(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 595 T2** 2006.05.24

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 763 057 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 595.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/05448**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 918 912.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/029935**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.04.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **09.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.03.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.05.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 14/00*** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
234580 **28.04.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., Ridgefield, Conn., US

(72) Erfinder:
KEHRY, Marilyn, Danbury, US; CASTLE, Brian E., New Fairfield, US

(74) Vertreter:
Kompter, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 64560 Riedstadt

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG VON B-ZELLEN UND VERWENDUNGEN DAFÜR**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet der Immunologie. Speziell werden erfindungsgemäß Verfahren zur Proliferation und Differenzierung von B-Zellen bereitgestellt.

Stand der Technik

[0002] Während einer Immunreaktion führt eine Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen zu einer Sekretion von antigenspezifischen Antikörpern von hoher Affinität. Wenn sich die Antikörperreaktion auf Protein-Antigene richtet hängt die Bildung von Antikörpern auch von der Aktivierung von spezifischen Helfer-T (Th)-Zellen und ihren Wechselwirkungen mit B-Zellen ab. Während der Vorgänge der Aktivierung und Differenzierung folgen B-Zellen einem oder mehreren charakteristischen und irreversiblen Wegen, um eine von verschiedenen identifizierbaren Funktionalitäten zu erwerben. Beispielsweise unterliegen aktivierte B-Zellen zunächst einer hochgradigen Proliferation, wobei während dieser Periode der Zellteilung mehrere verschiedene Ereignisse ablaufen können: ein Isotypwechsel kann erfolgen, wodurch sich eine Rekombination von Genen der variablen (V) Region der schweren Kette proximal zu verschiedenen konstanten Regionen (γ-Unterklassen, α, oder ε) und eine Sekretion von verschiedenen Antikörperklassen ergibt; eine somatische Mutation kann in den Gensegmenten der V-Region der schweren und leichten Ketten erfolgen, wodurch Antikörper-Kombinationsstellen von hoher Affinität entstehen; und B-Zellen können einer Differenzierung unterliegen und zu Gedächtniszellen oder wirksamen Antikörper-sezernierenden Plasmazellen werden.

[0003] Welchen Weg eine spezielle B-Zelle einschlägt, wird höchstwahrscheinlich durch die Typen von Stimuli, die sie erfährt, festgelegt; dies wird vermutlich durch das Gesamtmilieu festgelegt. Beispielsweise kann die Anwesenheit von anderen Zelltypen (verschiedene Typen von Th-Zellen und/oder follikulären, dendritischen Zellen) und die Anwesenheit oder Abwesenheit eines speziellen Antigens unterschiedliche Signale an B-Zellen liefern. Einige Ereignisse, wie die Signale, die Gedächtnis B-Zellen erzeugen, und die molekularen Mechanismen, die die somatische Mutation und Selektion von Antikörper erzeugenden Zellen von hoher Affinität steuern, sind nur schlecht aufgeklärt. Weitere Vorgänge, wie anfängliche Aktivierungssignale, die naive B-Zellen zur Proliferation antreiben und die durch Kontakt mit spezifischen vorbehandelten und aktivierten Th-Zellen bereitgestellt werden, sind nunmehr gut charakterisiert (D. Parker, Annu. Rev. Immunol., Bd.11 (1993), S. 331–360). Ferner wurden auch die Einflüsse von löslichen, von Th-Zellen abgeleiteten Lymphokinen auf aktivierte B-Zellen beschrieben (D. Parker, Annu. Rev. Immunol., Bd. 11 (1993), S. 331–360); Hodgkin et all., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034; Noelle et al., J. Immunol., Bd. 146 (1993), S. 1118–1124).

[0004] Da die Erzeugung von vorbehandelten und aktivierten Th-Zellen für die B-Zellaktivierung obligatorisch ist, ist die Festlegung der Erfordernisse von B-Zellen selbst unter Anwendung klassischer in vitro-Systeme, die für die Untersuchung von B-Zellreaktionen verwendet werden, schwierig. Bei diesen Systemen, bei denen vielfach gereinigte B-Zellen, antigenspezifische Th-Zellklone und Antigen verwendet wurden, waren die Erfordernisse für die Th-Zellaktivierung ebenfalls für die Erzeugung einer B-Zellreaktion wesentlich.

I. Kontaktabhängige Abgabe von Signalen aus Th-Zellen an B-Zellen

[0005] Die an der B-Zellaktivierung durch Th-Zellen beteiligten Stufen lassen sich erstens in die durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) eingeschränkte Aktivierung und das Priming von spezifischen Th-Zellen und zweitens in die Wechselwirkung von sekundären, aktivierten Th-Zellen mit B-Zellen unter Induktion von B-Zellaktivierung, Proliferation und Differenzierung unterteilen (D. Parker, Annu. Rev. Immunol., Bd. 11 (1993), S. 331–360). Naive Th-Zellen unterliegen einem Priming durch Wechselwirkungen mit Antigenen, die zu Peptiden gespalten (prozessiert) worden sind, die eine Bindung mit Klasse II-MHC-Molekülen an der Oberfläche von Antigene aufweisenden Zellen eingegangen sind. Bei der Th-Zell-Primingstufe sind ruhende B-Zellen nicht in der Lage, als Antigene aufweisende Zellen zu dienen, da sie offensichtlich nicht fähig sind, den Th-Zellen die erforderlichen Costimulationssignale zu liefern. Antigene aufweisende Zellen, die die für das Th-Zellpriming geeigneten Costimulationssignale liefern können, sind ineinander verflochtene dendritische Zellen, die in an T-Zellen reichen Bereichen der Milz auftreten, und möglicherweise aktivierte B-Zellen. Nachdem spezifische Th-Zellen einem Priming unterworfen worden sind, sind ihre Aktivierungserfordernisse offensichtlich weniger stringent. Einem Priming unterworfene Th-Zellen können in wirksamer Weise durch ruhende B-Lymphozyten aktiviert werden, die mit spezifischen Antigenrezeptoren ein Antigen eingefangen und es zu Peptiden prozessiert haben (D. Parker, Annu. Rev. Immunol., Bd. 11 (1993), S. 331–360). Nach der Aktivierung können einem Priming unterworfene Th-Zellen Gene exprimieren, die sie befähigen, im Gegenzug entsprechende Kontakt- und Lymphokin-abhängige Aktivierungssignale an ruhende B-Zellen auszusenden (M. R. Kehry und P. D. Hodgkin, Sem. Immunol., Bd. 5 (1993), S. 393–400).

II. Historischer Überblick

[0006] Mehrere Untersuchungen in den 1980er Jahren beschrieben kritische Merkmale von spezifischen Signalen, die durch aktivierte, einem Priming unterworfene Th-Zellen an B-Zellen ausgesandt werden (Coffman et al., Immunol. Rev., Bd. 102 (1988), S. 5–28; DeFranco et al., J. Exp. Med., Bd. 159 (1984), S. 861–880). Der B-Zell-Th-Zell-Kontakt war erforderlich. Die Th-Zell-abgeleiteten Signale, die die Aktivierung von ruhenden B-Zellen antreiben, konnten nicht durch lösliche Lymphokine allein ersetzt werden (Andersson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 77 (1980), S. 1612–1616; Julius et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 79 (1982), S. 1989–1993; T. Owens, Eur. J. Immunol., Bd. 18 (1988), S. 395–401; Whalen et al., J. Immunol., Bd. 141 (1988), S. 2230–2239; Hirohata et al., J. Immunol., Bd. 140 (1988), S. 3726–3744; Noelle et al., J. Immunol., Bd. 140 (1989), S. 1807–1814; Julius et al., Eur. J. Immunol., Bd. 18 (1988), S. 381–386). Ein Befund, der für die Charakterisierung der bei der Abgabe von Kontaktsignalen an ruhende B-Zellen beteiligten Moleküle von Bedeutung war, bestand darin, dass voraktivierte Th-Zellen zur Abgabe von Aktivierungssignalen verwendet werden konnten. Dies lässt darauf schließen, dass die durch naive B-Zellen empfangenen Kontaktsignale nicht verwandt sein mussten; sie waren Antigen-unabhängig und nicht MHC-beschränkt. Die B-Zellen aktivierenden Signale schienen sich von den Signalen zu unterscheiden, die für die Th-Zellaktivierung erforderlich waren, und waren somit befähigt, signifikante B-Zell-Nebenreaktionen zu erzeugen (Whalen et al., J. Immunol., Bd. 141 (1988), S. 2230–2239). Dies ließ darauf schließen, dass die B-Zellrezeptoren für von Th-Zellen abhängige Kontaktsignale konstitutiv exprimiert wurden und nicht polymorph oder auf den B-Zell-Antigenrezeptor bezogen waren. Ferner war es sehr wahrscheinlich, dass die Th-Zellmoleküle, die die Kontaktsignale liefern, in ruhenden Th-Zellen nicht in funktionellem Zustand vorlagen. Dies schließt eine Rolle für den T-Zell-Rezeptorkomplex aus, der zunächst bezüglich des Empfangs von antigenspezifischen Th-Zellaktivierungssignalen ins Spiel gebracht wurde.

[0007] Diese Untersuchungen beschrieben auch eine Rolle für von Th-Zellen abgeleitete Lymphokine bei der Festlegung der Menge und des Isotops eines sezernierten Antikörpers (Coffman et al., Immunol. Rev., Bd. 102 (1988), S. 5–28). Bei der Maus wurde gezeigt, dass die Fähigkeit eines Th-Zellklons zur Induktion der B-Zelldifferenzierung vom Repertoire der nach der Aktivierung sezernierten Lymphokine abhängt. Th-Zellklone vom Th2-Typ, die IL-4 und IL-5 sezernieren, sind bei der Induktion der Produktion von IgM und bei der Umstellung auf IgG1, IgA und IgE wirksam (Coffman et al., Immunol. Rev., Bd. 102 (1988), S. 5–28; Mosmann & Coffman, Annu. Rev. Immunol., Bd. 7 (1989), S. 145–173). Obgleich zunächst einige Meinungsverschiedenheiten über die Fähigkeit von Th-Zellklonen vom Th1-Typ, die IL-2 und IFN-γ erzeugen, zur Stimulation der B-Zelldifferenzierung herrschten, hat es den Anschein, dass die meisten Th-Zellklone dazu befähigt sind, die entsprechenden Kontakte und löslichen Signale zu liefern, um ruhende B-Zellen zur Sekretion von Antikörpern zu aktivieren, wenn Th2-Lymphokine bereitgestellt werden (Abbas et al., J. Immunol., Bd. 144 (1990), S. 2031–2037).

[0008] Obgleich es den Anschein hatte, dass die Rolle von Lymphokinen darin besteht, die B-Zelldifferenzierung zu induzieren, und nicht in der Einleitung von Aktivierungsereignissen, war ein System erforderlich, das einen Th-Zellkontakt getrennt von löslichen Signalen lieferte. Eine frühe Untersuchung belegte, dass Membrankomponenten aus T-Zellen auf andere Zelltypen durch ein vom Sendai-Virus vermitteltes Fusionsereignis übertragen werden können (Lindquist et al., Scand. J. Immunol., Bd. 23 (1986), S. 119–125). Diese Zellen enthielten funktionale, T-zellspezifische Membranproteine, die eine Leitung von Signalen für die Aktivierung von T-zellspezifischen Genen bewirken konnten, wobei die Zellen jedoch nicht auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung von B-Zellen untersucht wurden. Eine weitere Untersuchung belegte, dass Tumorzellen-Plasmamembranen ausreichten, um allogene, zytotoxische T-Lymphozyten zu erzeugen (Stallcup et al., Cell. Immunol., Bd. 89 (1984), S. 144–150). Dies ließ darauf schließen, dass ein Zell-Zell-Kontakt kritische Signale lieferte, die die Lymphozyten-Aktivierung regulierten. Jedoch wirkten hohe Dosen von Plasmamembranen nicht-spezifisch hemmend sowohl auf T- als auch auf B-Lymphozyten-Reaktionen (Stallcup et al., Cell. Immunol., Bd. 89 (1984), S. 144–150). Einige Jahre später präparierten Sekita et al. Plasmamembranen aus einer Vielzahl von T-Zellen und lymphoiden Zelllinien und wiesen ihre Fähigkeit zur Stimulation und Costimulation der B-Zellproliferation nach (Sekita et al., Eur. J. Immunol., Bd. 18 (1988), S. 1405–1410). Jedoch stellten diese Autoren fest, dass aus den meisten Zelltypen präparierte Membranen B-Zellen aktivieren konnten (Sekita et at., Eur. J. Immunol., Bd. 18 (1988), S. 1405–1410). Da für Th-Zellen oder für aktivierte, übermäßig ruhende T-Zellen keine Spezifität festgestellt wurde, schien sich die aktive Komponente in diesen Membranen von der Komponente zu unterscheiden, die durch Aktivierung von normalen, einem Priming unterworfenen Th-Zellen induziert wurde.

