmune thyroiditis, eksperimentel allergisk encephalomyelitis 5 (EAE) multipel sclerose, nogle former for diabetes Reynaud's syndrom, reumatoid arthritis, osv. De monoklonale antistoffer, der er i stand til at binde ICAM-1, kan sædvanligvis anvendes til behandlingen af disse sygdomme, der for tiden behandles gennem steroid-10 terapi.

4. Diagnostiske og prognostiske anvendelser.

15

Da ICAM-1 oftes eksprimeres på steder med inflammation kan monoklonale antistoffer, der er i stand til at binde til ICAM-1, anvendes som et middel til at beskrive eller visualisere steder med infektion og 20 inflammation hos en patient. Ved en sådan anvendelse mærkes de monoklonale antistoffer detekterbart gennem anvendelsen af radioisotoper, affinitetsmærker (såsom biotin, avidin, osv.) fluorescerende markører, paramagnetiske atomer, osv. Fremgangsmåder til gennemførelse 25 af en sådan mærkning er velkendt inden for teknikken. Klinisk anvendelse af antistoffer til diagnostisk beskrivelse er angivet af Grossman, H.B., Urol. Clin. North Amer. 13:465-474 (1986)), Unger, E.C. et al., Invest. Radiol. 20:693-700 (1985)), og Khaw, B.A. et 30 al., Science 209:295-297 (1980)).

Tilstedeværelsen af inflammationen kan desuden påvises gennem anvendelsen af bindingsligander, såsom mRNA, cDNA eller DNA, som binder til ICAM-1-

gensekvenser eller til ICAM-1-mRNA-sekvenser hos celler som eksprimerer ICAM-1. Teknikker og gennemførelse af sådanne hybridiseringsprøver er beskrevet af Maniatais, T. (supra).

5 Påvisningen af foci af sådanne detekterbart mærkede antistoffer er angivende for et sted med inflammation eller tumorudvikling. Ved en udførelsesform gennemføres denne undersøgelse for inflammation ved at fjerne vævsprøver eller blod og inkubere sådanne prøver
10 i nærværelse af detekterbart mærkede antistoffer. Ved en foretrukken udførelsesform gennemføres denne teknik på en ikke-invasiv måde gennem anvendelse af magnetisk billedoptagelse, fluorografi, osv. En sådan diagnostisk test kan benyttes ved overvågning af organtransplan-
15 tionsafvisninger for tidlige tegn på potentiel vævsafvisning. Sådanne prøver kan desuden gennemføres i forsøg på at bestemme et individs predilektion for rheumatoid arthritis eller andre kroniske inflammationssygdomme.

20

5. Supplement til introduktionen af antigen materiale administreret til terapeutiske og diagnostiske formål.

25

Immunreaktioner overfor terapeutiske eller diagnostiske midler, såsom bovin insulin, interferon, vævstype-palsminogen-aktivator eller murine monoklonale antistoffer, svækker i det væsentlige den terapeutiske
30 eller diagnostiske værdi af sådanne midler, og kan faktisk forårsage sygdomme såsom serumsygdom. En sådan situation kan afhjælpes gennem anvendelsen af de omhandlede antistoffer. Ved denne udførelsesform vil så-

danne antistoffer blive administreret sammen med et terapeutisk eller diagnostisk middel. Tilsætningen af antistofferne hindrer modtageren i at genkende midlet og hindre derfor modtageren i initiering af immunreaktion overfor dette. Fravær af en sådan immunreaktion gør det muligt for patienten at modtage yderligere administreringer af det terapeutiske eller diagnostiske middel.

10

F. Anvendelser af intercellulær adhæsionsmolekyle-1 (ICAM-1).

ICAM-1 er en bindingspartner af LFA-1. ICAM-1 eller dets funktionelle derivater kan som sådan anvendes ombytteligt med antistoffer, der er i stand til at binde til LFA-1, ved behandling af sygdom. I opløst form kan sådanne molekyler således anvendes til inhibering af inflammation, organafvisning, vævsafvisning, osv. ICAM-1 eller dets funktionelle derivater kan benyttes på samme måde som anti-ICAM-1-antistoffer til at mindske immunogeniciteten af terapeutiske eller diagnostiske midler.

ICAM-1, dets funktionelle derivater og dets antagonist kan benyttes til blokering af metastasis eller proliferation af tumorceller, som eksprimerer enten ICAM-1 eller LFA-1 på deres overflader. En lang række fremgangsmåder kan benyttes til opnåelse af et sådant mål. Migreringen af hæmatopoietiske celler kræver f.eks. LFA-1-ICAM-1-binding. En sådan bindingsantagonist undertrykker derfor denne migrering og blokerer metastasis af tumorceller af leukocytherkomst. Toxin-derivatiserede molekyler, der er i

stand til at binde til enten ICAM-1 eller et medlem af LFA-1-familien af molekyler kan alternativt administreres til en patient. Når sådanne toxinafledte molekyler binder til tumorceller, der eksprimerer ICAM-1 eller et
5 medlem af LFA-1-familien af molekyler, dræber tilstedeværelsen af toxinet tumorcellerne, hvorved proliferation af tumoren inhiberes.

10 G. Anvendelser af ikke-immunoglobuline antagonist af ICAM-1-afhængig adhæsion.

ICAM-1-afhængig adhæsion kan inhiberes ved ikke-immunoglobuline antagonist, der er i stand til at
15 binde til ICAM-1 eller LFA-1. Et eksempel på en ikke-immunoglobulin antagonist af ICAM-1, er LFA-1. Et eksempel på en ikke-immunoglobulin antagonist, som binder til LFA-1, er ICAM-1. Gennem anvendelsen af de ovennævnte prøver, kan ikke-immunoglobuline antagonist
20 yderligere identificeres og renses. Ikke-immunoglobuline antagonist af ICAM-1-afhængig adhæsion kan benyttes til det samme formål som antistoffer til LFA-1 eller antistoffer til ICAM-1.

25

H. Administrering af de omhandlede midler.

De terapeutiske virkninger af ICAM-1 kan opnås ved at forsyne en patient med hele ICAM-1-molekylet el-
30 ler ethvert terapeutisk aktivt peptidfragment deraf.

ICAM-1 og dets funktionelle derivater kan opnås enten syntetisk, gennem anvendelsen af rekombinant-DNA-teknologi eller ved proteolysis. De terapeutiske forde-

- le ved ICAM-1 kan øges gennem anvendelsen af funktionelle derivater af ICAM-1, der indeholder yderligere tilsatte aminosyrerester, for at øge koblingen til bærere eller øge aktiviteten af ICAM-1. Opfindelsen omfatter yderligere funktionelle derivater af ICAM-1, som mangler visse aminosyrerester, eller som indeholder ændrede aminosyrerester, så længe sådanne derivater besidder evnen til celluæradhæsionspåvirkning.
- 10 Både de omhandlede antistoffer og det nævnte ICAM-1-molekyle siges at være "i det væsentlige uden naturlig forurening", hvis præparaterne, som indeholder disse, i det væsentlige ikke indeholder materialer, som normalt og naturligt findes i disse produkter.
- 15 Når man giver en patient antistoffer, eller fragmenter deraf, der er i stand til at binde til ICAM-1, eller når man giver ICAM-1 (eller i fragment, variant eller derivat deraf) til en modtagende patient, vil dosis af administreret middel variere afhængigt af
- 20 faktorer såsom patientens alder, vægt, højde, køn, generel medicinsk tilstand, tidligere medicinsk historie, osv. Det er sædvanligvis ønskeligt at forsyne modtageren med en dosis antistof, som ligger indenfor området fra ca. 1 pg/kg til ca. 10 mg/kg
- 25 (patientens kropsvægt), skønt en mindre eller større dosis kan administreres. Når man til en patient fører ICAM-1-molekyler eller deres funktionelle derivater, foretrækkes det at administrere sådanne molekyler i en dosis, som også ligger indenfor fra ca. 1 pg/kg til 10
- 30 mg/kg (patientens kropsvægt) skønt en mindre eller større dosis også kan administreres.

Som omtalt nedenfor kan den terapeutiske virkningsfulde dosis mindskes, hvis anti-ICAM-1-anti-

stoffet co-administreres med et anti-LFA-1-antistof. Som benyttet heri siges to antistoffer (eller deres funktionelle derivater) at blive co-administreret til en patient, hvis de har været administreret til patienten indenfor et tidsrum, således at begge forbindelser kan påvises i patientens serum.

Både antistoffet, der er i stand til at binde til ICAM-1, og ICAM-1 i sig selv kan administreres til patienter intravenøst, intramuskulært, subkutant, enteralt eller parenteralt. Når antistof eller ICAM-1 administreres ved injektionen kan administreringen ske ved kontinuær infusion, eller ved enkel eller mange boli.

Det er med de omhandlede anti-inflammatoriske midler tilsigtet at give dem til modtagende individer i en mængde, der er tilstrækkelig til at undertrykke inflammation. En mængde siges at være tilstrækkelig til at "undertrykke" inflammation, hvis dosis, administrationsmåde, osv af midlet, er tilstrækkelig til at dæmpe eller hindre inflammation.

De omhandlede anti-inflammatoriske midler kan tilføres enten før eller ved indtrædelse af inflammation (for at undertrykke den forventede inflammation) eller efter start af inflammation.

Et middel siges at være "farmakologisk acceptabelt" hvis dets administrering kan tolereres af en modtagende patient. Et sådant middel siges at blive administreret i en "terapeutisk virkningsfuld mængde", hvis den administrerede mængde er fysiologisk signifikant. Et middel er fysiologisk signifikant, hvis dets tilstedeværelse resulterer i en påviselig ændring i fysiologien hos en modtagne patient.

Antistoffet og ICAM-1molekyler kan formuleres i overensstemmelse med kendte fremgangsmåder til frem-

stilling af farmaceutisk nyttige midler, hvor disse materialer eller deres funktionelle derivater kombineres i en blanding med en farmaceutisk acceptabel bærevehikel. Egnede vehikler og deres formulering, herunder
5 andre humane proteiner, f.eks. humant serum albuminer beskrevet f.eks. i Remington's Pharmaceutical Sciences (16. ud., Osol, A., Ed., Mack, Easton PA (1980)). For at danne et farmaceutisk acceptabelt middel, der er egnet til effektiv administrering, vil sådanne midler
10 indeholde en virkningsfuld mængde af anti-ICAM-1-antistof eller ICAM-1-molekyle eller deres funktionelle derivater, sammen med en egnet mængde af et bærevehikel.

Yderligere farmaceutiske fremgangsmåder kan anvendes til at kontrollere virkningsvarigheden. Præparater med kontrolleret frigivelse kan opnås ved anvendelsen af polymere til kompleksdannelse eller absorption af anti-ICAM-1-antistof eller ICAM-1 eller deres funktionelle derivater. Den kontrollerede tilførsel kan gennemføres ved at vælge passende makromolekyler
20 (f.eks. polyestere, polyamino-syrer, polyvinyl, pyrrolidon, ethylenvinylacetat, methylcellulose, carboxymethylcellulose eller protamin, sulfat) og koncentrationen af makromolekyler samt fremgangsmåderne til inkorporering, for at kontrollere frigivelse. En anden egnet
25 fremgangsmåde til at kontrollere virkningsvarighed hos præparater med kontrolleret frigivelse er inkorporering af anti-ICAM-1-antistof eller ICAM-1-molekyler, eller deres funktionelle derivater, i partikler af et polymert materiale, såsom polyestere, polyamino-syrer, hydrogeler, poly(mælkesyre)- eller ethylenvinylacetatco-polymerer. I stedet for inkorporering af disse midler i
30 de polymere partikler er det alternativt muligt at omslutte disse materialer i mikrokapsler fremstillet

f.eks. ved coacerveringsteknikker eller ved interfacial polymerisation, f.eks. henholdsvis hydroxymethylcellulose- eller gelatinemikrokapsler og poly(methylmethacrylat)mikrokapsler eller i kolloide medikament-
5 tilførselssystemer, f.eks. liposomer, albumin mikrosphærer, mikroemulsioner, nanopartikler og nanokapsler eller i makroemulsioner. Sådanne teknikker er beskrevet i Reminton's Pharmaceutical Sciences (1980).

Opfindelsen belyses nu nærmere ved hjælp af de
10 efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

Dyrkning af pattedyrceller.

De omhandlede EBV-transformerede og hybridoma-
15 celler opbevarede sædvanligvis i RPMI 1640 dyrkningsmedium, suppleret med 20 mM L-glutamin, 50 µg/ml gentamicin og 10% fetal bovin- (eller fetal kalve-) sera. Cellerne dyrkedes ved 37°C i en atmosfære med 5% CO₂, 95% luftfugtighed.

20 Til etablering af Epstein-Barr virus-(EBV-) transformanter inkuberedes 10⁶ T-celle-fattige perifere mononukleære blodceller/ml i RPMI 1640 medium, suppleret med 20% fetal kalveserum (FCS), og 50 µg/ml gentamicin i 16 timer med EBV-holdig supernatant af
25 B95-8-celler (Thorley-Lawson, D.A. et al., J. Exper. Med. 146:495 (1977)). Celler i 0,2 ml aliquot anbragtes i 10 mikrotiter brønde. Mediet erstattedes med RPMI 1640 medium (suppleret med 20% fetal kalveserum og 50 µg/ml gentamicin) indtil cellervækst konstateredes.
30 Cellerne voksede i de fleste brønde og ekspanderes i det samme medium. Phytohemagglutinin (PHA)-blaster etableredes ved 10⁶ celler/ml i RPMI 1640 medium (suppleret med 20% fetal kalveserum) indeholdende en

1:800 fortynding af PHA-P (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI). PHA-linier ekspanderedes med interleukin 2 (IL-2)-konditioneret medium og pulseredes ugentlig med PHA (Cantrell, D.A. et al., J. Exper. Med. 5 158:1895 (1983)). Ovennævnte fremgangsmåde er angivet af Springer, T. et al., J. Exper. Med. 160:1901-1918 (1984). Celler opnået gennem ovennævnte fremgangsmåde screenes dernæst med anti-LFA-1-antistoffer til bestemmelse af hvorvidt de eksprimerer LFA-1-antigenet. 10 Sådanne antistoffer er angivet af Sanches-Madrid, F. et al., J. Exper. Med. 158:1785 (1983).

Eksempel 2.

Prøver for cellulær aggregation og adhæsion.

15 For at prøve udstrækningen af cellulær adhæsion anvendtes aggregationsprøver. De i sådanne prøver benyttede cellelinier vaskedes 2 gange med RPMI 1640 medium indeholdende 5 mM Hepes-puffer (Sigma Chemical Co., St. Louis) og genopslæmmedes til en koncentration 20 på 2×10^6 celler/ml. Til fladbundede, 96-brøndes mikrotiterplader (no. 3596; Costar, Cambridge, MA) sættes 50 μ l af passende monoklonalt antistof-supernatant eller 50 μ l komplet medium med eller uden rensede monoklonale antistoffer, 50 μ l fuldstændigt medium in- 25 deholdende 200 ng/ml af phorbolesteren, phorbolmyristatetat (PMA) og 100 μ l celler i en koncentration på 2×10^6 celler/ml i fuldstændigt medium. Dette gav en endelig koncentration på 50 ng/ml PMA og 2×10^5 celler/brønd. Cellerne fik lov til spontant at sætte 30 sig, og graden af aggregationen registreredes på forskellige tidspunkter. Resultater lå på fra 0-5+, hvor 0 indikerer at i det væsentlige ingen celler fandtes i klynger; 1+ indikerede at højst 10% af cellerne

var i aggregater; 2+ indikerede at højst 50% af cellerne var samlet; 3+ indikerede at op til 100% af cellerne var i små, løse klynger; 4+ indikerede at op til 100% af cellerne var samlet i større klynger; 5 og 5+ indikerede at 100% af cellerne var i store meget kompakte aggregater. Til opnåelse af et mere kvantitativt estimat af cellulær adhæsion sættes reagenser og celler til 5 ml polystyrenrør på samme måde som ovenfor. Tuberne anbragtes i et stativ på en rotationsryster ved 37°C. Efter en time ved ca. 200 omdr./min. 10 anbragtes 10 µl cellesuspensionen i et hæmocytometer og antallet af frie celler bestemtes. Procent aggregation bestemtes ved den følgende ligning:

$$x^{15} \% \text{ aggregation} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{antal frie celler}}{\text{antal tilførte celler}} \right)$$

Antallet af tilførte celler i ovennævnte formel er antallet af celler per ml i et kontrolrør, der kun 20 indeholder celler og fuldstændigt medium som ikke er blevet inkuberet. Antallet af frie celler i ovennævnte ligning svarer til antallet af ikke-aggregerede celler per ml fra eksperimentalerør. Ovennævnte fremgangsmåde er beskrevet af Rothlein, R., et al., J.Exper. Med. 25 163:1132-1149 (1986).

Eksempel 3.

LFA-1-afhængig cellulær aggregation.

Den kvalitative aggregationsprøve beskrevet i 30 eksempel 2 gennemførtes med anvendelse af den Epstein-Barr-transformerede cellelinie JY. Ved tilsætning af PMA til dyrkningsmediet i mikrotiterpladerne observeredes aggregation af celler. Tidsforkortede videooptagel-

ser viste, at JY-celler på bunden af mikrotiterbrøndene var bevægelige og udviste aktiv membrankrusning og pseudopodiabevægelse. Kontakt mellem nabocellers pseudopodia resulterede ofte i celle-celleadhærence. Hvis
5 adhærence fastholdtes bevægede området med cellekontakt sig til uropodet. Kontakt kunne opretholdes til trods for kraftige cellebevægelser og cellernes trækken i forskellige retninger. Den primære forskel mellem PMA-behandlede og ubehandlede celler viste sig at være
10 stabiliteten af disse kontakter når de først var dannet. Med PMA udvikledes klynger af celler, der voksede i størrelse efterhånden som yderligere celler hæftedes til deres periferi.

Som et andet middel til måling af adhæsion benyttedes den kvantitative prøve beskrevet i eksempel 2. Cellesuspensioner rystedes ved 200 omdr./min. i 2 timer, overførtes til et hæmocytometer, og celler, der ikke var i aggregater optaltes. I fravær af PMA var 42% (standardafvigelse = 20%, N = 6) af JY-cellerne i
20 aggregater efter 2 timer, medens JY-celler inkuberet under identiske betingelser med 50 ng/ml PMA havde 87% (standardafvigelse = 8%, N = 6) af cellerne i aggregater. Kinetiske studier af aggregation viste at PMA øgede hastigheden og størrelsen på alle testede tidspunkter (fig. 3).
25

Eksempel 4.

Inhibering af aggregation af celler under anvendelse af anti-LFA-1-monoklonale antistoffer.

30 For at undersøge virkningen af anti-LFA-1 monoklonale antistoffer på PMA-induceret cellulær aggregation sættes sådanne antistoffer til celler inkuberet i overensstemmelse med den kvalitative aggregationsprøve

41

fra eksempel 2. De monoklonale antistoffer viste sig at inhibere dannelsen af celleaggregater enten i nærværelse eller fravær af PMA. Både $F(ab')_2$ - og Fab' -fragmenterne af monoklonale antistoffer var overfor

5 LFA-1's α -kæde i stand til at inhibere cellulær aggregation. Hvor i det væsentlige 100% celler dannede aggregater fravær af anti-LFA-1-antistof viste det sig at højst 20% af cellerne var i aggregater når antistof tilsattes. Resultaterne af dette forsøg er beskrevet af

10 Rothlein, R, et al. (J. Exper. Med. 163:1132-1149 (1986)).

Eksempel 5.

Cellulær aggregation behøver LFA-1-receptoren.

15 EBV-transformerede lymfoblastoidceller fremstilledes fra patienter analogt med metoden beskrevet i eksempel 1. Sådanne celler underkastedes screening over for monoklonale antistoffer, der er i stand til at genkende LFA-1 og cellerne viste sig at være LFA-1-mangel-

20 fulde.

Den kvalitative aggregationsprøve beskrevet i eksempel 2 anvendtes, idet de ovennævnte LFA-1-mangelfulde celler benyttedes. Sådanne celler var ikke i stand til spontant at danne aggregater, selv i nærværelse af PMA.

25

Eksempel 6

Optagelsen af ICAM-1.

De LFA-1-mangelfulde celler fra eksempel 5 mær-

30 kedes med carboxyfluoresceindiacetat (Patarroyo, M. et al., Cell. Immunol. 63:237-248 (1981)). De mærkede celler blandedes i et forhold på 1:10 med autologe eller JY-celler, og procentdelen af fluorescein-mærkede

celler i aggregatet bestemmes i overensstemmelse med fremgangsmåden af Rothlein, R. et al., J. Exper. Med. 163:1132-1149 (1986). De LFA-1-mangelfulde celler viste sig at være i stand til at coaggregere med LFA-1 eksprimerende celler (fig. 4).

For at afgøre om LFA-1 kun var vigtig ved dannelse af aggregater eller ved deres bevarelse sættes antistoffer, der er i stand til at binde til LFA-1, til de ovennævnte præformede aggregater. Tilsætningen af antistof viste sig kraftigt at sprænge den præformede aggregation. Tidsforkortet videooptagelse bekræftede at tilsætningen af de monoklonale antistoffer til præformede aggregater startede sprængning indenfor 2 timer (Tabel. 1). Efter tilsætning af monoklonale antistoffer mod LFA-1, fortsatte pseudopodiale bevægelser og formændringer hos individuelle celler indenfor aggregatet uændret. Individuelle celler disassocierede gradvis fra aggregatets periferi; efter 8 timer var de fleste celler dispergerede. Ved baglæns kørsel af tidsforkortet videooptagelse viste sprængningen af præformede aggregater med LFA-1-monoklonale antistoffer at være ækvivalent med aggregationsprocessen i fravær af LFA-1-monoklonalt antistof.

Tabel 1

Anti-LFA-1-monoklonale antistoffers evne til at
sprænge præformede PMA-inducerede JY-celler-aggregater.

5

Forsøg	Aggregationsregistrering		
	18 timer		
	2 timer ^a	-mAb	+mAb
10 1	4+	4+	1+ ^b
2	3+	4+	1+ ^c
3	5+	5+	1+ ^d

Aggregation i den kvalitative mikrotiter-pladeprøve re-
gistreredes visuelt. Med anti-LFA-1 tilstede gennem
prøveperioden var aggregationen højst 1+.

^aMængden af aggregation lige før tilsætning af mono-
klonalt antistof efter 2 timer.

^bTS1/18 + TS1/22.

^cTS1/18.

25 ^dTS1/22.

Eksempel 7.Nødvendigheden af divalente ioner
til LFA-1-afhængig aggregation.

LFA-1-afhængige adhæsioner mellem cytotoxiske
5 T-celler og målceller kræver tilstedeværelsen af magnesium
(Martz, E. J. Cell. Biol. 84:584-598 (1980)).
PMA-induceret JY-celleaggregation testedes for divalent
kationafhængighed. JY-celler dannede ikke aggregater
(idet prøven fra eksempel 2 benyttedes) i medium
10 uden calcium- eller magnesiumioner. Tilsætningen af
divalent magnesium understøttede aggregation ved
koncentrationer helt ned til 0,3 mM. Tilsætningen af
calciumioner alene havde ringe effekt. Calciumioner
viste sig imidlertid at øge magnesiumioners evne til
15 at understøtte PMA-induceret aggregation. Når 1,25
mM calciumioner sættes til mediet, viste magnesium-
ionkoncentrationer helt ned til 0,02 mM at støtte
aggregationen. Disse data viser at den LFA-1 afhængige
aggregation af celler kræver magnesiumioner, og at
20 calciumioner, skønt de i sig selv er utilstrækkelige,
kan virke synergistisk med magnesiumioner til at give
mulighed for aggregation.

