

(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **A 61 K 38:19 A 61 K 35/12 //(C 12 N 15/00 C 12 P 21/02)**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1986 03829**

(22) Indleveringsdag: **1986-08-11**

(24) Løbedag: **1986-08-11**

(41) Alm. tilgængelig: **1987-02-17**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2003-07-14**

(30) Prioritet: **1985-08-16 US 766893 1986-07-31 US 888995**

(73) Patenthaver: **Schering Aktiengesellschaft, Corporate Trademark Center, D-13342 Berlin, Tyskland**

(72) Opfinder: **Dirk M. Anderson, 1757 N.W. 58th Street, Seattle, WA 98107, USA**
Michael A. Cantrell, 4035 Midvale Avenue N., Seattle, WA 98103, USA
Douglas P. Cerretti, 2415 W. Bertona, Seattle, WA 98199, USA
Paul J. Conlon, III, 4805 Stanford Avenue N.E., Seattle, WA 98105, USA
David J. Cosman, 310 - 12th Avenue East, Seattle, WA 98102, USA
Kenneth H. Grabstein, 5829 N.E. 75th Street, No. 443, Seattle, WA 98115, USA
Alf D. Larsen, 320 Summit Avenue E., No. 15, Seattle, WA 98102, USA
Virginia L. Price, 2617 Boyer Avenue E., Seattle, WA 98102, USA

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau A/S, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Anvendelse af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor til fremstilling af et medikament til fremme af tumoricid aktivitet**

(57) Sammendrag:

Makrofager og prækursor monocytter aktiveres til at udvise tumoricid aktivitet ved stimulering udelukkende med granulocyt makrofag kolonistimulationsfaktor. En patient, der lider af tumorer, kan behandles ved direkte administrering af terapeutisk virksomme mængder af aktiveret granulocyt makrofag kolonistimulationsfaktor. Homogen granulocyt makrofag kolonistimulationsfaktor til brug ved aktivering af makrofager og monocyt prækursorer fremstilles ved rekombinant DNA teknikker. Genet, der koder for granulocyt makrofag kolonistimulationsfaktor isoleres, og rekombinant proteinprodukt udtrykkes derefter i et passende ekspressionssystem. Den fra ekspressionssystemet udvundne granulocyt makrofag kolonistimulationsfaktor renses til homogenitet ved revers fase HPLC.

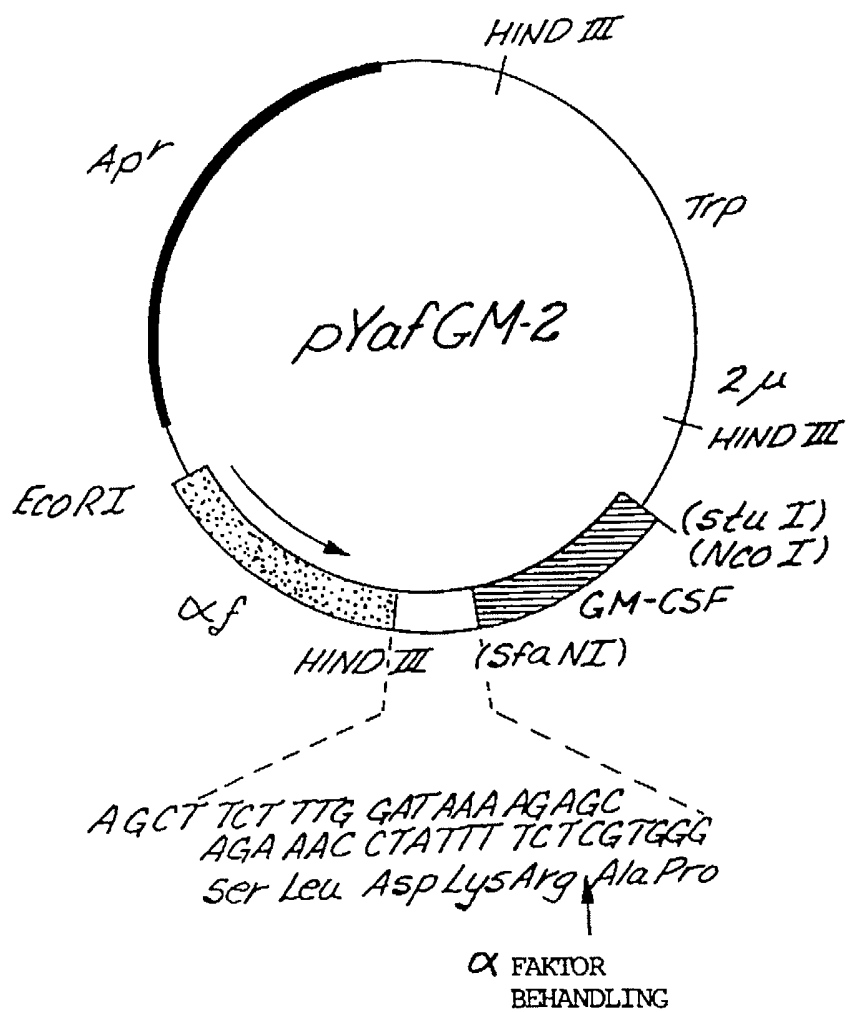


Fig. 2.

Den foreliggende opfindelse angår anvendelse af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor (i det følgende "GM-CSF) til fremstilling af et medikament til fremme af tumoricid aktivitet af celler af makrofag herkomst, hvori cellerne af makrofag herkomst udsættes for en virksom mængde af nævnte medikament.

Makrofager er forholdsvis store (10-20 μm), aktivt motile fagocytiske celler, der udvikles ud fra blodbårne monocytter, som på deres side har deres oprindelse i knoglemarven. Det er blevet iagttaget, at makrofager ved aktivering undergår adskillige funktionelle, biokemiske og morfologiske ændringer, herunder membranrynkning, peroxidelaborering, forøget expression af Ia-antigener og forøget sekretion af plasminogen. Makrofager anses også for at være en nøglekomponent i immunsystemet. I aktiveret tilstand er de blevet sat i forbindelse med ødelæggelse af fremmede partikler og udslidte celler, og de er for nylig blevet identificeret som tilvejebringende resistens mod og/eller udryddelse af neoplastisk sygdom. Udviklingen af aktiverede makrofager og prækursormonocytter, der udvikler disse aktiviteter, kræver samtidig tilstedeværelse af effektive aktiveringssignaler og modtagelige mononukleære fagocytter.

Det har været almindeligt accepteret, at aktivering af makrofager kan induceres af visse lymfokiner omtalt som makrofag aktiveringsfaktorer eller MAF. Cameron et al., J. Clin. Invest. 63:977 (1979); Mantavi et al., Int. S. Cancer, 25:691 (1980); og Kleinerman et al., J. Clin. Invest. 72:304 (1983).

Det vides ikke, om MAF er en bestemt lymfokin eller helt eller delvis er opbygget af andre lymfokiner. Nogle forskere har foreslået, at MAF i musesy-

stemet er opbygget af gamma-interferon ("IFN- γ "). Se Roberts and Vasil, J. Interferon Res. 2:519 (1982); og Svedersky et al., J. Exp. Med. 159:812 (1984).

Imidlertid menes andre lymfokiner end IFN- γ og
5 så muligvis at aktivere makrofager til det punkt, hvor de er i stand til at dræbe tumorceller. Makrofager producerer lymfokinen interleukin 1 ("IL-1"), der vides at stimulere væksten af hudceller, medvirke til heling af sår og fremkalde inflammation og feber.
10 Onozaki et al., J. Immunol., 135:314 (1985) har for nylig foreslået, at IL-1 også fremmer tumoricid aktivitet af friske monocytter.

Det er blevet rapporteret, at makrofager og prækursormonocytter også kan aktiveres til at udvise
15 tumoricid aktivitet ved behandling med forskellige reagenser, såsom de bakterielle produkter lipopolysaccharid ("LPS"), Sone et al., Cancer Res., 42:2227 (1982) eller peptidoglycan eller analoge dertil, såsom muramyl-dipeptid ("MDP"), Nagao et al., Infec.
20 Immun., 24:304 (1979), Kleiner et al., Cancer Res., 43:2010 (1983). Blandt andre makrofag aktiveringsreagenser er tumorpromotoren phorbol-myristat-acetat ("PMA"), Pick et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 332:378 (1979) og ionoforer, Pick et al., supra, og Hund et
25 al., Nature (London), 265:543 (1979).

De seneste forskningsrapporter har indiceret, at effektiv aktivering af makrofager til at udvise ikke-specifik tumoricid aktivitet ikke er resultatet af et enkelt signal, men kræver en serie af reaktio-
30 ner. Meltzer postulerer i "Lymphokines", Pick og Landy, udg., Academic Press, New York, s. 319-343 (1981), at aktiveringen af makrofager til at udvise

tumoricid aktivitet kræver rekruttering eller akkumulering af blodmonocyter på reaktionsstedet, såsom ved en infektion, hvorpå monocytterne differentierer til kompetente mononukleære fagocytter. Efter denne indledende fase af monocytdifferentiering primes monocytterne til en modtagelig tilstand med et initialsignal hidrørende fra en lymfokin. Endelig modning af den fremmede makrofag til cytotoxisk aktivitet kræver udløsning via et andet signal, f.eks. hidrørende fra LPS. Anvendt i forbindelse med hinanden er de koncentrationer, der kræves af primingssignalet (lymfokinen) og udløsningssignalet (LPS) for et givet niveau af makrofag aktivering, meget lavere, end hvis disse signaler anvendtes alene, hvilket indikerer en synergistisk samvirkning mellem sådanne signaler.