[0009] Die vielversprechendsten Untersuchungen zur Entwicklung eines von Th-Zellen freien Systems zur Abgabe von Kontaktsignalen an B-Zellen bedienten sich einer in Bezug auf Plasmamembranen angereicherten Fraktion von Vesikeln, die aus einem aktivierten Mäuse-Th2-Zellklon, nämlich D10.G4.1 (D10), präpariert worden waren, um Kontaktsignale

in Abwesenheit von anderen Zelltypen zu liefern (A. A. Brian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 85 (1988), S. 564–568). Bei dieser Arbeit wurde eine Spezifität insofern nachgewiesen, als aus ruhenden Th2-Zellen präparierte Membranen nicht stimulatorisch für die B-Zellproliferation waren. Jedoch war die B-Zellpopulation nicht zur Beseitigung von voraktivierten B-Zellen gereinigt worden, die andere Aktivierungserfordernisse als ruhende B-Zellen aufweisen. Voraktivierte B-Zellen reagieren auf Th2-Lymphokine allein (insbesondere IL-5) durch Wachstum und Sekretion von IgM in Abwesenheit der Th-zellabhängigen Kontaktsignale (Takatsu et al., Immunol. Rev., Bd. 102 (1988), S. 107–135). Da es nicht möglich ist, verunreinigende Vesikel des endoplasmatischen Retikulums, die Lymphokine enthalten, von Plasmamembran-Vesikeln zu trennen, war es bei der ursprünglichen Arbeit (A. A. Brian, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 85 (1988), S. 564–568) nicht klar, ob ein tatsächlicher, kontaktabhängiger Stimulus auf ruhende B-Zellen durch eine Plasmamembranfraktion aus einem Th-Zellklon geliefert werden kann.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0010] Die vorliegende Erfindung beruht auf der Beobachtung, dass hochdichter, membrangebundener CD40-Ligand (nachstehend "hdmb-CD40-Ligand") eine Langzeitproliferation von B-Zellen in Kultur induzieren kann. Ferner wurde festgestellt, dass durch Variation der Typen und der Konzentration von Lymphokinen und/oder Kontaktzellen, die während der Proliferation vorhanden sind, proliferierende B-Zellen zur Differenzierung (Reifung) zu Antikörper erzeugenden Zellen induziert werden können. Schließlich wurde festgestellt, dass eine Proliferation und Differenzierung in Gegenwart eines Antigens bevorzugt differenzierende Populationen von B-Zellen proliferiert oder auswählt, um den prozentualen Anteil von Zellen, die spezifische Antikörper gegen das zugeführte Antigen erzeugen, zu erhöhen.

[0011] Auf der Grundlage der vorstehenden Beobachtungen werden gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung Verfahren zur Proliferation von B-Zellen bereitgestellt, die die Stufe der Kultivierung von einer oder mehreren B-Zellen in Gegenwart von hdmb-CD40-Ligand umfassen. Die erfindungsgemäßen Verfahren können auf B-Zellen angewandt werden, die aus einem beliebigen Säuger isoliert worden sind, wobei es sich insbesondere um humane B-Zellen handelt.

[0012] Die hier beanspruchten Verfahren verbessern frühere Versuche zur Proliferation von B-Zellen bei der Verwendung von hdmb-CD40-Ligand. Frühere Versuche zur Proliferation von B-Zellpopulationen in Gegenwart von natürlich isoliertem, membrangebundenem CD40-Liganden, von membrangebundenem CD40-Liganden, der aus transfizierten Tierzellen erzeugt worden war, von rekombinant erzeugten löslichen Formen von CD40-Liganden und anti-CD40-Rezeptor-Antikörpern haben zu schlechten Ergebnissen geführt (beschrieben beispielsweise bei Armitage et al., J. Immunology, Bd. 15 (1993), S. 3671–3680). Es ergibt sich tendenziell eine mäßige Proliferation, die nach 1 bis 4 Replikationsrunden endet. Dabei besteht häufig die Notwendigkeit der Anwesenheit eines Lymphokins oder Cytokins (z. B. von Th-Lymphokinen), um die Proliferation zu stimulieren. Unter Anwendung der vorliegenden Verfahren wurden starke Proliferationsreaktionen in der Höhe von 250-fach erhalten.

[0013] Das vorliegende Verfahren kann bei einer einstufigen Proliferation oder bei einer mehrstufigen Proliferation eingesetzt werden. Speziell wird hdmb-CD40-Ligand dem Kulturmedium während der anfänglichen Züchtungsphasen zugesetzt. Die Anwesenheit von hdmb-CD40-Ligand wird aufrechterhalten, bis die Proliferationsrate abnimmt. Die Zellen werden sodann durch Züchtung unter Bedingungen, bei denen kein hdmb-CD40-Ligand enthalten ist, zum Ruhen veranlasst. Nach Erreichen des Ruhezustands können die Zellen zur Fortsetzung der Proliferation und Differenzierung restimuliert werden, indem man hdmb-gebundenen CD40-Liganden und Cytokine erneut in die Kulturmedien gibt.

[0014] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beruht auf der Beobachtung, dass Cytokine, Extrakte von Zellen und/oder ausgewählte Feederzellen bei Zugabe von B-Zellen, die unter Anwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren proliferieren oder proliferiert haben, die B-Zellen zur Differenzierung zu Antikörper erzeugenden Zellen stimulieren. Auf der Grundlage dieser Beobachtung stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Differenzierungs-Proliferation von B-Zellen bereit, die die Stufe der Kultivierung von B-Zellen in Gegenwart von hdmb-CD40-Ligand und einem oder mehreren Lymphokinen, Feederzellen oder Extrakten davon umfassen. Zu Beispielen für die Cytokine und Feederzellen, die verwendet werden können, gehören ohne Beschränkung hierauf Th2-Lymphokine und follikuläre dendritische Zellen.

[0015] Eine dritte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beruht auf der Beobachtung, dass die Differenzierung von B-Zellen partiell gesteuert werden kann, indem man dem Kulturmedium ein Antigen zusetzt. Speziell kann der prozentuale Anteil von B-Zellen, die Antikörper, die selektiv für ein spezifisches Antigen sind, erzeugen, erhöht werden, indem man dem Kulturmedium während des Proliferationsstadiums, des Ruhestadiums, des Differenzierungsstadiums oder des Reproliferationsstadiums der hier beschriebenen Verfahren ein Antigen zusetzt.

[0016] Zusätzlich zur in vitro-Verwendung werden in

der Literatur andere Formen des CD40-Liganden als Mittel zur Proliferation und Aktivierung von B-Zellen in einem Säugetierwirt beschrieben. Im allgemeinen können pathologische Zustände, die zu einer Suppression der B-Zellproliferation und -aktivierung führen, unter Verwendung des erfindungsgemäßen hdmb-CD40-Liganden anstelle der früher erzeugten Formen des CD40-Liganden behandelt werden. Indem man einen Säuger mit dem hdmb-CD40-Liganden versorgt, können B-Zell-Populationen innerhalb des Wirts auf ein Niveau und in einer Geschwindigkeit proliferiert werden, die wesentlich höher sind, als sie bei früher isolierten Formen des CD40-Liganden festgestellt werden.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1: Sequenzen von murinem und humanem CD40 und CD40-Liganden

[0017] Nucleotidsequenzen von humanem und murinem CD40-Liganden. CD40 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie (Mallett & Barclay, Immunol. Today, Bd. 12 (1991), S. 220–223) das vier sich wiederholende, an Cys reiche extrazelluläre Domänen enthält. Der murine CD40-Ligand ist ein Typ 2-Membranglycoprotein mit einem MG von 33 000–35 000 und einer vorhergesagten Länge von 260 Aminosäuren, der an aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Er ist verwandt mit TNF (Farrah & Smith, Nature, Bd. 358 (1992), S. 26) und Liganden der TNF-Rezeptortamilie (Goodwin et al., Cell, Bd. 73 (1993), S. 447–456; Smith et al., Cell, Bd. 73 (1993), S. 1349–1360; Smith et al., Cell, Bd. 76 (1994), S. 959–962; Aruffo et al., EMBO J. (1992); Hollenbaugh et al., EMBO J., Bd. 11 (1992), S. 4313–4321).

Fig. 2: Zeitlicher Verlauf der SF9-Zellinfektion

A. SF9-Zellen wurden mit einem rekombinanten Baculovirus mit einem Gehalt an Mäuse-CD40-Liganden für verschiedene Zeitspannen infiziert. Eine angereicherte Plasmamembranfraktion wurde präpariert. Jede Membranpräparation wurde in einem B-Zellproliferationstest titriert (2 × 10^4 B-Zellen/Vertiefung für 72 h). Ausgefüllte Kreise, 18 h Infektion; leere Quadrate, 42 h Infektion; leere Kreise, 66 h Infektion; ausgefüllte Quadrate, 90 h Infektion.
B. hdmb-CD40-Ligand, der im vorstehenden Abschnitt A erzeugt worden war, wurde zur Stimulation von B-Zellen in Gegenwart von D10 sn (1/100; Lymphokin enthaltender Überstand aus 9 h stimuliertem D10G4.1-Th2 T-Zellklon, Hodgkin et al., J. Immunology, Bd. 145 (1990), S. 2025–2034) verwendet. Die Symbole sind die gleichen wie in Fig. 1A.

Fig. 3: Spezifität der B-Zellproliferation bei Induktion durch hdmb-CD40-Ligand

[0018] B-Zellen (2 × 10^4/Vertiefung) wurden mit einer konstanten Menge an hdmb-CD40-Ligand (1/200) stimuliert. Ausgefüllte Kreise, CD40-IgG-Zugabe (35 µg/ml bei der höchsten Konzentration); leere Quadrate, kein CD40-IgG.

Fig. 4: Einflüsse der Ausstreichdichte auf die Proliferation von B-Zellen.

[0019] B-Zellen wurden auf Platten mit 96 Vertiefungen (1 × 10^4/Vertiefung) mit hdmb-CD40-Ligand (1/80) und D10 sn (1/100) gebracht. Die Zellen wurden gezählt und die Medien wurden alle 48 h ausgetauscht. Nach 5 und 8 Tagen wurden die Zellen resuspendiert und 1/8 aufgeteilt. Ausgefüllte Dreiecke, Zellen nicht geteilt; ausgefüllte Kreise, 1/8-Teilung nach 5 Tagen; ausgefüllte Quadrate, 1/8-Teilung nach 8 Tagen; leere Kreise, 1/8-Teilung, multipliziert mit dem Faktor 8; leere Quadrate, zweite 1/8 Teilung, multipliziert mit dem Faktor 64.

Fig. 5: Vergleich der B-Zellexpansion in flachbödigen Vertiefungen gegenüber Vertiefungen mit "V"-Boden

[0020] B-Zellen wurden auf Platten mit 96 Vertiefungen mit flachem Boden oder "V"-Boden gebracht (1 × 10^3/Vertiefung). Die Zellen wurden entweder mit hdmb-CD40-Ligand und D10 sn (++) oder nur mit hdmb-CD40-Ligandenmembranen (+–) inkubiert. Die Zellen wurden gezählt und das Medium wurde alle 48 Stunden entfernt und ersetzt. Ausgefüllte Quadrate, hdmb-CD40-Ligand und D10 sn in einer Platte mit flachem Boden; leere Kreise, hdmb-CD40-Ligand und D10 sn in einer Platte mit "V"-Boden; leere Quadrate, hdmb-CD40-Ligand in einer Platte mit flachem Boden; ausgefüllte Kreise, CD40-Ligand in einer Platte mit "V"-Boden.

Fig. 6: Wachstum und Antikörpersekretion von B-Zellen bei Stimulation mit hdmb-CD40-Ligand und D10 sn

A. B-Zellen wurden auf Platten mit 96 Vertiefungen mit "V"-Boden (1 × 10^3 Zellen/Vertiefung) mit hdmb-CD40-Ligand (1/300) und D10 sn (1/100) gebracht. Alle 48 h wurden die Zellen entfernt und gezählt. Leere Quadrate, Gesamtzahl von febensfähigen Zellen; ausgefüllte Kreise, Bruchteil der Zellen, die lebensfähig waren.
B. Medium von Wiederholungsvertiefungen wurden zur Messung der Antikörperkonzentration durch quantitativen ELISA-Test entnommen. Ausgefüllte Kreise, IgM; ausgefüllte Quadrate, IgG1; ausgefüllte Dreiecke, IgE. Die kumulativen Antikörperkonzentrationen sind in ng/ml angegeben.