Eksempel 8

25 Isoleringen af hybridomaceller, der er i stand til at
eksprimere anti-ICAM-1-monoklonale antistoffer.

Monoklonale antistoffer, der er i stand til at
binde til ICAM-1, isoleredes i overensstemmelse med
fremgangsmåden af Rothlein, R. et al., J. Immunol.
30 137:1270-1274 (1986). 3 BALB/C-mus immuniseredes intra-
peritonealt med EBV-transformerede perifere blod-
mononukleære celler fra et LFA-1-mangelfuldt individ
(Springer, T.A. et al., J. Exper. Med. 160:1901

(1984)). Ca. 10^7 celler i 1 ml RPMI 1640 medium benyttes for hver immunisering. Immuniseringerne administreres 45, 29 og 4 dage før miltceller fjernes fra musene til produktion af de ønskede hybridomacellelinier. På dag 3 før fjernelsen af miltcellerne modtog musene yderligere 10^7 celler i 0,15 ml medium (intravenøst).

Isolerede miltceller fra ovennævnte dyr fusioneres med P3X73Ag8.653 myelomaceller i et forhold på 4:1 i overensstemmelse med Galfre, G. et al., Nature 266:550 (1977). Aliquoter af de opnåede hybridomaceller introduceres i 96-brønde mikrotiterplader. Hybridomasupernatanterne underkastes screening for inhibering af aggregation og én inhiberende hybridoma (af over 600 testede brønde) klonedes og subklonedes ved grænsefortynding. Denne subklon betegnede RR1/1.1.1 (herefter betegnet "RR1/1").

Monoklonalt antistof RR1/1 viste sig i det væsentlige at inhibere den LFA-1-eksprimerede cellelinie JY's PMA-stimulerede aggregation. Det RR1/1-monoklonale antistof inhiberede aggregation tilsvarende, eller en smule mindre end visse monoklonale antistoffer til LFA-1- α eller - β -underenheder. Kontrolmonoklonalt antistof over for HLA, som eksprimeres rigeligt på JY-celler inhiberede i modsætning hertil ikke aggregation. Antigenet bundet af monoklonalt antistof RR1/1 defineres som det intercellulære adhæsionsmolekyle-1 (ICAM-1).

Eksempel 9.Anvendelse af anti-ICAM-1-monoklonale antistoffer til karakterisering af ICAM-1 molekylet.

- For at bestemme ICAM-1's natur og især hvorvidt
- 5 ICAM-1 var forskellig fra LFA-1, immunofældedes celleproteiner under anvendelse af monoklonalt antistof RR1/1. Immunopræcipitationen gennemføres i overensstemmelse med fremgangsmåden af Rothlein, R. et al., J. Immunol. 137:1270-1274 (1986)). JY-celler lyseredes
- 10 ved 5×10^7 celler/ml i 1% Triton X-100, 0,14 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, med frisk tilsat 1 mM phenylmethylsulfonylfluorid, 0,2 enheder per ml trypsin-inhibitoraprotinin (lysis puffer) i 20 minutter ved 4°C. Lysatet centrifugeredes ved 10.000 x g i 10 min. og præklaredes
- 15 med 50 µl af en 50%'s suspension af CNBr-aktiveret, glycin-quenched Sephrose Cl-4B i 1 time ved 4°C. 1 ml lysat immunopræcipiteredes med 20 µl af en 50%'s suspension af monoklonalt antistof RR1/1 koblet til Sepharose Cl-4B (1 mg/ml) natten over ved 4°C
- 20 (Springer, T.A. et al., J. Exper. Med. 160:1901 (1984)). Sepharose-bundet monoklonalt antistof fremstilledes, idet CNBr-aktivering af Sepharose CL-4B i carbonatpuffer benyttedes, i overensstemmelse med fremgangsmåden af March, S. et al. (Anal. Biochem. 60:149 (1974)).
- 25 Vaskede immunopræcipitater underkastedes SDS-PAGE og sølvfarvning i overensstemmelse med fremgangsmåden af Morrissey, J.H. Anal. Biochem. 117:307 (1981).

- Efter eluering af proteiner med SDS-prøvepuffer (Ho, M.K. et al., J. Biol. Chem. 258:636 (1983)) ved
- 30 100°C, halveredes prøverne og udsattes for elektroforese (SDS-8% PAGE) under reducerende (fig. 5A) eller ikke-reducerende betingelser (fig. 5B). Bånd med molekylvægte på 50 kd og 25 kd svarede til de tunge og let-

te kæder af immunoglobuliner fra det monoklonale antistof Sepharose (fig. 5A, bane 3). Varierende mængder af andre bånd i 25-50 kd vægtområdet observeredes desuden, men ikke i præcipitater fra lodne leukemiaceller, som
5 kun gav et 90 kd molekylvægtbånd. LFA-1's 177kd α -underenhed og 95 kd β -underenhed viste sig at migrere forskelligt fra ICAM-1 under både reducerende (fig. 5A, bane 2) og ikke-reducerende (fig. 5B, bane 2) betingelser.

- 10 For at bestemme monoklonalt antistof RR1/1's virkning på PHA-lymfoblast-aggregation anvendtes den kvantitative aggregationsprøve beskrevet i eksempel 2. T-celle-blastceller stimuleredes således i 4 dage med PHA, vaskedes grundigt og dyrkedes dernæst i 6 dage
15 i nærværelse af IL-2 konditioneret medium. PHA viste sig at blive internaliseret under denne 6 dages dyrkning og bidrog ikke til aggregationsprøven. I tre forskellige prøver med forskellige T-celle-blastpræparat inhiberedes ICAM-1 monoklonale antistoffer aggregation
20 ensartet (Tabel 2).

Tabel 2

Inhibering af PMA-stimuleret PHA-lymfoblast
aggregation af RR1/1 monoklonalt antistof^a

5	Forsøg	PMA	Mab	% Aggregation Inhibering	
				%	%
10	1 ^c	-	Kontrol	9	---
		+	Kontrol	51	0
		+	HLA-A,B	58	-14 ^d
		+	LFA-1- α	31	39
15		+	ICAM-1	31	39
	2 ^e	-	Kontrol	10	---
		+	Kontrol	78	0
		+	LFA-1- β	17	78
20		+	ICAM-1	50	36
	3 ^f	-	-----	7	
		+	Kontrol	70	
		+	HLA-A,B	80	-14
		+	LFA-3	83	-19
		+	LFA-1- α	2	97
		+	LFA-1- β	3	96
		+	ICAM-1	34	51

25

^aAggregation af PHA-inducerede lymfoblaster stimuleret med 50 ng/ml PMA mængdebestemtes indirekte ved mikroskopisk tælling af antallet af ikke-aggregerede celler som beskrevet i eksempel 2.

30

^bProcent inhibering i forhold til celler behandlet med PMA og X63 monoklonalt antistof.

^cAggregation målt 1 time efter den samtidige til-

49--

sætning af monoklonalt antistof og PMA. Celler rystedes ved 175 omdr./min.

^dEt negativt tal indikerer procent aggregationsfor-
5 øgelse.

^eAggregation måltes 1 time efter den samtidige til-
sætning af et monoklonalt antistof og PMA. Celler
pelletteredes ved 200 x G i 1 min., inkuberedes ved
10 37°C i 15 min., resuspenderedes forsigtigt og rystedes
i 45 min. ved 100 omdr./min.

^fCeller præbehandledes med PMA i 4 timer ved 37°C. Ef-
ter at monoklonalt antistof var tilsat inkuberedes rør-
15 ene ved 37°C stationært i 20 min. og rystedes ved 75
omdr./min. i 100 min.

LFA-1-monoklonale antistoffer var konsekvent mere inhiberende end ICAM-1-monoklonale antistoffer, hvorimod HLA-A, B og LFA-3 monoklonale antistoffer var uden virkning. Disse resultater indikerer at af de testede monoklonale antistoffer var kun dem, der var i stand til at binde til LFA-1 eller ICAM-1, i stand til at inhibere cellulær adhæsion.

Eksempel 10

10 Fremstilling af monoklonalt antistof mod ICAM-1.

Immunisering.

En Balb/C mus immuniseredes intraperitonealt (i.p) med 0,5 ml 2×10^7 JY-celler i RPMI medium 103 dage og 24 dage før fusion. På 4. og 3. dagen før fusion immuniseredes mus i.p. med 10^7 celler af PMA-differentierede U937-celler i 0,5 ml RPMI medium.

Differentiering af U937-celler.

20 U937-celler (ATCC CRL-1593) differentierede ved inkubering af disse ved 5×10^5 /ml i RPMI med 10% fetal bovin serum, 1% glutamin og 50 µg/ml gentamycin (fuldstændigt medium) indeholdende 2 ng/ml phorbol-12-myristataacetat (PMA) i en steril polypropylenbeholder. 25 På 3. dagen af denne inkubering fjernedes halvdelen af volumen af mediet og erstattedes med frisk, fuldstændigt medium indeholdende PMA. På dag 4 fjernedes celler, vaskedes og præpareredes til immunisering.

30 Fusion.

Miltceller fra de immuniserede mus fusioneredes med P3x63 Ag8.653 myelomaceller i et forhold på 4:1 i overensstemmelse med Galfre et al., (Nature 266:550

51

(1977)). Efter fusionen udpladedes cellerne i en 96 brøndes fladbundet mikrotiterplade med 5^{10} milt-celler/brønd.

5 Selektion af anti-ICAM-1 positive celler.

Efter én uge underkastedes 50 μ l supernatant screening ved den kvalitative aggregationsprøve ifølge eksempel 2, idet både JY og SKW-3 benyttedes som aggregerende cellelinier. Celler fra supernatanter, 10 der inhiberer JY-celleaggregation, men ikke SKW-3, udvalgte og klonedes to gange under anvendelse af begrænsende fortynding.

Dette forsøg resulterede i identifikationen og kloningen af tre separate hybridomalinier, som 15 frembragte anti-ICAM-1-monoklonale antistoffer. Antistofferne produceret af disse hybridomalinier var henholdsvis IgG_{2a}, IgG_{2b} og IgM. Hybridomacellelinien, som producerede IgG_{2a} anti-ICAM-1-antistoffet tildeles betegnelsen R6 5 D6 E9 B2. Antistoffet produceret af den foretrukne hybridomacellelinie betegnedes 20 R6 5 D6 E9 B2 (herefter omtalt som "R6-5-D6"). x Hybridomacellelinie R6 5 D6 E9 B2 deponeredes hos the American Type Culture Collection den 30. oktober 1987 og fik tildelt betegnelsen ATCC HB 9580.

25

Eksempel 11

Ekspressionen og reguleringen af ICAM-1.

For at måle ICAM-1-ekspressionen udvikledes en radioimmunprøve. I denne prøve ioderedes rensset 30 RR1/1 under anvendelse af iodogen til en specifik aktivitet på 10 uCi/ μ g. Endotelceller dyrkedes i 96 brøndes plader og behandledes som beskrevet for hvert forsøg. Pladerne afkøledes til 4°C ved an-

bringelse i et koldt rum i 0,5-1 time, ikke direkte på is. Monolagene vaskedes 3 gange med kolde, fuldstændige medier og inkuberedes dernæst 30 min. ved 4°C med ^{125}I RR1/1. Monolagene vaskedes dernæst 3 gange med fuldstændige medier. Det bundne ^{125}I frigjordes under anvendelse af 0,1 N NaOH og taltes. Den specifikke aktivitet af ^{125}I RR1/1 indstilledes, ved hjælp af ikke-mærket RR1/1, til opnåelse af et linært signal indenfor de antigen-tætheder man støter på under dette studium. Ikke-specifik binding bestemtes i nærværelse af et tusind gange overskud af ikke-mærket RR1/1 og substraheredes fra den totale binding til opnåelse af den specifikke binding.

ICAM-1-ekspression, målt under anvendelse af ovennævnte radioimmunprøve, øges på humane umbilical-vene-endotelceller (HUVEC) og humane saphenevene-endotelceller (HSVEC) af IL-1, TNF, LPS og IFN- γ (Tabel 3). Saphenevene-endotelceller anvendtes i dette studium til bekræftelse af resultaterne fra umbilicalvene-endotelceller i dyrkede store vene-endotelceller fra fuldt udviklet væv. Den basale ekspression af ICAM-1 er 2 gange højere på saphenevene-endotelceller end på umbilicalevene-endotelceller. Udsættelse af umbilicalvene-endotelcelle for rekombinant-IL-1- α , IL-1- β og TNF- γ øger ICAM-1-ekspression 10-20 gange. IL-1- α , TNF og LPS var blandt de mest potente inducere og IL-1 var mindre potent på en vægtbasis og desuden ved mætningskoncentrationer for respons (Tabel 3). IL-1- β ved 100 ng/ml øgede ICAM-1-ekspression 9 gange på HUVEC og 7,3 gange på HSVEC med halv-maksimal øgning forekommende ved 15 ng/ml. rTNF ved 50 ng/ml øgede ICAM-1-ekspressionen 16 gange på HUVEC og 11 gange på HSVEC med halv-maksimale virkninger ved 0,5 ng/ml.

Interferon- γ frembragte en signifikant øgning i ICAM-1-ekspression på 5,2 gange på HUVEC eller 3,5 gange på HSVEC ved 10.000 U/ml. Virkningen af LPS ved 10 μ g/ml var af tilsvarende størrelsesorden som rTNF.

5 Parvise kombinationer af disse mediatorer resulterede i yderligere eller lidt mindre end yderligere virkninger på ICAM-1 ekspression (Tabel 3). Kryds-titrering af rTNF med rIL-1- β eller rIFN- γ viste ingen synergisme mellem disse ved suboptimale eller optimale koncentrationer.

10

Eftersom LPS øgede ICAM-1-ekspression på endotelceller i koncentrationer, der somme tider findes i dyrkningsmedier, undersøgtes den mulighed at den basale ICAM-1-ekspression kan skyldes LPS. Når adskillige

15 serumbatches testedes viste det sig, at lav endotoxinserum gav lavere ICAM-1-basal-ekspression ved 25%. Alle de heri angivne resultater var for endotelceller dyrket i lav endotoxinserum. Inkluderingen af det LPS-neutraliserende antibiotikum polymyxin B ved 10 μ g/ml

20 mindskede imidlertid kun ICAM-1-ekspressionen yderligere 25% (Tabel 3). Øgningen i ICAM-1-ekspression ved behandling med IL-1 eller TNF påvirkedes ikke ved nærværelse af 10 μ g/ml polymyxin B, som er i overensstemmelse med de lave endotoxinkoncentrationer i disse

25 præparater (Tabel 3).

Tabel 3

Anti-ICAM-1-monoklonale antistoffer.

5	Tilstand (16 timer)	^{125}I Specifik bundet (CPM)			
		HSVEC		HSVEC	
10	Kontrol	603 $\pm$ 11	-	1132 $\pm$ 31	-
	100 ng/ml rIL-1 beta	5680 $\pm$ 633	9x	8320 $\pm$ 766	7.3x
	50 ng/ml rIL-1 alpha	9910 $\pm$ 538	16x	-	-
	50 ng/ml rTNF alpha	9650 $\pm$ 1500	16x	12690 $\pm$ 657	11.2x
	10 $\mu\text{g/ml}$ LPS	9530 $\pm$ 512	16x	10459 $\pm$ 388	9.2x
	10 ng/ml rIFN gamma	3120 $\pm$ 308	5.2x	4002 $\pm$ 664	3.5x
15	rIL-1 beta + rTNF	1469 $\pm$ 1410	24x	16269 $\pm$ 660	14x
	rIL-1 beta + LPS	13986 $\pm$ 761	23x	10870 $\pm$ 805	10x
	rIL-1 beta + rIFN gamma	7849 $\pm$ 601	13x	8401 $\pm$ 390	7.4x
	rTNF + LPS	15364 $\pm$ 1241	24x	16141 $\pm$ 1272	14x
	rTNF + rIFN gamma	13480 $\pm$ 1189	22x	13238 $\pm$ 761	12x
	LPS + IFN gamma	10206 $\pm$ 320	17x	10987 $\pm$ 668	10x
20	polymyxin B (10 $\mu\text{g/ml}$)	480 $\pm$ 23	-	-	-
	polymyxin B + rIL-1	5390 $\pm$ 97	11x	-	-
	polymyxin B + rTNF	9785 $\pm$ 389	20x	-	-
	1 $\mu\text{g/ml}$ LPS	7598 $\pm$ 432	13x	-	-
	polymyxin B + LPS	510 $\pm$ 44	1.1x	-	-

Opregulering af ICAM-1-ekspression på HVEC og HSVEC-
 25 HVEC eller HSVEC podedes i plader med 96-brønde ved
 en 1:3 fra et flydende monolag og fik lov til at gro
 til sammenløb. Cellerne behandledes dernæst med de
 angivne materialer eller medier i 16 timer, og RIA
 som ved fremgangsmåder. Alle punkter gennemførtes 4
 30 gange.

Eksempel 12Kinetik af interleukin 1 og γ -interferon-
induktion af ICAM-1.

Kinetikken af interleukin 1 og γ -interferon-
5 virkninger på ICAM-1-ekspression på dermale fibro-
blaster bestemtes under anvendelse af den ^{125}I gede-
anti-muse-IgG-bindingsprøve af Dustin, M.L. et al.
(J. Immunol. 137:245-254 (1986)). Til gennemførelse af
denne bindingsprøve, dyrkedes humane, dermale fibrobla-
10 ster i en 96-brøndes mikrotiterplade til en tæthed på
 $2-8 \times 10^4$ celler/brønd ($0,32 \text{ cm}^2$). Cellerne vaskedes 2
gange med RPMI 1640 medium suppleret som beskrevet i
eksempel 1. Cellerne vaskedes yderligere en gang med
Hanks balancerede saltopløsning (HBSS), 10 mM HEPES,
15 0,05% NaN_3 og 10% varmeinaktiveret fetal bovin serum.
Vaskning med denne bindingspuffer gennemførtes ved 4°C .
Til hver brønd sættes 50 μl af ovennævnte bindingspuf-
fer og 50 μl af den passende hybridoma-supernatant med
X63 og W6/32 som henholdsvis de negative og positive
20 kontroller. Efter inkubering i 30 minutter ved 4°C un-
der forsigtig omrøring vaskedes brøndene to gange med
bindingspuffer, og det andet antistof ^{125}I -gede-anti-
mouse-IgG, tilsættes ved 50 nCi i 100 μl . ^{125}I -gede-
anti-mouse-antistoffet fremstilledes under anvendelse af
25 Iodogen (Pierce) i overensstemmelse med fremgangsmåden
af Fraker, P.J. et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun.
80:849 (1978)). Efter 30 min. ved 4°C vaskedes brøndene
to gange med 200 μl bindingspuffer og celledaget oplø-
stes ved tilsætning af 100 μl 0,1 N NaOH. Dette og en
30 100 μl vask taltes i en Beckman 5500 γ -counter. Det
specifikke antal counts per min. beregnedes som [cpm
med monoklonalt antistof]-[cpm med X63]. Alle trin,
herunder induktion med specifikke reagenser, gennemfør-
tes 4 gange.

Virkningen af interleukin 1 med en halveringstid for ICAM-1-induktion på 2 timer var hurtigere end virkningen af γ -interferon med en halveringstid på 3,75 timer (fig. 6). Tidsforløbet til returnering til resterende koncentrationer af ICAM-1 viste sig at være afhængig af cellecyklussen eller hastigheden af celle-
5 vækst. I hvilende celler er interleukin 1 og γ -interferonvirkninger stabile i 2-3 dage, hvorimod ICAM-1-ekspressionen afbildet som logfasekulturer er nær grundlinien 2 dage efter fjernelsen af disse indu-
10 cerende midler.

Dosis-responskurver for induktionen af ICAM-1 ved rekombinant muse- og human interleukin 1 og for rekombinant human γ -interferon er vist i fig. 7. γ -
15 interferon og interleukin 1 viste sig at have ens koncentrationsafhængigheder med næsten identiske virkninger ved 1 ng/ml. Humant og rekombinant muse-interleukin 1 havde desuden ens kurver, men er mindre virkningsfulde end human interleukin 1-præparater ved
20 inducering af ICAM-1-ekspression.

Cyclohexamid, en inhibitor for proteinsyntese, og actinomycin-D, en inhibitor for mRNA-syntese, op-
hæver virkningerne af både interleukin 1 og γ -interferon på ICAM-1-ekspression på fibroblaster (Tabel 4).
25 Tunicamycin, en inhibitor for N-bundet glycosylering, inhiberede yderligere kun interleukin 1-virkningen med 43%. Disse resultater indikerer at protein- og mRNA-syntese, men ikke N-bundet glycosylering er nødvendig for interleukin 1- og γ -interferon-stimulerede
30 øgninger i ICAM-1-ekspression.

TABEL 4

Virkninger af cycloheximid, actinomycin D og tunicamycin på ICAM-1-induktion med IL-1 og γ -IFN på humane, dermale fibroblaster^a.

5

Behandling	125I Ged-Anti-Mus IgG Specifikt bundet (cpm)	
	anti-ICAM-1	anti-HLA-A,B,C
10 Kontrol (4 timer)	1524 $\pm$ 140	11928 $\pm$ 600
+ cycloheximid	1513 $\pm$ 210	10678 $\pm$ 471
+ actinomycin D	1590 $\pm$ 46	12276 $\pm$ 608
+ tunicamycin	1461 $\pm$ 176	12340 $\pm$ 940
IL 1 (10 U/ml) (4 timer)	4264 $\pm$ 249	12155 $\pm$ 510
+ cycloheximid	1619 $\pm$ 381	12676 $\pm$ 446
15 + actinomycin D	1613 $\pm$ 88	12294 $\pm$ 123
+ tunicamycin	3084 $\pm$ 113	13434 $\pm$ 661
IFN- γ (10 U/ml) (18 timer)	4659 $\pm$ 109	23675 $\pm$ 500
+ cycloheximid	1461 $\pm$ 59	10675 $\pm$ 800
+ actinomycin D	1326 $\pm$ 186	12089 $\pm$ 550

20

^aHumane fibroblaster dyrkedes til en tæthed på 8×10^4 celler/0,32 cm² brønd. Behandlinger gennemførtes i et slutvolumen på 50 μ l indeholdende de angivne reagenser.

25 Cycloheximid, actinomycin D og tunicamycin tilsattes i henholdsvis 20 μ g/ml, 10 μ M og 2 μ g/ml samtidig med cytokinerne. Alle punkter er middelværdier fra fire bønne $\pm$ standardafvigelse.

Eksempel 13ICAM-1's vævsfordeling.

Histokemiske studier gennemførtes på frossen væv fra menneskeorganer til bestemmelse af fordelingen af
5 ICAM-1 i thymus, lymfeknuder, tarm, hud, nyrer og lever. Til gennemførsel af en sådan analyse fikserede frosne vævsstykker (4 µm tyk) af normalt, humant væv i acetone i 10 min. og farvedes med det monoklonale antistof RR1/1 ved en immunoperoxidaseteknik, under anvendelse af avidin-biotin-kompleksmetoden (Vector Laboratories, Burlingame, CA) beskrevet af Cerf-Bensussan, N. et al. (J. Immunol. 130:2615 (1983)). Efter inkubering med antistoffet, inkuberedes stykkerne fortløbende med biotinylerede heste-anti-muse-IgG og avidin-
15 biotinylerede peroxidasekomplekser. Stykkerne dyppedes til sidst i en opløsning indeholdende 3-amino-9-ethylcarbazol (Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI) til udvikling af en farvereaktion. Stykkerne fikseredes dernæst i 4% formaldehyd i 5 min. og modfarvedes med
20 hematoxylin. Kontroller omfattede stykker inkuberet med ikke-relaterede monoklonale antistoffer i stedet for RR1/1-antistoffet.

ICAM-1 viste sig at have en fordeling, der i det væsentlige er lig med den hos størstedelen af
25 histokompatibilitetskompleks (MHC) klasse II antigenerne. De fleste blodkar (både små og store) i alt væv viste farvning af endotelceller med ICAM-1-antistof. Den vaskulære endotelfarvning var mere intens i de interfollikulære (paracortical) områder i lymfeknuder, tonsiler og Peyer's "patches" i sammenligning med
30 kar i nyre, lever og normal hud. I leveren var farvningen i det væsentlige begrænset til sinusformede beklædningsceller; hepatocytterne og endotelcellerne,

som indvendigt beklæder de fleste portalvener, og arterierne var ikke farvede.