Et forhold lig lymfokin-LPS samarbejdet er blevet rapporteret for LPS og IFN- γ . Schultz, J. Interferon Res., 2:459 (1982). Udviklingen af rekombinant DNA teknologien kombineret med in vitro cellulære bioanalyser har ført til kloning af cDNA'erne af IFN- γ , IL-1 og andre lymfokiner. Tilgængeligheden af meget rent rekombinantafledt IFN- γ har bekræftet tidligere rapporter om dets MAF aktivitet og kravet om et andet udløsningssignal, såsom LPS for effektivt at inducere IFN- γ til at udvise ikke-specifik tumoricid aktivitet.

Den foreliggende opfindelse angår anvendelsen af GM-CSF til stimulering af makrofager til at formidle ikke-specifik tumoricid aktivitet, hvilken aktivering ikke er afhængig af tilstedeværelsen af en costimulator, såsom LPS eller IFN- γ . GM-CSF er en speciel type kolonistimulationsfaktor ("CSF"). CSF henfører til en familie lymfokiner, som får stamfader-

celler, der findes i knoglemarven, til at differentiere i specifikke typer af modne blodceller. Den særlige type moden blodcelle, der fås fra en stamfadercelle, afhænger af typen af tilstedeværende CSF(er).
5 F.eks. menes erythropoietin, at få stamfaderceller til at modnes til erythrocyter, medens trombopoietin menes at drive stamfaderceller langs trombocytbanen. Tilsvarende afhænger granulocytmakrofagkolonidannelse af tilstedeværelsen af GM-CSF. Selv om CSF's og herunder
10 GM-CSF's evne til at fremkalde modning og proliferation af hvide blodlegemer fra knoglemarvsstamfædre er velkendt, har GM-CSF's kapacitet til særegent at aktivere makrofager til at formidle ikke-specifik tumoricid aktivitet hidtil været ukendt.

15 I overensstemmelse med ovenstående aktiveres makrofager til at formidle ikke-specifik tumoricid aktivitet udelukkende ved hjælp af et GM-CSF signal. De aktiverede makrofager kan anvendes til at inaktivere tumorceller in vivo eller in vitro. Patienter
20 med tumorer kan behandles ved isolering af makrofager, fra patientens krop og derefter stimulere de isolerede celler til at udvise tumoricid aktivitet ved dyrkning af cellerne med en terapeutisk virksom mængde GM-CSF. Derefter kan de stimulerede celler ad-
25 ministreres til patienten, hvorefter de aktiverede celler søger ud og ødelægger de tumorer, patienten er hjemstøgt af. Det vil kunne forstås, at i kraft af den foreliggende opfindelse kan tumorpatienter behandles med aktiverede makrofager, uden at patienterne udsæt-
30 tes for endotoxiner, radioaktive materialer eller andre skadelige stoffer.

Tilstrækkelige mængder homogen GM-CSF til brug ifølge opfindelsen kan fremstilles ved hjælp af re-

kombinant DNA teknikker. Genet, der koder for GM-CSF, isoleres og viderebehandles derefter til brug i systemer, som er i stand til, at udtrykke rekombinantproteinet på højt niveau. Den fra ekspressionsværdierne udvundne GM-CSF renses til homogenitet ved anvendelse af revers fase HPCL.

En procedure til at vise aktiverede makrofagers effektivitet til at dræbe specielle tumorer indbefatter dyrkning af makrofager med GM-CSF i forskellige koncentrationer. Efter en passende dyrkningsperiode fjernes GM-CSF, og måltumorcellerne udsættes derefter, efter at være blevet radiomærket, for de aktiverede makrofageeffektorceller. Efter en yderligere dyrkningsperiode fjernes de målceller, som er blevet dræbt, og de resterende målceller lyseres derefter for at måle resterende tælleverdier som et kvantitativt indeks for antallet af celler, som har overlevet eksponeringen for aktiverede makrofager.

Detaljer vedrørende typiske udførelsesformer af opfindelsen beskrives i det følgende under henvisning til tegningen, hvor

figur 1 illustrerer nukleotidsekvensen og den tilsvarende aminosyresekvens af det humane GM-CSF gen, herunder det ikke-kodende 3'område,

figur 2 illustrerer pY fGM-2-ekspressionsplasmidet med kodningsområdet af GM-CSF genet indført deri for anvendelse til transformering af værtsceller med henblik på at udtrykke funktionel human GM-CSF,

figur 3 er en graf, der illustrerer den specifikke lyse af tumorceller, som er formidlet af makrofager fra humant, perifert blod aktiveret ved for-

skellige koncentrationer af rensset rekombinant human GM-CSF

figur 4 er en graf, der illustrerer den specifikke lyse af tumorceller, som er formidlet af makrofager fra humant, perifert blod aktiveret ved forskellige koncentrationer af rensset rekombinant human GM-CSF og dermed sammenlignelig lyse formidlet af makrofager aktiveret med LPS, IFN- γ og IFN- γ kombineret med LPS, og

figur 5 er et fotografi af et sølvfarvet polyacrylamidgelbånd af rensset homogen rekombinant GM-CSF.

Fremstilling af prækursormonocyter

Makrofager i form af monocyter fra perifert blod rensedes med henblik på efterfølgende aktivering med GM-CSF under anvendelse af standardteknikker indbefattende Ficoll og Percell separation. Det ved disse procedurer opnåede topmonocytlag udstryges i medium, hvorefter ikke-vedhæftende celler fjernes, således at de tilbageværende monolag kan aktiveres ved tilsætning af GM-CSF og andre mulige aktiveringsmidler, herunder LPS og IFN- γ . For at gardere sig mod tilstedeværelsen af kontaminanter, såsom et endotoxin, testedes de ved celleseparationsprocessen anvendte reagenser med "Limulus Ameobocyte Lysate". Desuden fremstilledes cellepopulationer med endotoxinfrie puffere og medier.

I stedet for at blive isoleret fra perifert blod kan monocyter eller modne makrofager fås fra andre kilder, såsom miltceller, lymfekirtelceller eller lungeudskylninger.

Fremstilling af rekombinant GM-CSF; kloning af GM-CSF gen

GM-CSF produceres kun i ganske små mængder in vivo, men der kan fremstilles forholdsvis store mængder meget rent GM-CSF til brug ved aktivering af monocytter og makrofager ved hjælp af rekombinantteknikker. En diskussion af sådanne rekombinant DNA teknikker til proteinfremstilling anføres i de redaktionelle og underbyggende artikler og i bind 196 af Science (April 1977). For at drage fordel af de i denne reference omtalte rekombinant DNA teknikker må genet, der koder for GM-CSF, først isoleres fra et cDNA bibliotek, f.eks. med en nick-translateret cDNA probe. Den mærkede probe fås fra et muse GM-CSF cDNA bibliotek ved anvendelse af en syntetisk oligonukleotidprobe svarende til afsnittet af muse GM-CSF's nukleotidsekvens.

For at isolere den molekulære klon af det humane GM-CSF gen ekstraheres alt RNA fra lymfomcellelinier, såsom HUT-102, Jurkat eller HL60 eller fra andre typer kilder, såsom mononukleære celler fra humannt perifert blod. Polyadenyleret mRNA isoleres fra den totale RNA ekstrakt. Et cDNA bibliotek konstrueres ved revers transkription af det polyadenylerede mRNA med enzymet avianmyeloblastosis-virus ("AMV") revers transkriptase. DNA'et gøres dobbeltstrenget med DNA polymerase I og indføres i en passende kloningsvektor, såsom et plasmid, en bakteriofag eller et kosmid. Resulterende rekombinante kloningsvektorer anvendes derefter til transformering af en passende vært, såsom Escherichia coli ("E.coli"), gær eller en anden enkeltcellet organisme.

Transformerede værter identificeres og samles i forråd. Plasmid DNA fremstillet ud fra disse forråd hybridiseres med en nick-translateret cDNA muse GM-CSF probe, der er radiomærket med ^{32}P . Det eller de 5 forråd af kloner, som giver et positivt signal over for proben, identificeres, hvorefter det lovende forråd underinddeles, og hybridiseringsscreening gentages. En enkelt transformant svarende til det humane GM-CSF gen identificeres til sidst. Plasmid DNA frem- 10 stilles ud fra denne transformant og karakteriseres ved DNA sekvensanalyse, f.eks. under anvendelse af standardkæddetermineringsmetoder, som dem der oprindeligt blev udviklet af Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 70:5463 (1977).