Fig. 7: Wachstum und Antikörpersekretion von B-Zellen bei Stimulation mit hdmb-CD40-Ligand und D10 sn unter Ersetzen des Mediums

A. B-Zellen wurden auf Platten mit 96 Vertiefungen mit "V"-Boden (1 × 10^3 Zellen/Vertiefung) mit hdmb-CD40-Ligand (1/300) und D1Q sn (1/100) gebracht. Alle 48 h wurden Zellen entnommen und gezählt. Altes Medium wurde entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Leere Quadrate, Gesamtzahl der lebensfähigen Zellen; ausgefüllte Kreise, Bruchteil von Zellen, die lebensfähig waren.
B. Medium von Wiederholungsvertiefungen wurde zur Messung der Antikörperkonzentration durch quantitativen ELISA-Test entnommen. Ausgefüllte Kreise, IgM; ausgefüllte Quadrate, IgG1; ausgefüllte Dreiecke IgE. Kumulative Antikörperkonzentrationen sind in ng/ml angegeben.

Fig. 8: Wachstum und Antikörpersekretion von B-Zellen bei Restimulation mit hdmb-CD40-Ligand und D10 sn unter Ersetzen des Mediums

A. B-Zellen wurden auf Platten mit 96 Vertiefungen mit "V"-Boden (1 × 10^3 ZellenN/Vertiefung) mit CD40-Ligand (1/300) und D10 sn (1/100) gebracht. Alle 48 h wurden Zellen entnommen und gezählt. Altes Medium wurde entfernt und durch frisches Medium ersetzt. +–, Medium enthielt hdmb-CD40-Ligand; —, Medium enthielt keine Zusätze; ++, Medium enthielt hdmb-CD40-Ligand und D10 sn. Leere Quadrate, Gesamtzahl von lebensfähigen Zellen; ausgefüllte Kreise, Bruchteil von Zellen, die lebensfähig waren.
B. Medium von Wiederholungsvertiefungen wurde zur Messung der Antikörperkonzentration durch quantitativen ELISA-Test entnommen. Ausgefüllte Kreise, IgM; ausgefüllte Quadrate, IgG1; ausgefüllte Dreiecke, IgE. Kumulative Antikörperkonzentrationen sind in ng/ml angegeben.

Fig. 9: Häufigkeit von B-Zellen, die auf hdmb-CD40-Ligand reagieren

[0021] B-Zellen wurden in einer Menge von 1, 3, 10 und 30 Zellen/Vertiefung auf Platten mit 96 Vertiefungen mit "V"-Boden entweder mit hdmb-CD40-Ligand (1/300) oder hdmb-CD40-Ligand (1/300) und D10 sn (1/100) ausgestrichen. Nach 6 Tagen wurden die Zellen resuspendiert, auf flachbödige Platten übertragen und einer Bewertung auf die Anwesenheit von lebensfähigen Zellen (Zellen/Vertiefung) unterzogen.

Fig. 10: Proliferation von humanen B-Zellen

[0022] Humane B-Zellen wurden in Vertiefungen mit V-Boden gemäß den Angaben zu **Fig.** 7 mit oder ohne Zusatz von rekombinantem humanem IL-4, IL-6 oder IL-10 je nach den Angaben inkubiert.

Fig. 11: Humaner CD40-Ligand in Insektenzellmembranen stimuliert eine effiziente humane B-Zellproliferation

[0023] Gereinigte humane periphere Blut-B-Zellen (7 000/Vertiefung) wurden in BCM (100 µl) mit verschiedenen Konzentrationen von humanem hdmb-CD40-Ligand in Form von Plasmamembranen, die aus SF9-Zellen gereinigt worden waren, die mit einem humanen CD40-Liganden enthaltenden, rekombinanten Baculovirus (nachstehend als humaner hdmb-CD40-Ligand bezeichnet) infiziert waren, inkubiert. (Quadrate), B-Zellen in Abwesenheit von Membranen; (Dreiecke), humaner hdmb-CD40-Ligand; (Kreise), humaner hdmb-CD40-Ligand und ein Gemisch von rekombinanten, humanen Lymphokinen (IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-11). ^{3}H-Thymidin (1 µCi/Vertiefung) wurde während der letzten 6 h der Züchtungsperiode von 96 h zugegeben. Die einzelnen Punkte geben den Mittelwert von zwei Vertiefungen an.

Fig. 12: Klonale Frequenz von humanem B-Zellwachstum und -differenzierung

[0024] Gereinigte, humane, periphere Blut B-Zellen wurden in einer Menge von 1, 3, 10 und 30 Zellen/Vertiefung auf Platten mit 96 Vertiefungen mit V-Boden in Gegenwart von humanem hdmb-CD40-Liganden (1 µg/ml) und einem Gemisch von rekombinantem IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-11 (150 µl insgesamt) ausgestrichen. An den Tagen 4, 8 und 11 wurde altes Medium entfernt und durch frisches Medium mit einem Gehalt an humanem hdmb-CD40-Liganden und Lymphokinen ersetzt. (A) Vertiefungen mit einem Gehalt an lebensfähigen Zellen (≥4 Zellen/Vertiefung) wurden am Tag 14 nach Resuspendieren der Zellen und Übertragen auf Platten mit 96 flachbödigen Vertiefungen bewertet. Gestrichelte Linien geben die Anzahl von B-Zellen/Vertiefung wieder, wobei 37 % der Kulturen in Bezug auf das Wachstum negativ waren. Gemäß der Poisson-Verteilung enthält bei dieser Zellzahl jede Vertiefung eine wachsende Zelle. (B) Am Tag 11 von den Platten geerntete Medien wurden auf die Anwesenheit von humanem IgM und humanem IgG durch getrennte ELISA-Tests getestet. Die Anzahl von in Bezug auf IgG und IgM positiven Vertiefungen wurden zur Bewertung vereinigt. Gestrichelte Linien geben die Anzahl von B-Zellen/Viefung wieder, wobei 37 % der Kulturen in Bezug auf die Antikörpererzeugung negativ waren.

Fig. 13: IgM- und IgG-Sekretion durch humane B-Zellen bei Stimulation mit verschiedenen Lymphokin-Kombinationen

[0025] Humane, periphere Blut B-Zellen (500/Vertiefung) mit 96 Vertiefungen mit V-Boden wurden mit humanem hdmb-CD40-Liganden (1 µg/ml) in Gegen-

wart der angegebenen Lymphokine in 150 µl BCM 14 Tage inkubiert. Kulturüberstände wurden geerntet und die Konzentrationen an IgM und IgG durch Elisa bestimmt. Die einzelnen Punkte geben die Mittelwerte ± Standardabweichung von Wiederholungsversuchen in vier Vertiefungen an. Die Lymphokin-Konzentrationen wurden gemäß den Angaben in Beispiel 3, Materialien und Methoden, zugeführt. PHA/PMA sn, Kulturüberstand von PHA- und PMA-aktivierten, peripheren Blut-T-Zellen; αCD3 sn, Kulturüberstand von anti-CD3-aktivierten, peripheren Blut T-Zellen. Die Endkonzentrationen von humanen T Zellüberständen sind angegeben.

Fig. 14: Von Cytokin abhängige humane B-Zelldifferenzierung

[0026] Humane, periphere Blut-B-Zellen (500/Viefung) wurden auf Platten mit 96 Vertiefungen mit V-Boden mit humanem hdmb-CD40-Liganden (1 µg/ml) in Gegenwart von verschiedenen Verdünnungen des Überstands von anti-CD3-aktivierten, peripheren Blut-T-Zellen in 150 µl BCM inkubiert. Am Tag 23 wurde das Medium entfernt und die Konzentrationen an IgM (punktierte Balken) und IgG (schraffierte Balken) durch ELISA bestimmt. Die einzelnen Punkte geben die Mittelwerte ± Standardabweichung für Wiederholungsversuche in vier Vertiefungen an.

Fig. 15. Klonale Frequenz von antigenspezifischen Mäuse B-Zellen in nicht dem Priming unterworfener Milz

[0027] Dichte murine Mäuse B-Zellen wurden in 1 000, 3 000, 10 000 und 30 000 Zellen/Vertiefung auf Platten mit 96 Vertiefungen mit V-Boden in Gegenwart von Maus-hdmb-human-CD40-Ligand (0,1 µg/ml) und D10-Überstand (1/100) in 150 µl BCM ausgestrichen. An den Tagen 5, 8 und 12 wurde altes Medium entfernt und durch frisches Medium mit einem Gehalt an $Sf9^{CD40L}$ und Lymphokinen ersetzt. Am Tag 14 wurden die Vertiefungen auf die Anwesenheit von KLH-spezifischem Antikörper sezernierenden Zellen durch ELISPOT-Analyse gemäß den Angaben in Beispiel 3, Materialien und Methoden, getestet. Jede Vertiefung auf den ursprünglichen Platten wurde auf zwei identische ELISPOT-Platten aufgeteilt: eine der Platten des Doppelversuchs wurde auf IgM und die andere auf IgG entwickelt. Die Vertiefungen wurden unter einem Schnittmikroskop positiv auf spezifische IgM-sezernierende Zellen (≥3 Flecken/Vertiefung) oder auf spezifische IgG-sezernierende Zellen (≥4 Flecken/Vertiefung) bewertet. Gestrichelte Linien geben die Anzahl von B-Zellen/Vertiefung wieder, bei der 37 % der Kulturen negativ auf die Bildung von antigenspezifischem Antikörper waren.

Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0028] Die vorliegende Erfindung beruht auf der Feststellung, dass hochdichter, membrangebundener CD40-Ligand (nachstehend als hdmb-CD40-Ligand bezeichnet) eine hochgradige Proliferation von B-Zellen in Kultur induzieren kann. Ferner wurde durch Variation der Typen und der Konzentration von Cytokinen und/oder Kontaktzellen, die während der Proliferation vorhanden waren, festgestellt, dass proliferierende B-Zellen einer Induktion zur Differenzierung zu Antikörper erzeugenden Zellen veranlasst werden können. Schließlich wurde festgestellt, dass die Proliferation und Differenzierung in Gegenwart eines Antigens bevorzugt differenzierende B-Zellen proliferiert und auswählt, um für das zugeführte Antigen spezifische Antikörper zu erzeugen.

[0029] Auf der Grundlage dieser Feststellungen werden gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung Verfahren zur Proliferation von B-Zellen bereitgestellt, die die Stufe der Züchtung von einer oder mehreren B-Zellen in Gegenwart von hdmb-CD40-Ligand umfassen, wobei die Membran CD40-Ligand in einer mindestens 10-fach größeren Dichte enthält, als sie auf Zellen gefunden wird, die CD40-Ligand natürlich exprimieren, und die B-Zellen mindestens 100-fach vermehrt werden.

[0030] Der hier verwendete Ausdruck "Proliferation" ist als der Vorgang der Expansion (Zunahme) der Anzahl von B-Zellen definiert, und zwar ausgehend von einer oder mehreren Zellen zu einer größeren Anzahl von Zellen. In den folgenden Beispielen wird der Nachweis einer 250-fachen Proliferation geführt (8 Runden der Teilung innerhalb von 6 Tagen). Der Grad und die Menge der Proliferation, die unter Anwendung der vorliegenden Verfahren erzielt wird, variieren je nach dem Typ und der Art der ursprünglichen B-Zellen, sowie je nach den angewandten Kulturbedingungen. Solange jedoch die Anzahl an lebenden B-Zellen, die in der Kultur vorhanden sind, als Folge einer Teilung oder einer erhöhten Überlebensrate der sich teilenden Population zunimmt, werden die B-Zellen als "proliferierend" bezeichnet (vergl. die **Fig.** 2, 6, 7, 8 und Fig. 10).

[0031] Die hier verwendeten Ausdrücke "B-Zellen" oder "B-Zellpopulation" beziehen sich auf eine oder mehrere Zellen, die sich von einem Explantat mit einem Gehalt an B-Zellen oder einer davon abgeleiteten Kultur ableiten (bezüglich einer Definition von B-Zellen und B-Zellpopulationen wird verwiesen auf Parker, Annu. Rev. Immunol., Bd. 11 (1993), S. 331–360). Die bevorzugten B-Zellen zur erfindungsgemäßen Verwendung werden als "B-Zellen von geringer Dichte" klassifiziert. Wie in den nachstehend Beispielen beschrieben, können B-Zellen von geringer Dichte aus Milz, peripherem Blut, Knochenmark

oder Zellen, die aus lymphoiden Organen eines Säugers isoliert worden sind, unter Anwendung von aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren gereinigt werden (vergl. beispielsweise Hodgkin et al., J. Immunology, Bd. 145 (1990), S. 2025–2034; Clark et al., J. Immunology, Bd. 148 (1992), S. 3327–3335; Thomas et al., J. Immunology, Bd. 150 (1993), S. 821–834; und Freudenthal et al., PNAS USA, Bd. 87 (1990), S. 7698).

[0032] Die anfängliche Startpopulation von B-Zellen kann aus einem Explantat von isolierten B-Zellen geringer Dichte (etwa 1000 Zellen) bestehen. Bei der Population kann es sich um ein primäres Explantat von einzelnen isolierten B-Zellen, um eine Population, die aus existierenden B-Zellkulturen, die nach den hier beschriebenen Verfahren erzeugt worden sind, oder um eine Population handeln, die aus peripheren Blutzellen, Knochenmarkzellen und Zellen, die sich von lymphoiden Organen ableiten, isoliert worden ist. Dem Fachmann ist es geläufig, wie er die Züchtungsbedingungen je nach Quelle und Größe der Ausgangspopulation unter Heranziehung bekannter Parameter variieren kann (vergl. Fig. 4 und Fig. 11).