I thymusmarven observeredes difus farvning af store celler og et dentritisk farvningsmønster. I cortex var farvningsmønsteret focalt og i det væsentlige dentritisk. Thymocytter var ikke farvede. I det perifer lymfoide væv var de sekundære lymfoide folliklers germinale centerceller intenst farvede. I nogle lymfoide follikler var farvningsmønstret i det væsentlige dentritisk uden genkendelig farvning af lymfocytter. Der observeredes desuden svag farvning af celler i kappezonen. Dendritiske celler med cytoplasmiske udstrækninger (interdigiterende reticulumceller) og et lille antal lymfocytter i de interfollikulære eller paracorticalle områder var yderligere farvet med ICAM-1-bindingsantistof.

Celler, der lignende makrofager var farvet i lymfeknuderne og tyndtarmens lamina propria. Fibroblast-lignende celler (spindelformede celler) og dendritiske celler spredt i stroma og de fleste af de undersøgte organer farves med ICAM-1-bindingsantistoffet. Der konstateredes ingen farvning i de Langerhanske/indeterminante celler i epidermis. Der konstateredes ingen farvning i glat muskelvæv.

Farvningen af epitelceller kunne tilsvarende ses i tonsilernes mucosa. Skønt hepatocytter, galdekanal-epitelium, intestinale epitelceller og rørformede epitelceller i nyrer i de fleste tilfælde ikke farves, viste stykker af normal nyrevæv, opnået fra et nephrektomisk stykke med nyrecellecarcinoma, farvning af mange proximale rørformede celler for ICAM-1. Disse rørformede epitelceller farves desuden med et anti-HLA-DR-bindingsantistof.

Summarisk , eksprimeres ICAM-1 på ikke-hemato-
poietiske celler, såsom vaskulære endotelceller og
på hæmatopoietiske celler, såsom vævsmakrofager og
mitogen-stimulerede T-lymfocytbaster. ICAM-1 viste sig
5 at blive eksprimeret i små mængder på perifere blod-
lymfocytter.

Eksempel 14

Rensningen af ICAM-1 ved monoklonal antistof affinitetschromatografi

10

Generelt rensningsskema.

ICAM-1 rensedes fra humane celler eller væv un-
der anvendelse af monoklonalt antistof affinitetschro-
matografi. Monoklonalt antistof, RRI/1, reaktivt over-
15 for ICAM-1 rensedes først og kobledes til en inert ko-
lonnematrix. Dette antistof er beskrevet af Rothlein,
R et al. J. Immunol. 137:1270-1274 (1986), og Dustin,
M.L. et al. (J. Immunol. 137:245 (1986)). ICAM-1 solubi-
liseredes fra cellemembraner ved lysering af cellerne
20 i et ikke-ionisk detergent, Triton X-100, nær en neu-
tral pH-værdi. Cellelysate indeholdende opløst ICAM-1
dernæst gennem prækolonner bestemt til fjernelse af
materialer, der binder ikke-specifikt til kolonnema-
trixmaterialet, og dernæst gennem den monoklonale
25 antistof-kolonnematrix, der gør det muligt for ICAM-1
at binde til antistoffet. Antistofkolonnen vaskedes
dernæst med en serie af detergentvaskepuffere med
stigende pH-værdi op til pH 11,0. Under disse vasknin-
ger forblev ICAM-1 bundet til antistofmatrixen, medens
30 ikke-bindende og svagt bindende forurenende materialer
fjernedes. Det bundne ICAM-1 elueredes dernæst speci-
fikt fra kolonnen ved tilførsel af en detergentpuffer
på pH 12,5.

Rensning af monoklonalt antistof RR1/1 og covalent kobling til Sepharose CL-4B.

Det anti-ICAM-1 monoklonale antistof RR1/1 rensedes fra ascitesvæske fra hybridoma-bærende mus, eller fra hybridoma-kultursupernatanter ved standardteknikker for ammoniumsulfatudfældnings- og protein A-affinitetschromatografi (Ey et al., Immunochem. 15: 429 (1978)). Det rensede IgG, eller rotte-IgG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) kobledes covalent til Sepharose CL-4B (Pharmacia, Upsala, Sverige) under anvendelse af en modifikation af fremgangsmåden af March et al. (Anal. Biochem. 60:149 (1974)). Kort fortalt vaskedes Sepharose CL-4B i destilleret vand, aktiveret med 40 mg/ml CNBr i 5 M K_2HPO_4 (pH ca. 12) i 5 min. og vaskedes dernæst ekstensivt med 0,1 mM HCl ved 4°C. Det filtrerede, aktiverede Sepharose resuspenderedes med en tilsvarende mængde rensset antistof (2-10 mg/ml i 0,1 M $NaHCO_3$, 0,1 M NaCl). Suspensionen inkuberedes i 18 timer ved 4°C under nænsom "end-over-end"-rotation. Supernatanten kontrolleredes dernæst for ubundet antistof ved absorbans ved 280 nm, og resterende reaktive steder på aktiveret Sepharose blev mættet ved tilsætning af glycyl til 0,05 M. Koblingsvirkningsgraden var sædvanligvis over 90%.

Detergentsolubilisering af membraner fremstillet ud fra human milt.

Alle fremgangsmåder gennemførtes ved 4°C. Frosset, human milt (200 g fragmenter) fra patienter med hårcelleleukemi optøedes på is i 200 ml Tris-saltopløsning (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, pH 7,4 ved 4°C) indeholdende 1 mM phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,2 U/ml aprotinin og 5 mM iodacetamid. Vævet blev skåret

1 små stykker og homogeniseret ved 4°C med en Tekmar power homogenisator. Voluminet øgedes dernæst til 300 ml med Tris-saltopløsning, og 100 ml 10% Tween 40 (polyoxyethylensorbitanmonopalmitat) i Tris-saltopløsning tilsattes til opnåelse af en endelig koncentration på 2,5% Tween 40.

Til fremstilling af membraner, ekstraheredes homogenatet med tre slag fra en Dounce eller, mere foretrukket, en Teflon Potter Elvehjem homogenisator og centrifugeredes dernæst ved 1000 x g i 15 min. Supernatanten bevarede og pelleten reekstraheredes med 200 ml 2,5% Tween 40 i Tris-saltopløsning. Efter centrifugering ved 1000 x g i 15 min., samledes supernatanterne fra begge ekstraktioner og centrifugeredes ved 150.000 x g i 1 time til pelletering af membranerne. Membranerne vaskedes ved genopløsning i 200 ml Tris-saltopløsning, centrifugeredes ved 150.000 x g i 1 time. Membranpelleten genopslæmmedes i 200 ml Tris-saltopløsning og homogenisteredes med en motoriseret homogenisator og en teflonstøder indtil suspensionen var jævnt grumset. Voluminet øgedes dernæst til 900 ml med Tris-saltopløsning og N-lauroylsarcosin tilsattes til en slutkoncentration på 1%. Efter omrøring ved 4°C i 30 min. fjernedes uopløseligt materiale i detergentlysatet ved centrifugering ved 150.000 x g i 1 time. Triton X-100 sattes dernæst til supernatanten til en slutkoncentration på 2%, og lysatet omrørtes ved 4°C i 1 time.

30 Detergentsolubilisering af JY B-lymfoblastoidceller.

Den EBV-transformerede B-lymfoblastoidcellelinie JY dyrkedes i RPMI-1640 indeholdende 10% fetal kalveserum (FCS) og 10 mM HEPES til en tæthed på

63.

ca. $0,8-1,0 \times 10^6$ celler/ml. For at øge celleoverfladeekspressionen af ICAM-1 sattes phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) i 25 ng/ml 8-12 timer før høst af cellerne. Natriumvanadat ($50 \mu\text{M}$) sattes desuden, 5 til kulturerne på dette tidsrum. Cellerne pelleteredes ved centrifugering ved $500 \times g$ i 10 min., og vaskedes 2 gange i Hank's balanceredes saltopløsning (HBSS) ved genopslæmning og centrifugering. Cellerne (ca. 5 g per 5 l kultur) lyseredes i 50 ml lysispuffer ($0,14 \text{ M NaCl}$, 10 $50 \text{ mM Tris pH } 8,0$, $1\% \text{ Triton X-100}$, $0,2 \text{ U/ml aprotinin}$, 1 mM PMSF , $50 \mu\text{M natriumvandat}$) under omrøring ved 4°C i 30 min. Ikke-lyserede kerner og uopløseligt materiale fjernedes ved centrifugering ved $10.000 \times g$ i 15 min. efterfulgt af centrifugering af supernatanten 15 ved $150.000 \times g$ i 1 time og filtrering af supernatanten gennem Whatman 3 mm filterpapir.

Affinitetschromatografi af ICAM-1 til strukturundersøgelser.

20 Til rensning i stor skala af ICAM-1, som skal benyttes ved strukturstudier, benyttedes en kolonne med 10 ml RR1/1-Sepharose CL-4B (koblet ved $2,5 \text{ mg}$ antistof/ml gel), og to 10 ml præ-kolonner med CNBr-aktiveret, glycin-quenched Sepharose CL-4B, og rotte- 25 IgG koblet til Sepharose CL-4B (2 mg/ml) benyttedes. Kolonnerne blev serieforbundet og præ-vasket med 10 kolonne-voluminer lysispuffer, 10 kolonnevoluminer puffer på pH 12,5 ($50 \text{ mM triethylamin}$, $0,1\% \text{ Triton X-100}$, pH 12,5 ved 4°C , efterfulgt af ligevægtsindstilling med 30 10 kolonnevoluminer lysispuffer. En liter af detergent-lysat af human milt tilførtes med en strømhastighed på $0,5-1,0 \text{ ml per min.}$ De to præ-kolonner benyttedes til fjernelse af ikke-specifikt bindingsmateriale fra lysatet før passage gennem RR1/1-Sepharose-kolonnen.

Efter tilsætningen vaskedes RR1/1-Sepharose-kolonnen og bundet ICAM-1 fortløbende med en strømhastighed på 1 ml/min. med mindst 5 kolonnevoluminer af hver af de efterfølgende: 1) lysispuffer, 2) 20 mM Tris pH 8,0/0,14 M NaCl/0,1% Triton X-100, 3) 20 mM glycine pH 10,0/0,1% Triton X-100, og 4) 50 mM triethylamin pH 11,0/0,1% Triton X-100. Alle vaskpuffer indeholdt 1 mM PMSF og 0,2 U/ml aprotinin. Efter vaskningen elueredes det resterende bundne ICAM-1 med 5 kolonnevoluminer elueringspuffer (50 mM triethylamin/0,1% Triton X-100/pH 12,5 ved 4°C) med en strømhastighed på 1 ml/3 min. Det eluerede ICAM-1 opsamledes i 1 ml fraktioner og neutraliseredes straks ved tilsætning af 0,1 ml 1 M Tris, pH 6,7. Fraktionerne indeholdende ICAM-1 identificeredes ved SDS-polyacrylamideelektroforese af 10 µl aliquoter (Springer *et al.*, J. Exp. Med. 160:1901 (1984)), efterfulgt af sølvfarvning (Morrissey, J.H., Anal. Biochem. 117:307 (1981)). Under disse betingelser var mængden af ICAM-1 elueret i ca. 1 kolonnevolumen mere end 90% rent bedømt ud fra sølvfarvede elektroferogrammer (en lille mængde IgG, udvasket fra affinitetsmatrixen, var den største forurener). Fraktionerne indeholdende ICAM-1 samledes i en pulje og koncentreredes ca. 20 gange ved hjælp af Centricon-30-mikrokoncentratorer (Amicon, Danvers, MA). Det rensede ICAM-1 mængdebestemtes ved Lowry-proteinprøve af en ethanol-præcipiteret aliquot fra puljen: Ca. 500 µg rent ICAM-1 produceredes ud fra 200 g human milt.

Ca. 200 µg rensede ICAM-1 udsattes for en andentrins rensning ved præparativ SDS-polyacrylamidgel-elektroforese. Båndet, der repræsenterer ICAM-1, blev gjort synligt ved gennemblødning af gelen i 1 M

KCl. Det gelområdet som indeholdt ICAM-1 blev dernæst udskåret og elektroelueret i overensstemmelse med fremgangsmåden af Hunkapiller et al., Meth. Enzymol. 91: 227-236 (1983). Det rensede protein var mere end 98% rent bedømt ved SDS-PAGE og sølvfarvning.

Affinitetsrensning af ICAM-1 til funktionelle studier.

ICAM-1 til anvendelse i funktionelle studier rensedes fra detergentlysater af JY-celler som beskrevet ovenfor, men i mindre målestok (en 1 ml kolonne af RR1/1-Sepharose) og med følgende modifikationer. Alle opløsninger indeholdt 50 μ M natriumvanadat. Efter vaskning af kolonnen med pH 11,0-puffer indeholdende 0,1% Triton X-100, vaskedes kolonnen igen med fem kolonnevoluminer af den samme puffer indeholdende 1% n-actyl- β -D-glucopyranosid (octylglucosid) i stedet for 1,0% Triton X-100. Octylglucosid-detergentet fortrænger Triton X-100 bundet til ICAM-1 og modsat Triton X-100 kan det senere fjernes ved dialyse. ICAM-1 elueredes dernæst med pH 12,5-puffer indeholdende 1% octylglucosid i stedet for 0,1% Triton X-100, og analyseredes og koncentreredes som beskrevet ovenfor.

Eksempel 15

Karakteristika af rensed ICAM-1.

ICAM-1 rensed fra human milt migrerer i SDS-polyacrylamid-geler som et bredt bånd med M_r på 72.000 til 91.000. ICAM-1 rensed fra JY-celler migrerer også som et bredt bånd med M_r på 76.500 til 97.000. Disse M_r ligger indenfor det angivne område for ICAM-1 immunopræcipiteret fra forskellige cellekilder: M_r =90.000 for JY-celler, 114.000 på den myelomonocytiske cellelinie U937 og 97.000 på fibroblaster (Dustin et al., J.

- Immunol. 137:245 (1986)). Dette brede område i M_r tilskrives en extensiv, men variabel grad af glycosylering. Den ikke-glycosylerede precursor har en M_r på 55.000 (Dustin et al.). Proteinet renses enten fra
- 5 JY-celler eller human milt bevarer dets antigene virkning som godtgøres af dets evne til at genbinde til den oprindelige affinitetskolonne og ved immunopræcipitation med RR1/1-Sepharose og SDS-polyacrylamidelektroforese.
- 10 Til fremstilling af peptidfragmenter af ICAM-1 reduceredes ca. 200 µg med 2 mM dithiothreitol/2% SDS, efterfulgt af alkylering med 5 mM iodeddikesyre. Proteinet udfældes med ethanol og genopløstes i 0,1 M NH_4CO_3 /0,1 mM CaCl_2 /0,1% zwittergent 3-14 (Calbio-
- 15 chem), og underkastedes digestion med 1 vægt% trypsin ved 37°C i 4 timer, efterfulgt af yderligere digestion med 1% trypsin i 12 timer ved 37°C. De tryptiske peptider rensedes ved omvendt-fase HPLC under anvendelse af en 0,4 x 15 cm C4-kolonne (Vydac). Peptiderne elueredes
- 20 med en lineær gradient på 0% til 60% acetonitril i 0,1% trifluoreddikesyre. Udvalgte peptider underkastedes sekvensanalyse på en gasfasemikrosekvenator (Applied Biosystems). Sekvensinformationen opnået fra dette studium er vist i Tabel 5.

Tabel 5

Aminosyresekvenser af ICAM-1-tryptiske peptider.

Amino- syre- rest		Peptid											
	50a	50b	46a	46b	X	45	K	AA	J	U	O	M1	
5	1	[T/V]	A	(V/A)	E	V	S	L	E	A	L	V	L
	2	F	S	Q	P	E	F	N	L	G	T	L/E	
	3	L	I	T	A	L	P	P	D	S	L	P/(G)	
	4	T	S	F		A	T	L	V	I		P	
10	5	V	L	P		P	V	R	L	E		G/Y	
	6	Y	G	L		N	T	P	V	T		N/L	
	7	P	W	P		V	Y	Q	T	P		(N)	
	8	T	P	I		I	G	G	C	P/V		(Q)	
	9	S	F	G		(G)	-	L	S	K		(E)	
	10	E		E		(Q)	D	E	T			(D)	
	11	A		S		D/P	K	L	S				
	12	G/S		V		V	P	F	C				
15	13	A		T		D	Q	E	D				
	14	G		V		W	V/L	-	Q				
	15						I	T	P				
	16							S	K				
	17							A					
	18							P					
	19							X					
20	20							Q					
	21							L					

() = Lav konfidenssekvens.

[] = Meget lav konfidenssekvens.

25 / = Indikerer flertydelighed i sekvensen; den mest sandsynlige aminosyre er angivet først.

a = Større peptid.

b = Mindre peptid.

Eksempel 16Kloning af ICAM-1-genet.

Genet for ICAM-1 kan klones under anvendelse af en lang række fremgangsmåder. F.eks. kan aminosyresekvensinformationen, opnået gennem sekvenseringen af de tryptiske fragmenter af ICAM-1 (Tabel 5), benyttes til identificering af en oligonucleotidsekvens, som vil svare til ICAM-1-genet. ICAM-1-genet kan alternativt klones under anvendelse af anti-ICAM-1-antistof til detektering af kloner, som producerer ICAM-1.

Kloning af genet for ICAM-1 gennem anvendelsen af oligonucleotidprober.

Under anvendelse af den gentiske kode (Watson, J.D., In: Molecular Biology of the Gene, 3. udg. Ed., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977)), kan et eller flere forskellige oligonucleotider identificeres, som hver især vil være i stand til at kode for de ICAM-1 tryptiske peptider. Sandsynligheden for at et særligt oligonucleotid i virkeligheden udgør den aktuelle ICAM-1-kodende sekvens kan estimeres ved betragtning af abnorme baseparforhold og hyppigheden med hvilken et særligt codon faktisk benyttes (for at kode for en særlig aminosyre) i eukaryotiske celler. Sådanne "codon kutymeregler" er angivet af Lathe, R., et al., J. Molec. Biol. 183:1-12 (1985). Ved anvendelse af "codon kutymereglerne" af Lathe, identificeres et enkelt oligonucleotid, eller et sæt af oligonucleotider, som indeholder en teoretisk "mest sandsynlig" nucleotidsekvens (dvs. den nucleotidsekvens, der har det mindste overskud), som er i stand til at kode for de ICAM-1 tryptiske peptidsekvenser.

Oligonucleotidet eller sættet af oligonucleotider, der indeholder den teoretiske "mest sandsynlige"

sekvens, der er i stand til at kode for ICAM-1 fragmen-
terne benyttes til identificering af sekvensen af et
komplementært oligonucleotid eller sæt af oligonucleo-
tider, som er i stand til at hybridise den "mest
5 sandsynlige" sekvens, eller sæt af sekvenser. Et oligo-
nucleotid indeholdende en sådan komplementær sekvens
kan anvendes som en probe til identificering og isole-
ring af ICAM-1-genet (Maniatis, T., et al., Molecular
Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press,
10 Cold Spring Harbor, NY (1982).

Som beskrevet i afsnit C ovenfor, er det muligt
at klonе ICAM-1-genet fra eukaryotiske DNA-præparater,
som formodes at indeholde dette gen. Til identificering
og kloning af genet, som koder for ICAM-1-proteinet,
15 underkastes et DNA-bibliotek for dets evne til at
hybridisere med de ovennævnte oligonucleotidprober.
Da det er sandsynligt at der kun vil være to kopier af
genet for ICAM-1 i en normal diploid celle, og fordi
det er muligt at dette ICAM-1-gen kan indeholde store
20 ikke-transkriberede mellemliggende sekvenser
(introner), hvis kloning ikke er ønsket, er det ønske-
ligt at isolere ICAM-1-kodende sekvenser fra et cDNA-
bibliotek fremstillet ud fra mRNA fra en ICAM-1-
producerende celle fremfor fra genomisk DNA. Egnede
25 DNA eller cDNA præparater spaltes enzymatisk eller
klippes tilfældigt og ligeres i rekombinant vektorer.
Disse rekombinante vektoreres evne til at hybridisere
til ovennævnte oligonucleotidprober måles dernæst.
Fremgangsmåder til hybridisering er angivet f.eks. i
30 Maniatis, T., Molecular Cloning A Laboratory Manual,
Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)
eller i Haymes, B.T., et al., Nucleic Acid Hybridiza-
tion a Practicial Approach, IRL Press, Oxford, England

(1985). Vektorer, som viste sig at være i stand til en sådan hybridisering analyseres dernæst til bestemmelse af udstrækningen og naturen af de ICAM-1-sekvenser som de indeholder. Baseret på rent statistiske betragtninger, kunne et gen, såsom det der koder for ICAM-1-molekylet, identificeres entydigt (via hybridiserings-screening) under anvendelse af en oligonucleotidprobe med kun 18 nucleotider.

Den aktuelle identifikation af ICAM-1-peptid-sekvenser tillader således kort fortalt identifikationen af en teoretisk "mest sandsynlig" DNA-sekvens eller et sæt af sådanne sekvenser, der er i stand til at kode for et sådant peptid. Ved konstruktion af et oligonucleotid komplementært til denne teoretiske sekvens (eller ved konstruktion af et sæt af oligonucleotider komplementære til sættet af de "mest sandsynlige" oligonucleotider), opnås et DNA-molekyle (eller sæt af DNA-molekyler), der er i stand til at fungere som en probe til identifikation og isolering af ICAM-1-genet.

Under anvendelse af de i tabel 5 angivne ICAM-1-peptidsekvenser, bestemtes sekvensen af den "mest sandsynlige" sekvens af et oligonucleotid, der er i stand til at kode for AA- og J-peptider (henholdsvis Tabel 6 og 7). Oligonucleotider komplementære til disse sekvenser syntetiseredes og rensedes til anvendelse som prober til isolering af ICAM-1-gensekvenser. Egnede størrelse-selekterede cDNA-biblioteker produceredes ud fra poly(A)⁺ RNA fra begge PMA-inducerede HL-60 celler og fra PS-stimulerede umbilcalveneendotelceller. Et størrelse-selekteret cDNA-bibliotek fremstilledes under anvendelse af poly(A)⁺ RNA fra PMA-inducerede HL-60 celler i overensstemmelse med fremgangsmåden af Gubler, U., et al. ((Gene 25:263-269 (1983)) og Corbi, A., et al. (EMBO J. 6:4023-4028 (1987))).

Et sted-selekterende cDNA-bibliotek fremstilledes under anvendelse af poly(A)⁺ RNA fra umbilicalvene-endotelceller, som havde været stimuleret i 4 timer med PS 5 µg/ml. RNA ekstraheredes ved homogenisering af 5 cellerne i 4 M guanidiniumisothiocyanat og supernatanten udsattes for ultracentrifugering gennem en CsCl gradient (Chirgwin, J. M., et al., Biochem. 18:5294-5299 (1979)). Poly(A)⁺ RNA isoleredes fra blandingen af totale RNA-stykker via anvendelsen af oligo-10 (dT)-cellulosechromatografi (Type 3, Collaborative Research) Aviv, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69:1408-1412 (1972).

Tabel 6

Oligonucleotid komplementært til den mest sandsynlige nucleotidsekvens, der er i stand til at kode for ICAM-1-AA-peptidet.

5

	Amino- syre rest af ICAM-1	ICAM-1 AA-peptid	Mest sandsynlig sekvens, der koder for AA-peptid	Komplementær sekvens
			5'	3'
10	162	Glu	G	C
			A	T
	163	Leu	G	C
			C	G
			T	A
	164	Asp	G	C
			A	C
15			C	T
	165	Leu	C	G
			T	A
			G	C
	166	Arg	G	G
			G	C
20	167	Pro	C	C
			C	G
			C	G
	168	Gln	C	G
			A	T
			G	C
	169	Gly	G	C
25			C	G
	170	Leu	C	G
			T	A
			G	C
	171	Glu	G	C
			A	T
			G	C
30	172	Leu	C	G
			T	A
			G	C
	173	Phe	T	A
			T	A
			T	A
	174	Glu	G	C
			A	T
			G	C
			3'	5'

Tabel 6 (forsat)

Oligonuceltid komplementært til den mest sandsynlige nucleotidsekvens, der er i stand til at kode for ICAM-1-AA-peptidet.