15 Figur 1 illustrerer i den øvre linie nukleotidsekvensen af det humane GM-CSF gen. Kodningsområdet af det humane GM-CSF gen strækker sig fra nukleotid nr. 14 til nukleotid nr. 394. Den tilsvarende aminosyresekvens bestemt ud fra nukleotidsekvensen anføres 20 nedenunder de relevante kodoner. Modent protein begynder ved stjernen (*). Plasmid DNA betegnet pHG23 fremstillet ud fra cDNA'et fra den identificerede positive koloni og transformeret i E. coli er deponeret i overensstemmelse med Budapesttraktatens bestemmelse 25 ser ved American Type Culture Collection ("ATCC"), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A., under accessionsnr. 39900.

Ekspression af funktionel GM-CSF

30 Funktionel GM-CSF fremstilles ved ekspression af det i pHG23 i værtsceller indeholdte GM-CSF gen og testes derefter for det udtrykte produkts evne til at stimulere væksten af knoglemarvskolonier i agar. Et

cDNA fragment af i det væsentlige hele kodningsområdet af det i figur 1 viste GM-CSF gen (Sfa NI til Nco I fragmentet) indføres i en ekspressionsvektor udformet til at dirigere syntese og udskillelse af GM-CSF
5 fra gærværtsceller, f.eks. en vektor betegnet pYafGM-2 som vist i figur 2. Ekspressionsvektoren, såsom pYafGM-2 indeholder fortrinsvis sekvenser hidrørende fra plasmid pBR 332 (vist ved tyk linie i figur 2) indbefattende et replikationsområde og ampicillin-
10 resistensgenet (Ap^r). I det ideelle tilfælde indeholder ekspressionsvektoren også sekvenser fra gær, f.eks. tryptofan-1 genet (TRP-1) som en udvælgelig markør og 2u gærreplikationsområdet (afsnit vist ved tynd linie). Ekspressionsvektoren indbefatter for-
15 trinsvis yderligere præ/pro- α parringsfaktoren (" α -faktor") fra gær (prikket kasse) som en effektiv promotor sammen med ledesequenser til at styre syntesen og udskillelsen af GM-CSF i gærværter efterfulgt af sekvensen for kodningsområdet af GM-CSF vist i figur
20 1 (skraveret kasse). α -faktorgenets struktur omtales i Kurjan og Herkowitz, Cell, 30:933-943 (1982).

pYafGM-2 ekspressionsplasmidet transformeres i en passende stamme af Saccharomyces cerevisiae ("S.cerevisiae"). Blandt foretrukne stammer er
25 gærstammerne nr. 79, X2181-1B, DBY746, YNN280 og 20B-12. Disse stammer er alle α , Trp I, Leu 2 for kompatibilitet med α -faktorpromotoren og for udvælgelse af Trp^+ -transformanter. Disse stammer er alle udbredt tilgængelige, f.eks. kan stamme 79 fås fra Yeast Ge-
30 netic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, California 94702.

Transformering af gærvarter med det rekombinante ekspressionsplasmid indeholdende bIL-2 genet gennemføres i henhold til velkendte procedurer, ved hvilke sfæroplaster dannes og derefter vaskes før 5 plasmidoptagning. Der er etableret standardforskrifter for denne procedure. Se f.eks. Beggs, Nature (London), 275:104 (1978), og Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 75:1929 (1978).

Gærfermenteringssupernatanter analyseres for 10 biologisk aktivitet ved hjælp af deres evne til at dirigere dannelsen af blandede kolonier af granulocyt- og makrofagtype fra celler fra human knoglemarv. Som kontrol transformeredes også plasmid pYaf af samme konstruktion som pYafGM-2, men uden GM-CSF sekven- 15 serne i en gærvært og fermenteringssupernatanten testedes for biologisk aktivitet. pYafGM-2 supernatanten fandtes at dirigere syntese af høje niveauer af GM-CSF aktivitet ved knoglemarvsanalysen ($1,2 \times 10^6$ kolonidannende enheder per ml kultur ("CFU- 20 c/ml")), medens der ikke påvistes nogen aktivitet fra supernatanten hidrørende fra pYaf-kontrolplasmidet.

Rensning af rekombinant GM-CSF

Det i supernatanten fra ekspressionsværtscellerne indeholdte rekombinant GM-CSF renses til den i 25 det væsentlige er homogen ved revers fase HPLC. De anvendte HPLC procedurer gør fortrinsvis brug af en revers fase tetramethyl-, octadecyl-, octylmethyl- eller diphenyl-bundet siliciumoxidsøjle med en pore- 30 størrelse, som er tilstrækkelig stor.

Egnede reversfase HPLC-søjler til denne brug kan fås i handelen. En foretrukket søjle til dette formål er "Vydac®" søjleserien, der kan fås i handelen fra Separations Group, Hesperia, CA. F.eks. kan 5 der benyttes "Vydac® C4 eller C18" -adsorbent reversfasesøjler bestående af tetramethylsilangrupper bundet kovalent ved hjælp af siloxan (silican-oxygen-silican) bundet til overfladen af silicagel med en porediameter på 300 Å, der er blevet klassificeret 10 til en middelpartikelstørrelse fra 30 til 44 µm til at kunne udnyttes optimalt med proteinet GM-CSF, dvs. en porestørrelse på mindst 300 Å.

Før den sættes til søjlen, gøres den udtrykte GM-CSF sur med en passende syre, såsom trifluoreddikesyre ("TFA"). Elueringen af proteiner fra HPLC-søjlen udføres på en måde, der er velkendt inden for området. En egnet elueringsprocedure til fjernelse af de bundne proteiner fra søjlen indebærer brug af en lineær radient gradient af acetonitril. En foretrukket 20 gradient til dette formål er 0-100 vol/vol% acetonitril gradient i TFA (pH 2,0-2,1).

Det eluerede protein kan bekvemt overvåges med påvisningssystemer, der er velkendte inden for området. F.eks. kan de relative proteinkoncentrationer i 25 fraktioner elueret fra HPLC-søjlen bestemmes ved måling af det eluerede materiales absorbans i et automatiseret UV-lysspektrofotometer ved en lysbølgelængde på 214 nanometer. Et passende automatiseret UV-lysabsorbanspåvisningsapparat kan fås fra Waters Associates, Milford, ME. 30

Fraktioner udvundet ved HPLC proceduren analyseres for protein ved hjælp af fluorescamin-analysen og ved hjælp af SDS (natriumdodecylsulphat)polyacrylamid-gelelektroforese efterfulgt af
5 sølvfarvning som beskrevet i eksempel 4 nedenfor. Det udvundne GM-CSF betegnet Fxn 57 analyseres derefter for biologisk aktivitet under anvendelse af den ovenfor og i eksempel 3 nedenfor omtalte knoglemarvskolonidannelsesanalyse.

10 Hvis der ikke opnås tilstrækkelig proteinrensning ved den indledende HPLC procedure, kan den gentages ved anvendelse af samme søjle eller en anden søjletype. Desuden kan der benyttes samme eller et andet elueringsmiddel. Ved at udføre HPLC i to trin
15 rensedes GM-CSF til homogenitet som en enkelt symmetrisk top af biologisk aktivitet. Som vist i figur 5 identificeredes der ved polyacrylamidgelelektroforese to bånd af GM-CSF aktivitet med molekylvægte på ca. 21.000 og 17.000 dalton. Disse bånd svarer til glycosylerede (21.000) og uglycosylerede (17.000) typer af
20 GM-CSF produceret af gær. Ved knoglemarvskolonidannelsesanalysen fandtes aktivitetsniveauet af Fxn 57 at være $1,5 \times 10^7$ CFU-c/ml. Den specifikke aktivitet af denne homogene GM-CSF fandtes at være ca. $1,5 \times 10^6$
25 CFU-c/ μ g protein, eller $3,0 \times 10^{16}$ CFU-c/mol.

Fremstilling af målceller

Aktivering af makrofager til tumoricid tilstand analyseres med hensyn til forskellige typer af tumor-
30 celler, herunder f.eks. A375 human myelom cellelinien (ATCC nr. CRL 1619), den humane blæreskel-carcinom SCaBER (ATCC nr. HTB3), de humane astrocytomglio-bastomer U-87 MG og U-373 MG (henholdsvis ATCC nr.

HTB 14 og 17), de humane Ewing sarcomer Esa-1 og SK-ES-2 (ATCC nr. HTB 83 og HTB 87), de humane maline melanomer SK-MEL-28 og SK-MEL-3L (ATCC nr. HTB 72 og HTB 73), den humane levercarcinom SK-Hep-1 (ATCC nr. 5 HTB-52), den humane pancreascarcinom MIA PACA-2 (ATCC nr. CRL-1420) og den humane blærecarcinom 5637 (ATCC nr. HTB-9). Før analyse dyrkes målcellerne i monolag i medium suppleret med forskellige additiver, såsom kalvefosterserum ("FCS"). Derefter radiomærkes mål-
10 cellerne, f.eks. med [^{125}I] ioddeoxyuridin ("[" ^{125}I] IUdR"). En standardforskrift for mærkningsproceduren anføres i Kleinerman et al., supra og Onozaki, supra.