[0033] Die erfindungsgemäßen Verfahren können auf B-Zellen, die aus einem beliebigen Säuger isoliert worden sind, angewandt werden. Die nachstehenden Beispiele belegen die Fähigkeit von hdmb-CD40-Ligand zur Proliferation sowohl von murinen als auch von humanen B-Zellen (**Fig.** 2, 7 und Fig. 9–12).

[0034] Der hier verwendete Ausdruck "Kultivierung" bezieht sich auf den Satz von Verfahrensweisen, die in vitro angewandt werden, wenn eine Population von Zellen (oder eine einzelne Zelle) unter Bedingungen inkubiert wird, von denen gezeigt worden ist, dass sie das Wachstum oder die Lebensfähigkeit der Zellen in vitro unterstützen. Der Stand der Technik kennt eine Reihe von Formaten, Medien, Temperaturbereichen, Gaskonzentrationen und dergl., die in einem Kultursystem definiert werden müssen. Die Parameter variieren auf der Grundlage des gewählten Formats und der speziellen Bedürfnisse der Person, die die hier beschriebenen Verfahren ausführt. Es ist jedoch ersichtlich, dass die Bestimmung der Kultivierungsparameter von routinemäßiger Natur sind.

[0035] Aus der großen Vielzahl von Formaten können beliebige Formate, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf) die Hohlfaser-Technologie und die Immobilisierung an festen Trägern oder Kulturkolben, zur Anwendung in den hier beschriebenen Verfahren angepasst werden, da derartige Formate bereits mit Erfolg bei der Züchtung anderer Säugetier-Zelltypen eingesetzt worden sind. In den folgenden Beispielen wurden B-Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit V-Boden oder flachem Boden, die sterile Plattendeckel aufweisen, inkubiert (Fig. 5, Fig. 10 und Fig. 11). Während der Züchtung wurden die Platten in 5,5 % CO_2 bei 37 °C inkubiert. Diese Verfahren wurden zur Züchtung von B-Zellmassen von geringer Dichte (etwa 1 000 Zellen) sowie von 1, 3 und 10 Zellen pro Vertiefung zur Züchtung ausgewählter B-Zellklone herangezogen. Diese Verfahren wurden nur als ein Beispiel einer großen Vielzahl von Formaten und Bedingungen, die angewandt werden können, ausgewählt.

[0036] Zusätzlich zu einer großen Vielzahl von Formaten, können beliebige der derzeit bekannten Säugetier-Zellzüchtungsmedien in den hier beanspruchten Verfahren eingesetzt werden. Ein Fachmann kann die Eignung eines speziellen Mediums und einer Format/Medium-Kombination zur Anwendung in den beanspruchten Verfahren unter Heranziehung bekannter Verfahrensweisen festlegen. In den folgenden Beispielen wurde B-Zellmedium (BCM), das aus 10 fötalem Kälberserum (HyClone-charakterisiert), 10 mM Hepes, pH-Wert 7,3, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, nicht-essentielle Aminosäuren, Natriumpyruvat, 5×10^{-5} M Mercaptoethanol in RPMI 1640-Medium und 100 × Ergänzungen von Gibco verwendet. Ausführliche Übersichtsartikel über andere bekannte Formate und Züchtungsbedingungen, die bei der Säugetier-Zellzüchtung eingesetzt werden, sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0037] Die hier beanspruchten Verfahren beruhen weitgehend auf der Verwendung von hdmb-CD40-Ligand. Der hier verwendete Ausdruck "CD40-Ligand" bezieht sich auf beliebige Proteine, die eine erhebliche Ähnlichkeit mit einer der bekannten Aminosäuresequenzen des CD40-Liganden besitzen und CD40-Ligandenaktivität aufweisen (bezüglich einer Übersicht über die Aminosäuresequenz und die Nucleinsäuresequenz, die für CD40-Liganden kodiert, wird verwiesen auf Armitage et al., Nature, Bd. 357 (1992), S. 80–82; Hollenbaugh et al., EMBO J., Bd. 11 (1992), S. 4313–4321). Gemäß der hier verwendeten Ausdrucksweise werden zwei Proteinen eine wesentliche Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zugeschrieben, wenn eine aktive Domäne oder eine an der Rezeptorbindung beteiligte Region eine Aminosäure-Sequenzhomologie von 80 % oder mehr aufweist. Bei den erfindungsgemäß bevorzugten CD40-Liganden handelt es sich um den humanen CD40-Liganden und den Mäuse-CD40-Liganden.

[0038] Der erfindungsgemäße CD40-Ligand kann aus Zellen isoliert werden, die natürlicherweise den CD40-Liganden exprimieren, oder er kann aus Zellen gereinigt werden, die so verändert worden sind, dass sie den CD40-Liganden exprimieren. Bezüglich einer ausführlichen Übersicht wird auf die Anwendung von rekombinanten Verfahren zur Herstellung von CD40-Liganden (Armitage, Nature, Bd. 357 (1992), S. 80–82; und Hollenbaugh et al., EMBO J., Bd. 11 (1992), S. 4313–4321, sowie auf die nachfolgenden

Beispiele verwiesen.

[0039] Beim CD40-Liganden, der im vorliegenden Verfahren verwendet wird, handelt es sich um eine membrangebundene Form des CD40-Liganden. Der hier verwendete Ausdruck "membrangebundener CD40-Ligand" bezieht sich auf einen CD40-Liganden, der an eine Lipid- oder Plasmamembran gebunden ist. Das Anbringen des CD40-Liganden an eine Membran kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Beispielsweise kann der CD40-Ligand an eine Membran unter Verwendung der natürlichen Transmembrandomäne des CD40-Liganden angebracht werden, da der CD40-Ligand ein natürlich auftretendes Transmembranprotein ist. Durch Isolieren des natürlich auftretenden CD40-Liganden aus Zellen, die in natürlicher Weise den CD40-Liganden exprimieren oder die so verändert worden sind, dass sie diesen exprimieren, wird der CD40-Ligand in membrangebundener Form erhalten. Der angereicherte oder gereinigte CD40-Ligand wird aus Zellen als eine Membranfraktion erhalten oder kann als ein solubilisiertes Molekül isoliert und mit Lipiden unter Bildung einer künstlichen Membran rekonstituiert werden.

[0040] Alternativ können der CD40-Ligand oder lösliche Derivate des CD40-Liganden durch Verwendung eines geeigneten Membranprotein-Linkers und eines Protein-Vernetzungsmittels oder einer GPI-Verknüpfung an einer Plasmamembran angebracht werden. Im allgemeinen sind das Konzept und die Verfahren zum Verankern eines Proteins an einer Membran aus dem Stand der Technik bekannt. Beispielsweise kann ein bekanntes Protein-Vernetzungsmittel zur Vernetzung des CD40-Liganden mit einer Lipidmembran verwendet werden, die integrale Membranproteine mit freiliegenden aktivierbaren Resten enthält. Ein Fachmann kann leicht eine von zahlreichen bekannten Membran-Verankerungstechniken anpassen, um den membrangebundenen CD40-Liganden zu erhalten.

[0041] Der hier verwendete Ausdruck "hohe Dichte" bezieht sich auf Membranen, die den CD40-Liganden in einer mindestens 10-fach größeren Dichte enthalten, als sie auf Zellen gefunden wird, die den CD40-Liganden natürlich exprimieren, wobei dieser Wert insbesondere 100-fach größer ist. Es wurde festgestellt, dass frühere Versuche zur Expression des CD40-Liganden in einem rekombinanten Wirt zur Bildung von CD40-Ligand in Dichten geführt hat, die ähnlich den Dichten sind, die an Zellen gefunden werden, die in natürlicher Weise CD40-Liganden exprimieren (beispielsweise gemäß den Angaben von Armitage et al., J. Immunology, Bd. 15 (1993), S. 3671–3680).

[0042] Eine Vielzahl von Verfahren kann zur Bestimmung der "Dichte" des CD40-Liganden herangezogen werden. Hierzu gehören (ohne Beschränkung hierauf) die Fluoreszenzmikroskopie, die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse, der Rezeptor/Ligand-Bindungstest und die Immunoreaktivität (vergl. beispielsweise Castle et al., J. Immunol., Bd. 151 (1993), S. 1777–1788).

[0043] Wie vorstehend erörtert, kann eine Vielzahl von Verfahren dazu herangezogen werden, membrangebundenen CD40-Liganden von hoher Dichte zu erhalten. Das erfindungsgemäß bevorzugte Verfahren besteht in der Expression des CD40-Liganden in gezüchteten Insektenzellen, die mit einem modifizierten Baculovirus-Vektor infiziert sind. Es wurde festgestellt, dass der CD40-Ligand leicht in Insektenzellkulturen als membrangebundene Form von hoher Dichte exprimiert werden kann. Der Fachmann kann leicht bekannte Baculovirus-Expressionssysteme anpassen, um den CD40-Liganden in membrangebundener Form von hoher Dichte zu erzeugen. Die nachstehenden Beispiele belegen die Verwendung von gezüchteten SF9 Zellen zur Erzeugung des hdmb-CD40-Liganden zur Verwendung in den hier beanspruchten Verfahren (vergl. **Fig.** 2).

[0044] Frühere Versuche mit proliferierenden B-Zellen in Gegenwart von natürlich isoliertem, membrangebundenem CD40-Liganden, membrangebundenem CD40-Liganden, der aus transfizierten Tierzellen erzeugt worden ist, oder rekombinant exprimierten, löslichen Derivaten des CD40-Liganden haben zu schlechten Ergebnissen geführt. Die Proliferation ist tendenziell mäßig und endet nach 1 bis 4 Replikationsrunden. Die vorliegende Erfindung führt zu Verbesserungen gegenüber der Verwendung früherer Formen des CD40-Liganden insofern, als starke Proliferationsreaktionen in einer Höhe von 250-fach nachgewiesen wurden. Die Gegenwart von Lymphokinen bei Verwendung des hdmb-CD40-Liganden führt zur Differenzierung der proliferierenden B-Zellen zu Antikörper erzeugenden Zellen.

[0045] Das vorliegende Verfahren kann in einem einstufigen Proliferationsverfahren oder in einem mehrstufigen Verfahren eingesetzt werden. Bei einem mehrstufigen Verfahren wird der hdmb-CD40-Ligand dem Kulturmedium während der Anfangsphasen der Züchtung zugesetzt. Die Anwesenheit des hdmb-CD40-Liganden wird aufrechterhalten, bis die Proliferationsrate abnimmt. Anschließend werden die Zellen durch Züchtung unter Bedingungen, bei denen hdmb-CD40-Ligand nicht vorhanden ist, in den Ruhezustand versetzt. Nach Einstellen des Ruhezustands können die Zellen restimuliert werden, um die Proliferation fortzusetzen, indem man den hdmb-CD40-Liganden und Cytokine wieder der Kultur zusetzt (vergl. **Fig.** 8). Der Mechanismus, der einem Proliferationsstadium im Anschluss an ein Ruhestadium unter Verwendung des hdmb-CD40-Liganden zugrunde liegt, ist unbekannt. Es wurde jedoch festgestellt, dass zahlreiche aktivierte B-Zellpo-

pulationen eine derartige Ruhephase benötigen, nachdem die Geschwindigkeit der anfänglichen Proliferation abgenommen hat. Ein Fachmann kann leicht die B-Zellproliferation überwachen und den hdmb-CD40-Liganden aus dem Kulturmedium entfernen, wenn die Geschwindigkeit der Proliferation der B-Zellen abnimmt.

[0046] Verschiedene Verfahren können zur Überwachung der Proliferation von B-Zellen herangezogen werden. Hierzu gehören (ohne Beschränkung hierauf) die Messung des Einbaus einer markierten Verbindung, wie tritiertes Thymidin, oder direkte Zell-Zähltechniken. Diese beiden Verfahren werden ausführlich in den folgenden Beispielen beschrieben.

[0047] Spezielle Zeitpunkte für ein mehrstufiges Proliferationsverfahren lassen sich vom Fachmann leicht unter Anwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren bestimmen. In den folgenden Beispielen bestand das angewandte Verfahren in einer 6-tägigen Züchtung von B-Zellen (eine isolierte Population von geringer Dichte) in Gegenwart von hdmb-CD40-Ligand (Proliferationsstadium). Nach 6-tägiger Züchtung wurde der hdmb-CD40-Ligand aus dem Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden weitere 6 Tage gefüttert (Ruhestadium). Nach der 6-tägigen Ruhephase, in der der hdmb-CD40-Ligand nicht vorhanden war, wurden die Zellen erneut in Gegenwart von hdmb-CD40-Ligand und von geeigneten Cytokinen gezüchtet (Reproliferationsstadium).