5

Amino- syre rest af ICAM-1	ICAM-1 AA-peptid	Mest sandsynlig sekvens, der koder for AA-peptid	Komplementær sekvens
10	175	Asn	A A C A C C U C A 3'
	176	Thr	T T G T G G A G 5'
15	177	Ser	

Tabel 7

Oligonucleotid komplementært til den mest sandsynlige nucleotidsekvens, der er i stand til at kode for ICAM-1-J-peptidet.

5

	Amino- syre rest af ICAM-1	ICAM-1 AA-peptid	Mest sandsynlig sekvens, der koder for AA-peptid	Komplementær sekvens
10	19	Val	5' G T G	3' C A C
	20	Thr	A C C	T G G
15	21	Cys	T G C	A C G
	22	Ser	C T C	A G G
	23	Thr	C A C	T G G
20	24	Ser	C T C	A G G
	25	Cys	C T G	A C A
25	26	Asp	T G A	C T G
	27	Gln	C C A	G T C
	28	Pro	G C C	G G G
30	29	Lys	A A 3'	T T 5'

Første cDNA streng syntetiseredes under anvendelse af 8 µg poly(A)⁺ RNA, avian myeloblastosis virus revers transkriptase (Life Sciences) og en oligo(dT) primer. DNA-RNA-hybridet underkastedes digestion med 5 RNase H (BRL) og den anden streng syntetiseredes under anvendelse af DNA-polymerase I (New England Biolabs). Produktet methyleredes med Eco R1-methylase (New England Biolabs), blunt-end ligeredes til Eco R1-linkere (New England Biolabs), underkastedes digestion med Eco R1 og størrelse-selekteredes på en med lavt smeltepunkt agarosegel. cDNA større end 500bp ligeredes til λgt10, som i forvejen havde været underkastet digestionen med Eco R1 og dephosphoryleret (Stratagene). Ligeringsproduktet pakkedes dernæst 15 (Stratagene gold).

Umbilicalveneendotelcellen og HL-60 cDNA-biblioteker udpladedes dernæst på 20.000 PFU/150 mm plade. Rekombinant DNA dobbeltoverførtes til nitrocellulosefiltre, denatureredes i 0,5 M NaOH/1,5M NaCl, 20 neutraliseredes i 1M Tris, pH 7,5/1,5M NaCl og bagtes ved 80°C i 2 timer (Benton, W.D., et al., Science 196: 180-182 (1977)). Filtre præhybridiseredes og hybridiseredes i 5X SSC indeholdende 5X Denhardt's opløsning, 50 mM NaPO₄ og 1 µg/ml laksesperm DNA. Præhybridisering 25 ring gennemførtes ved 45°C i 1 time.

Hybridiseringen gennemførtes under anvendelse af 32bp (5-TTGGGCTGGTCACAGGAGGTGGAGCAGGTGAC) eller 47bp (5'-GAGGTGTTCTCAAACAGCTCCAGGCCCTGGGGCCGCAGGTCCAGCTC) anti-sense oligonucleotider baseret på, analogt med 30 ovennævnte, henholdsvis de ICAM-1-tryptiske peptider J og AA (Tabel 6 og 7) (Lathe, R., J. Molec. Biol., 183:1-12 (1985)). Oligonucleotider endemærkedes med γ-(³²P)ATP under anvendelse af T4 polynucleotid-

kinase og konditioneredes, anbefalet af fabrikanten (New England Biolabs). Efter hybridisering natten over vaskedes filtrene to gange med 2X SSC/0,1% SDS i 30 min. ved 45°C. Fager isoleredes fra disse plaques, 5 hvilke udviste hybridisering og rensedes ved efterfølgende genudpladning og rescreening.

Kloning af genet for ICAM-1 gennem anvendelsen af anti-ICAM-antistof.

10 Genet for ICAM-1 kan alternativt klones gennem anvendelsen af anti-ICAM-1-antistof. DNA eller mere foretrukket cDNA ekstraheres og renses fra en celle, som er i stand til at eksprimere ICAM-1. Det rensede cDNA underkastes fragmentering (ved klipning, endo-
15 nuclease digestion, osv.) til frembringelse af en pulje af DNA- eller cDNA-fragmenter. DNA- eller cDNA-fragmenter fra denne pulje kloner dernæst i en ekspressionsvektor til produktion af et genomisk bibliotek af ekspressionsvektorer, hvis medlemmer hver indeholder
20 et unikt klonet DNA- eller cDNA-fragment.

Eksempel 17

Analyse af cDNA-klonerne.

Fag DNA fra positive kloner underkastedes digestion med Eco R1 og undersøgtes ved Southern analyse
25 stion med Eco R1 og undersøgtes ved Southern analyse under anvendelse af et cDNA fra en klon, som en probe. Maksimale størrelse-cDNA-indføjninger som kryds-hybridiserede, subklonedes i Eco R1-stedet i plasmidvektor pGEM 4Z (Promega). HL-60 subkloner indeholdende
30 cDNA i begge orienteringer slettedes ved exonuclease III-digestion (Henikoff, S., Gene 28:351-359 (1984)) i overensstemmelse med fabrikantens anbefalinger (Erase-a-Base, Promega). Progressivt slettet cDNA klonedes

dernæst og udsattedes for dideoxynucleotidkæddetermine-
ringssekvensering (Sanger, F. et al., Proc. Natl.
Acad. Sci. (USA) 74:5463-5467 (1977) i overensstemmelse
med fabrikantens anbefalinger (Sequenase, U.S.
5 Biochemical). HL-60 cDNA 5' og kodende områder sekven-
seredes komplementært til begge strenge og 3'-området
sekvenseredes ca. 70% på begge strenge. En representa-
tiv endotel cDNA sekvenseredes og det meste af dens
længde ved shotgun kloning af 4bp-genkendelsesrestri-
10 ktionsenzymfragmenter.

cdNA-sekvensen af en HL-60 og en endotelcelle
cdNA etableredes (fig. 8). 3023 bp-sekvensen indeholder
et kort 5' -ikke translateret område og et 1,3 kb 3' -
ikke-translateret område med et consensus polyadenyle-
15 ringssignal i position 2966. Den længst åbne læseramme
bebynder ved det første ATG i position 58 og slutter
ved en TGA terminerende triplet i position 1653. Iden-
titet mellem den translaterede aminosyresekvens og sek-
venser bestemt ud fra otte forskellige tryptiske pep-
20 tider med i alt 91 aminosyrer (understreget i fig. 8)
bekræftede at autentiske ICAM-1 cDNA-kloner var blevet
isoleret. Baseret på sekvensanalyse, er der i tab. 8
vist mulige peptider indenfor ICAM-1-sekvensen gen-
kendt af LFA-1.

Tabel 8

Aminosyresekvenser af ICAM-1 tryptiske peptider.

	<u>Peptid</u>	<u>Rester</u>	<u>Sekvens</u>
5	J	14- 29	X G S V L V T C S T S C D Q P K
	U	30- 39	L L G I E T P L (P) (K)
	50	78- 85	(T) F L T V Y X T
	X	89- 95	V E L A P L P
	AA	161-182	X <u>E L D L R P Q G L E</u> --
10			<u>L F E X T S A P X Q L</u>
	K	232-246	L N P T V T Y G X D S F S A K
	45	282-295	S F P A P N V (T/I) L X K P Q (V/L)

- 15 -- Indikerer at sekvensen fortsætter på næste linie.
Understregede sekvenser benyttedes til fremstilling af oligonucleotidprober.

- Hydrofobisitetsanalyse (Kyte, J. et al., J. Molec. Biol., 157:105-132 (1982)) foreslår tilstedeværelsen af en 27 restsignalsekvens. Udpegelsen af +1 glutaminet er i overensstemmelse med vores manglende evne til at opnå N-terminalsekvens på 3 forskellige ICAM-1-proteinpræparater; glutamin kan cyclisere til pyroglutaminsyre, hvilket resulterer i en blokeret N-terminus. Den translaterede sekvens fra 1-453 er i det væsentlige hydrofil, efterfulgt af et 24 resthydrofobisk formodentligt transmembranområde. Transmembranområdet efterfølges af adskillige ladede rester indeholde i et 27 rest formodentligt cytoplasmisk område.

Den forudsatte størrelse af den fulgt udviklede polypeptidkæde er 55.219 daltons, hvilket er i udmærket overensstemmelse med den observerede størrelse på

55.000 for deglycosylerede ICAM-1 (Dustin, M.L. et al., J. Immunol. 137:245-254 (1986)). Otte N-linkede glycosyleringssteder er forudsagt. Manglende asparagin i de tryptiske peptidsekvenser af to af disse steder be-
 5 kræfter deres glycosylering og deres ekstracellulære orientering. Antages 2.500 daltons per høj-mannose N-bundet carbohydrat, forudsiges en størrelse på 75.000 daltons for ICAM-1-precursoren i sammenligning med de observerede seks på 73.000 daltons (Dustin, M.L., et
 10 al., J. Immunol. 137:245-254 (1986)). Efter omdannelse af høj-mannose til kompleks carbohydrat, ligger det fuldt udviklede ICAM-1 glycoprotein på 76 til 114 kd, afhængig af celletype 1 (Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137:245-254 (1986)). ICAM-1 er således en kraftig
 15 glycosyleret, men ellers et typisk integralmembranprotein.

Eksempel 18

ICMA-1 er et integrin-bindingsmedlem af immunoglobulin
 20 supergenfamilien.

Kopiering af ICAM-1-interne gentagelser gennemføres under anvendelse af "Microgenie protein alignment programmet" (Queen, C., et al., Nacl. Acid. Res., 12: 581-599 (1984)) efterfulgt af inspektion. Kopiering af
 25 ICAM-1 overfor IgM, N-CAM og MAG gennemførtes under anvendelse af "Microgenie and the ALIGN programmet" (Dayhoff, M.O., et al., Meth. Enzymol. 91:524-545 (1983)). Fire proteinsekvensdatabaser, opbevaret ved the National Biomedical Research Foundation, gennemses for
 30 proteinsekvensligheder under anvendelse af FASTP-programmet af Williams og Pearson (Lipman, D.J., et al., Science 227:1435-1439 (1985)).

Eftersom ICAM-1 er en ligand af et integrin, var det ikke forudset af det ville være et medlem af

immunoglobulinsupergenfamilien. Inspektion af ICAM-1-sekvensen viser imidlertid at den opfylder alle kriterier, der foreslås for medlemskab af immunoglobulinsupergenfamilien. Disse kriterier omtales efter tur i
5 det efterfølgende.

Hele det ekstracellulære område af ICAM-1 er konstrueret ud fra 5 homologe immunoglobulin-lignende områder, som er vist opstillet i fig. 9A. Områder 1-4 er henholdsvis 88, 97, 99 og 99 rester lang og er så-
10 ledes af typiske Ig område størrelse; område 5 er afkortet indenfor 68 rester. Søgninger i NBRF-databasen under anvendelse af FASTP-programmet afslørede signifikante homologier mellem medlemmer af immunoglobulinsupergenfamilien, herunder IgM og IgG C områder, T-
15 cellereceptor- α -underenhed variabelt område og α -1- β -glycoprotein (fig. 9B-D).

Under anvendelse af ovennævnte information sammenlignedes aminosyresekvensen af ICAM-1 med aminosyresekvenser af andre medlemmer af immunoglobulinsupergen-
20 familien.

Tre typer af Ig superfamilieområder, V, C1 og C2 er differentieret. Både V- og C-områder er konstrueret ud fra 2 β -plader bundet sammen ved intraområde-disulfidbindingen; V-områder indeholder 9 anti-
25 parallelle β -strenger, mens C-områder indeholder 7. Konstante områder deltes i C1- og C2-sæt baseret på karakteristiske rester vist i fig. 9A. C1-sættet omfatter proteiner, der er involveret i antigen-genkendelse. C2-sættet omfatter adskillige Fc-receptorer og protei-
30 ner indvolveret i cell-adhæsion herunder CD2, LFA-3, MAG og NCAM. ICAM-1-områder viste sig at være kraftigst homologe med områder fra C2-sættet anbringende ICAM-1 i dette sæt; dette afspejles i stærkere lighed til be-

varede rester i C2- end i C1-områder som vist for β -strengene B-F i fig. 9. ICAM-områder står således meget bedre på linie med β -strengene A og G i C2-områder end med disse strenge i V- og C1-områder, hvilket muliggør gode grupperinger på tværs af hele C2 område-styrken. Opstilling af C2-områder fra NCAM, MAG og α 1- β -glycoprotein er vist i fig. 9B og 9C; identitet varierer fra 28 til 33%. Opstilling af T-cellereceptor $V\alpha$, 27% identitet og IgM C-område 3 34% er desuden vist (fig. 9B, 9D).

En af de vigtigste karakteristika for immunoglobulinområder er de disulfid-bundne cysteinbrobindinger mellem B og F β -strengene, som stabiliserer β -lagsandwichen; i ICAM-1 er cysteiner bevaret i alle tilfælde undtagen i streng f i område 4, hvor et leucin findes, som kan være rettet mod sandwich og stabilisere kontakten som foreslået for visse andre B- og C2-sæt områder. Afstanden mellem cysteinerne (43, 50, 52 og 37 rester) er som beskrevet for C2-sættet.

Til test for tilstedeværelsen af intrakædedisulfidbindinger i ICAM-1, udsattes endotelcelle-ICAM-1 for SDS-PAGE under reducerende og ikke-reducerende betingelser. Endotelcelle-ICAM-1 benyttedes fordi det udviser mindre glycosyleringsheterogenitet end for JY eller hårcellemilt-ICAM-1 og tillader større følsomhed overfor skift i M_r . ICAM-1 rensedes derfor fra 16 timer LPS (5 μ g/ml) stimulerede umbilicalvene-endotelcellekulturer ved immunoaffinitetschromatografi som beskrevet ovenfor. Acetoneudfældet ICAM-1 genopslæmmedes i prøvepuffer (Laemmli, U.K., Nature 227: 680-685 (1970)) med 0,25% 2-mercaptoethanol eller 25 mM iodacetamid og bragtes til 100°C i 5 min. Prøverne underkastedes SDS-PAGE 4670 og sølvfarvning 4613. Endo-

telcelle-ICAM-1 havde et tydeligt M_r på 100 Kd under reducerende betingelser og 96 Kd under ikke-reducerende betingelser, hvilket i høj grad tyder på nærværelsen af intrakædedisulfider i nativ ICAM-1.

- 5 Anvendelsen af den primære sekvens til forudsigelse af den sekundære struktur (Chou, P.Y., et al., Biochem. 13:211-245 (1974)) viste de 7 forventede β -strengene i hvert ICAM-1-område, mærket a-g øverst i fig. 9A, hvilket præcis opfylder forudsigelsen for et
- 10 immunoglobulinområde og svarer til positionerne af strengene A-H i immunoglobuliner (nederst fig. 9A). Område 5 mangler A- og C-strengene, men da disse danner rammer om lagene, kan lagene stadig formes, f.eks. hvor streng D ersattes med streng C, som foreslået for
- 15 andre C2 områder; og den karakteristiske disulfidbinding mellem B- og F-strengene ville være upåvirket. Kriterierne for område-størrelse, sekvenshomologi, bevarelse af cysteindannelse af den formodede intraområde-disulfidbinding, tilstedeværelse af disulfidbindinger, og forudsagt β -lagstruktur opfyldes således
- 20 alle til inkludering af ICAM-1 i den immunoglobuline supergene familie.

- ICAM-1 viste sig at være yderst stærkt homolog med NCAM- og MAG-glycoproteiner fra C2-sættet. Dette er
- 25 af særlig interesse efter som både NCAM og MAG medierer celle-celleadhæstion. NCAM er vigtig i neuron-neuron og neuro-muskulære interaktioner (Cunningham, B.A., et al., Science 236:799-806 (1987)), medens MAG er vigtig i neuron-oligodendrocyt og oligodendrocyt-oligodendro-
- 30 cyt interaktioner under myelinering (Poltorak, M., et al., J. Cell Biol. 105:1893-1899 (1987)). Celleoverfladeekspressionen af NCAM og MAG reguleres udviklingsmæssigt under henholdsvis nervesystemdannelse og

myelinering analogt med den regulerede introduktion af ICAM-1 ved inflammation (Springer, T.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 5:223-252 (1987)). ICAM-1, NCAM (Cunningham, B.A., et al., Science 236:799-806 (1987)) og MAG (Salzer, J.L., et al., J. Cell. Biol. 104:957-965 (1987)) er ens i hovedstrukturen samt homologe eftersom hver er et integralmembranglycoprotein konstrueret ud fra 5 C2-områder, idet de danner det N-terminale ekstracellulære område, skønt nogle yderligere ikke-Ig-lignende sekvenser findes i NCAM mellem det sidste C2-område og det transmembrane område. ICAM-1 står over hele dets længde, herunder i transmembran og cytoplasmiske områder på linie med MAG med 21% identitet; den samme % identitet findes ved sammenligning af 5 områder mellem ICAM-1 og NCAM-1. En skematisk sammenligning mellem den sekundære struktura af ICAM-1 og MAG er vist i fig. 10. Område-for-område-sammenligninger viser at homologiniveauet mellem områderne indenfor ICAM-1 og NCAM-molekyler ($x \pm$ standardafvigelse, henholdsvis $21 \pm 2,8\%$ og $18,6 \pm 3,8\%$) er det samme som homologiniveauet ved sammenligning af ICAM-1 områder med NCAM- og MAG-områder (henholdsvis $20,4 \pm 3,7$ og $21,9 \pm 2,7$). Skønt der er tegn på alternativ spaltning i de C-terminale områder i NCAM (Cunningham, B.A., et al., Science 236:799-806 (1987); Barthels, D., et al., EMBO J. 6:907-914 (1987)) og MAG (Lai, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84 4377-4341 (1987)), har man ikke fundet noget tegn på dette ved sekvenseringen af endotel- eller HL-60 ICAM-1-kloner eller i de undersøgelser af ICAM-1-proteinrygraden og precursoren i en lang række celletyper (Dustin M.L., et al., J. Immunol. 137:245-254 (1986)).

ICAM-1 fungerer som en ligand for LFA-1 i lymfocytinteraktioner med forskellige celletyper. Lymfo-

cytter binder til ICAM-1 inkorporeret i kunstige membranbilag, og dette kræver LFA-1 på lymfocytten, hvilket direkte påviser LFA-1-interaktion med ICAM-1 (Marlin, S.D., et al., cell 51:813-819 (1987)). LFA-1
5 er et leukocytintegrin og har ingen immunoglobulinlignende træk. Leukocytintegriner omfatter én integrin subfamilie. De andre to underfamilier medierer celle-matrix interaktioner og genkender sekvensen RGD indenfor deres ligander, som omfatter fibronectin, vitronectin,
10 tin, collagen og fibrinogen (Hynes, R.O., Cell 48:549-554 (1987); Ruoslahti, E., et al., Science 238:491-497 (1987)). Leukocytintegrinerne eksprimeres kun på leukocyter, er involveret i celle-celleinteraktioner og de eneste kendte ligander er ICAM-1 og iC3b, et fragment
15 ment på den komplementære komponent C3, som ikke udviser immunoglobulin-lignende træk, og som genkendes af Mac-1 (Kishimoto, T.K., et al., In: Leukocyt Typing III, McMichael, M. (ud.), Springer-Verlag, New York (1987); Springer, T.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 5:
20 223-252 (1987); Anderson, D.C., et al., Ann. Rev. Med. 38:175-194 (1987)). Baseret på sekvensanalyse er mulige peptider indenfor ICAM-1-sekvensen, genkendt af LFA-1, vist i Tabel 9.

Tabel 9

Peptider inden i ICAM-1-sekvensen, som muligvis genkendes af LFA-1.

- 5 -L-R-G-E-K-E-L-
 -R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-
 -L-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-A-V-G-E-P-A-E-
 -P-R-G-G-S-
 -P-G-N-N-R-K-
- 10 -Q-E-D-S-Q-P-M-
 -T-P-E-R-V-E-L-A-P-L-P-S-
 -R-R-D-H-H-G-A-N-F-S-
 -D-L-R-P-Q-G-L-E-
- 15 ICAM-1 er det første eksempel på et medlem af
 den immunoglobuline supergene familie, som binder til
 et integrin. Skønt begge disse familier spiller en vigtig
 rolle ved celleadhæsion, har interaktioner mellem dem ikke tidligere været forventet. I modsætning hertil
- 20 er interaktioner indenfor immunoglobulinsuperfamilien ganske almindelig. Det er meget sandsyneligt at
 yderligere eksempler på interaktioner mellem integrinet og immunoglobulinfamilierne vil kunne findes. LFA-1
 genkender en ligand, forskellig fra ICAM-1 (Springer,
- 25 T.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 5:223-252 (1987)),
 og leukocytintegrinet Mac-1 genkender en ligand, forskellig
 fra C3b1 i neutrofil-neutrofiladhæsion (Anderson, D.C., et al., Ann. Rev. Med. 38:175-194
 (1987)). Rensede MAG-holdige vesikler binder yderligere
- 30 re til neuritter, som er MAG, og MAG må således være i stand til heterofil interaktion med en særskilt receptor (Poltorak, M., et al., J. Cell Biol. 105:1893-1899 (1987)).

NCAM's rolle i neural-neural og neural-muskulære celleinteraktioner har været foreslået at skyldes de homofile NCAM-NCAM-interaktioner (Cunningham, B.A., et al., Science 236:799-806 (1987)). MAG's vigtige rolle i interaktioner mellem tilstødende, omdrejende loops i Schwann-celler omsluttende axoner under myelin-omslutningsdannelse kan skyldes interaktion med en særskilt receptor eller homofile MAG-MAG interaktioner. Homologien mellem NCAM og den hyppige forekomst af områ-
10 rådeområde-interaktioner indenfor den immunoglobuline supergene familie rejser muligheden for at ICAM-1 kunne engageres i homofile interaktioner samt ICAM-1-LFA-1-heterofile interaktioner. Binding af B-lymfoblastceller som co-eksprimerer lignende tætheder af LFA-1 og ICAM-1
15 til ICAM-1 i kunstige eller cellulære monolag kan imidlertid fuldstændig inhiberes ved præbehandling af B-lymfoblasten med LFA-1-MAb, mens adhærence er upåvirket af B-lymfoblast-præbehandling med ICAM-1-MAb. Præbehandling af monolaget med ICAM-1-Mab ophæver fuldstan-
20 dig binding (Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137:245-254 (1986); Marlin, S.D., et al., cell 51:813-819 (1987)). Disse erkendelser viser at hvis ICAM-1 homofile interaktioner overhovedet forekommer, må de være meget svagere end heterofile interaktioner
25 med LFA-1.

Muligheden for at leukocytintegrinerne kender ligander på en fundamental anden måde stemmer overens med nærværelsen af en 180 restsekvens i deres α -underenheder, der kan være vigtig i ligandbinding og som ik-
30 ke findes i RGD-genkendelsesintegrinerne (Corbi, A., et al. (EMBO J. 6:4023-4028 (1987))). Skønt man har foreslået at Mac-1 genkender RGD sekvens, som findes i iC3b 5086, er der ingen RGD-sekvens i ICAM-1 (fig. 8).

Dette er i overensstemmelse med det fibronetiske peptid GRGDSP og kontrolpeptidet GRGESP's manglende evne til at inhibere ICAM-1-LFA-1-adhæsion (Marlin, S.D., et al., cell 51:813-819 (1987)). Beslægtede sekvenser, såsom PRGGS og RGEKE findes imidlertid i ICAM-1 i områder, som siges at danne sløjfe mellem henholdsvis β -strengene a og b i område 2 og c og d i område 2 (fig. 9), og skulle således have mulighed for genkendelse. Det er af interesse at det homologe MAG-molekyle indeholder en RGD-sekvens mellem område 1 og 2 (Poltorak, M., et al., J. Cell Biol. 105:1893-1899 (1987); Salzer, J.L., et al., J. Cell. Biol. 104:957-965 (1987)).