Analyse for tumoricid aktivitet

15 Forskellige koncentrationer af testprøver af lovende aktivatorsubstanser, dvs. GM-CSF, IFN- γ , LPS sættes til de ovenfor fremstillede udstrøgne makrofager. Efter en passende dyrkningsperiode, dvs. 24 timer, fjernes testprøven, og radiomærkede målceller
20 sættes til kulturbrøndene. Efter en endelig dyrkningsperiode fjernes målceller dræbt af de aktiverede makrofager, og de resterende levedygtige celler i hver brønd lyseres med et passende reagens, såsom NaOH. Lysatets radioaktivitet måles derefter i en
25 gammataaller. Brønde, der indeholder radiomærkede målceller, men ikke-aktiverede makrofager, tjener som kontrol for målcellelevedygtigheden.

Den af de aktiverede makrofager formidlede cytotoksiske aktivitet beregnes som følger:

Procent spontan cytotoxicitet =

5

$$100 - \frac{\text{cpm i målceller dyrket med makrofager}}{\text{cpm i målceller alene}} \times 100$$

Procent specifik cytotoxicitet formidlet af aktive-
10 rede monocytter =

$$100 - \frac{\text{cpm i målceller dyrket med aktiverede makrofager}}{\text{cpm i målceller dyrket med kontrolmakrofager}} \times 100$$

15

Figur 3 og 4 illustrerer den tumoricide aktivitet af makrofager fra humant perifert blod aktiveret med forskellige koncentrationer af rekombinant human GM-CSF, LPS, IFN- γ eller LPS sammen med IFN- γ . Figur 3
20 illustrerer således den dosisafhængige kapacitet af LPS og IFN- γ til individuelt eller i kombination at inducere makrofagformidlet tumormåldestruktion. Figur 3 viser også aktiviteten ved forskellige koncentrationer af gær supernatant indeholdende rekombinant GM-
25 CSF. Som vist i figur 3 stimulerede sådan gær supernatant ved en fortynding på 1:500 (200 CFU-c/ml) makrofager til at udvikle ca. 65% specifik cytotoxicitet. Som ligeledes anført i figur 3 var kontrolgærfermenteringssupernatant ikke i stand til at fremkalde
30 makrofag cytotoxicitet. Rå gær supernatant har en titer på ca. $1-2 \times 10^5$ CFU-c/ml.

Figur 4 viser et fuldt forløb af dosisreakti-
onstitrering af rensset rekombinant human GM-CSF. Som
vist i figur 4 indtræffer der en halv-maksimal frem-
kaldelse af makrofagformidlet tumorcellecytotoksici-
tet ved en fortynding af søjlefraktionen indeholdende
homogen GM-CSF på ca. 1:1.000.000 (15 CFU-c/ml). Kon-
troldata, der illustrerer cytotoxiciteten af IFN- γ ,
LPS og LPS i kombination med IFN- γ vises også i figur
4.

10 Som det fremgår af det foregående, fungerede
GM-CSF effektivt som et særegent signal til at få mo-
nocyter til at udvise tumorcid aktivitet. Dette er
en biologisk egenskab ved GM-CSF, som ikke hidtil har
været kendt.

15

Behandling af tumorpatienter

Renset rekombinant GM-CSF som fremstillet oven-
for kan anvendes til at behandle humane patienter el-
ler andre pattedyr, der lider af tumorer, ved anven-
delse af forskellige terapiprocedurer. Terapeutisk
20 virksomme doser af GM-CSF kan administreres til et
individ med behov for behandling ad en række forskel-
lige konventionelle veje, såsom parenteralt eller
transdermalt. I almindelighed kan den rekombinante
25 GM-CSF administreres i doser på ca. 1,0 til 10^6 $\mu\text{g/kg}$
legemsvægt af individet per dag. Behandling påbegyn-
des fortrinsvis ved et lavere niveau i dette dosisin-
terval og øges derefter, indtil den ønskede therapeu-
tiske effekt opnås. Der vil desuden nødvendigvis ind-
30 træffe variationer i dosis i afhængighed af forskel-
lige faktorer, f.eks. tilstanden af individet, som
behandles. Den person, der er ansvarlig for admini-

streringen, vil i alle tilfælde bestemme den passende dosis for det enkelte individ.

Til parenteral administrering kan den rekombinante GM-CSF indføres i individet i enkelte eller
5 multiple doser, f.eks. ved hjælp af subkutan, intramuskulær, intraperitoneal, eller intravenøs injektion. Som alternativ vil GM-CSF kunne indføres via aerosol inhalation, transdermal eller transbukal absorption eller rektalt suppositorium. Til administ-
10 ring ved injektion kan opløsninger af rekombinant GM-CSF i sesamolie, jordnøddeolie eller vandig propylenglycol anvendes, såvel som sterile ikke-toksiske, ikke-allergene opløsninger af destilleret, serumalbumin, Ringer's opløsning, Hank's opløsning etc. Sådan-
15 ne opløsninger vil om nødvendigt kunne forpufres på passende måde, og det flydende fortyndingsmiddel først gøres isotonisk med en tilstrækkelig mængde saline eller glucose.

Som en behandlingsforskrift kan makrofager isoleres fra en donor og stimuleres til tumoricid aktivitet ved at dyrke cellerne med en terapeutisk virksom mængde GM-CSF. De aktiverede makrofager kan derefter administreres til en recipient ved anvendelse af en af de ovenfor omtalte teknikker. Typisk, men
25 ikke i alle tilfælde, er donoren og recipienten samme individ.

De foreliggende behandlingsprocedurer kan anvendes i forbindelse med praktisk taget alle typer af tumorer, specielt "massive" tumorer. Blandt sådanne
30 tumorer er alle carcinomer, såsom blære, nyre, skelceller, lunge, lever, bryst og kolon. Sådanne tumorer indbefatter også eventuelle melanomer eller sarcomer.

Opfindelsen illustreres nærmere i de følgende eksempler.

Eksempel 1

5 Fremstilling af makrofager fra perifert blod

Den del af makrofager fra perifert blod (opnået fra Portland, Oregon, Red Cross) der udgjorde det gule lag rensedes under anvendelse af pyrogen-fri reagenser målt ved hjælp af "Limulus Ameobocyte Lysate" (Whittaker M.A. BioProducts, Walkersville, MD). Hvert
10 brungult lag fortyndedes i "Roswell Park Memorial Institute ("RPMI")-1640" medium med heparin (50 U/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) til 200 ml af celler og lagdeltes på "IsolympH®" (Gallard-Schlesinger,
15 Carle Place, NY) og centrifugeredes derefter ved 1400 x g i 25 min. Grænsefladecellerne (mononukleære leukocyter) vaskedes og lagdeltes derefter ved en koncentration fra 4 til 5×10^7 celler i 2 ml på kontinuer-
20 te "Percoll®" (Pharmacia Fine Chemicals) gradienter og centrifugeredes derefter ved 200 x g og 4°C i 20 min. for at adskille makrofagerne fra resten af de mononukleære leukocyter. Det resulterende topmakro-
faglag opsamledes, vaskedes i "RPMI-1640" med 5% FCS og pletteredes derefter i en koncentration fra 1 til
25 2×10^5 celler per brønd i fladbundede 96-brønds "Microtiter" plader (Costar, Cambridge, MA) sammen med "RPMI-1640" og 5% FCS. Efter inkubation i 1 time ved 37°C fjernedes de ikke-vedhæftede celler ved sugning med en 18 gauge nål, hvorefter makrofaglagene
30 skylledes to gange med serumfrit "RPMI-1640" medium, hvorved makrofagerne gjordes klar til tilsætning af testprøver bestående af forskellige koncentrationer

af formodede aktivatorer, såsom GM-CSF, IFN- γ . LPS eller LPS i kombination med IFN- γ som omtalt nærmere nedenfor.

5 Eksempel 2

Fremstilling af rekombinant GM-CSF

I det væsentlige hele GM-CSF-genets kodningsområde og en del af dets 3'-flankeområde fjernedes fra cDNA klonen ifølge figur 1 og anvendtes til dannelsen af et rekombinant ekspressionsplasmid betegnet pYafGM-2 til at styre GM-CSF ekspression i gærværtsceller. pYafGM-2 ekspressionsplasmidet er deponeret i overensstemmelse med Budapesttraktatens bestemmelser ved ATCC under accessionsnr. 53157. Som vist i figur 2 indbefatter pYafGM-2 et replikationsområde og et Ap^r resistensgen fra plasmid pBR322 (vist ved tyk streg). Ekspressionsplasmidet indbefatter også 2u cirkelreplikationsområdet for gær og et Trp I gen til udvælgelse af transformerede gærvarter (TRP - [Trp - auxotrofe], afsnit vist ved tynd streg i figur 2). Ekspressionsplasmidet indbefatter yderligere gær α -faktorpromotor- og ledesequenserne (prikket kasseafsnit) til brug ved styring af transkription og udskillelse af GM-CSF. GM-CSF sekvenserne (skraveret kasseafsnit) er fusioneret med α -faktorsequenserne med et syntetisk oligonukleotid (åbent kasseafsnit) som omtalt nærmere nedenfor.