[0048] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beruht auf der Feststellung, dass Cytokine, Extrakte von ausgewählten Zellen, Mittel, die Oberflächenrezeptoren und Ig-Moleküle vernetzen, und/oder ausgewählte Feederzell-Populationen bei Zusatz zu B-Zellen, die unter Anwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren proliferieren oder eine Proliferation durchgemacht haben, die B-Zellen zur Differenzierung zu Antikörper erzeugenden Zellen stimulieren. Auf der Grundlage dieser Feststellung werden erfindungsgemäß Verfahren zur Differenzierung von proliferierenden B-Zellen, die den Schritt der Kultivierung von B-Zellen in Gegenwart des hdmb-CD40-Liganden und eins Cytokins, von Feederzellen oder eines Extrakts davon umfassen.

[0049] Der hier verwendete Ausdruck "Cytokine" bezieht sich auf die Klasse von Molekülen, von denen gezeigt worden ist, dass sie eine zelldifferenzierende und/oder wachstumsfördernde Aktivität besitzen. Cytokine lassen sich identifizieren und dem Kulturmedium in hochgereinigter Form zusetzen, beispielsweise als gereinigtes Interleukin-1, IL-2, IL-4, INF-α und dergl., oder sie können als Überstände oder Extrakte, die aus stimulierten Zellen, die Cytokine erzeugen, erhalten worden sind, zugesetzt werden. Erfindungsgemäß wurden Th2-Lymphokine zur Differenzierung von murinen Milz B-Zellen verwendet, während entweder Lymphokine, die durch anti-CD3-aktivierte T-Zellen sezerniert worden sind, oder eine Kombination von rekombinanten IL-2, IL-4, IL-6 und IL-10 die Differenzierung von hdmb-CD40L-stimulierten, humanen, peripheren Blut B-Zellen unterstützten. Speziell wurde für murine B-Zellen der Th2-Klon D10.G4.1 9 Stunden mit Concanavalin A stimuliert und die Kulturüberstände wurden an Mannose/Agarose absorbiert, 30 Minuten mit 100 000 g ultrazentrifugiert, steril filtriert und vor der Verwendung bei –80 °C gelagert (Th2 SN oder Th2-Überstand) (vergl. Hodgkin et al., J. Immunology, Bd. 145 (1990), S. 2025–2034). Der isolierte Th2-Überstand wurde sodann zur Stimulation der Differenzierung der proliferierenden murinen B-Zellen verwendet.

[0050] Zur Differenzierung von humanen, peripheren Blut B-Zellen wurde ein lymphokinhaltiger Überstand folgendermaßen hergestellt. Periphere, mononukleare Blutzellen, die nach Zentrifugation über Ficoll-Hypaque erhalten worden waren, wurden nacheinander an Platten einem "Panning" unterzogen, die über Nacht mit anti-CD14 (5 µg/ml), anti-CD14 und anti-CD19 (jeweils 2,5 µg/ml) und anti-CD8 (5 µg/ml) beschichtet worden waren, unterzogen. Das "Panning" erfolgte in ausgewogener Hank-Salzlösung, 5 % FBS, 10 mM HEPES, pH-Wert 7,3, 1 Stunde bei 4 °C. Nicht-anhaftende Zellen wurden gewaschen und in einer Menge von 4×10^6 Zellen/ml in warmem BCM (RPMI 1640, ergänzt mit 10 % FBS, 10 mM HEPES (pH-Wert 7,3), 2 mM L-Glutamin (GIBCO, Grand Island, NY), 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (GIBCO), 1 mM Natriumpyruvat, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 100 U/ml jeweils an Penicillin und Streptomycin (GIBCO)) resuspendiert. Für die anti-CD3-Stimulation wurden die Zellen auf Gewebekulturschalen gebracht, die 48 Stunden bei 37 °C mit 4 µg/ml anti-CD3 beschichtet worden waren. Zur Stimulation mit PHA/PMA wurden Zellen 2 Stunden bei 37 °C mit 2,5 µg/ml PHA und 10 ng/ml PMA inkubiert, gewaschen und 46 Stunden bei 37 °C in frischem, warmem BCM inkubiert. Nach Entfernen der Zellen durch Zentrifugation mit niedriger Drehzahl wurden die Überstände mit 100 000 × g zentrifugiert, durch eine 0,2 µM-Membran filtriert und in Aliquotanteilen bei –80 °C aufbewahrt.

[0051] Ferner können Cytokine, die von anderen Zelltypen einschließlich dendritischen Zellen, follikulären dendritischen Zellen und anderen Antigenen präsentierenden Zellen, in Gegenwart oder Abwesenheit eines spezifischen Antigens erzeugt worden sind, den Kulturen als Stimuli zugesetzt werden. Zusätzlich zum Th2- und anti-CD3-stimulierten Überstand, der in den Beispielen verwendet wurde, kann der Fachmann in den vorliegenden Differenzierungsverfahren leicht beliebige bekannte Cytokine einsetzen.

[0052] Zusätzlich zu spezifischen Cytokinen oder Cytokine enthaltenden Überständen können Feederschichten, zelluläre Extrakte, die aus anderen Zellen, die an der B-Zelldifferenzierung beteiligt sind, erhalten worden sind, und/oder Mittel, die B-Zelloberflächenmoleküle vernetzen, den proliferierenden B-Zellen zur Stimulierung der Differenzierung zugesetzt werden. Beispielsweise ist es bekannt, dass B-Zellen mit follikulären, dentritischen Zellen während der Reifung in Wechselwirkung treten. Membranextrakte, Kulturüberstände oder gereinigte Moleküle, die sich von follikulären dentritischen Zellen ableiten (auf die gleiche Weise erhalten, wie es vorstehend für Th2-Überstände beschrieben worden ist) oder eine Feederschicht von follikulären, dendritischen Zellen können zur Stimulation der Differenzierung der proliferierenden B-Zellen oder zur Verstärkung der Differenzierung, die durch die Verwendung anderer Cytokine, wie sie vorstehend beschrieben wurden, stimuliert werden, verwendet werden. Ferner können Mittel, wie Antikörper, die Oberflächenrezeptoren vernetzen, die Differenzierung der proliferierten und proliferierenden B-Zellen signalisieren (in einigen Fällen induzieren diese Mittel eine somatische Hypermutation in den CDRs der variablen Regionen der für den Antikörper kodierenden DNA innerhalb der B-Zelle). Von anti-IgD- oder anti-IgM-Antikörpern, die membrangebundene Ig-Moleküle an der B-Zelle vernetzen, wurde gezeigt, dass sie einen Klassenwechsel der sezernierten Antikörper stimulieren (wobei sie beispielsweise zur Erzeugung hoher Konzentrationen an IgA-Antikörpern führen).

[0053] Die Cytokine, Zellextrakte/Überstände oder Feederzellen, die zur Stimulation der Differenzierung verwendet werden, können den B-Zellen zu zahlreichen verschiedenen Zeitpunkten während der Züchtung zugesetzt werden. Beispielsweise können die Cytokine zu Züchtungsbeginn zugesetzt werden. Bei Anwendung eines derartigen Verfahrens beginnt die Antikörpererzeugung normalerweise nach 8 bis 10 Tagen (**Fig.** 6, 7, Fig. 10 und Fig. 13). Alternativ können Cytokine während der Ruhephase oder der Reproliferationsphase zugesetzt werden, wenn ein mehrstufiges Verfahren herangezogen wird. Der Vorteil einer mehrstufigen Vorgehensweise besteht darin, dass er die Proliferation einer anfänglichen kleinen B-Zellpopulation und/oder deren Selektion vor der Differenzierung ermöglicht.

[0054] Eine Vielzahl von Verfahren kann zur Überwachung der Differenzierung von B-Zellen herangezogen werden. Zu derartigen Verfahren gehören (ohne Beschränkung hierauf) die Prüfung der morphologischen Eigenschaften der proliferierenden Zellen, Tests, die die Anwesenheit von Antikörperprotein bestimmen, Tests auf Zelloberflächenmarker und Verfahren, die die Anwesenheit von Nucleinsäuresequenzen, die für Antikörper kodieren, bestimmen (**Fig.** 6, 7, Fig. 10, Fig. 13 und Fig. 14). Der Fachmann kann beliebige dieser Verfahren leicht an die Überwachung der Differenzierung von proliferierenden B-Zellen, die durch die hier beschriebenen Verfahren erhalten werden, anpassen.

[0055] Während der Differenzierung kann es bevorzugt sein, ausgewählte Individuen oder Subpopulationen der proliferierenden B-Zellen herauszuklonen, um klonale Zelllinien zu erhalten. Derartige Verfahren lassen sich besonders leicht unter Anwendung von aus dem Stand der Technik bekannten Zellausstrichtechniken durchführen (vergl. die Fig. 9, 12 und Fig. 15). Der Fachmann kann leicht derartige Klonierungsverfahren auf die proliferierenden und differenzierenden B-Zellen, die durch die hier beschriebenen Verfahren erzeugt werden, anwenden.

[0056] Eine dritte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beruht auf der Feststellung, dass die Differenzierung von proliferierenden B-Zellen partiell durch Zusatz eines Antigens zum Kulturmedium gesteuert werden kann. Speziell kann der prozentuale Anteil von B-Zellen, die einen für ein spezifisches Antigen selektiven Antikörper erzeugen, erhöht werden, indem man dem Kulturmedium während der Proliferationsphase, der Differenzierungsphase oder der Reproliferationsphase der hier beschriebenen Verfahren ein Antigen zusetzt.

[0057] Gemäß der hier verwendeten Terminologie handelt es sich bei einem Antigen um eine Verbindung, von der gezeigt worden ist oder es sich zeigen lässt, dass sie eine Antikörperreaktion stimuliert, wenn sie einem Säugetierwirt verabreicht wird. Antigene liegen in einer Vielzahl von Formen vor und umfassen (ohne Beschränkung hierauf) Proteine, Kohlenhydrate, synthetische Verbindungen und Vitaminderivate. Der Fachmann kann leicht bekannte Verfahren anwenden, um die Antigenizität einer speziellen Verbindung festzustellen.

[0058] Bei einer Anwendung des vorstehenden Verfahrens wird ein Antigen dem Kulturmedium zugesetzt, wenn das Cytokin (oder ein anderes Differenzierungsmittel) vorhanden ist. Beispielsweise wird bei Verfahren, bei denen das Cytokin während der anfänglichen Proliferation zugesetzt wird, das Antigen in diesem Stadium der Inkubation zugesetzt. Bei Verfahren, bei denen das Cytokin nach dem anfänglichen Proliferationsstadium zugesetzt wird, wird das Antigen in diesem Stadium zugegeben. Ferner kann der Fachmann leicht bekannte Verfahren anwenden, um die Antigenizität eines Antigens zu erhöhen sowie um zu gewährleisten, dass das Antigen in Kontakt mit den proliferierenden und differenzierenden B-Zellen kommt. Zu derartigen Verfahren können die Kupplung des Antigens an einen Protein- oder Kohlenhydratträger zur Verstärkung von Eigenschaften, wie Löslichkeit und Antigenizität, oder die Kupplung des Antigens an die Oberfläche einer Membran oder ei-

ner Kunststoff-Kulturvertiefung, um selektiv differenzierende B-Zellen exprimierende Oberflächenantikörper an das gekuppelte Antigen anzuheften ("Panning"), gehören.

[0059] Bei einem Beispiel der Antigenanwendung wird das Antigen an die Membran, die den hdmb-CD40-Liganden enthält, gekuppelt. Die Kupplung eines Antigens an den hdmb-CD40-Liganden bewirkt eine bevorzugte Zielrichtung des hdmb-CD40-Liganden auf B-Zellen, die das bestimmte Antigen erkennen. Bei einem weiteren Beispiel werden das Antigen oder der Antigen/hdmb-CD40-Ligand als ein Dextran-Copolymeres bereitgestellt. Eine Copolymerisation mit Dextran stellt ein bekanntes Verfahren zur Erhöhung der Epitopdichte eines Antigens dar, wodurch die Anzahl und der Grad der verfügbaren B-Zellkontakte erhöht werden.

[0060] Obgleich festgestellt wurde, dass eine Antigenstimulation den prozentualen Anteil an B-Zellen, die unter Erzeugung von gegen das Antigen gerichteten Antikörpern differenzieren, gilt eine derartige Bevorzugung nicht vollständig über die gesamte Population von proliferierenden B-Zellen hinweg. Daher muss der Fachmann bekannte Klonierungs- oder Panning-Techniken anwenden, um spezielle Klonierungslinien von differenzierten B-Zellen zu isolieren, die gegen das zugeführte Antigen gerichtete Antikörper erzeugen.