Eksempel 19

15 Southern og Northern Blots.

Southern blots gennemførtes under anvendelse af 5 μ g genomisk DNA ekstraheret fra tre cellelinier; BL2, en Burkitt lymfomacellelinie (en gave fra Dr. Gilbert Lenoir); JY og Er-LCL, EBV-transformerede B-lymfoblastoidcellelinier.

DNA underkastedes digestion med 5X af den af fabrikanten anbefalet mængde af Bam HI og Eco RI endonucleaser (New England Biolabs). Efter elektroforese gennem en 0,8% agarosegel, overførtes DNA til en nylonmembran (Zeta Probe, BioRad). Filteret præhybridiseredes og hybridiseredes idet standardfremgangsmåderne fulgtes under anvendelse af ICAM cDNA fra HL-60 mærket med α -(32 P)d XTP's ved vilkårlig priming (Boehringer Mannheim). Northern blots gennemførtes under anvendelse af 20 μ g total RNA eller 6 μ g poly(A)⁺ RNA. RNA denatureredes og underkastedes elektroforese gennem en 1% agarose-formaldehydgel og elektro-overførtes til Zeta probe. Filtre præhybridiseredes og hybridiseredes som

beskrevet tidligere (Staunton, D.E., et al., Embo J. 6:3695-3701 (1987)) under anvendelse af HL-60 cDNA-proben af ^{32}P -mærkede oligonucleotidprober (beskrevet ovenfor).

5 Southern blots, hvor man benytter 3 kb cDNA-proben og genomisk DNA underkastet digestion med Bam HI og Eco RI viste enkle dominerende hybridiseringsfargmenter på henholdsvis 20 og 8 kb, hvilket tyder på et enkelt gen og på at det meste af den kodende infor-
10 mation findes indenfor 8 kb. I blots med tre forskellige cellelinier var der ikke tegn på restriktionsfragment polymorfisme.

Eksempel 20

15 Ekspression af ICAM-1-genet.

En "ekspressionsvektor" er en vektor, som (på grund af tilstedeværelsen af passende transkriptions- og/eller translationskontrolsekvenser) er i stand til at eksprimere et DNA- (eller cDNA)-molekyle, som har
20 været klonet i en vektor og derved producere et polypeptid eller protein. Ekspression af klonede sekvenser forekommer, når ekspressionsvektoren introduceres i en passende værtscelle. Hvis en prokaryotisk ekspressionsvektor benyttes vil den passende værtcelle således en-
25 hver prokaryotisk celle, der er i stand til at eksprimere de klonede sekvenser. Hvis man på lignende måde benytter en eukaryotisk ekspressionsvektor, ville den passende værtscelle være enhver eukaryotisk celle, der er i stand til at eksprimere de klonede sekvenser.
30 Da eukaryotisk DNA kan indeholde intervenerende sekvenser, og da sådanne sekvenser ikke kan fremstilles korrekt i prokaryotiske celler, foretrækkes det at anvende cDNA fra en celle, som er i stand til at eksprimere

ICAM-1 til opnåelse af et prokaryotisk genomisk ekspressionsvektorbibliotek. Fremgangsmåder til fremstilling af cDNA, og fremstilling af et genomisk bibliotek er angivet af Maniatis, T., et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)).

Det ovennævnte ekspressionsvektors genomiske bibliotek benyttes til at frembringe en bank af værtceller (som hver indeholder et medlem af biblioteket).
10 Ekspressionsvektoren kan introduceres i værtcellen ved en række forskellige midler (dvs. transformation, transfektion, protoplastsammensmeltning, elektropore-ring osv.). Banken med ekspressionsvektor-holdige celler formeres klonisk, og dets medlemmer prøves individuelt (under anvendelse af en immunoprøve) for at be-
15 stemme om de producerer et protein, der er i stand til at binde til antiICAM-1-antistof.

Ekspressionsvektorerne fra de celler, som producerer et protein, der er i stand til at binde til
20 anti-ICAM-antistof, analyseres dernæst yderligere for at bestemme om de eksprimerer (og således indeholder) hele ICAM-1-genet, om de kun eksprimerer (og indeholder) et fragment af ICAM-1-genet, eller om de eksprimerer (og indeholder) et gen, hvis produkt ikke
25 er ICAM-1, skønt det immunologisk er beslægtet med ICAM-1. Skønt en sådan analyse kan gennemføres med ethvert egnet middel, foretrækkes det at bestemme nucleotidsekvensen af DNA- eller cDNA-fragmentet, som er klonet i ekspressionsvektoren. Sådanne nucleotid-
30 sekvenser undersøges dernæst for at bestemme om de er i stand til at kode for polypeptider, som har den samme aminosyresekvens som ICAM-1's tryptiske digestionfragmenter (Tabel 5).

En ekspressionsvektor som indeholder et DNA- eller cDNA-molekyle, der koder for ICAM-1-genet, kan således genkendes ved : (i) Evnen til direkte ekspression af et protein, som et i stand til at binde til anti-ICAM-1-antistof; og (ii) tilstedeværelsen af en nucleotidsekvens, der er i stand til at kode for hver af de tryptiske fragmenter af ICAM-1. Det klonede DNA-molekyle af en sådan ekspressionsvektor kan fjernes fra ekspressionsvektoren og isoleres på ren form.

10

Eksempel 21

Funktionelle aktiviteter af rensset ICAM-1.

I celler fungerer ICAM-1 normalt som et overfladeprotein knyttet til cellemembranen. Funktionen af rensset ICAM-1 testedes derfor, efter at molekylet var rekonstitueret, i kunstige lipidmembraner (liposomer eller vesikler) ved opløsning af proteinet i detergent-solubiliserede lipider, efterfulgt af fjernelse af detergentet ved dialyse. ICAM-1 rensset fra JY-celler og elueret i detergentet octylglucosid, som beskrevet ovenfor, rekonstitueredes i vesikler, og ICAM-1-indeholdende vesikler fusioneredes til dækglas eller plastkulturbrønde, som tillod påvisningen af cellebinding til proteinet.

25 Fremstilling af plane membraner og plast-bundne vesikler.

Vesikler fremstilledes ved fremgangsmåden af Gay et al. (J. Immunol. 136:2026 (1986)). Kort fortalt opløstes æggephosphatidylcholin og kolesterol i trichlormethan og blandedes i et molært forhold på 7:2. Lipidblandingen tørredes til en tynd film under rotering under en strøm af nitrogen og lyofiliseres.

des dernæst i 1 time for at fjerne alle spor af tri-chlormethan. Lipidfilmen opløstes dernæst i 1% octyl-glucosid/0,14 M NaCl/20 mM Tris (pH 7,2) til en slut-koncentration af phosphatidylcholin på 0,1 mM. Ca. 5 10 µg rensat ICAM-1 eller human glycophorin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) som en kontrolmembran glycoprotein, sættes til hver af de opløste lipider. Protein-lipid-detergentopløsningen dialyseredes der-næst ved 4°C mod 3 hold af 200 voluminer af 20 mM 10 Tris/0,14 M NaCl, pH 7,2, og et hold af HBSS.

Plane membraner fremstilledes ved fremgangsmåden angivet af Brian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6159 (1984). Dækglas (med en diameter på 11 mm) kobles i 15 min. i en 1:6 fortynding af 7X detergent (Linbro), vas-15 kedes natten over i destilleret vand, henstod neddyppet i 70% ethanol og lufttørredes. En 80 µl dråbe af en ve-sikelsuspension indeholdende enten ICAM-1 eller glycophorin anbragtes på bunden af brøndene i en 24-brøndes klyngetestplade og de præparerede dækglass flød let på 20 toppen. Efter 20-30 min. inkubering ved stuetemperatur fyldtes brøndene med HBSS og dækglasset vendtes om for at bringe den plane membran opad. Brøndene vaskedes dernæst omhyggeligt med HBSS for at fjernes ubundne ve-sikler. Den plane membranoverflade udsattes aldrig for 25 luft.

Under forsøgene med plane membraner smeltet til glasoverflader viste det sig, at vesikler indeholdende ICAM-1 binder direkte til plastoverfladen af multi-brønde vævskulturplader og bevarer funktionel virkning 30 som bevist ved specifik cellebinding. Sådanne vesikler omtales herefter som "plast-bundne vesikler" (PBV), eftersom naturen af lipidvesikeler bundet til plast ikke er bestemt. Plast-bundne vesikler fremstilledes

ved tilsætning af 30 µl vesikelsuspension direkte til bunden af brøndene i 96-brøndes vævskulturbakker (Falcon) efterfulgt af inkubering og vaskning, som beskrevet for plane membraner.

5

Celleadhæsiionsprøver.

Celleadhæsiionsprøver ved anvendelse af plane membraner eller plast-bundne vesikler gennemførtes begge to på i det væsentlige samme måde, med undtagelse af
10 at celleantallet og voluminer for PBV-prøver reduceredes til en femtedel af det, der benyttedes ved plane membranprøver.

T-lymfocytter fra normale kontroller og en patient med leukocytadhæsiionsdefekt (LAD), hvis
15 celler ikke eksprimerer LFA-1 (Anderson, D.C. et al., J. Infect. Dis. 152:668 (1985)) fremstilledes ved dyrkning af perifere mononukleære blodceller med 1 µg/ml Concanavalin-A (Con-A) i RPMI-1640 plus 20% FCS med 5×10^5 celler/ml i 3 dage. Cellerne vaskedes dernæst
20 to gange med RPMI og en gang med 5 mM methyl- α -D-mannopyranosid til fjernelse af resterende lectin fra celleoverfladen. Cellerne dyrkedes i RPMI/20% FCS indeholdende 1 ng/ml rekombinant IL-2, og benyttedes mellem 10 og 22 dage efter initieringen af kultur.

25 Til påvisning af cellebinding til plane membraner eller PBV, radiomærkedes Con-A blaster, T-lymfoma SKW-3 og de EBV-transformerede B-lymfoblastoidcellelinier JY (LFA-1 positive) og den LFA-1 defekte lymfoblastoidcellelinie (BBN) (som stammer fra patient
30 nr. 1, Springer, T.A. et al., J. Exper. Med. 160: 1901-1918 (1986)) ved inkubering af 1×10^7 celler i 1 ml RPMI-1640/10% FCS med 100 uCi $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ i 1 time ved 37°C efterfulgt af 4 vaskninger med RPMI-1640 til

fjernelse af ikke-inkorporerede mærker. I monoklonalt antistofblokeringsforsøg præbehandledes celler eller plast-bundne vesikler med 20 µg/ml rensset antistof i RPMI-1640/10% FCS ved 4°C i 30 min., efterfulgt af 5 4 vaskninger til fjernelse af ubundet antistof. I forsøg for divalente kationers virkning på cellebinding, vaksedes cellerne en gang med Ca^{2+} -, Mg^{2+} -frit HBSS plus 10% dialyseret FCS, og CaCl og MgCl sættes til de indikerede koncentrationer. I alle forsøg præ-10 afbalanceredes celler og plane membraner eller PBV ved passende temperatur (4°C, 22°C eller 37°C) i den passende prøvepuffer.

Til måling af cellebinding til rensset ICAM-1 centrifugeredes ^{51}Cr -mærkede celler (5×10^5 EBV-15 transformanter i plane membranprøver; 1×10^5 EBV-transformanter eller SKW-3-celler, 2×10^5 Con-A-blaste i PBV-prøver) i 2 min. ved 25 x g på plane membraner eller PBV, efterfulgt af inkubering ved 4°C, 22°C eller 37°C i 1 time. Efter inkubering fjernedes 20 ubundne celler ved otte cykler med påfyldning og aspiration med puffer præindstillet til den passende temperatur. Bundne celler bestemtes ved solubilisering af brøndindholdet med 0,1 N NaOH/1% Triton X-100 og tælling på en γ-tæller. Procent cellebinding bestemtes 25 ved at dividere cpm fra bundne celler med input celleassocieret cpm. I plane membranprøver korrigeredes input cpm for forholdet mellem dækglassets overfladeareal og dyrkningsbrøndenes overfladeareal.

I disse prøver bandt EBV-transformerede B-30 lymfoblastoidceller, SKW-3 T-lymfomaceller og Con-A T-lymfoblaster specifikt til ICAM-1 i kunstige membraner (fig. 11 og 12). Bindingen var specifik, eftersom cellerne bandt meget svagt til kontrol plane membraner

eller vesikler indeholdende ækvivalente mængder af et andet humant celleoverfladeglycoprotein, glycophorin. Yderligere bandt LFA-1-positive EBV-transformanter og Con-A blaster medens deres LFA-1-negative modparter ikke bandt i nogen signifikant udstrækning, hvilket viser at bindingen var afhængig af tilstedeværelsen af LFA-1 på cellerne.

Både specifiteten af cellebinding og afhængighed af cellulær LFA-1 bekræftedes i monoclonale antistofblokeringsforsøg (fig. 13). Bindingen af JY-celler kunne inhiberes med 97%, når ICAM-1 indeholdende PBV præbehandlede med anti-ICAM-1 monoclonalt antistof RR1/1. Præbehandling af cellerne med det samme antistof havde ringe virkning. Omvendt inhiberedes det anti-LFA-1-monoclonale antistof TS1/18 binding med 96%, men kun når cellerne, men ikke PBV, var præbehandlet. Et kontrolantistof TS2/9 reaktivt med LFA-3 (et andet lymfocytoverfladeantigen) havde ingen signifikant inhiberende virkning, hverken når celler eller PBV præbehandlede. Dette forsøg viser, at ICAM-1 i sig selv og ikke visse mindre forurenende materialer i de kunstige membraner, medierer den observerede cellulære adhæsion, og at adhæsionen er afhængig af LFA-1 på bindingscellen.

Bindingen af celler til ICAM-1 i kunstige membraner viser desuden to andre egenskaber hos det LFA-1-afhængige adhæsionssystem: Temperaturafhængig og nødvendigheden af divalente kationer. Som vist i fig. 14 bandt Con-A blaster til ICAM-1 i PBV mest effektivt ved 37°C, delvis ved 22°C og meget svagt ved 4°C. Som vist i fig. 15 var bindingen fuldstændig afhængig af tilstedeværelsen af divalente kationer. Ved fysiologiske koncentrationer var Mg^{2+} alene tilstrækkelig for maksi-

mal cellebinding, mens Ca^{2+} alene giver meget lave niveauer af binding. En tiendedel Mg^{2+} af den normale koncentration sammen med Ca^{2+} var imidlertid synergistisk og frembragte maksimal binding.

- 5 Summarisk viser specifiteten af cellebinding til rensat ICAM-1, inkorporeret i kunstige membraner, den specifikke inhibering med monoklonale antistoffer, og temperaturen og det divalente kationbehov viser, at ICAM-1 er en specifik ligand for det LFA-1 afhængige
10 adhæsionsystem.

Eksempel 22

Ekspression af ICAM-1 og HLA-DR i allergiske og toksiske laptestreaktioner.

- 15 Hudbiopsier fra fem normale individer undersøgte for deres ekspression af ICAM-1 og HLA-DR. Det viste sig at medens endotelcellerne i nogle blodkar sædvanligvis eksprimerede ICAM-1, eksprimeredes der ingen ICAM-1 på keratinocytter fra normal hud. Ingen
20 farvning for HLA-DR på nogle keratinocytter fra normale hudbiopsier observeredes. Kinetikken af ekspression af ICAM-1 og klasse II-antigener undersøgte dernæst på celler i biopsier fra allergiske og toksiske hudlæsioner. Det viste sig at halvdelen af de seks undersøgte
25 individer havde keratinocytter, som eksprimerede ICAM-1, fire timer efter anvendelse af haptent (Tabel 10). Der var en øgning i procentdelen af individer, der eksprimerer ICAM-1 på deres keratinocytter med tiden for udsættelse af haptent, samt en øgning af intensiteten af farvning, hvilket indikerer mere ICAM-1
30 ekspression per keratinocyt op til 48 timer. Faktisk er der på dette tidspunkt en del keratinocytter i alle biopsier farvet positivt for ICAM-1. Ved 72 timer (24

timer efter hapten fjernedes) havde 7 ud af 8 individer stadigvæk ICAM-1 eksprimeret på deres keratinocytter, mens ekspressionen af ICAM-1 på et individ vandrede mellem 48 og 72 timer.

Tabel 10

Kinetik af introduktion af ICAM-1 og HLA-DR på keratinocytter fra allergiske labtestbiopsier.

5					
	Tid efter lappåførsel (timer)	Antallet af biopsier	ICAM-1 alene	HLA-DR alene	ICAM-1 og HLA-DR
	Normal hud	5	0	0	0
10	Allergisk laptest				
	4	6	3 ^a	0	0
	8	9	3	0	0
	24	8	7	0	0
15	48 ^b	8	5	0	3
	72	8	6	0	1

20

25

^a Prøver betragtedes som værende positive, hvis i det mindste små klynger af keratinocytter farvedes.

^b Alle lapper fjernedes på dette tidspunkt.

Histologisk var farvningsmønsteret for ICAM-1 på keratinocytter fra biopsier taget fire timer efter påføring af hapten sædvanlig i små klynger. Ved 48 timer eksprimeredes ICAM-1 på overfladen af størstedelen af keratinocytterne, idet der ikke sås nogen forskel mellem skadens center og periferi. Intensiteten af farvningen aftog som keratinocytterne nærmedes stratum corneum. Dette konstateredes hos biopsier taget fra centrum og periferien af skaderne. På dette tidspunkt var laptesten også positiv (infiltration, erythema og vesikler). Der observeredes ingen forskel i ICAM-1 ekspression når forskellige haptener påførtes følsomme individer. Foruden keratinocytterne eksprimeredes ICAM-1 desuden på nogle mononukleære celler og endotelceller på stedet med skaden foruden keratinocytterne.

Ekspressionen af HLA-DR på keratinocytter på de allergiske hudskader var mindre hyppige end ekspressionen af ICAM-1. Ingen af de undersøgte individer havde skader med keratinocytter, som farvede positivt for HLA-DR op til 24 timer efter påførsel af haptens. Faktisk havde kun fire biopsiprøver keratinocytter, som eksprimerede HLA-DR og ingen biopsier havde keratinocytter, der var positive overfor HLA-DR og ikke ICAM-1 (Tabel 10).

I modsætning til den allergiske laptestskade havde den toksiske laptestskade, induceret med krotonolie eller natriumlaurylsulfat, keratinocytter, der udviste ringe, hvis nogen, ICAM-1 på deres overflader på alle testede tidspunkter (Tabel 11). Faktisk havde kun én af de 14 individer, der var udsat for den toksiske laptest keratinocytter, der eksprimerede ICAM-1 i deres skader 48 timer efter lappåførslen, hvilket tidspunkt er det optimale tidspunkt for ICAM-1-ekspression

hos de allergiske laptestindivider. I modsætning til de allergiske laptestbiopsier eksprimeredes der desuden ikke HLA-DR på keratinocytter af toksiske laptest-skader.

- 5 Disse data indikerer at ICAM-1 eksprimeres i immunbaseret inflammation og ikke i toksisk baseret inflammation, og ekspressionen af ICAM-1 kan således benyttes til at skelne mellem immunbaseret- og toksisk baseret inflammation, såsom akut nyresvigt hos nyre-
10 transplantationspatienter, hvor det er vanskeligt at bestemme hvorvidt svigtet skyldes afvisning eller nephrotoxicitet af det immunundertrykkende terapeutiske middel. Nyrebiopsi og vurdering af opregulering af ICAM-1 ekspressionen vil tillade differentiering mellem
15 immunbaseret afvisning og ikke-immunbaseret toxicitetsreaktion.

100

Tabel 11

Kinetik af introduktion af ICAM-1 og HLA-DR på keratinocytter fra toxiske laptestbiopsier.

5					
	Tid efter lappåførsel (timer)	Antallet af biopsier	ICAM-1 alene	HLA-DR alene	ICAM-1 og HLA-DR
10	4	4	0	0	0
	8	3	1 ^a	0	0
	24	3	1	0	0
	48 ^b	14	1	0	0
	72	3	1	0	0

^a Prøver betragtedes som værende positive, hvis i det mindste små klynger af keratinocytter farvedes.

^b Alle lapper fjernedes på dette tidspunkt.

Eksempel 23Eksprimering af ICAM-1 og HLA-DR i godartede kutane sygdomme.

5 Celler fra hudbiopsier med skader fra patienter med forskellige typer af inflammatoriske hudsygdomme undersøgtes for deres ekspression af ICAM-1 og HLA-DR. En del keratinocytter i biopsier med allergisk kontakt-eksem, pemphigoid/pemphigus og lichen planus eksprime-

10 rede ICAM. Lichen planus-biopsier viste den mest intense farvning med et mønster svarende til eller endog stærkere end dem, der konstateredes hos de 48 timer allergiske laptestbiopsier (Tabel 12). I overensstemmelse med resultaterne, der sås ved den allergiske laptest konstateredes den mest intensive ICAM-1-farvning på

15 steder med kraftig mononukleær celleinfiltration. 8 ud af de 11 testede lichen planus-biopsier var yderligere positive for HLA-DR ekspression på keratinocytter.

Ekspressionen af ICAM-1 på keratinocytter fra hudbiopsier fra patienter med exanthema og urticaria

20 var mindre udtalte. Kun fire ud af de syv testede patienter med disse sygdomme havde keratinocytter, der eksprimerede ICAM-1 på læsionsstedet. HLA-DR ekspressionen viste sig kun på én patient, og dette var i konjunktions med ICAM-1.

25 Endotelceller og en del af de mononukleære celleinfiltrater fra alle de testede godartede inflammatoriske hudsygdomme eksprimerede ICAM-1 i forskellig udstrækning.

Tabel 12

Ekspression af ICAM-1 og HLA-DR på
keratinocytter fra godartede kutane sygdomme.

5	Diagnose	Antallet af tilfælde	ICAM-1 alene	HLA-DR alene	ICAM-1 og HLA-DR
	Allergisk				
	kontakteksem	5	3 ^a	0	2
	Lichen Planus	11	3	0	8
10	Pemhigoid/				
	Pemhigus	2	2	0	0
	Exanthema	3	2	0	0
	Urticaria	4	1	0	1

15

^aPrøver betragtedes som værende positive, hvis mindst
20 små klynger af keratinocytter farvedes.

Eksempel 24Ekspression af ICAM-1 på keratinocytter
fra hudskader hørende til psoriasis.

Ekspressionen af ICAM-1 i hudsbiopsier fra 5 patienter med psoriasis undersøgtes før initieringen og periodisk under et forløb med PUVA-behandling. Biopsier opnåedes fra fem patienter med klassisk psoriasis bekræftet ved histologi. Biopsier blev udtaget i rækkefølge før og under indikeret tid for PUVA-behandling. PUVA tilførtes 3-4 gange om ugen. Biopsier blev taget fra periferien af psoriasis plaques hos fem patienter og yderligere biopsier blev taget fra klinisk normal hud fra fire af patienterne.

Friske hudbiopsistykker blev frosset og opbevaret i flydende nitrogen. Seks μm cryostatsektioner lufttørredes natten over ved stuetemperatur, fikseredes i acetone i 10 min. og farvedes enten straks eller indvikledes i aluminiumfolie og opbevarede ved -80°C indtil farvning.

Farvning gennemførtes på den efterfølgende måde. Sektioner inkuberedes med monoklonale antistoffer og farvedes ved en 3-trins immunoperoxidasemetode (Stein, H., et al., Adv. Cancer Res 42:67-147, (1984)), under anvendelse af diaminobenzidin H_2O_2 -substrat. Tonsiler og lymfeknuder benyttedes som en positiv kontrol på anti-ICAM-1- og HLA-DR-farvning. Væv farvet i fravær af et primært antistof var negative kontroller.