Som nævnt ovenfor fjernedes GM-CSF genets kodningsområde fra Sfa NI til Nco I stedet fra pHG 23 klonerne ved anvendelse af Sfa NI og Nco I restriktionszymer ved en standardforskrift, f.eks. som anført i Maniatis et al., Molecular Cloning, A Labora-

tory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. Sfa NI enzymet spalter GM-CSF genet fra pHG23 klonen på et sted, der befinder sig to nukleotider nedstrøms fra 5'terminalen af det område, 5 der koder for det modne protein (nukleotid nr. 14), da der ikke fandtes noget restriktionssted, som svarer præcist til nukleotid nr. 14. Et oligonukleotid syntetiseredes kemisk for igen at tilføje 5'-terminal-afsnittet af det modne GM-CSF gens kodningsområde 10 og også for at tilføje et andet α -faktor-behandlingssted for at opnå fuldstændig behandling af signalsekvensen for udskillelse af den modne form af GM-CSF. S sammensætningen af oligonukleotidet som vist i tabel I nedenfor og i figur 2 (åbent kasseafsnit) 15 indbefatter en Hind III komplementær 5'-terminal efterfulgt af et Cathepsin-B-lignende modningssted opbygget af sekvensen: TCT TTG GAT AAA AGA efterfulgt af en Sfa NI komplementær 3'-terminal, der koder for de første to aminosyrerester i det modne GM-CSF pro- 20 tein. Selv om det i tabel I viste oligonukleotid syntetiseredes kemisk ved triester-teknikken som beskrevet i detaljer af Sood et al., Nucl. Acad. Res., 4:2557 (1977) og Hirose et al., Tet. Lett., 28:2449 (1978) må det forstås, at oligonukleotidet kan frem- 25 stilles på andre måder, såsom ved phosphodiester-metoden.

Tabel 1

30	5'- A	GCT	TCT	TTG	GAT	AAA	AGA	GC	-3'
			AGA	AAC	CTA	TTT	TCT	CGT	GGG
			Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Ala	Pro

Det må forstås, at andre rekombinant DNA standardteknikker vil kunne anvendes til at frembringe samme ekspressionsvektor, og at den konstruktion, der er beskrevet i detaljer ovenfor, er en illustrerende repræsentant for forskellige strategier, som ville kunne anvendes til fremstilling af et GM-CSF cDNA fragment til indføring i pYafGM-2 ekspressionsvektoren eller til ekspression i andre bakterie- eller pattedyrsvektorer.

10 pYafGM-2 vektoren transformerades i gærstamme 79 (α , Trp 1-1, Leu 2-1) af S. cerevisiae for udvælgelse af Trp⁺ transformanter ved hjælp af standardteknikker. Forud for transformering dyrkedes stamme 79 enten i selektive medier (YNB-trp, bestående af 0,67% 15 gærnitrogenbase (Difco Labs., Detroit, MI), 0,5% (Casamino-syrer, 2% glucose, 10 mikrogram/milliliter ("µg/ml") adenin og 20 µg/ml uracil) eller i rigt medium (YPD, bestående af 1% gærekstrakt, 2% pepton og 2% glucose suppleret med 80 µg/ml adenin og 80 µg/ml 20 uracil). Celler høstedes ved centrifugering ved 1000 x g og 22°C i 5 min., hvorefter den resulterende pille vaskedes med sterilt destilleret vand.

Gærcellerne koncentrerades derefter ved resuspendering i 1/10 vol. SED (1 M sorbitol, 25 mM 25 ethylendiamintetracetat ("EDTA") [pH 8,0 og 50 mM dithiothreitol] og inkubation ved 30°C i 10 min. Derefter centrifugeredes celle-puffer-blandingen i 5 min. ved 300 x g. Pilleren vaskedes en gang med 1/10 vol 1 M sorbitol, og cellerne resuspenderedes i 20 ml 30 SCE (1 M sorbitol, 0,1 M natriumcitrat [pH 5,8], 0,01 M EDTA). Glusulase sættes i en mængde på 10⁻³ vol til opløsningen for at nedbryde cellevæggene, hvorefter

opløsningen inkuberedes ved 30°C i 30 min. under lejlighedsvis forsigtig rystning. Tilstedeværelsen af sfæroplaster analyseredes ved fortynding af 10 mikroliter ("µl") af gærcellerne i en dråbe af 5 vægt/vol% SDS på et mikroskopobjektglas for at undersøge for "skygger" ved 400 x fasekontrast. Derefter centrifugeredes celleblandingen ved 300 x g i 3 min. Den resulterende pille vaskedes to gange med 1/10 vol. 1M sorbitol og derefter en gang med CaS (1 M sorbitol, 10 mM CaCl₂).

Derefter transformeredes gær-sfæroplasterne med den tidligere fremstillede plasmidvektor ved en procedure på grundlag af Beggs, supra. De pelletiserede sfæroplaster suspenderedes i 1/200 vol CaS og opdeltes i 100 mikroliter portioner i 1,5 ml Eppendorf rør. Fra 1 til 10 µl af plasmid DNA'et sattes til hver portion (0,5 til 5 µg). Blandingen inkuberedes ved stuetemperatur i 10 min., hvorefter 1 ml PEG (20% PEG 4000, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl [pH 7,4] sattes til hver portion for at fremme DNA optagelsen. Efter 10 min. ved stuetemperatur centrifugeredes blandingen i 5 min. ved 300 x g. Den resulterende pille resuspenderedes i 150 µl SOS (10 ml 2 M sorbitol, 6,7 ml YEPD [1% (vægt/vol) gærekstrakt, 2% (vægt/vol) pepton, 2% (vægt/vol) glucose], 0,13 ml 1 M CaCl₂, 27 µl 1% tryptofan og 3,7 ml vand). Denne blanding inkuberedes ved 30°C i 20 min. Derefter blev cellerne udstrøget.

Før udstrygning præinkuberedes de selektive protoplast/DNA blandingsplader ved 37°C. 3 ml smeltet topagar (45°C) sammensat af 18,2 ml sorbitol, 2 g agar, 0,6 g "Difco" gærnitrogenbase (uden aminosyrer), 2 g glucose, 0,1 ml 1% adenin, 0,4 ml 1% uracil

og aminosyrer efter behov sættes derefter til hver portion af transformerede celler, og rørenes indhold hældtes på de selektive plader. Derefter inkuberedes pladerne fra 2 til 4 dage ved 30°C. Kolonier, som udvikledes i Trp minus-mediet, indeholdt plasmider, der havde Trp 1 genet, dvs. sådanne, som er transformeret.

Før biologisk og tumoricid analyse dyrkedes transformanterne i 20 til 50 ml rigt medium ved 30°C til stationær fase.

På udvindingstidspunktet tilsattes proteaseinhibitorerne phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) og Pepstatin A til en slutkoncentration på henholdsvis 1 mM og 1 µM. Cellerne fjernedes derefter ved centrifugering ved 300 x g, og mediet filtreredes gennem et 0,45 µm celluloseacetatfilter (Corning Glass Works, NY). De sterile supernatanter opbevaredes ved 4°C.

Eksempel 3

20 Kolonianalyse

Tilstedeværelsen af human GM-CSF udvundet fra gærkulturerne i eksempel 2 bekræftedes ved analyse af supernatanternes evne til at stimulere vækst af humane knoglemarvskolonier i agar. Til brug ved analysen opsamledes human knoglemarv fra hoftebensranden på voksne donorer i en hepariniseret injektionssprøjte. Marven fortyndedes i forholdet 1:3 med fosfat-bufferet saltopløsning (PBS) ved stuetemperatur og lagdeltes på en opløsning af 54% "Percoll®" (Pharmacia Fine Chemicals). Efter centrifugering ved 500 x g ved stuetemperatur i 20 min. opsamledes grænsefladen og vaskedes med 20 volumener PBS. Derefter centrifu-

geredes suspensionen ved 250 x g ved stuetemperatur i 10 min. Så resuspenderedes cellerne i 10 ml " α -Minimal Essential Medium" med nukleotider (" α -Mem", Gibco) med henblik på celletælling og bestemmelse af 5 levedygtighed. Derefter tilsattes FCS, og celsuspensionen opbevarede på is, indtil analysen udførtes.

Ved analysen tilsattes knoglemarvsceller behandlet som ovenfor til en slutkoncentration på 1 x 10⁵/ml til et inkubationsmedium bestående af: (a) 7 dele af en opløsning indeholdende 28% FCS, 0,7 x 10⁻⁴ M 2-mercaptoethanol, 0,12 mg/ml asparagin, 0,7 mg/ml glutamin, 150 enheder penicillin G, 150 enheder streptomycin, 1,1 x α -MEM med nukleotider og 2,2 x 15 vitaminer (Gibco), og (b) 3 dele af en 1,4% baktogagar-opløsning (Difco). Kulturerne inkuberedes ved 37°C i en fugtet atmosfære i nærvær af 5% CO₂. Efter 7 til 14 dages dyrkning bestemtes antallet af kolonier og deres type, enten granulocyt, makrofag eller bladet granulocyt-makrofag. Opfinderne fandt, at GNI-CSP genet fra pY α fGM-2 kloner dirigerede syntese af GM-CSP aktivitet i et højt niveau på 1,25 x 10⁶ kolonidannende enheder per 10⁵ (CFU-c/ml). Dette aktivitetsniveau blev bestemt ved at multiplicere det resiprok- 25 ke af fortyndingen, der gav 50% af det maksimale koloni antal, med 50. Opfinderne nåede frem til, at det gennemsnitlige antal kolonier fra 1 x 10⁵ knoglemarvsceller var 96 $\pm$ 29. De kolonier, der efter 14 dage var dannet med den rekombinante GM-CSF, var veldefi- 30 nerede og bestod af 3 typer: Ca. 1/3 blandede granulocyt-makrofag-kolonier, ca. 1/3 tætte granulocyt-kolonier og ca. 1/3 spredte makrofagkolonier.