[0061] Die vorstehenden Verfahren zur Proliferation und Differenzierung können für eine Vielzahl von Aufgaben und Anwendungsmöglichkeiten eingesetzt werden. Der Fachmann erkennt leicht den Wert der Tatsache, dass es möglich ist, eine große Anzahl von B-Zellen zu proliferieren und zu erhalten, und insbesondere von humanen B-Zellen. Speziell entfällt bei derartigen Verfahren die Notwendigkeit der Immortalisierung von B-Zelllinien, um verwendbare/bearbeitbare Mengen von Materialien, die sich von B-Zellen ableiten, zu erhalten. Von B-Zellen abgeleitete Materialien gelten als wertvoll bei der Entwicklung von pharmazeutischen Verbindungen auf Antikörperbasis. Vor der Erfindung der Anmelder war die auf humane B-Zellen gerichtete Forschung eingeschränkt, was auf die Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials zurückzuführen war. Erfindungsgemäß werden nunmehr für solche Aufgaben Vorräte an expandierten B-Zellen bereitgestellt.

[0062] Proliferierte B-Zellen, die differenziert sind oder nicht, können als Quelle für mRNA dienen, die für eine Gesamtheit oder einen Teil eines Antikörpermoleküls kodiert. Aufgrund der beschränkten Menge einer für einen Antikörper kodierenden mRNA, die von einer B-Zelle gebildet wird und aufgrund der polyklonalen Natur und der begrenzten Klonzahl von B-Zellen, die innerhalb eines Säugetierwirts gefunden wird, ist es schwierig, ausreichende Mengen einer mRNA, die für den gewünschten Antikörper kodiert, aus einzelnen B-Zellen zum Einsatz in rekombinanten Antikörper-Produktionstechniken zu erhalten. Durch Bereitstellung eines Verfahrens zum Proliferieren und Differenzieren von B-Zellen stellt die vorliegende Erfindung eine Quelle für Ausgangsmaterial bereit, das ein Fachmann zur Gewinnung von mRNA, die für einen Antikörper kodiert, verwenden kann.

[0063] Ferner kann ein Fachmann B-Zellen identifizieren, die zur weiteren Verwendung mit spezifischen Antigenen reagieren. Bevor man sich mit der gentechnischen Antikörperbearbeitung befasst, ist es zu bevorzugen, die Spezifität (welches Antigen erkannt wird) des durch eine B-Zelle oder einen B-Zellklon erzeugten Antikörpers zu bestimmen. Obgleich PCR-Verfahren die Isolierung der Nucleotidsequenz, die für einen Antikörper kodiert, aus nur einer einzigen Zelle ermöglichen, sind Zellmassen von mindestens 100 Zellen erforderlich, um die Natur eines sezernierten Antikörpers zu isolieren und zu charakterisieren. Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren zur Gewinnung eines derartigen Materials bereit.

[0064] Zusätzlich zur in vitro-Verwendung wird in der Literatur ausgeführt, dass ein CD40-Ligand ein Mittel zur Proliferation und Aktivierung von B-Zellen innerhalb eines Säugetierwirts bereitstellt. Im allgemeinen können pathologische Zustände, die zu einer Unterdrückung der B-Zellproliferation und -aktivierung führen, unter Verwendung des hier beschriebenen hdmb-CD40-Liganden behandelt werden. Durch Bereitstellen eines hdmb-CD40-Liganden bei einem Säuger können B-Zellpopulationen innerhalb eines Wirts auf ein Niveau proliferiert werden, das wesentlich über dem Niveau liegt, das bei bisher produzierten Formen eines CD40-Liganden gefunden wird. Ferner kann der hdmb-CD40-Ligand zur in vitro-Proliferation und/oder -Differenzierung von B-Zellen verwendet werden, die dann wieder dem Wirt, dem sie entnommen worden sind oder einem anderen verträglichen Wirt zugeführt werden können. Ein derartiges Verfahren ermöglicht die Proliferation von B-Zellen außerhalb des Wirts, wodurch die Gefahr von negativen Einflüssen von in vivo-Therapeutika verringert wird.

[0065] Bei der Versorgung eines Patienten mit dem hdmb-Liganden varriert die Dosierung des verabreichten Mittels in Abhängigkeit von Faktoren, wie Alter, Gewicht, Größe, Geschlecht, Allgmeinzustand und medizinische Vorgeschichte des Patienten und dergl. Im allgemeinen ist es erstrebenswert, den Empfänger mit einer Dosierung des Mittels im Bereich von etwa 1 pg/kg bis 10 mg/kg (Körpergewicht des Patienten) zu versorgen, obgleich auch niedrigere und höhere Dosen verabreicht werden können.

[0066] Die therapeutisch wirksame Dosis kann bei

Verwendung der vorstehend beschriebenen Zusammensetzung in Kombination mit einem anderen Mittel, das eine immunostimulatorische Aktivität besitzt (z. B. II-4, IL-14, ein spezifisches Antigen oder ein anti-Immunoglobulin-Antikörper), gesenkt werden. Die hier verwendete Ausdrucksweise, dass zwei oder mehr Verbindungen "in Kombination" miteinander zu verabreichen sind, bezieht sich auf die Fälle, dass (1) die physiologischen Wirkungen der einzelnen Verbindungen oder (2) die Serumkonzentrationen der einzelnen Verbindungen gleichzeitig gemessen werden können.

[0067] Die hier beschriebenen Mittel sollen bei den Empfängern in einer ausreichenden Menge bereitgestellt werden, um die Anzahl der B-Zellen im Wirt zu erhöhen. Die Verabreichung der hier beschriebenen Mittel kann zu prophylaktischen oder therapeutischen Zwecken erfolgen. Bei prophylaktischer Verwendung werden die Mittel vor einem etwaigen Absinken der Anzahl an B-Zellen oder Antikörper-Serumspiegel im Wirt bereitgestellt. Die prophylaktische Verabreichung des oder der Mittel dient dazu, eine etwaige anschließende Verringerung der B-Zellzahl zu verhindern oder abzuschwächen. Bei therapeutischer Anwendung werden das oder die Mittel beim Einsetzen (oder kurz danach) einer Verringerung der Anzahl an B-Zellen oder Antikörper, die in einer Blutprobe vorhanden sind, verabreicht. Die therapeutische Verabreichung der Verbindungen) dient dazu, jede tatsächliche Verringerung der B-Zellzahl oder Antikörperspiegel abzuschwächen.

[0068] Die hier beschriebenen Mittel werden einem Säuger in einer pharmazeutisch verträglichen Form und in einer therapeutisch wirksamen Konzentration verabreicht. Eine Zusammensetzung wird als "pharmakologisch verträglich" bezeichnet, wenn ihre Verabreichung vom Empfänger toleriert werden kann. Von der Verabreichung einer "therapeutisch wirksamen Menge" eines derartigen Mittels spricht man, wenn die verabreichte Menge physiologisch signifikant ist. Ein Mittel ist physiologisch signifikant, wenn seine Anwesenheit zu einer nachweisbaren Veränderung der Physiologie eines Patienten führt.

[0069] Die hier beschriebenen Mittel können nach bekannten Verfahren zur Herstellung von pharmazeutisch wertvollen Zusammensetzungen zubereitet werden, wobei diese Materialien oder ihre funktionellen Derivate im Gemisch mit einem pharmazeutisch verträglichen Trägervehikel vereinigt werden. Geeignete Vehikel und ihre Zubereitung, einschließlich anderer humaner Proteine, z. B. Humanserumalbumin, werden beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Sciences (16. Auflg., A. Osol, Hrsg., Mack, Easton, PA (1980)) beschrieben. Um eine pharmazeutisch verträgliche Zusammensetzung zu bilden, die sich für eine wirksame Verabreichung eignet, enthalten derartige Zusammensetzungen eine wirksame Menge von einem oder mehreren der erfindungsgemäßen Mittel zusammen mit einer geeigneten Menge eines Trägervehikels.

[0070] Weitere pharmazeutische Verfahren können zur Steuerung der Wirkungsdauer herangezogen werden. Präparate mit kontrollierter Freisetzung lassen sich unter Vewrendung von Polymeren erhalten, um eines oder mehrere der hier beschriebenen Mittel zu komplexieren oder absorbieren. Die kontrollierte Abgabe kann vorgenommen werden, indem man entsprechende Makromoleküle (z. B. Polyester, Polyaminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Ethylenvinylacetat, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose oder Protaminsulfat) und die Konzentration von Makromolekülen sowie die Verfahren zur Einverleibung, um die Freisetzung zu kontrollieren, auswählt. Ein weiteres mögliches Verfahren, die Wirkungsdauer durch Präparate mit kontrollierter Freisetzung zu steuern, besteht in der Einverleibung der hier beschriebenen Mittel in Teilchen eines polymeren Materials, wie Polyester, Polyaminosäuren, Hydrogele, Poly-(milchsäure) oder Ethylen-Vinylacetat-Copolymere. Alternativ ist es anstelle einer Einverleibung dieser Mittel in polymere Teilchen möglich, diese Materialien in Mikrokapseln einzuschließen, die beispielsweise durch Koazervierungstechniken oder durch Grenzflächenpolymerisation hergestellt worden sind, z. B. in Hydroxymethylcellulose- oder Gelatine-Mikrokapseln und Poly-(methylmethacrylat)-Mikrokapseln, oder in kolloidalen Arzneistoff-Abgabesystemen, z. B. Liposomen, Albumin-Mikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanopartikeln und Nanokapseln oder in Makroemulsionen. Derartige Techniken sind in Remington's Pharmaceutical Sciences (16. Auflg., A. Osol Hrsg., Mack, Easton, PA (1980) beschrieben.

[0071] Im Anschluss an diese allgemeine Beschreibung der Erfindung ergibt sich ein leichteres Verständnis unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele, die der Erläuterung dienen und den Schutzumfang der Erfindung nicht beschränken sollen, sofern nichts anderes angegeben ist.

Beispiele

Beispiel 1

Identifikation von Faktoren, die bei der B-Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind.

A. Trennung von Zellkontakt- und Lymphokin-Signalen

[0072] Obgleich die Rolle von Lymphokinen anscheinend in einer Induktion der B-Zelldifferenzierung und nicht in einer Einleitung von Aktivierungsereignissen besteht, erscheinen sowohl der Zellkontakt als auch Lymphokine für die Erzeugung einer Antikörperreaktion als wesentlich. Ob Zellkontakt- und

Lymphokin-Signale charakteristische Wirkungen auf ruhende B-Zellen ausüben, bedurfte noch einer klaren Bewertung. Ferner war die Identität der Lymphokine, die die B-Zellaktivierung, Differenzierung und den Isotyp-Wechsel stützten, nicht klar. Da der Th2-Zellklon D10 sämtliche erforderlichen Kontakt- und Lymphokinabhängigen Signale an ruhende B-Zellen liefern konnte, wurde dieser antigenspezifische Klon für anfängliche Untersuchungen und die Präparation von Plasmamembranen ausgewählt. Eine antigenunabhängige Aktivierung von D10-Zellen wurde durch Inkubation von Zellen entweder mit dem Mitogen Concanavalin A (Con A) oder mit anti-CD3-Antikörpern, die an Kunststoffschalen adsorbiert waren, erreicht. Nach der Ernte wurden die Zellen zur Herstellung von Membranvesikeln, die in Bezug auf Plasmamembranen angereichert waren, gemäß den Angaben von A. A. Brian, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 85 (1988), S. 564–568), verwendet. Der Kulturüberstand wurde als Quelle für Th2-Lymphokine verwendet, wobei eine Ultrazentrifugation zur Entfernung etwaiger Membrankomponenten und eine Absorption von etwaigem verbleibendem Con A durchgeführt wurde. Weitere Untersuchungen bedienten sich ähnlicher Verfahren zur Herstellung von in Bezug auf Plasmamembran angereicherten Fraktionen (Noelle et al., J. Immunol., Bd. 146 (1991), S. 1118–1124; Sekita et al., Eur. J. Immunol., Bd. 18 (1988), S. 1405–1410).

1. Rolle des Zellkontakts

[0073] Aus aktivierten D10-Th-Zellen präparierte Membranen induzierten eine starke Proliferation von kleinen ruhenden B-Zellen. Die stimulatorische Aktivität war 3 Stunden nach Th-Zellaktivierung mit Con A nachweisbar und erreichte nach 6 Stunden ein Maximum und fiel dann auf niedrige Werte ab. Diese Kinetik folgte eng der Kinetik der Lymphokin-Erzeugung durch die gleichen Zellen, was auf einen gemeinsamen regulatorischen Weg sowohl für Zelloberflächen- als auch sezernierte B-Zell-Stimulationskomponenten schließen lässt (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034). Ein weiterer Hinweis auf einen gemeinsamen Signalgebungsweg bestand darin, dass der Immunophilinbindende, immunosuppressive Arzneistoff Cyclosporin A (Bram et al., Molec. Cell. Biol., Bd. 13 (1993), S. 4760–4769) sowohl die Lymphokin-Sekretion als auch die Induktion der B-Zellen-Stimulationsaktivität hemmte (P. D. Hodgkin und M. R. Kehry, Advances in Molec. Cell. Immunol., Bd. IA, S. 127–160, Greenwich, CT: JAI Press, Inc. (1993)). Ähnlich den frühen Ergebnissen von Stallcup et al. über die nicht-spezifischen Hemmeigenschaften von Plasmamembranen (Stallcup et al., Cell. Immunol., Bd. 89 (1984), S. 144–150) erzeugten hohe Dosen von Membranen aus aktivierten Th-Zellen eine nicht-spezifische Hemmwirkung auf die B-Zellproliferation (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034).