De monoklonale antistoffer mod HLA-DR erhveredes fra Becton Dickinson (Mountainview, California). Det monoklonale anti-ICAM-1-antistof var R6-5-D6. Peroxidase-konjugeret kanin-anti-muse-Ig og peroxidase-konjugeret svine-anti-kanin-Ig erhvervedes fra DAKAPATTS, København, Danmark. Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid opnåedes fra Sigma (St. Louis, Mo.).

Resultaterne af undersøgelsen viste at endotelcellerne i nogle blodkar eksprimerer ICAM-1 i både syg og normal hud, men intensiteten af farvning og antallet af blodkar, der eksprimerer ICAM-1 øgedes i psoriasis-hudskaderne. Mønsteret af ekspresion af ICAM-1 varierede yderligere i keratinocytter fra ubehandlet psoriasis-hudskader fra de fem patienter, fra kun små klynger med cellefarvning til at mange farvede keratinocytter. Under forløbet med PUVA-behandling viste ICAM-1-ekspressionen på to af patienterne (patient nr. 2 og 3) udbredt reduktion, som gik forud eller var samstemmende med klinisk remission (Tabel. 13). Patienterne nr. 1, 4 og 5 havde formindskelse og øgning af ICAM-1-ekspression under PUVA-behandlingen, hvilket korrelerer til henholdsvis kliniske remissioner og tilbagefald. Der var ingen ICAM-1-ekspression på keratinocytter fra normal hud før eller efter PUVA-behandling. Dette indikerer, at PUVA ikke inducerer ICAM-1 på keratinocytter fra normal hud.

Observationen af at densiteten af det mononukleære celleinfiltrat korrelerede med mængden af ICAM-1-ekspression på keratinocytter var af betydning. Dette vedrører både et aftagende antal mononukleære celler i skader under PUVA-behandling, når ICAM-1-ekspression desuden vandrede, og et øget antal af mononukleære celler under PUVA-behandling, når ICAM-1-ekspression på keratinocytter var mere fremtrædende. Endotelceller og dermale mononukleære celler er desuden ICAM-1-positive. I klinisk normal hud, var ICAM-1-ekspressionen begrænset til endotelceller uden mærkning af keratinocytter.

Ekspressionen af HLA-DR på keratinocytter var variabel. Der var ingen HLA-DR-positiv biopsi, der ikke også var ICAM-1-positiv.

Summarisk viser disse resultater at før behandling er ICAM-1-ekspression udtalt på keratinocyterne og korrelerer til et tæt mononukleær celleinfiltrat. Under PUVA-behandling ses en udtalt mindskelse af ICAM-1-farvning parallelt med den kliniske forbedring. Histologisk mindskedes det dermale infiltrat også. Når et klinisk tilbagefald var tydelig under behandling øgedes ekspressionen af ICAM-1 på keratinocyterne og tætheden af dermal infiltrat. Når en klinisk remission konstateredes under behandling var der en samtidig aftagelse i ICAM-1-farvning på keratinocyterne og en mindskelse i det dermale infiltrat. Ekspressionen af ICAM-1 på keratinocytter svarer således til tætheden af mononukleær celleinfiltrat på dermis. Disse data viser at klinisk reaktion overfor PUVA-behandling resulterer i en udtalt mindskelse af ICAM-1-ekspression på keratinocytter parallelt med en mere moderat aftagelse af de mononukleære celler. Dette indikerer at ICAM-1-ekspression på keratinocytter er ansvarlig for initering og opretholdelse af det dermale infiltrat og at PUVA-behandling nedregulerer ICAM-1, som på sin side mindsker det dermale infiltrat og den inflammatoriske reaktion. Dataene indikerer desuden at der var en variabel HLA-DR-ekspression på keratinocytter under PUVA-behandling.

Ekspressionen af ICAM-1 på keratinocytter med psoriasisskader korrelerer med den kliniske alvorlighed af skaden samt størrelsen af dermal infiltrat. ICAM-1 spiller således en central rolle ved psoriasis og inhibering af dets ekspression og/eller inhibering af dets interaktion med CD 18 komplekset på mononucleare celler vil være en virkningsfuld behandling af sygdommen. Registrering af ICAM-1-ekspression på keratinocytter vil yderligere være et effektivt værktøj til

diagnostisering og prognose, samt evaluering af terapi-
forløbet for psoriasis.

Tabel 13

Sekventiel ICAM-1-ekspression af keratinocytter i hud-skader med psoriasis (PS) og klinisk normal hud (N) før og under PUVA-behandling.

5

Tid før og under PUVA-behandling		patient nr.							
		1	2	3	4	5			
		PS	PS	N	PS	N	PS	N	PS
10	0	+	+	-	++	-	++	-	+++
	1 dag	+							
	1 uge	+	+	-	-	-	++	-	+
	0								
	2 uger	++			+	-	+	-	+
	3 uger	++							
					*		0		
15	4 uger	++	+	-	-	-	++	-	
			*						*
	5-6 uger		-	-					-
									0
	7 uger						(++)	(+)	+++
		*							*
	10 uger	(+)							-

20

- +++ Mange positive keratinocytter.
 ++ En del positive keratinocytter.
 + Fokalt positive keratinocytter.
 (+) Meget få, spredte positive keratinocytter.
 30 - Ingen positiv farvning.
 x Klinisk remission.
 o Klinisk tilbagefald.

Eksempel 25Ekspression af ICAM-1 og HLA-DR i
maligne kutane sygdomme.

Modsat læsioner fra godartede kutane tilstande
5 var ekspressionen af ICAM-1 på keratinocytter fra ma-
lign hudskader meget mere variable (Tabel 14). Af de
23 undersøgte kutane T-cellelymfomas, identificeredes
ICAM-1positive keratinocytter kun i 14 tilfælde. Der
var en tendens til at keratinocytter fra biopsier med
10 mycosis fungoide skader taber deres ICAM-1-ekspression
ved udvikling af sygdommen til mere fremskridne trin.
ICAM-1-ekspression observeredes imidlertid på en varie-
rede del af det mononucleare celleinfiltrat fra de fle-
ste af de kutane T-cellelymfomaskader. Blandt de re-
15 sterende undersøgte lymfoma havde fire ud af otte kera-
tinocytter, der eksprimerede ICAM-1. Af de 29 patienter
med maligne kutane sygdomme, som undersøgtes havde
5 keratinocytter, som eksprimerede HLA-DR uden at
eksprimere ICAM-1 (Tabel 14).

Tabel 14

Ekspression af ICAM-1 og HLA-DR på keratinocytter fra
maligne kutane sygdomme.

5					
	Diagnose	Antal af	ICAM-1	HLA-DR	ICAM-1 og
		tilfælde	alene	alene	HLA-DR
	CTCL, MFI	8	1 ^a	0	4
	CTCL, MFII-III	10	1	2	5
10	CTCL, SS	3	1	0	2
	CTCL, Stor celle	2	0	2	0
	CBCL	2	0	0	1
	Leukemia Cutis	3	1	1	1
	Histiocytosis X	1	0	0	0
15					

^aPrøver betragtedes som værende positive, hvis små
klynger af keratinocytter farvedes.

Eksempel 26Virkning af anti-ICAM-1-antistoffer på proliferationen af humane perifere mononukleære blodceller.

- Humane perifere mononukleære blodceller inducere-
- 5 redes for at proliferere ved tilstedeværelsen og genkendelsen af antigener eller mitogener. Visse molekyler, såsom mitogenet concanavalin A, eller det T-cellebindende antistof OKT3 forårsager en ikke-specifik proliferation af perifere mononukleære blodceller.
- 10 Humane perifere mononukleære blodceller er heterogene, idet de består af subpopulationer af celler, som er i stand til at genkende specifikke antigener. Når en perifer mononukleær blodcelle, som er i stand til at genkende et særligt specifikt antigen,
- 15 møder dette antigen induceres proliferationen af denne subpopulation af mononukleær celle. Tetanus toxoid og "keyhole limpet" hæmocyanin er eksempler på antigener, som genkendes af subpopulationer af perifere mononukleære blodceller, men som ikke genkendes at alle per-
- 20 rifere mononukleære celler hos sensibiliserede individer.

- Anti-ICAM-1-monomoklonalt antistof R6-5-D6's evne til at inhibere prolifererende reaktioner fra humane perifere mononukleære blodceller i systemer, der vides
- 25 at kræve celle-celleadhæsioner testedes.

- Perifere mononukleære blodceller rensedes på Ficoll-Paque (Pharmacia) gradienter ifølge fabrikantens instruktioner. Efter opsamling af grænsefladen vaskedes cellerne tre gange med RPMI 1640 medium og dyrkedes i
- 30 fladbundede, 96-brøndes mikrotiterplader i en koncentration på 10^6 celler/ml i RPMI 1640 medium suppleret med 10% fetal bovin serum, 2 mM glutamin og gentamicin (50 µg/ml).

Antigen, enten T-cellemitogenet, concanavalin A (0,25 µg/ml), det T-celle-bindende antistof, OKT3 (0,001 µg/ml), "keyhole limpet" hæmocyanin (10 g/ml) eller tetanus toxoid (1:100 fortynding fra kilde) sættes til celler, som dyrkedes som beskrevet ovenfor enten i nærværelse eller fravær af anti-ICAM-antistof (R6-5-D6; slutkoncentration på 5 g/ml). Cellerne dyrkedes i 3,5 dage (concanavalin A forsøg), 2,5 dage (OKT3-forsøg) eller 5,5 dage ("keyhole limpet" hæmocyanin og tetanus toxoid-forsøg) før prøverne afsluttedes.

18 timer før afslutningen af prøven sættes 2,5 µCi ³H-thymidin til kulturerne. Cellulær proliferation prøvedes ved at måle inkorporeringen af thymidin i DNA ved de perifere mononukleære blodceller. Inkorporeret thymidin opsamledes og taltes i en flydende scintillationstæller (Merluzzi et al., J. Immunol. 139:166-168 (1978)). Resultaterne af disse forsøg er vist i fig. 16 (concanavalin A-forsøg), fig. 17 (OKT3-forsøg), fig. 18 ("keyhole limpet" hæmocyanin-forsøg) og fig. 19 (tetanus toxoid-forsøg).

Det viste sig, at anti-ICAM-1-antistof inhiberer proliferative reaktioner overfor det ikke-specifikke T-cellemitogen, ConA; det ikke-specifikke T-celleassocierede antigen, OKT-3; og de specifikke antigener, "keyhole limpet" hæmocyanin og tetanus toxoid, i mononukleære celler. Inhiberingen af anti-ICAM-1-antistof var sammenlignelig med det anti-LFA-1-antistof, der antyder at ICAM-1 er en funktionel ligand af ICAM-1, og at antagonisme af ICAM-1 vil inhibere specifikke forsvarssystemreaktioner.

Eksempel 27Virkning af anti-ICAM-1-antistof på den
blandede lymfocytreaktion.

Som omtalt ovenfor er ICAM-1 nødvendig for effektive cellulære interaktioner under en immunreaktion medieret gennem LFA-1-afhængig celleadhæsion. Introduktionen af ICAM-1 under immunreaktioner eller inflammatorisk sygdom tillader interaktionen af leukocytter med hinanden og med entodelceller.

10 Når lymfocytter fra to ikke-relaterede individer dyrkes i hinandens nærværelse observeres blasttransformation og celleproliferation af lymfocytterne. Denne reaktion af én population af lymfocytter overfor nærværelsen af en anden population af lymfocytter er kendt
15 som en blandet lymfocytreaktion (MLR), og den er analog med reaktionen af lymfocytter overfor tilsætningen af mitogener (Immunology The Science of Self-Nonself Discrimination, Klein. J., John Wiley & Sons, NY (1982), s. 453-4581).

20 Der gennemførtes forsøg til bestemmelse af virkningen af anti-ICAM-1-monoklonale antistoffer på human MLR. Disse forsøg gennemførtes som følger. Perifert blod opsamledes fra normale raske donorer ved venepunktur. Blodet opsamledes i heparinisrede rør og fortyndes
25 1:1 ved stuetemperatur med Puck's G (GIBCO) balancerede saltopløsning (BSS). Blodblandingen (20 ml) anbragtes ovenpå 15 ml af en Ficoll/Hypaque densitetsgradient (Pharmacia, tæthed = 1,078 stuetemperatur) og centrifugeredes ved 1000 x g i 20 min. Grænsefladen opsamledes
30 og vaskedes 3X i Puck's G. Cellerne taltes på et hæmacytometer og genopslæmmedes i RPMI-1640 dyrkningsmedium (GIBCO) indeholdende 0,5% gentamicin, 1 mM Lglutamin (GIBCO) og 5% varmeinaktiveret (56°C, 30

min.) human AB sera (Flow Laboratories) (herefter omtalt som RPMI-dyrkningsmedium).

Muse-anti-ICAM-1 (R6-5-D6) benyttedes i disse forsøg. Alle monoklonale antistoffer (fremstillet fra ascites af Jackson ImmunoResearch Laboratories, Boston, MA) benyttedes som rensede IgG-præparater.

Perifere mononucleare blodceller (PBMC) dyrkedes i medium med $6,25 \times 10^5$ celler/ml i Linbro rundbundede mikrotiterplader (# 76-013-05). Stimulatorceller fra en adskilt doner bestråledes ved 1000 R og dyrkedes med respondercellerne ved den samme koncentration. Det totale volumen per kultur var 0,2 ml. Kontroller omfattede responderceller alene og stimulatorceller alene. Dyrkningspladerne inkuberedes ved 37°C i en 5% CO₂-fugtet luftatmosfære i 5 dage. Brøndene pulseredes med 0,5 µCi tri..... thymidin (³HT) (New England Nuclear) i mindst 18 timer per kultur. I nogle tilfælde gennemførtes en 2-vejs MLR. Protokollen var den samme med undtagelse af at den anden donors celler ikke inaktiveredes ved bestråling.

Cellerne høstede på glasfiberfiltre under anvendelse af et automatiseret multiprøvehøstapparat (Skatron, Norge), idet der rensedes med vand og methanol. Filtrene ovntørredes og taltes i Aquasol i en Beckman (LS-3801) flydende scintillatortæller. Resultaterne er angivet som middelværdien af CPM $\pm$ middelfejl for 6 individuelle kulturer.

Tab. 16 viser at rensede anti-ICAM-1 monoklonale antistoffer inhiberer MLR på en dosisafhængig måde med signifikant undertrykkelse synlig ved 20 ng/ml. Renset muse-IgG havde ringe eller ingen undertrykkende virkning. Undertrykkelse af MLR med det anti-ICAM-1 monoklonale antistof forekommer når antistoffet tilsættes indenfor de første 24 timers dyrkning (Tabel 17).

Tabel 16

Virkning af anti-ICAM-1-antistof på én-vejs lymfocytreaktionen.

5	Responderceller ^a Stimulatorceller ^b Antistof ^c			3H-Inkorporation (CPM)	
	-	-	-	445 ^d ±	143
	-	+	-	148 ±	17
	+	-	-	698 ±	72
10	+	+	-	42,626 ±	1,579
	+	+	mIgG (10.0 ug)	36,882 ±	1,823 (14%)
	+	+	mIgG (0.4 ug)	35,500 ±	1,383 (17%)
15	+	+	mIgG (0.02 ug)	42,815 ±	1,246 (0%)
	+	+	R6-5-D6 (10.0 ug)	8,250 ±	520 (81%)
	+	+	R6-5-D6 (0.4 ug)	16,142 ±	858 (62%)
	+	+	R6-5-D6 (0.03 ug)	28,844 ±	1,780 (32%)
20	a.	Responderceller (6,25 X 10 ⁵ /ml)			
	b.	Stimulatorceller (6,25 X 10 ⁵ /ml, bestrålet ved 10000R).			
	c.	Renset monoklonalt antistof til ICAM-1 (R6-5-D6) eller renset muse IgG (mIgG) ved slutkoncentrationer (µg/ml).			
25	d.	Middelværdi ± middelfejl af 5-6 kulturer, antallet i parentes indikerer procent inhibering af MLR.			

115

Tabel 17

Tilsætningstidspunkt af anti-ICAM-1.

5	R ^a	S ^b	Tilsætninger ^c	³ H Inkorporering (CPM)				
				Tilsætningstidspunkt for medium eller antistof				
				Dag 0	Dag 1	Dag 2		
10	-	-	medium	205 ^d ± 14	476 ± 132	247 ± 75		
	-	+	medium	189 ± 16	nd ^e	nd		
	+	-	medium	1,860 ± 615	nd	nd		
15	+	+	medium	41,063 ± 2,940	45,955 ± 2,947	50,943 ± 3,072		
	+	+	R6-5-D6	17,781 ± 1,293 (57%) ^f	38,409 ± 1,681 (16%)	47,308 ± 2,089 (7%)		

- 20 a. Resonderceller ($2,5 \times 10^5$ /ml).
- b. Stimulatorceller ($6,25 \times 10^5$ /ml, bestrålet ved 1000 R).
- c. Dyrkningsmedium eller rensset monoklonalt anti-stof til ICAM-1 (R6-5-D6) ved 10 µg/ml tilsættes på dag 0 med 24 timers intervaller.
- 25 d. Middelværdi ± middelfejl af 4-6 kulturer.
- e. nd = ikke udført.
- f. Procent inhibering

Antistofs evne til overfor ICAM-1 at inhibere MLR viser at ICAM-1 monoklonale antistoffer har terapeutisk anvendelse ved akut transplantationsafvisning. ICAM-1 monoklonale antistoffer har desuden terapeutisk
5 virkning hvad angår immunmedierede sygdomme, der afhænger af LFA-1/ICAM-1 regulerede celle til celle interaktioner.

De her beskrevne forsøg viser at tilsætningen af monoklonale antistoffer til ICAM-1 inhiberer den blandede lymfocytreaktion (MLR), når de tilsættes under de
10 første 24 timer af reaktionen. ICAM-1 bliver yderligere opreguleret på humane perifere blodmonocytter under in vitro dyrkning.

Det har yderligere vist sig, at ICAM-1 ikke
15 eksprimeres på hvilende humane perifere blodlymfocytter eller -monocytter. ICAM-1 opreguleres på monocytterne af dyrkede celler alene eller celler, der er codyrket med ikke-relaterede donorceller i en blandet lymfocytreaktion under anvendelse af almindelige flowcytometriske analyser (fig. 20). Denne opregulering af
20 ICAM-1 på monocytter kan anvendes som en indikator for inflammation, især hvis ICAM-1 eksprimeres på friske monocytter fra individer med akut eller kronisk inflammation.

25 ICAM-1's specificitet for aktiverede monocytter og antistoffets evne overfor ICAM-1 til at inhibere en MLR antyder at ICAM-1-monoklonale antistoffer må have en diagnostisk og terapeutisk mulighed ved akut transplantationsafvisning og relaterede immunmedierede
30 sygdomme, der kræver celle til celle interaktioner.

Eksempel 28Synergistiske virkninger af den kombinerede administrering af anti-ICAM-1- og anti-LFA-1-antistoffer.

Som vist i eksempel 27 inhiberes MLR af anti-
5 ICAM-1-antistof. MLR kan desuden inhiberes af anti-LFA-1-antistoffet. For at bestemme hvorvidt den kombinerede administration af anti-ICAM-1- og anti-LFA-1-antistoffer ville have en forbedret eller synergistisk virkning gennemførtes en MLR-prøve (gennemført som beskrevet i eksempel 27) i nærværelse af forskellige
10 koncentrationer af de to antistoffer.

Denne MLR-prøve viste at kombinationen af anti-ICAM-1 plus anti-LFA-1, i koncentrationer hvor intet antistof alene dramatisk inhiberer MLR, er signifikant
15 mere potente i inhibering af MLR-reaktionen (Tabel 18). Dette resultat indikerer at terapier som involverer coadministreringen af anti-ICAM-1-antistof (eller fragmenter deraf) og anti-LFA-1-antistof (eller fragmenter deraf) har kapaciteten til at bibringe en forbedret
20 anti-inflammatorisk terapi. Sådan en forbedret terapi muliggør administrering af lavere doser af antistof, end der ellers ville være terapeutisk effektivt, og dette er af vigtighed, hvor høje koncentrationer af individuelle antistoffer inducerer en antiidiotypisk reaktion.
25

Tabel 18

Virkning af forskellige doser af anti-ICAM-1 og (R3.1) anti-LFA-1 på blandet lymfocytreaktion.

5	% Inhibering					
	Koncentration (µg/ml)					
	Anti-ICAM-1 (R6-5-D6)					
Anti-LFA-1	0	0,004	0,02	0,1	0,5	2,5
100,0	0	7	31	54	69	70
0,0008	1	7	28	48	62	71
0,004	0	13	30	50	64	72
0,02	29	38	64	75	84	86
0,1	92,5	90	91	92	92	92
150,5	93	90	90	92	93	91

Eksempel 29

Virkning af anti-ICAM-1-antistof ved undertrykkelse af afvisningen af transplanterede allogene organer.

For at vise virkningen af anti-ICAM-1-antistof ved undertrykkelse af afvisningen af et allogenisk transplanteret organ, transplanteredes Cynomolgus aber med allogene nyrer i overensstemmelse med fremgangs-
25 måden beskrevet af Cosimi et al. (Transplant. Proc. 13: 499-503 (1981)) med den ændring at valium og ketamin benyttedes som anæsthesia.

Nyretransplantationen gennemførtes således i det væsentlige som følger. Heterotropisk nyreallotransplan-
30 tation gennemførtes i 3-5 kg Cynomolgus aber, i det væsentlige som beskrevet af Marquet (Marquet et al., Medical Primatology, Part II, Basel, Karger, s. 125 (1972)) efter induktion af anæsthesia med valium og

ketamin. Ende-til-side anastomoser af donor nyrekar på et stykke af aorta eller vena cava konstrueredes under anvendelse af 7-0 Prolene sutur. Donorureter spatuleredes og implanteredes ind i blæren ved hver ekstravesiale adgang (Taguchi, Y., et al., i Dausset et al. (eds), in: Advances in Transplantation, Baltimore, Williams & Wilkins, s. 393 (1968)). Nyrefunktion evalueredes ved ugentlig eller to gange ugentlig serumcreatinin-bestemmelser. Yderligere skaffedes hyppige
10 allotransplantationsbiopsier til histopatologiske undersøgelser, og fuldstændige autopsier gennemførtes på alle ikke-overlevende modtagere. Hos de fleste modtagere gennemførtes bilateral nephrectomi på transplantationstidspunktet og efterfølgende uremisk død be-
15 tragtedes som slutpunktet for allotransplantationsoverlevelse. Hos nogle modtagere gennemførtes unilateralativ nephrectomi og kontralateral ureteral ligation på transplantationstidspunktet. Når allotransplantationsafvisning forekom fjernedes ligaturen på den
20 autologe ureter, hvilket resulterede i restitution af normal nyrefunktion og muligheden for at fortsætte immunologisk registrering hos det modtagne dyr.

Monoklonalt antistof R6-5-D6 administreredes dagligt i 12 dage, startende to dage før transplantation, i en dosis på 1-2 mg/kg/dag. Serumkoncentrationer af creatinin testedes periodisk for at registrere afvisning. Virkningen af anti-ICAM-1-antistof på immunosystemets afvisning af de allogeniske nyrer er vist i Tabel 15.

120

Tabel 15

Overlevelsestid for allogene nyremodtagere.

5	Kontrol-	Overlevelses-	R6-5-D6 be-	Overlevelses-
	abe #	tid (dage)	handlet abe	tid (dage) ^a
	1	8	1	20
	2	11	2	8
	3	11	3	30
10	4	10	4	31
	5	9	5	11
	6	10	6	23 ^b

15 ^a Dyrene tildeltes 1-2 mg/kg/dag i 12 dage startende
2 dage før transplantationen.

^b Stadig i live den 8. april 1988.

20 Resultaterne viser at R6-5-D6 var effektiv ved
forlængelse af livet hos aber, der modtog allogene nyre-
transplanteringer.

P A T E N T K R A V

1. Monoklonalt antistof, k e n d e t e g n e t ved, at det er R6-5-D6, der er i stand til at binde til et molekyle, valgt fra gruppen bestående af ICAM-5 1 og funktionelle derivater af ICAM-1.

2. Antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at molekylet er i stand til at binde til en receptor, der findes på overfladen af en lymfocyt, og at bindingen af antistoffet til molekylet svækker molekylets evne til at binde til lymfocytens receptormolekyle.

3. Antistof ifølge et vilkårligt af kravene 1-2, k e n d e t e g n e t ved, at det er på mærket form.

4. Hybridomacelle, k e n d e t e g n e t ved, at den er i stand til at producere det monoklonale antistof ifølge et vilkårligt af kravene 1, 2 eller 3.

5. Hybridomacelle, k e n d e t e g n e t ved, at den er i stand til at producere det monoklonale antistof R6-5-D6, idet cellen er ATCC HB 9580.

20 6. Fragment af antistoffet ifølge et vilkårligt af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at det er i stand til at binde til molekylet.

7. Fragment af antistoffet ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at det er på mærket form.

25 8. Fremgangsmåde til diagnosticering af tilstedeværelsen og lokaliseringen af en ICAM-1-eksprimerende tumorcelle i et pattedyr eller menneske, som man formoder indeholder en sådan celle, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter:

30 (a) inkubering af en vævsprøve fra individet, med en blanding indeholdende en detekterbart mærket bindingsligand, der er i stand til at binde til ICAM-1, idet liganden vælges fra gruppen bestående af et an-

tistof ifølge et vilkårligt af kravene 1-3 og et fragment af et antistof ifølge et vilkårligt af kravene 6 eller 7, hvor fragmentet er i stand til at binde til ICAM-1, og

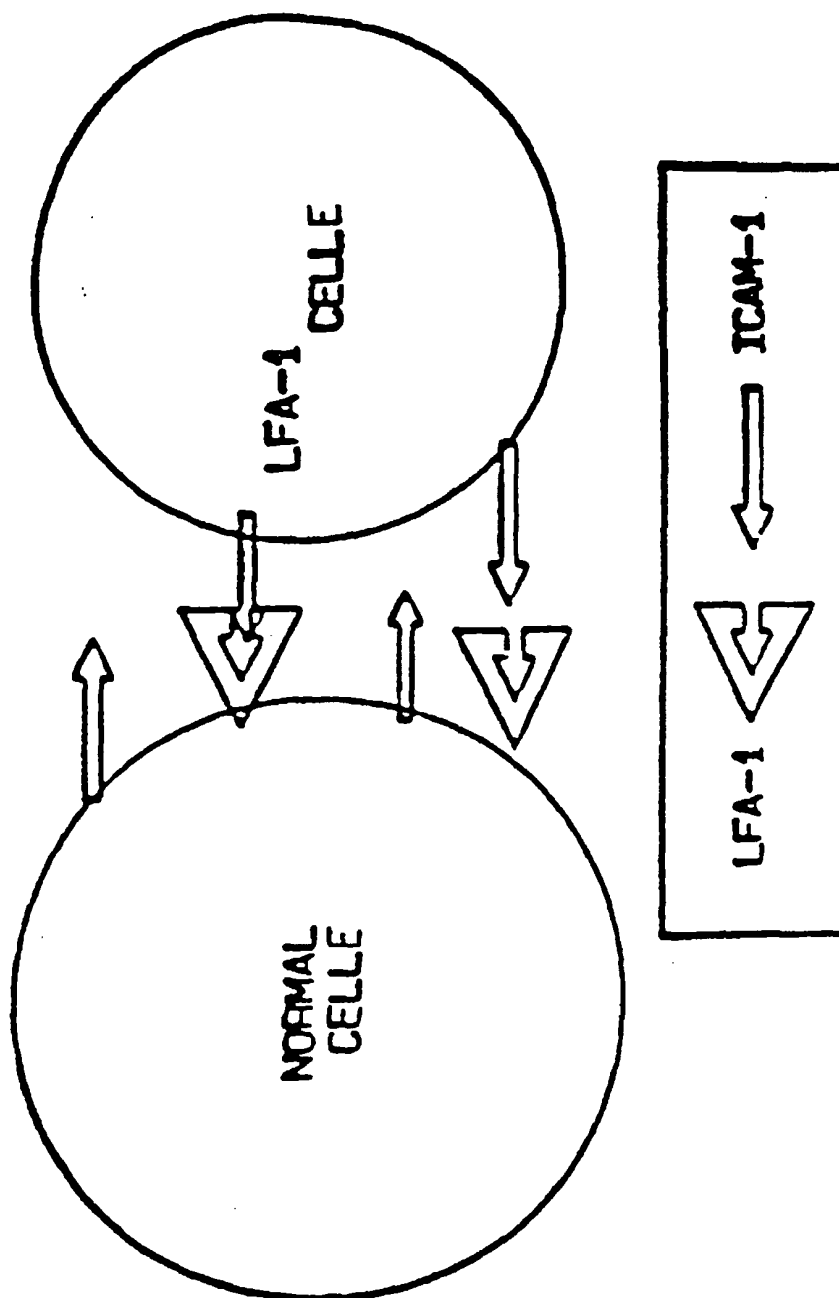
5 (b) detektering af bindingsliganden.

9. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder et antistof eller toxinafledt antistof ifølge et vilkårligt af kravene 1-3, der er i stand til at binde til et molekyle valgt blandt
10 ICAM-1 og et funktionelt derivat af ICAM-1, eller et fragment af et antistof eller toxin-afledt fragment af et antistof ifølge et vilkårligt af kravene 6 eller 7, idet fragmentet er i stand til at binde til et molekyle valgt blandt ICAM-1 og et funktionelt derivat af ICAM-1, sammen med en inert farmaceutisk bærer.
15

10. Anvendelse af et antistof eller toxinafledt antistof ifølge et vilkårligt af kravene 1-3, der er i stand til at binde til et molekyle valgt blandt
20 ICAM-1 og et funktionelt derivat af ICAM-1, eller et fragment af et antistof eller toxinafledt fragment af et antistof ifølge et vilkårligt af kravene 6 eller 7, hvilket fragment er i stand til at binde til et molekyle valgt blandt ICAM-1 og et funktionelt derivat af ICAM-1, til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af inflammation, der stammer fra en reaktion fra det specifikke forsvarssystem hos et pattedyr eller menneske, eller til undertrykkelse af væksten af en ICAM-1-eksprimerende tumor eller en
25
30 LFA-1-eksprimerende tumor.