Som en kontrol af ekspressionssystemet transformeredes et plasmid identisk med pY α -fGM-2, men uden GM-CSF sekvenserne også i gærstamme 79. Kultursupernatanten fra gæren frembragte ikke nogen GM-CSF 5 aktivitet ved knoglemarvskolonidannelsesanalysen.

Eksempel 4

Rensning af rekombinant GM-CSF

Mediet fra eksempel 2 indeholdende udskilt re-
10 kombinant GM-CSF bragtes til 1% i TFA og filtreredes derefter gennem 0,45 μ m filter (Corning Glass Works, New York). Derefter pumpedes mediet direkte i en "Vydac® C4" reversfasesøjle (1,0 x 30 cm rustfrit stål med 10 μ m pakning eller "Waters®" radiale kompressi-
15 onspatron [Waters Associate, Milford, ME] pakket med 50 μ m "Vydac® C4" pakning) under anvendelse af en "Milton Roy" pumpe (Lab. Data Control, Riveria Beach, FL) ved en strømningshastighed på 5 ml/min. Op til 1
1 medium tilsattes på en gang, og den samlede prote-
20 inbelastning på søjlen fandtes i almindelighed at være omkring 20 mg. Belastningssøjlen vaskedes med 0,1% TFA for at fjerne ubundne prøvekomponenter, indtil absorbansen ved 214 nm faldt til basislinieværdier (værdier før belastning). Eluering af det bundne pro-
25 tein opnåedes med en lineær gradient af 0 til 95% acetonitril i 0,1 vol/vol% TFA med en hastighed på 1% acetonitril/ml. Gradienten dannedes med en "Waters®" væskechromatograf bestående af en "Model 680" gradientdanner, 2 "M-45" pumper og en "Model 414" detek-
30 tor, der overvågede ved 214 nm. Topproteinfraaktioner iagttoges ved fra 55 til 60% acetonitril.

Topfraktionerne indeholdende GM-CSF fra den første HPLC procedure opsamledes og fortyndedes i forholdet 1:3 i 0,1 vol/vol% TFA i H₂O, hvorefter aktiviteten underkastedes rekromatografi og re-eluering 5 med samme gradient af TFA og acetonitril på en "Vydac® C18" søjle (3,9 ml x 15 cm søjle, 5 µm pakning). Topfraktioner iagttoges ved fra 55 til 60% acetonitril.

Fraktioner analyseredes for protein ved fluorescaminanalyse. Desuden analyseredes topfraktioner 10 igen ved SDS polyacrylamid gelelektroforese efterfulgt af sølvfarvning. Ved elektroforeseprocessen tørres 20 µl portioner af de under elueringsproceduren opsamlede fraktioner under vacuum efter tilsætning af 15 2 ml 10% SDS til hver portion. Den tørrede remanens opløstes i 40 µl ikke-reducerende prøvepuffer sammensat af 0,0625 M Tris (pH 6,8), 2 vægt/vol% SDS, 10 vol/vol% glycerol og 5 vol/vol% 2-mercaptoethanol. Opløsningen kogtes i 3 min., hvorefter den underka- 20 stedes elektroforese på 12% polyacrylamidgel ved den af Laemmli, Nature (London), 227:680 (1970) beskrevne metode. Gelprøverne for de individuelle fraktionstal sølvfarvedes ved den af Oakley et al., Anal. Biochem., 105:361-364 (1980) beskrevne metode. Essentiel 25 homogenitet af GM-CSF bekræftedes ved elektroforesen og sølvfarvningen, som gav to proteinbånd svarende til glycosylerede (21.000 dalton) og ikke-glycosylerede (17.000 dalton) typer af GM-CSF, figur 5. Aktiviteten af dette homogene materiale bestemt 30 ved den i eksempel 3 ovenfor beskrevne kolonidannelsesanalyse fandtes at være ca. $1,5 \times 10^7$ CFU^c/ml med

en specifik aktivitet på $1,5 \times 10^6$ CFU^c/μg af protein.
pI værdien fandtes at være ca. fra 5,0 til 5,4.

Eksempel 5

5 Fremstilling af mærkede målceller

Målceller opbevaredes i "RPMI 1640" medium suppleret med 5% ved 37°C i en fugtet atmosfære indeholdende 5% CO₂. Cytotoksicitetsanalyse udførtes, når de dyrkede målceller var i deres eksponentielle vækstfase.
10 se. Målcellerne indbefattede den humane melanomcellelinie A375 (ATCC nr. CRL 1619), den humane levercarcinomcellelinie SK-Hep-1 (ATCC nr. HTB-52), den humane pancreascarcinom MIA-PACA-2 (ATCC nr. CRL-1420) og den humane blærecarcinom 5637 (ATCC nr. HTB-9).

15 De eksponentielt voksende målceller radiomærkedes med ¹²⁵I-IUdR. Ved radiomærkningsproceduren inkuberedes målcellerne ved 37°C i 24 timer i RPMI medium suppleret med 5% FCS medium indeholdende ¹²⁵I-IUdR (0,3 μCi/ml; specifik aktivitet, 200 mCi/ml; New England Nuclear, Boston, MA). Derefter vaskedes cellerne
20 to gange for at fjerne ubundet radiomærkat og høstes derefter ved 1 minuts trypsinisering med 0,25% trypsin (Difco Labs, Detroit, MI) og 0,02% EDTA. De mærkede celler resuspenderedes i RPMI-1640 medium
25 suppleret med 5% FCS.

Eksempel 6

Analyser for tumoricid aktivitet

Ved tumoricid analyseproceduren sættes 200 μl
30 volumener af forskellige koncentrationer/fortyndinger af testprøver af rekombinant GM-CSF fra eksempel 4, rensset naturel IFN-γ (Meloy Laboratories, Springfield,

VA), LPS (Difco Labs., Detroit, MI, E. coli LPS-N) og LPS kombineret med IFN- γ til dyrkningsbrøndene indeholdende de udstrøgne makrofager. Som nævnt i eksempel 1 fjernedes ikke-vedhæftende makrofagceller fra 5 dyrkningsbrøndene ved udsugning med en 18 gauge nål, før testprøverne sættes til makrofagerne, hvorefter monolagene skylledes to gange med serumfrit "RPMI-1640". For GM-CSF's vedkommende udførtes analyser med forskellige fortyndinger af både supernatant produceret 10 ret med gær indeholdende GM-CSF plasmidet som fremstillet i eksempel 2 ovenfor (figur 3) og rensat rekombinant GM-CSF som fremstillet i eksempel 5 (figur 4). Fortyndingerne af LPS, IFN- γ og LPS sammen med IFN- γ anføres også i figur 3 og 4. Som kontrol udføres 15 tes analyser med supernatanter produceret med gær, som ikke indeholdt GM-CSF plasmidet. Efter 24 timers inkubation af testprøver med hvilende makrofager sugedes testprøverne fra.

Ca. 10^4 ^{125}I -UdR-mærkede målceller fra eksempel 20 5 sættes til hver af makrofagbrøndene til opnåelse af et indledende mål-til-effektor (aktiveret makrofag) celleforhold mellem 1:10 og 1:20. Desuden blev radio-mærkede målceller udstrøget alene som en yderligere kontrolgruppe. Da analysen måler lyse af vedhæftende 25 målceller, hvorved celle-til-cellekontakt mellem effektor- og målceller er påkrævet, blev kultursupernatanterne suget fra efter 24 timer og erstattet med frisk "RPMI-1640" medium for at eliminere potentielle fejl på grund af celler, som ikke hang ved, men ikke 30 nødvendigvis blev dræbt ved analysen. Efter yderligere 48 timer skylledes monolagene kraftigt for at fjerne målceller dræbt af makrofagerne. De vedhæften-

de levedygtige celler, som blev tilbage i hver brønd, lyseredes med 50 μ l 0,5 M NaOH. De resterende tællinger opsamledes med en bomuldstampon, hvorefter radioaktiviteten målt med en gammatæller. Den procentuelle makrofagformidlede cytotoxicitet beregnedes i henhold til formlen:

Procent udviklet cytotoxicitet =

$$100 - \frac{\text{cpm i målceller dyrket med stimulerede makrofager}}{\text{cpm i målceller dyrket med hvilende makrofager}} \times 100$$

Analyseresultaterne er indeholdt i figur 3 og 4. Som vist i figur 3 og som forventet aktiverede LPS og IFN- γ interfeeron makrofager til det punkt, hvor de formidler tumoricid aktivitet. Desuden var som tidligere rapporteret IFN- γ 's effektivitet som makrofagaktivator kun signifikant, når den tilsattes sammen med en lille mængde LPS. Som yderligere vist i figur 3 var supernatant produceret med gær indeholdende GM-CSF plasmidet effektivt til at få makrofager til at dræbe tumorceller, medens kontrolsupernatant (produceret med gær, som ikke indeholder GM-CSF plasmidet) ikke var i stand til at fremkalde makrofag cytotoxicitet.