[0074] Ein auffallendes Merkmal der B-Zellaktivierung durch Th-Membranen bestand darin, dass sie antigenunabhängig und MHC-unbeschränkt war. In Einklang mit diesen Beobachtungen war die Th-Membranstimulation polyklonal und induzierte bei bis zu 70 % der kleinen ruhenden B-Zellen einen Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus innerhalb von 48 Stunden der Stimulation (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034).

[0075] Ferner handelte es sich bei der induzierten Aktivität offensichtlich um ein nicht beschriebenes Molekül, da es nicht durch Antikörper gegen in Frage stehende Moleküle, z. B. Klasse II-MHC, T-Zellrezeptor, CD4, LFA-1, Thy-1 oder CD28, blockiert wurde. Somit schien das Kontaktsignal in Abwesenheit von Lymphokinen sämtliche erforderlichen Signale für die Induktion der polyklonalen B-Zellen-DNA-Synthese zu liefern.

[0076] B-Zellen, die durch aktivierte Th-Zellmembranen stimuliert waren, sezernierten kein Immunoglobulin, wenn nicht der Lymphokin enthaltende Überstand von D10-Zellen der Kultur zugesetzt wurde. Bemerkenswerterweise glichen die Mengen der erzeugten Hauptimmunoglobulin-Isotypen (IgM, IgG1 und IgE) den Mengen, die durch B-Zellen, die direkt durch intakte D10-Zellen stimuliert worden waren, erzeugt wurden. Somit schien die antigenunabhängige Aktivierung von B-Zellen durch Th-Membranen und Lymphokine sämtliche Signale zu liefern, die für die Induktion der B-Zellproliferation, den Immunoglobulin-Klassenwechsel und die Differenzierung zur Immunoglobulin-Sekretion erforderlich waren (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034; Noelle et al., J. Immunol., Bd. 146 (1991), S. 1118–1124).

2. Rolle von Lymphokinen

[0077] Die Zellklone lassen sich aufgrund ihres Lymphokin-Sekretionsprofils im Anschluss an die Aktivierung einteilen (Mosmann & Coffman, Annu. Rev. Immunol., Bd. 7 (1989), S. 145–173). Die Th1 T-Zellen sezernieren in besonderer Weise IL-2 und IFN-γ und sind im allgemeinen schlechte Stimulatoren der in vitro-B-Zellen-Immunoglobulinsekretion. Th2-Zellen sezernieren IL-4 und IL-5 und induzieren eine starke Immunoglobulinsekretion aus B-Zellen. Die verschiedenen Fähigkeiten zur Induktion der Immunoglobulinsekretion könnten entweder auf Unterschiede in den sezernierten Lymphokinen oder auf eine Behinderung der Th1-Zellen zur Erzeugung geeigneter stimulatorischer Zelloberflächenliganden zurückzuführen sein. Um diese Möglichkeiten zu testen, wurden Membranen aus sechs verschieden aktivierten Th1-Zellklonen hergestellt. Sie stimulierten jeweils eine starke B-Zellen-Proliferation und wie bei Th2-Membranen induzierten die Th1-Membranen allein keine Immunoglobulinsekretion (Hodgkin et al.,

J. Immunol., Bd. 147 (1991), S. 3696–3702). Wenn Überstände von aktivierten Th2-Zellen zu Th1-Membranen gegeben wurden, waren die durch B-Zellen sezernierten Immunoglobulin-Isotopen identisch mit denen, die im Anschluss an eine Aktivierung mit Th2-Membranen und Th2-Lymphokinen sezerniert wurden. Ferner waren Lymphokin enthaltende Überstände von jedem der Th1-Zellklone nicht befähigt, eine Immunoglobulinsekretion aus B-Zellen zu induzieren, die mit Membranen stimuliert worden waren, die entweder aus Th1- oder Th2-Zellen hergestellt worden waren (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 147 (1991), S. 3696–3702). Daher hat es den Anschein, dass das Lymphokin-Repertoire von Th1-Zellen und nicht die Unfähigkeit zur Bereitstellung von kontaktabhängigen Signalen dafür verantwortlich ist, dass Th1-Zellen in vitro schlechte B-Zellstimulatoren sind.

[0078] Die Th2-Lymphokine IL-4 und IL-5 spielten beide eine Rolle bei der Erzielung der Differenzierung von Membran-stimulierten B-Zellen zur Immunoglobulin-Sekretion.

[0079] Die Kombination von rekombinantem IL-4 und IL-5 reproduzierte die Fähigkeit von Th2-Überständen zur Induktion der IgM-, IgG1- und IgE-Synthese, und anti-IL-4-Antikörper verhinderten vollständig die Immunoglobulinsekretion (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034; Noelle et al., J. Immunol., Bd. 146 (1991), S. 1118–1124 (unveröffentlichte Ergebnisse)). Die Cytokine, die für die humane B-Zellproliferation verwendet werden, können sich von den Cytokinen unterscheiden, die für die murine Zelldifferenzierung eingesetzt werden. Eine ausführlichere Untersuchung der Kombination von IL-4 und IL-5 ergab, dass der Einfluss von jedem dieser Lymphokine recht kompliziert war. IL-4 allein verstärkte die B-Zellproliferation, die durch Th-Zellmembranen induziert wird (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034). IL-4 war für den Eintritt von B-Zellen in die S-Phase des Zellzyklus nicht wesentlich, erhöhte aber die Empfindlichkeit von B-Zellen auf den Th-Membran-Stimulus um etwa das 10-fache. Im Gegensatz dazu besaßen andere Lymphokine, einschließlich IL-5, keinen Einfluss auf die Th-Membran-induzierte Proliferation. IL-4 allein konnte ferner Membran-stimulierte B-Zellen zur Induktion der Sekretion von Immunoglobulin veranlassen (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034). Es bestand jedoch eine ausgeprägte Dosis-Wirkungs-Disparität; die Verstärkung der B-Zellproliferation erforderte 100-fach weniger Il-4 als die Induktion der Immunoglobulinsekretion. Der Einfluss von IL-5 schien die Fähigkeit von IL-4 zur Induktion der B-Zelldifferenzierung zur Immunoglobulinsekretion zu verstärken und zeigte die größte Wirkung bei niedrigen IL-4-Konzentrationen. Ferner ist es klar, dass die Unfähigkeit von IL-4 allein, Th1-Membran-stimulierte B-Zellen zur Sekretion von Immunoglobulin zu veranlassen (Noelle et al., J. Immunol., Bd. 146 (1991), S. 1118–1124; Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 147 (1991), S. 3696–3702) sowohl durch diese Dosis-Wirkungs-Disparität als auch durch die Anwesenheit von restlichem IFN-γ in Th1-Membranvesikeln erklärbar ist, da durch Th1-Membranen und IL-4 stimulierte B-Zellen in Gegenwart von anti-IFN-γ große Mengen an Immunoglobulin synthetisieren (unveröffentlichte Beobachtungen).

[0080] Die Fähigkeit des Th-Membransystems einzelne Ereignisse der B-Zellaktivierung zu trennen, ermöglichte es uns festzustellen, wann Lymphokine zur Induktion der Immunoglobulinsekretion erforderlich waren. Durch Initiieren von Kulturen mit Th-Membranen und durch Zugabe oder Entfernen von D10-Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten stellten wir fest, dass Lymphokine in kritischer Weise während eines Zeitfensters erforderlich waren, das eng der Periode der B-Zellproliferation entsprach (Hodgkin et al., Eur. J. Immunol., Bd. 24 (1994), S. 239–246). Diese Experimente zeigten, dass die von Lymphokin abhängige Festlegung zur Differenzierung zu einer Immunoglobulinsezernierenden Zelle vor der ersten Runde der Zellteilung erfolgte. Ferner war die Wahrscheinlichkeit von Zellen zur Differenzierung zur Sekretion von IgE um so größer, je länger die Zellen den Lymphokinen während der Proliferation ausgesetzt waren. Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf zeigten, dass IgM-sezernierende Zellen zuerst in Kulturen am dritten Tag auftraten und den IgG1-sezernierenden Zellen um 24 Stunden vorausgingen. IgE-sezernierende Zellen traten am 5. Tag auf und nahmen zahlenmäßig mit der Abnahme der Anzahl der IgM-sezernierenden Zellen zu.

B. Architektur der B-Zellaktivierung durch Th-Zellmembranen

[0081] Zahlreiche Merkmale des Mechanismus, nach dem Moleküle B-Zellen aktivieren, wurden durch Untersuchungen charakterisiert, die ursprünglich dafür vorgesehen waren, biochemisch Th-Zelloberflächenmoleküle in Membranvesikeln zu isolieren und zu rekonstituieren. Ursprünglich wurde gezeigt, dass eine Detergens-Solubilisierung von Th-Membranen die Fähigkeit dieser Membranen zur Aktivierung von ruhenden B-Zellen beseitigt. Jedoch konnte eine lösliche Fraktion dazu verwendet werden, mit der Fähigkeit von intakten Th-Membranen zur Stimulation der B-Zellproliferation zu konkurrieren (M. R. K., unveröffentlichte Feststellungen). Da ein Waschen von Th-Membranen mit 3M Salzlösungen keinen Einfluss auf die Aktivität hatte (M. R. K., unveröffentlichte Ergebnisse), schienen die B-Zellen-aktivierenden Moleküle integrale Membranproteine zu sein.

[0082] Der physikalische Charakter von aktiven Th-Membranvesikeln wurde geprüft, indem man die Membranaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten

während der Präparation und nach einer kurzen Ultraschallbehandlung testete. Parallel mit den biologischen Tests wurde eine Transmissionselektronenmikroskopie an jedem Membranpräparat durchgeführt (Kehry et al., "Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation IV": Cellular Communications, Plenum Press, New York (1992), S. 139–148). Es wurde festgestellt, dass Membranvesikel, die frisch hergestellt und auf einem Saccharosekissen zentrifugiert worden waren, wenig Aktivität enthielten und großenteils vereinzelt und nicht-aggregiert waren. Nach Ultrazentrifugation zu einem Pellet und nach Resuspension wiesen diese Vesikel eine maximale Aktivität in Bezug auf eine Stimulation der B-Zellproliferation auf und bestanden aus zahlreichen, äußerst großen Aggregaten. Gleichermaßen verringerte eine Ultraschallbehandlung von aktiven Membranvesikeln ihre Aktivität und führte zur Bildung von kleinen, nicht aggregierten Vesikeln. Eine Ultrazentrifugation von der Ultraschallbehandlung unterzogenen Vesikeln stellte die vollständige Aktivität wieder her und erzeugte größere Aggregate (Kehry et al., "Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation IV": Cellular Communications, Plenum Press, New York (1992), S. 139–148). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Th-Membranvesikel mit einer maximalen B-Zellstimulationsaktivität tatsächlich Vesikelaggregate mit der Fähigkeit zur weitgehenden Vernetzung der B-Zelloberfläche waren.

[0083] Die Bindung und das Schicksal der Th-Membranvesikel in Kulturen mit ruhenden B-Zellen wurden ebenfalls geprüft. B-Zellen konnten durch Färbung mit anti-B220-Antikörper sichtbar gemacht werden, und da anti-CD4 die Fähigkeit der Th-Membranen zur Aktivierung von B-Zellen nicht blockierte (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034), konnte anti-CD4 zur Sichtbarmachung von Th-Membranvesikeln, die an B-Zellen gebunden waren, verwendet werden. Die weitgehend aggregierten Th-Membranen konnten durch eine 24-stündige Kultur an B-Zellen gebunden werden und die Aggregation der B-Zellen wurde durch eine 72-stündige Kultur in maximaler Weise induziert. Obgleich im Verlauf von 4 Tagen (zu diesem Zeitpunkt trat eine maximale B-Zellproliferation auf) die Th-Membranvesikel desaggregierten, wurde ein Kontakt zwischen Th-Membranen und den B-Zellen aufrechterhalten und es wurde keine Aufnahme oder Bedeckung von Membranvesikeln beobachtet (Kehry et al., "Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation IV": Cellular Communications, Plenum Press, New York (1992), S. 139–148).