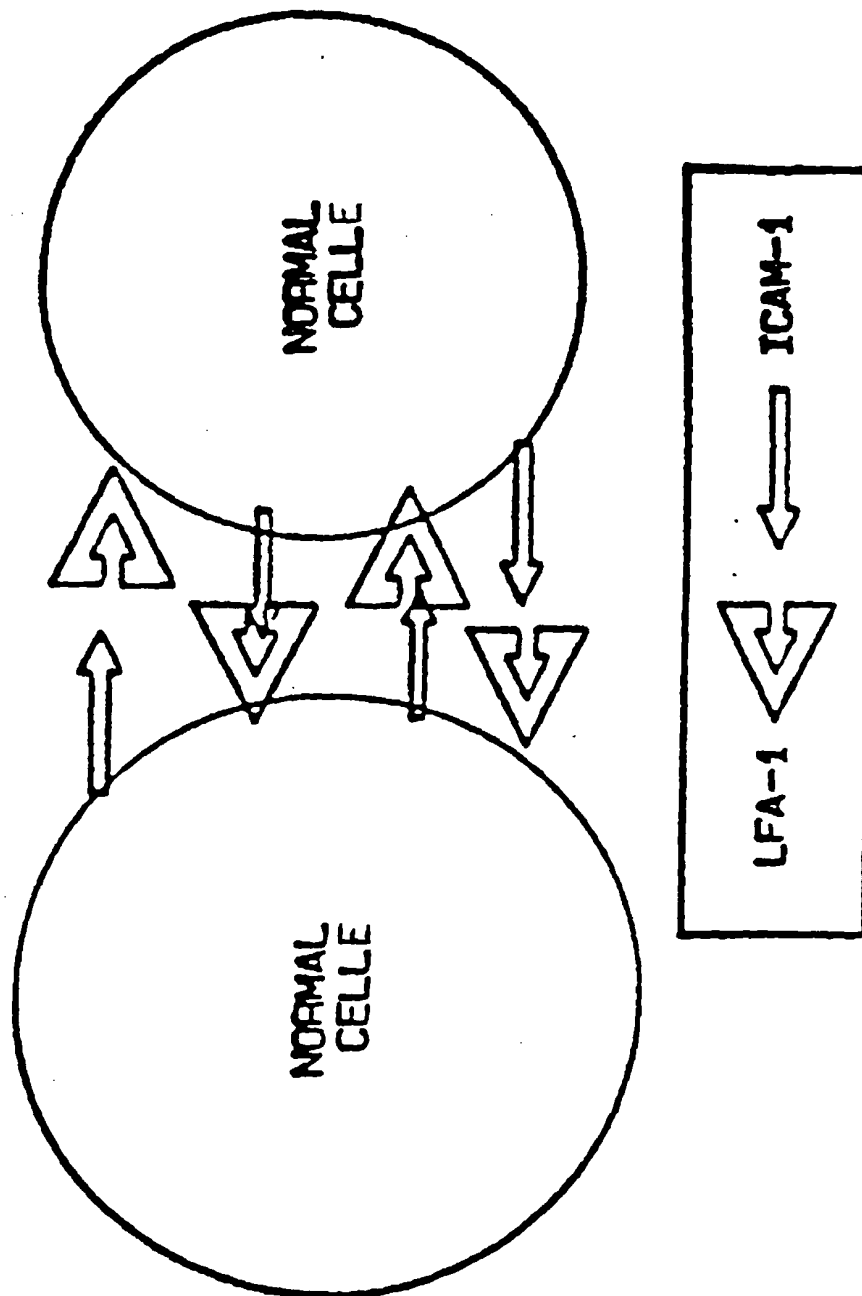
FIGUR 1

NORMAL/LFA-1 MANGELFULD CELLE-
ADHÆSION



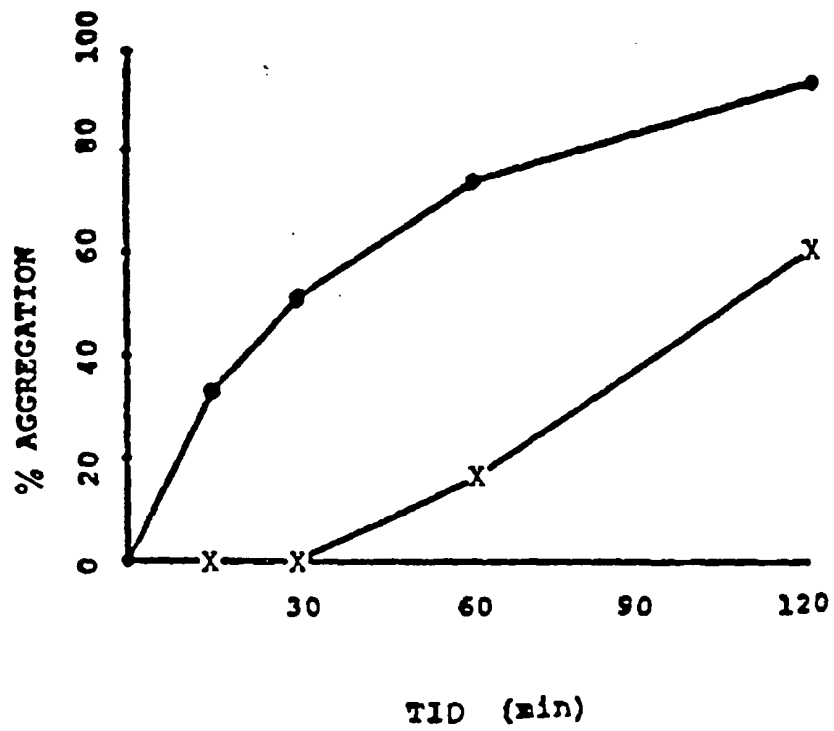
FIGUR 2

NORMAL/NORMAL CELLE -
ADHESION

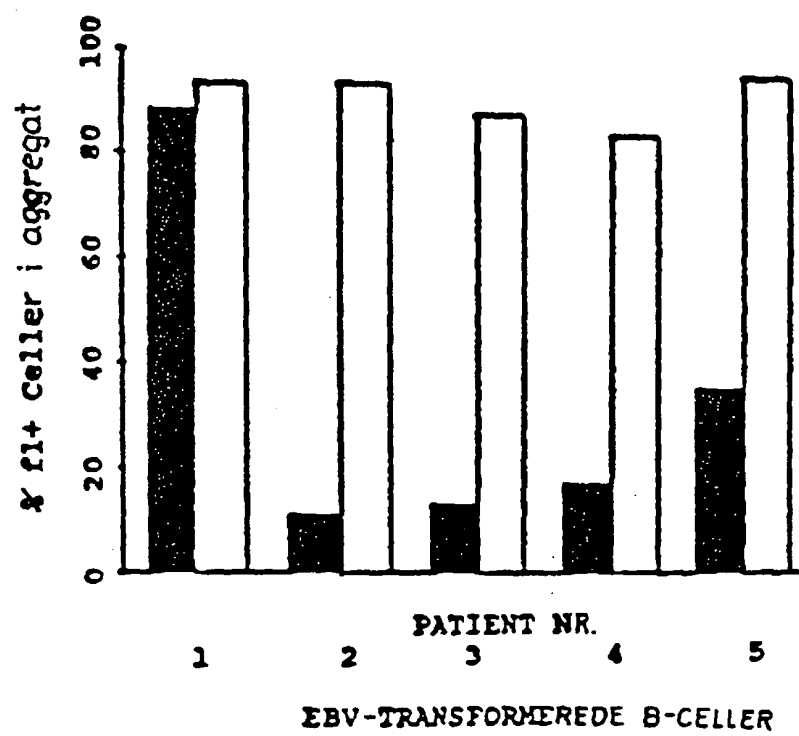


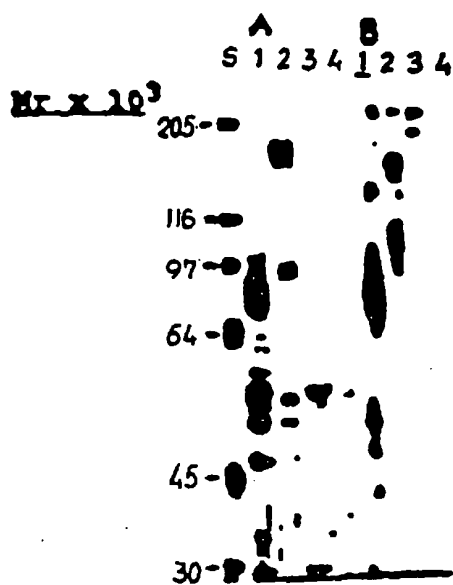
FIGUR 3

DK 176020 B1

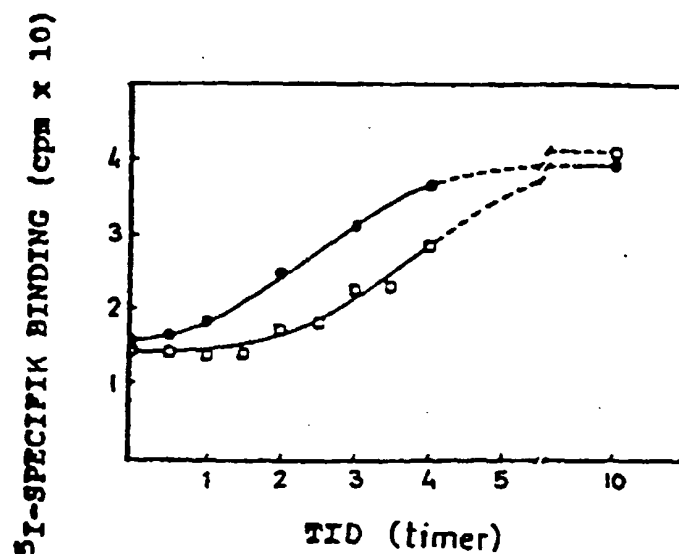


FIGUR 4



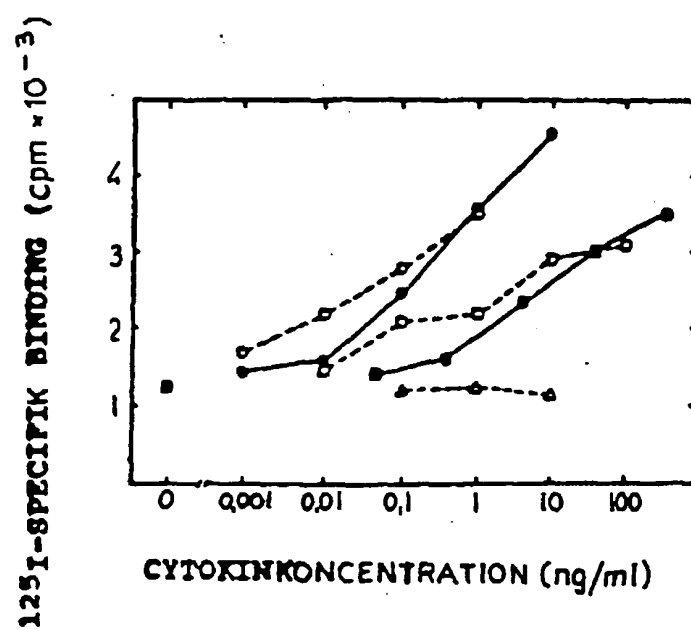


FIGUR 5

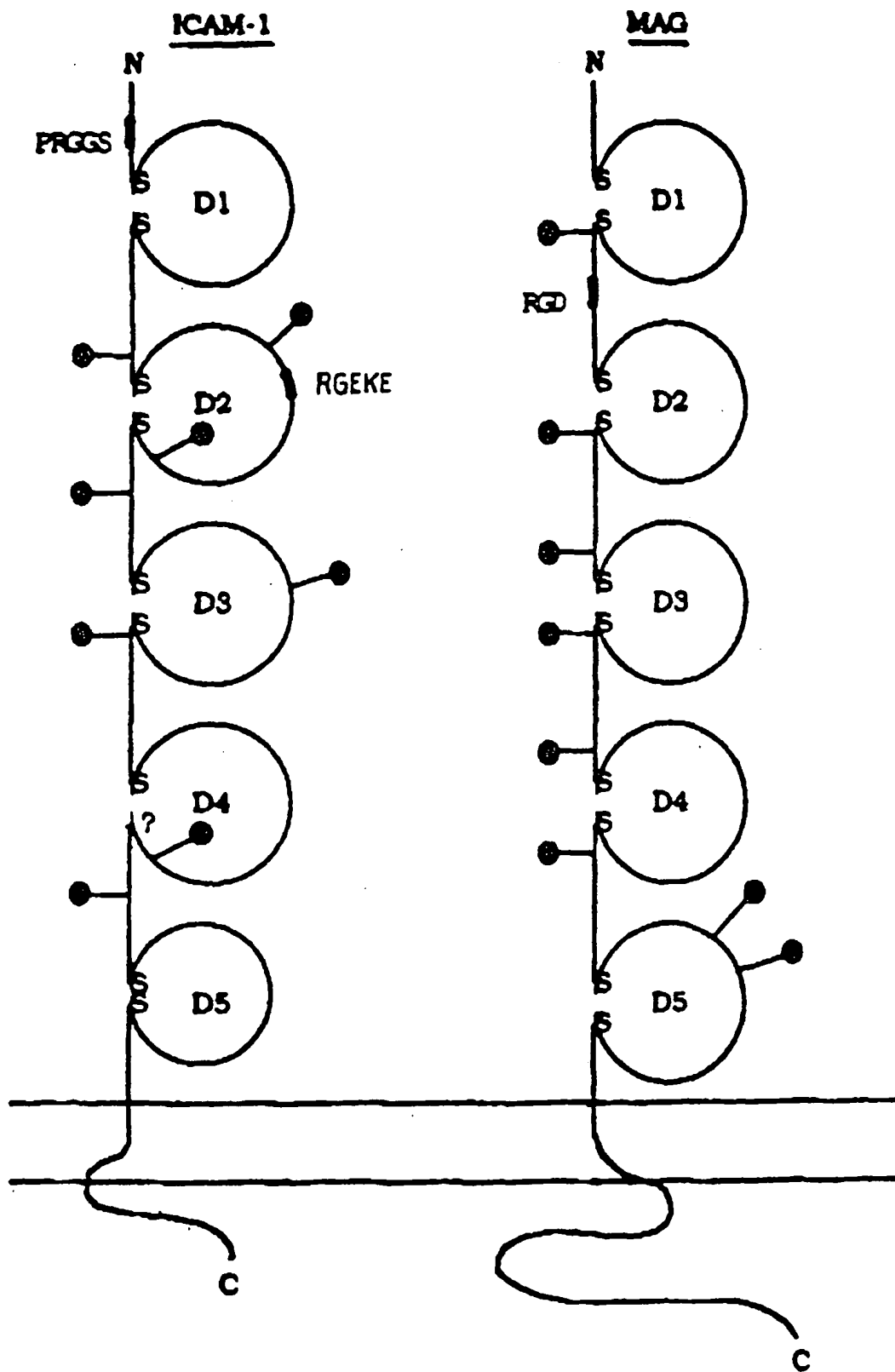


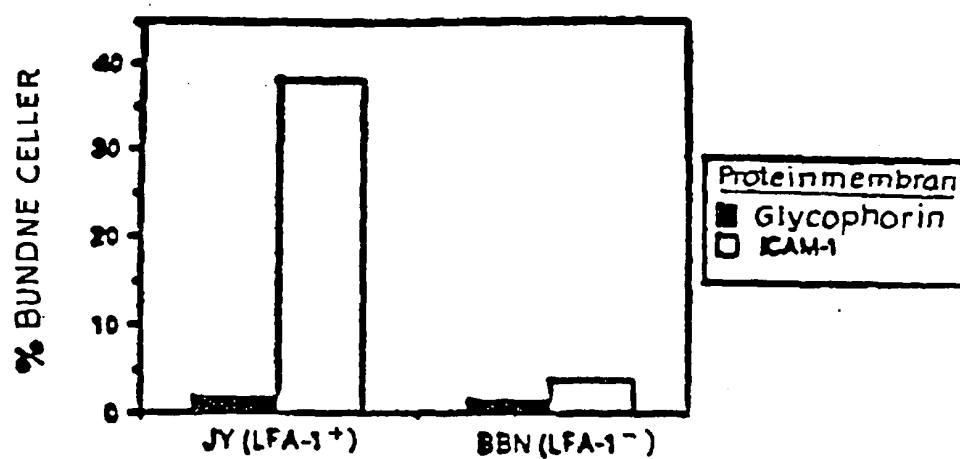
FIGUR 6

FIGUR 7



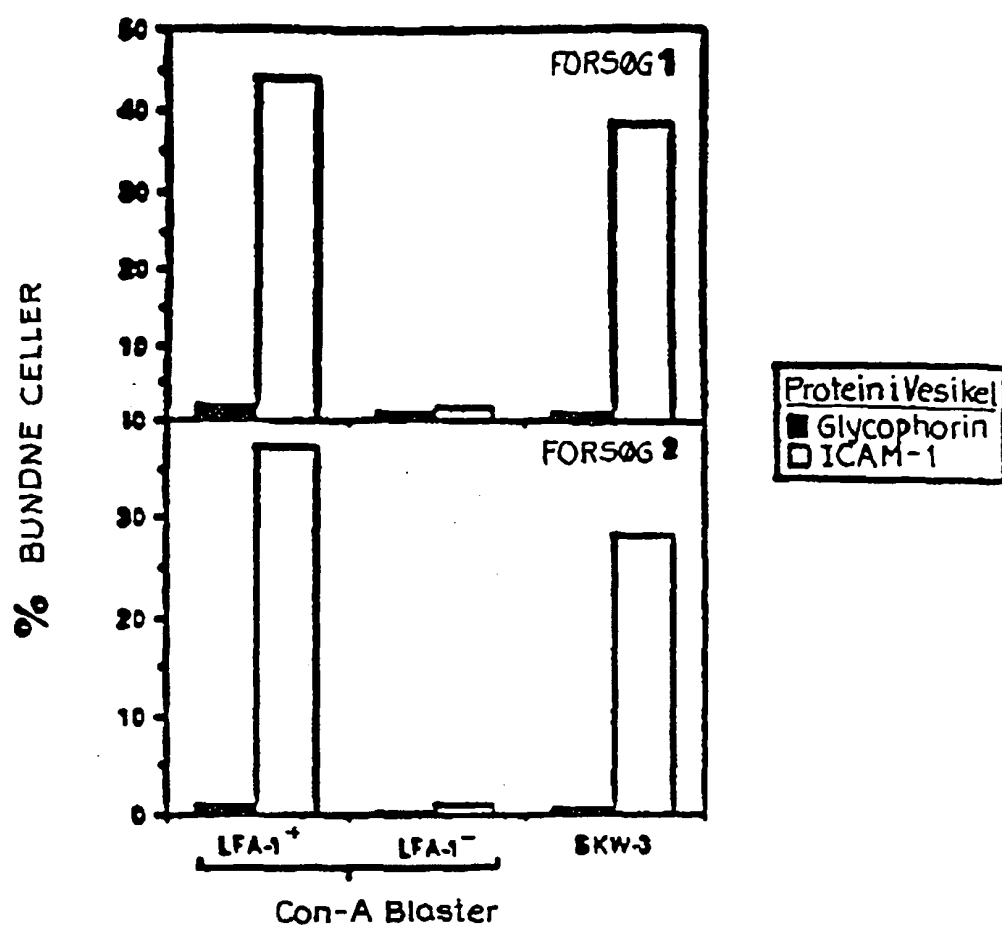
FIGUR 10





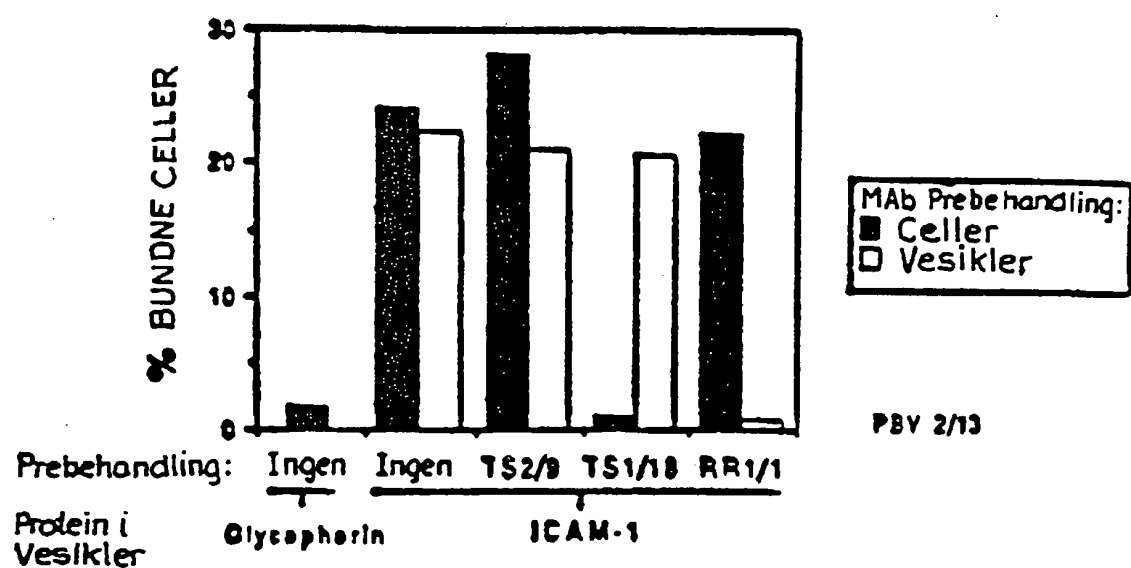
Figur 11

LFA-1- positive EBV-transformerede B-lymfoblastoidceller
binder til ICAM-1 i plane membraner

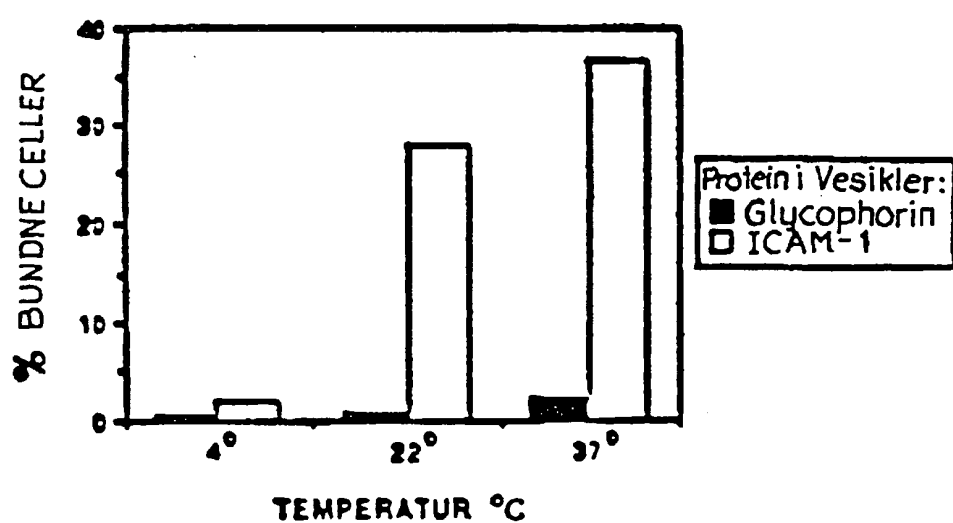


Figur 12

LFA-1 positive T-Lymfoblaster og T-Lymfomaceller binder til ICAM-1 i plast-bundne vesikler

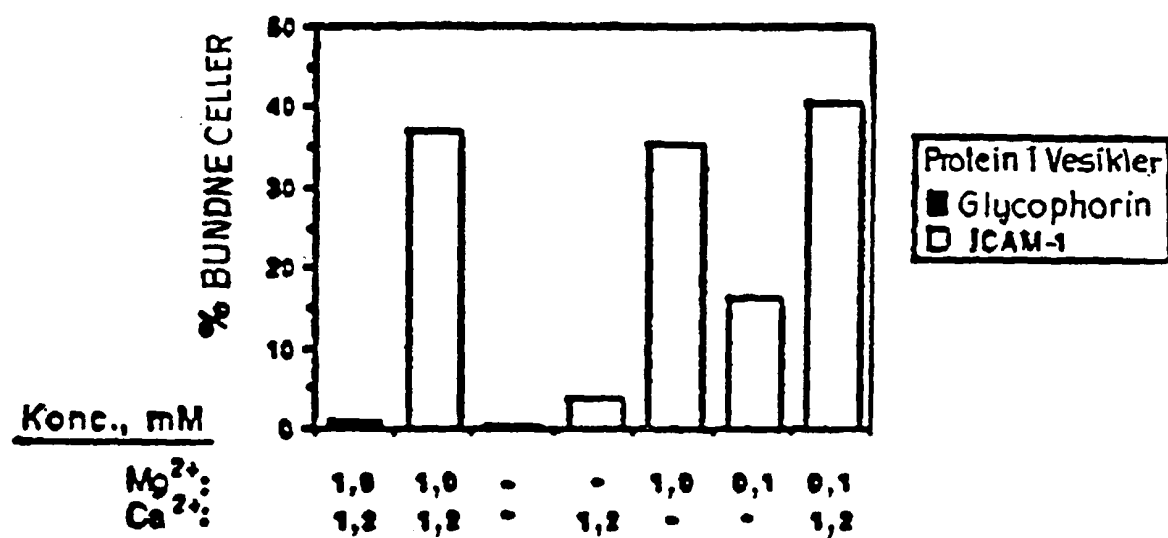


Figur 13 Inhibering af binding af JY B-Lymfoblastoid celle-binding til ICAM-1 i plast-bundne vesikler ved prebehandling af celler eller vesikler med monoclonale antistoffer.



Figur 14

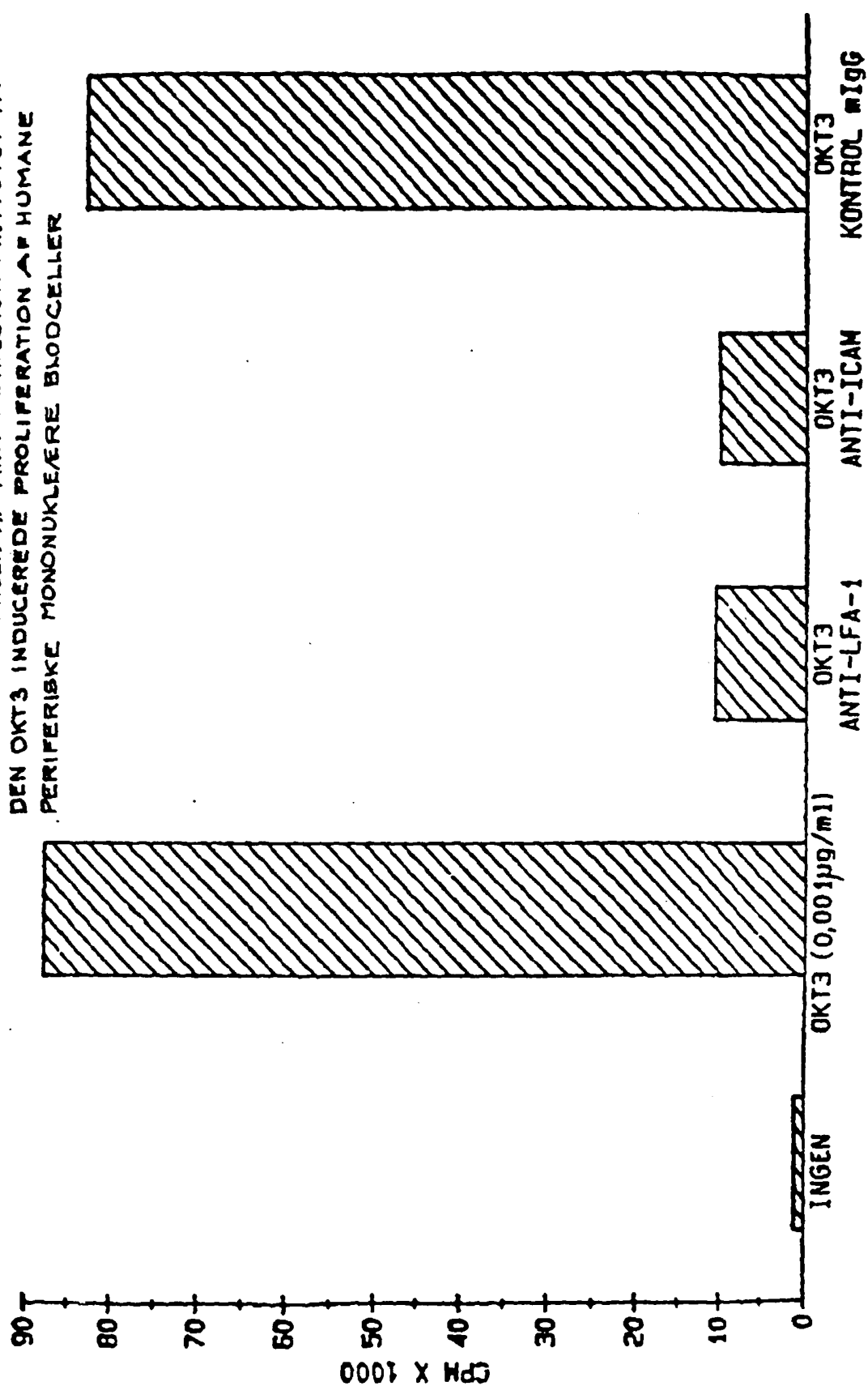
Virkning af temperatur på binding af T-Lymfo-
blaster til ICAM-1 i plastbundne vesikler



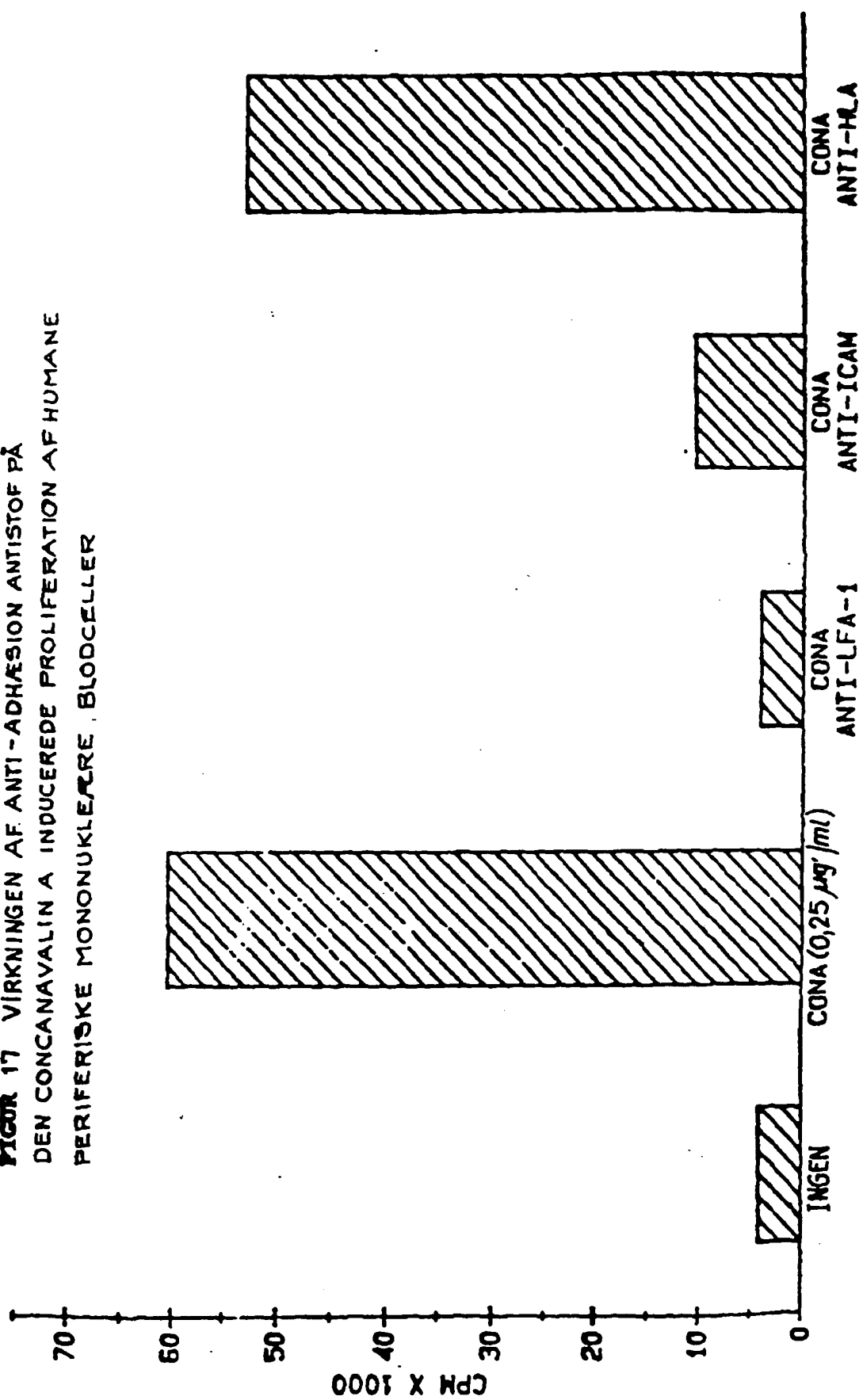
Figur 15

Nødvendigheden af divalente kationer til binding af T-Lymfoblaster til ICAM-1 i plast-bundne vesikler

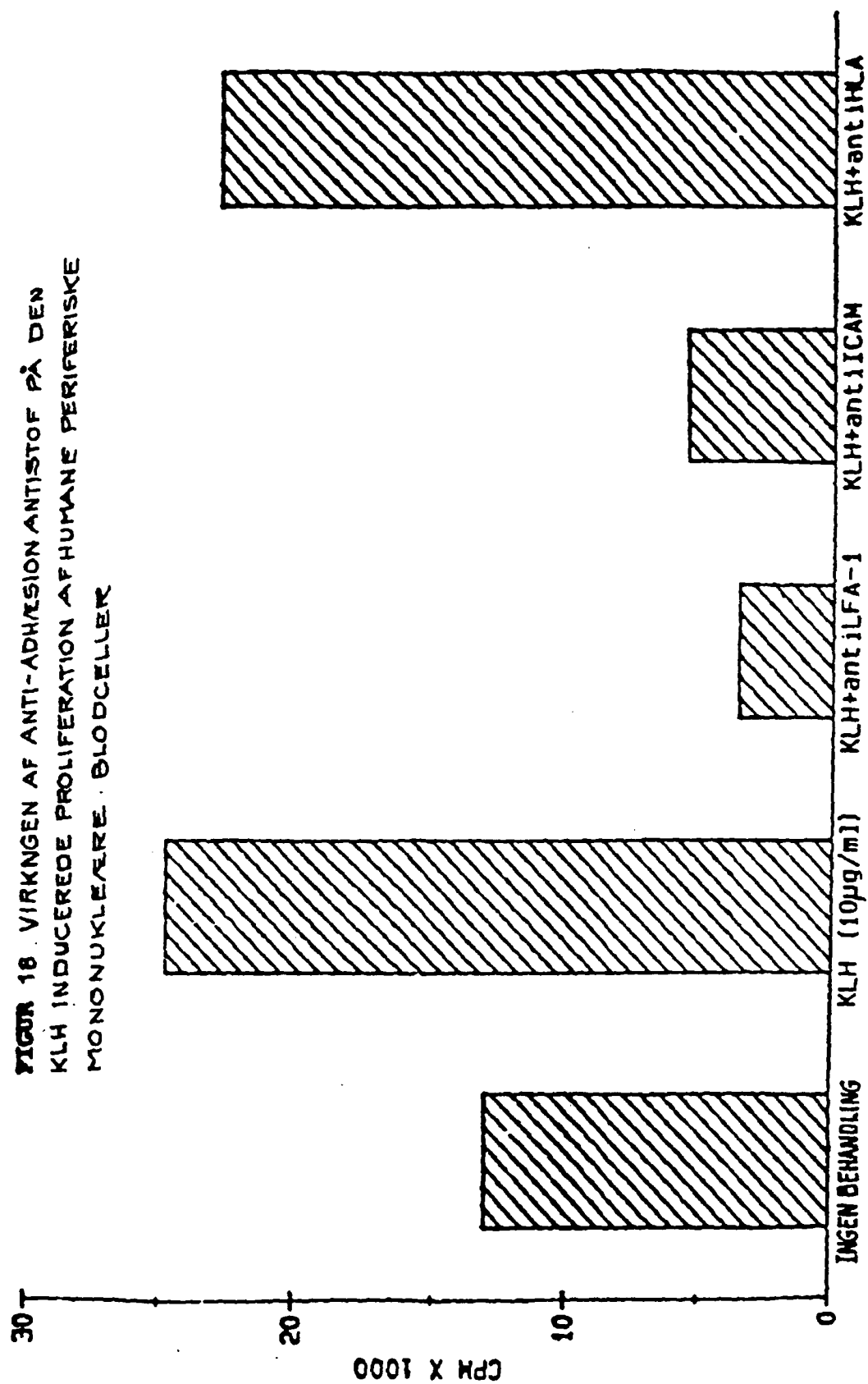
FIGUR 16 VIRKNINGEN AF ANTI-ADHÆSION ANTISTOF PÅ
DEN OKT3 INDUCEREDE PROLIFERATION AF HUMANE
PERIFERISKE MONONUKLEÆRE BLOODCELLER

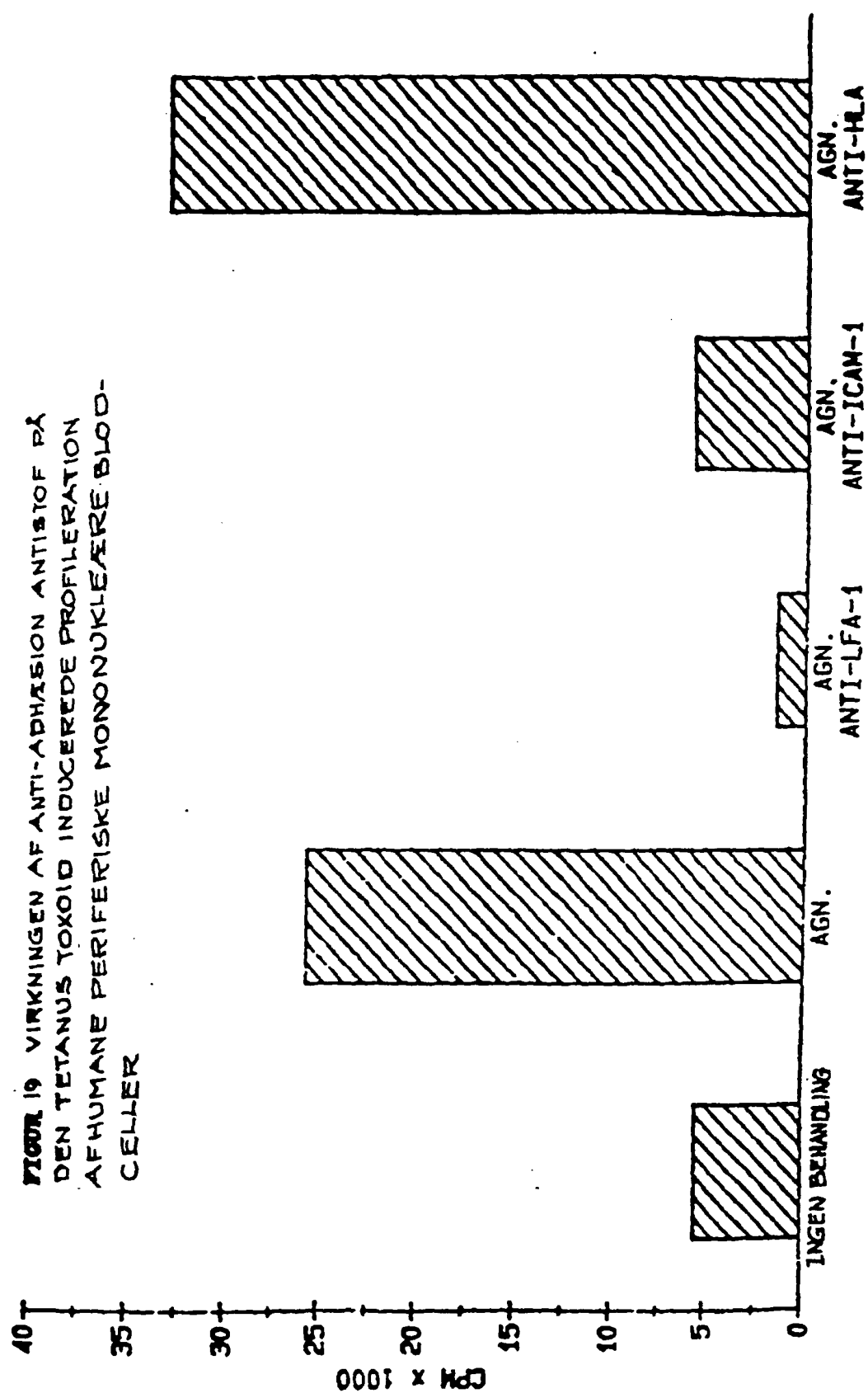


FIGUR 17 VIRKNINGEN AF ANTI-ADHÆSION ANTISTOF PÅ
DEN CONCAVALIN A INDUCEREDE PROLIFERATION AF HUMANE
PERIFERISKE MONONUKLEÆRE BLOODCELLER



FIGUR 18 VIRKNGEN AF ANTI-ADHESION ANTISTOF PÅ DEN
KLH INDUCEREDE PROLIFERATION AF HUMANE PERIFERISKE
MONONUKLEÆRE BLODCELLER





FIGUR 20