Figur 4 viser et fuldt forløb af dosistitrering af rensset rekombinant GM-CSF. Som vist i figur 4 havde rensset rekombinant GM-CSF selv ved en fortynding på 1:500.000 en evne til at aktivere makrofager til at udtrykke tumoricid aktivitet (30 CFU-c/ml), og halv-maksimal fremkaldelse af udviklet specifik cytotoxicitet indtraf ved en fortynding af søjlefraktio-

nen på ca. 1:1.000.000 (15 CFU-c/ml). Som i figur 3 vises der også i figur 4 passende kontrolprøver af LPS, IFN- γ og IFN- γ plus LPS. Til forskel fra IFN- γ tjente GM-CSF som et effektivt enkeltsignal til 5 aktivering af makrofager til tumoricid aktivitet i fravær af exogent LPS.

Eksempel 7

Analyse for tumoricid aktivitet - human carcinom- 10 cellelinie

Den i eksempel 6 anførte analyse for tumoricid aktivitet gennemføres også med hensyn til den humane blæreskeicarcinom SCaBER (ATCC nr. HTB 3). Disse målceller radiomærkes som beskrevet i eksempel 5. Analy- 15 sen udføres under anvendelse af samme procedure som beskrevet i eksempel 6 med undtagelse af, at der i stedet for A375 målcellerne anvendes radiomærkede SCaBER målceller.

20 Eksempel 8

Analyse for tumoricid aktivitet - human myelom

Tumoricid analyseproceduren i eksempel 6 og 7 anvendes i forbindelse med den humane maligne myelom SK-MEL-28 (ATCC nr. HTB 72). Målcellerne radiomærkes 25 som beskrevet i eksempel 5. Analysen udføres på samme måde som anført i eksempel 6 og 7 med undtagelse af, at SK-MEL-28 celler anvendes som målceller.

Eksempel 9

30 Analyse for tumoricid aktivitet - human hepatom

Den i eksempel 6 anførte analyse for tumoricid aktivitet udførtes også med hensyn til den humane levercarcinom SK-Hep-1 (ATCC nr. HTB-52). Målcellerne

radiomærkedes på samme måde som beskrevet i eksempel 5. Ved analysen anvendtes GM-CSF i en koncentration på 10 nanogram per milliliter (ng/ml) analysevolumen. Ca. 10^4 125 IUdr-mærkede målceller anvendtes ved hver analyse til opnåelse af et indledende mål:effektor (aktiveret monocyt) celleforhold mellem 1:20 og 1:30. Som kontrol blev radiomærkede målceller også udstrøget alene. Ved denne analyse fandtes de GM-CSF-aktiverede monocytter i gennemsnit at formidle specifik cytotoxicitet af tumorcellerne ved et niveau på ca. 14%.

Eksempel 10

Analyse for tumoricid aktivitet - human pancreascarcinom

Tumoricidanalyseproceduren i eksempel 9 anvendtes i forbindelse med den humane pancreascarcinom cellelinie MIA PACA-2 (ATCC nr. CRL 1420). Målcellerne radiomærkedes som beskrevet i eksempel 5. Analysen udførtes på den i eksempel 9 anførte måde med undtagelse af, at MIA PACA-2 cellerne anvendtes som målceller. Ved denne specielle analyse fandtes den gennemsnitlige procentuelle genererede cytotoxicitet at være ca. 38%.

Eksempel 11

Analyse for tumoricid aktivitet - human blærecarcinom

Tumoricidanalyseproceduren i eksempel 9 anvendtes også i forbindelse med den humane blærecarcinom cellelinie 5637 (ATCC nr. ETB-9). Målcellerne mærkedes som beskrevet i eksempel 5. Analysen udførtes på samme måde som anført i eksempel 9 med undtagelse af, at 5637 celler anvendtes som målceller. Ved denne

31

specielle analyse fandtes den procentuelle genererede
cytotoksicitet at være ca. 30%. Denne specielle ana-
lyse og de ovenfor anførte viser, at GM-CSF tjente
som effektivt enkeltsignal til aktivering af makrofa-
5 ger til tumoricid aktivitet.

10

15

20

25

30

P A T E N T K R A V

1. Anvendelse af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor til fremstilling af et medikament til fremme af tumoricid aktivitet af celler af makrofag herkomst, hvori cellerne af makrofag herkomst udsættes for en virksom mængde af nævnte medikament.

2. Anvendelse af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor ifølge krav 1, hvori fremgangsmåden til fremme af tumoricid aktivitet af cellerne af makrofag herkomst omfatter:

- a) Isolering af celler af makrofag herkomst fra kroppen;
- b) de isolerede celler kontaktes med en virksom mængde af en granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor; og
- c) derefter indføres cellerne i en recipients krop.

3. Anvendelse af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor ifølge krav 1, hvori fremgangsmåden til fremme af tumoricid aktivitet af celler af makrofag herkomst omfatter indføring i kroppen af et menneske, en effektiv mængde af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor.

4. Anvendelse af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor ifølge krav 3, hvor medikamentet fremstilles til administrering ved injektion, oral administrering, aerosol inhalation, transdermal eller transbukal absorption eller ved rektal suppositorium.

5. Anvendelse af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor ifølge krav 4, hvor medikamentet fremstilles til administrering ved subkutan, intramuskulær, intraperitoneal eller intravenøs injektion.

6. Anvendelse af granulocyt makrofag stimulerende faktor til fremstillingen af et medikament til cancerterapi.

7. Anvendelse af granulocyt makrofag stimulerende faktor ifølge krav 6, hvori fremgangsmåden til cancerterapi omfatter trinnene med indføring i kroppen af et menneske af en virksom mængde af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor.

8. Anvendelse af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor ifølge et vilkårligt af kravene 1-7, hvori den granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor er fremstillet ved rekombinant DNA teknikker.

9. Anvendelsen af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor ifølge et vilkårligt af kravene 1-8, hvor den granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor er oprenset til en specifik aktivitet på mindst $1,5 \times 10^6$ kolonidannende enheder pr. μg protein som bestemt ved knoglemarvskolonidannende analyse.

10. Anvendelsen af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor ifølge et vilkårligt af kravene 1-5 eller krav 9 afhængig af kravene 1-5, hvori makrofagerne er afledt fra perifere blodmonocytter.

11. Anvendelsen af granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor ifølge et vilkårligt af kravene 1-10, hvori fra 0,01 til 100 nanogram granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor anvendes per 2×10^5 celler af makrofag herkomst.

12. Anvendelsen ifølge et vilkårligt af kravene 1-11, hvori den granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor er human granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor.

[illegible]

FIG. 1

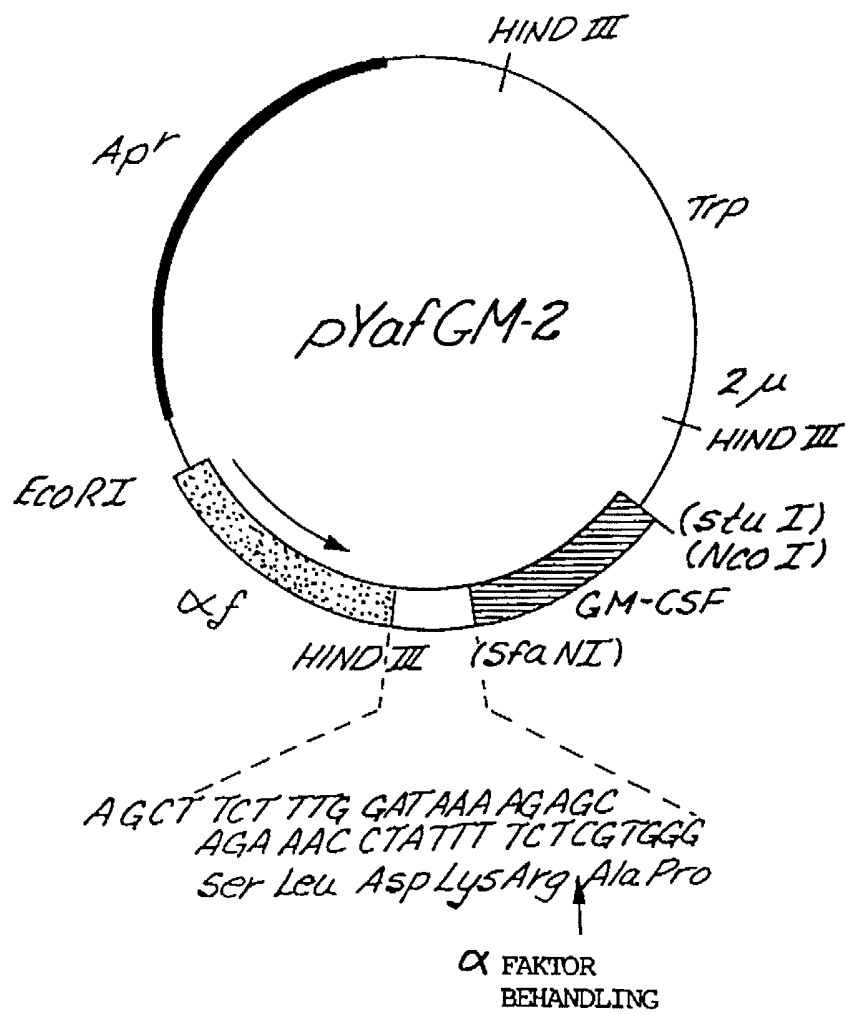
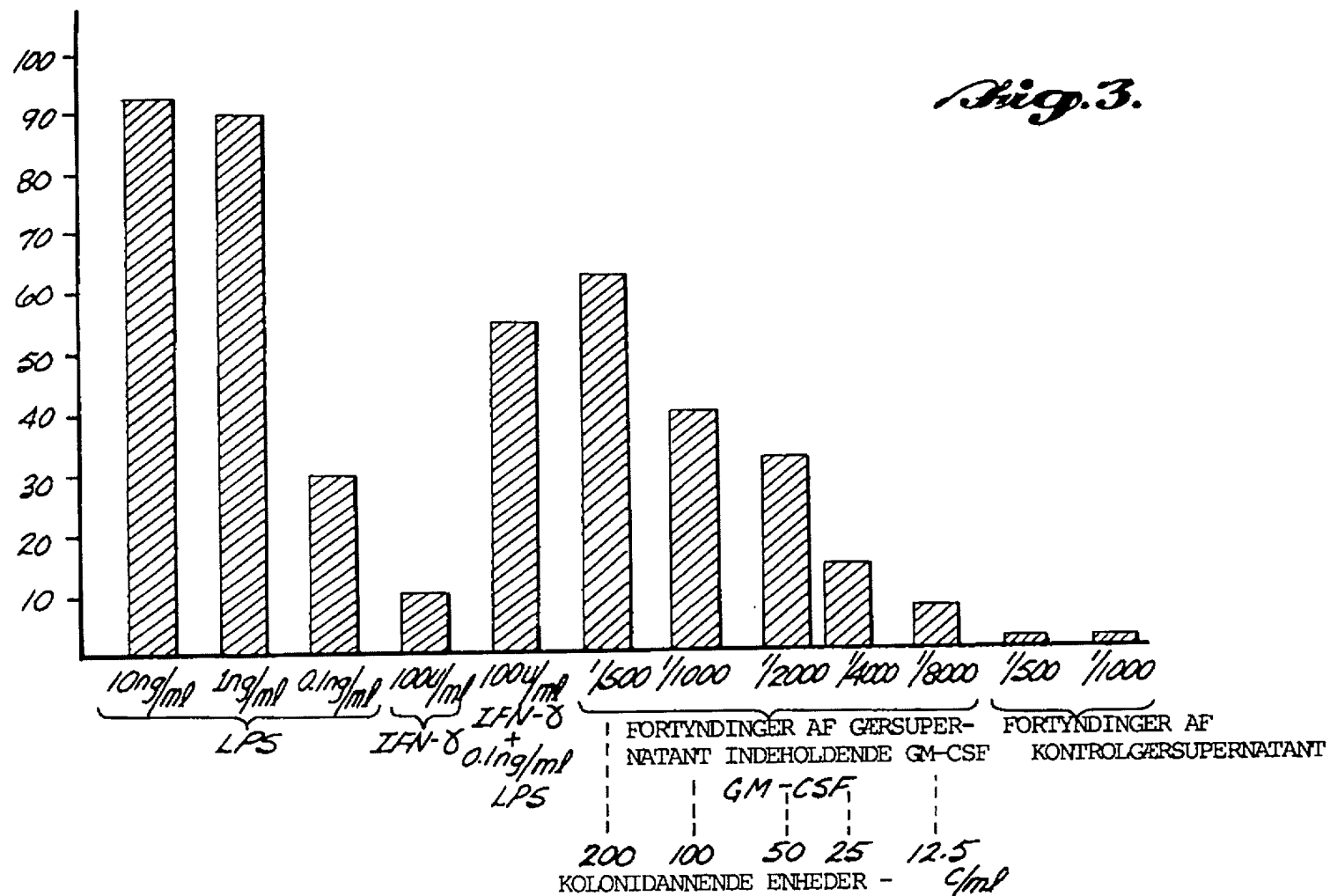


Fig. 2.

% SPECIFIK CYTOTOXICITET FORMIDLET AF AKTIVERET GM-CSF



KONCENTRATION AF AKTIVERINGSMIDDEL

% SPECIFIK CYTOTOXICITET FORMIDLET AF AKTIVERET GM-CSF

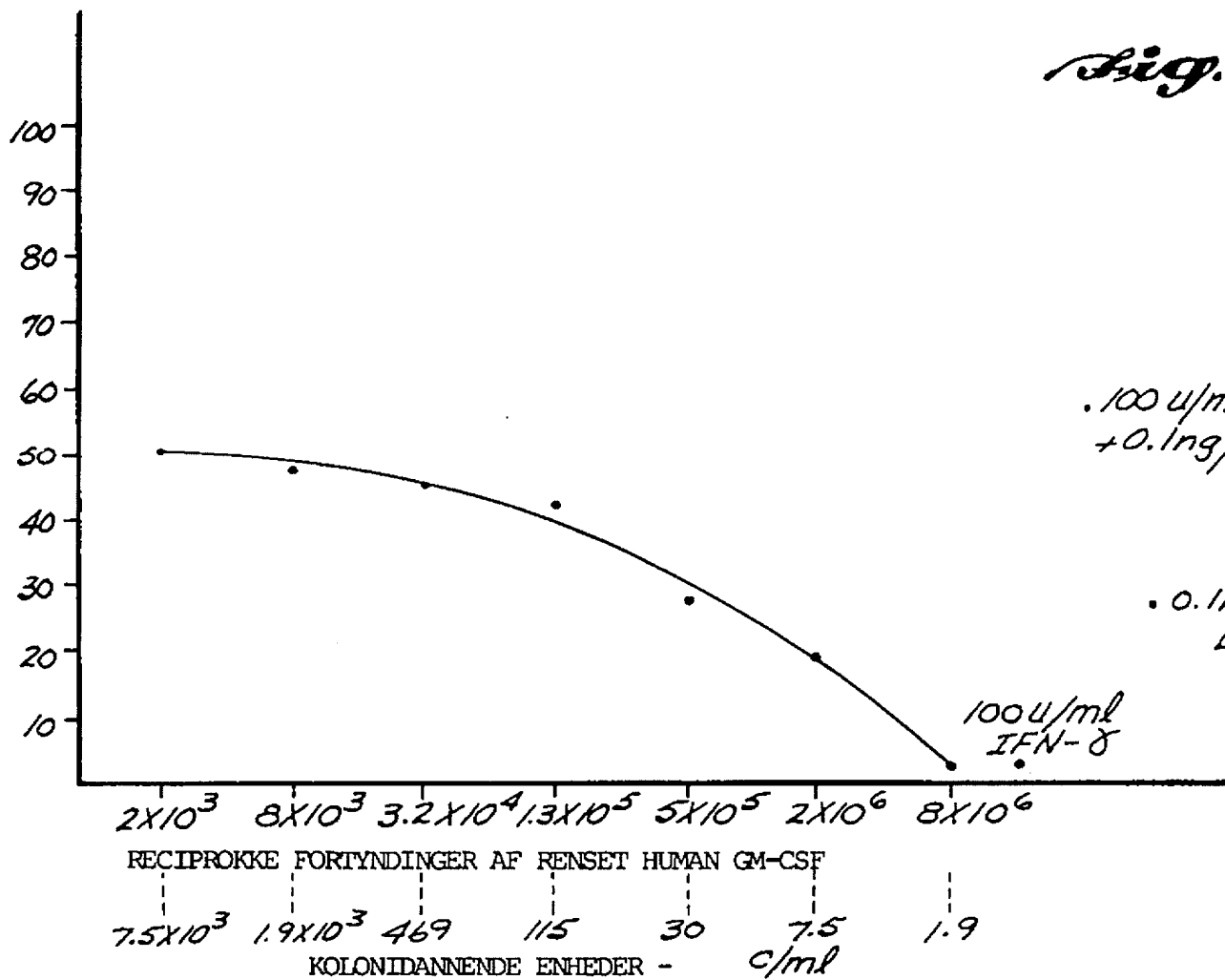


Fig. 4.

• 100 u/ml IFN- γ
+ 0.1 ng/ml LPS

• 0.1 ng/ml
LPS

100 u/ml
IFN- γ

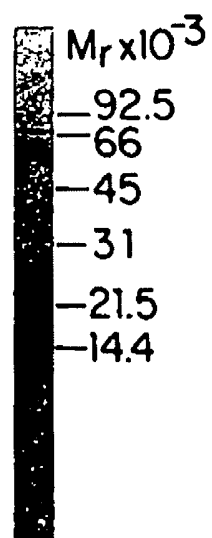


Fig. 5.