[0084] Ferner wurde festgestellt, dass durch Waschen von mit Th-Membranen stimulierten B-Zellen mit eiskaltem Pufer mit einem Gehalt an Chelatbildnern für zweiwertige Metalle die funktionelle B-Zellstimulation gestoppt werden konnte. Dies wurde herangezogen, um die Länge der Th-Membran-B-Zellen-Kontaktzeit festzustellen, die für die Induktion der B-Zellproliferation erforderlich war. Th-Membranen wurden nach verschiedenen Züchtungszeiten gewaschen. Es wurde festgestellt, dass, obgleich ein Kontakt früh erfolgte, eine längere Kontaktperiode (24–36 Stunden) zwischen B-Zellen und Th-Membranen erforderlich war, um ein maximales B-Zellwachstum zu induzieren. Dies lässt darauf schließen, dass ruhende B-Zellen eine kontinuierliche Signalgebung während dieser Zeitspanne benötigen, um eine Induktion der DNA-Synthese zu erreichen (Kehry et al., "Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation IV": Cellular Communications, Plenum Press, New York (1992), S. 139–148). Somit benötigten B-Zellen aktivierende Moleküle zur umfangreichen Vernetzung der B-Zelloberfläche und zur Bereitstellung von funktionellen Signalen mindestens 24 Stunden, um ruhende B-Zellen zur Proliferation anzutreiben.

C. Identität eines Rezeptor-Liganden-Paares

[0085] Eine anfängliche Charakterisierung der B-Zellen aktivierenden Moleküle, die bei der Abgabe des Kontaktsignals an ruhende B-Zellen beteiligt sind, ergab sich aus biochemischen Untersuchungen über aktive Th-Zellmembranen (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034). Unter Anwendung zahlreicher Wasch-, Proteolyse- und Detergenssolubilisierungstechniken wurde festgestellt, dass B-Zellen aktivierende Moleküle integrale Membranproteine darstellen, die für ihre Expression neue m-RNA und eine neue Proteinsynthese benötigen. In jeglicher Hinsicht handelt es sich bei B-Zellen aktivierenden Molekülen um Lymphokin-artige Komponenten der aktivierten Th-Zellmembran (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034): sie wurden de novo nach Th-Zellaktivierung synthetisiert; ihre Synthese durch aktivierte Th-Zellen war rasch und vorübergehend; und sie übten ihre Einflüsse auf andere Zelltypen in einer nicht-verwandten Art und Weise aus. In einem ersten Schritt zur Identifizierung der B-Zellen aktivierenden Moleküle isolierten Lederman et al. einen Antikörper gegen ein Th-zellspezifisches Molekül, das alle vorstehenden Eigenschaften aufwies (Lederman et al., J. Exp. Med., Bd. 175 (1992), S. 1091–1101). Eine gleichzeitige Herangehensweise zog mögliche Kandidaten für einen konstitutiv exprimierten Rezeptor für B-Zellen aktivierende Moleküle auf der Oberfläche von ruhenden B-Zellen in Betracht. Mehrere Beweisketten ließen darauf schließen, dass das CD40-Molekül ein mutmaßlicher B-Zellrezeptor für die Aktivierung von B-Zellen war. Eine Stimulation von humanen B-Zellen durch Antikörper gegen CD40 in Gegenwart von Lymphokinen schien zahlreiche Merkmale der Th-abhängigen B-Zellaktivierung, -proliferation und -differenzierung zu reproduzieren (Jabara et al., J. Exp. Med., Bd. 172 (1990), S. 1861–1864; Rousset et al., J. Exp. Med.,

Bd. 173 (1991), S. 705–710; Zhang et al., J. Immunol., Bd. 146 (1991), S. 1836–1842; Banchereau et al., Science, Bd. 251 (1991), S. 70–72). CD40 gehört zu der TNF-Rezeptorfamilie, deren Mitglieder durch wiederholte, Cys-reiche, extrazelluläre Domänen gekennzeichnet sind. Aufgrund von funktioneller Homologie zum TNF-Rezeptor wurde eine Suche nach einem löslichen Liganden für CD40 unternommen (E. A. Clark, Tiss. Antigens, Bd. 35 (1990), S. 33–36). Jedoch machte es die Aktivität von anti-CD40-Antikörper und die Fähigkeit dieser Antikörper, die an Fc-Rezeptor exprimierenden L-Zellen immobilisiert waren, zur Induktion eines Langzeitwachstums von humanen B-Zellen (Banchereau et al., Science, Bd. 251 (1991), S. 70–72 möglich, dass ein Ligand für CD40 membrangebunden sein konnte.

[0086] Mehrere Laboratorien erzeugten eine lösliche Form von CD40, die die extrazelluläre Domäne von humanem CD40 mit dem Fc-Bereich von humanem IgG1 verknüpfte (Fanslow et al., J. Immunol., Bd. 149 (1992), S. 655–660; Castle et al., J. Immunol. Bd. 151 (1993), S. 1777–1788). Dieses Fusionsprotein war zu einer Blockade der Th-zellabhängigen B-Zellaktivierung befähigt (Castle et al., J. Immunol., Bd. 151 (1993), S. 1777–1788; Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 89 (1992), S. 6550–6554) und wurde zur Identifizierung und Klonierung eines Liganden für CD40 verwendet (Armitage et al., Nature, Bd. 357 (1992), S. 80–82). Der CD40-Ligand wurde als ein Glycoprotein mit einem MG von 33 000–35 000 identifiziert, das nicht kovalent mit anderen Proteinen assoziiert war und durch aktivierte T-Zellen exprimiert wurde. Wenn der rekombinante CD40-Ligand an der Oberfläche von Fibroblasten exprimiert wurde, war er zur Stimulation der B-Zellproliferation befähigt, wenngleich auch in relativ niederen Konzentrationen (Armitage et al., Nature, Bd. 357 (1992), S. 80–82). Gleichzeitig wurden Antikörper erzeugt, die sowohl humane (Lederman et al., J. Exp. Med., Bd. 175 (1992), S. 1091–1101) als auch murine (Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 89 (1992), S. 6550–6554) B-Zellen aktivierende Moleküle erkannten. Diese Antikörper wiesen die Fähigkeit zur Blockade der Th-zellabhängigen B-Zellaktivierungsereignisse auf und es wurde gezeigt, dass sie den Liganden für CD40 erkennen.

[0087] Der CD40-Ligand weist sämtliche Eigenschaften von B-Zellen aktivierenden Molekülen und eines membranassoziierten Lymphokins auf (Farrah & Smith, Nature, Bd. 358 (1992), S. 26). Das auffallendste Strukturmerkmal des CD40-Liganden liegt in seiner Homologie zu TNF-α und TNF-β (Farrah & Smith, Nature, Bd. 358 (1992), S. 26; Smith, Cell, Bd. 76 (1994), S. 959–962) und in seiner mutmaßlichen Orientierung als ein Membranglycoprotein vom Typ 2. Es wurde festgestellt, dass die Regulierung der Expression des CD40-Ligandengens in Th-Zellklonen ähnlich wie bei der IL-2-Genregulation ist (Castle et al., J. Immunol., Bd. 151 (1993), S. 1777–1788), was erneut darauf schließen lässt, dass der CD40-Ligand ein Mitglied einer neuen Klasse von membranassoziierten Lymphokinen ist. Dies wird durch die kürzlich erfolgte Klonierung von verwandten Zelloberflächenliganden für zwei weitere Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie gestützt, nämlich CD27 (Goodwin et al., Cell, Bd. 73 (1993), S. 447–456) und CD30 (Smith et al., Cell, Bd. 73 (1993), S. 1349–1360). Die kritische Rolle des CD40-Liganden bei der Th-zellabhängigen B-Zellaktivierung wurde durch Korrelation bei einer Immunmangelkrankheit, dem X-verknüpften Ultra-IgM-Syndrom, mit einer mangelnden Expression von funktionellen CD40-Liganden an Th-Zellen nachgewiesen. Der Defekt ergibt sich aus einer Vielzahl von Mutationen im CD40-Ligandengen (Allen et al., Science, Bd. 259 (1993), S. 990–993; Aruffo et al., Cell, Bd. 72 (1993), S. 291–300; Korthauer et al., Nature, Bd. 361 (1993), S. 539–541; DiSanto et al., Nature, Bd. 361 (1993), S. 541–543). Dieses Syndrom ist durch das Fehlen von umgestellten IgG-, IgA- und IgE-sezernierenden B-Zellen und durch einen Mangel des entsprechenden Antikörpers charakterisiert.

[0088] Neuere Untersuchungen über verschiedene Formen von rekombinanten, humanen und murinen CD40-Liganden haben unser Verständnis für die Anforderungen von ruhenden B-Zellen für eine Induktion der Aktivierungs- und Proliferationsereignisse vertieft. Als ein Fusionsprotein mit der extrazellulären Domäne von CD8a wurde für den löslichen CD40-Liganden ein geringer Aktivitätsgrad in Bezug auf die Stimulierung der B-Zellproliferation festgestellt (Laue et al., J. Exp. Med., Bd. 177 (1993), S. 1209–1213; Hollenbaugh et al., EMBO J., Bd. 11 (1992), S. 4313–4321). Bei fehlender externer Vernetzung wirkte der lösliche CD40-Ligand vorwiegend als ein Costimulator der B-Zellproliferation in Verbindung mit Phorbolestern, anti-CD20, oder anti-μ (Lane et al., J. Exp. Med., Bd. 177 (1993), S. 1209–1213; Hollenbaugh et al., EMBO J., Bd. 11 (1992), S. 4313–4321). Wir haben beobachtet, dass das CD8-CD40-Ligandenfusionsprotein dazu befähigt ist, die Proliferation von ruhenden B-Zellen erst nach einer Vernetzung mit anti-CD8 oder bei Verwendung als Costimulator mit Th2-Lymphokinen anzutreiben (B. Castle und M. R. K., Sem. Immunol., Bd. 6 (1994), S. 287–294) oder nach Oberflächen-IgM- oder IgD-Vernetzung (C. M. Snapper et al., J. Immunol., Bd. 154 (1995), S. 1177–1187). Da lösliches CD40 nicht monomer ist (B. Castle und M. R. K., unveröffentlichte Feststellungen), lässt dies darauf schließen, dass ruhende B-Zellen ein hohes Maß an CD40-Vernetzung zur Induktion der Proliferation benötigen. Ferner scheint IL-4 die Empfindlichkeit von ruhenden B-Zellen auf geringe Grade der CD40-Vernetzung zu erhöhen, wie unter Verwendung von anti-CD40-Antikörpern festgestellt wurde (E. A. Clark, Tiss. Antigens, Bd. 35 (1990), S. 33–36; Rousset et al., J. Exp. Med., Bd. 173 (1991), S. 705–710; Gordon et al., Eur. J. Immu-

nol., Bd. 17 (1987), S. 1535–1538). Ähnliche Reaktionen wurden unter Verwendung von IL-4- und anti-μ-Antikörpern festgestellt (Hodgkin et al., Cell. Immunol., Bd. 134 (1991), S. 14–30). Somit scheint unter Bedingungen, die eine weitgehende Vernetzung induzieren, der CD40-Ligand zur Aktivierung von ruhenden B-Zellen ausreichend zu sein. Unter suboptimalen Vernetzungsbedingungen wirkt der CD40-Ligand als Costimulator mit Lymphokinen oder anderen B-Zelloberflächenmolekülen. Welche Bedingungen der B-Aktivierung den Bedingungen ähnlich sind, die durch normale Th-Zellen induziert werden, bleibt noch zu ermitteln.

[0089] Die Fähigkeit von Th2-Lymphokinen zur Costimulation der B-Zellproliferation mit dem löslichen CD40-Liganden liefert eine Erklärung für die Diskrepanz der Wirkungen von IL-4 auf die durch Th-Membranen induzierte B-Zellproliferation (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034; Noelle et al., J. Immunol., Bd. 146 (1991), S. 1118–1124). In einer Untersuchung wurde festgestellt, dass Th-Membranen dazu befähigt sind, einen Anstieg der NA-Synthese in ruhenden B-Zellen zu stimulieren, jedoch für die Durchführung der DNA-Synthese die Zugabe von IL-4 benötigten (Noelle et al., J. Immunol., Bd. 146 (1991), S. 1118–1124). In einer anderen Untersuchung wurde festgestellt, dass Th-Membranen zur Stimulation der B-Zellproliferation in Abwesenheit von zugesetzten Lymphokinen befähigt sind, obgleich IL-4 in signifikanter Weise die B-Zellproliferation verstärkte (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034). Es ist nunmehr bekannt, dass die rekombinante Membranform des CD40-Liganden allein zur Stimulation der B-Zellproliferation befähigt ist (Armitage et al., Nature, Bd. 357 (1992), S. 80–82) (vergl. die nachstehenden Ausführungen). Es hat den Anschein, dass die zur Präparation von Th-Membranen in den beiden Untersuchungen eingesetzten Verfahren sich möglicherweise insofern unterschieden, als in einem Fall, bei dem ein unterschiedliches Homogenisierungsverfahren an aktivierten Th-Zellen durchgeführt wurde (Noelle et al., J. Immunol., Bd. 146 (1991), S. 1118–1124) möglicherweise kleinere, weniger aggregierte Vesikel erhalten wurden. Dies stünde in Analogie zu ultraschallbehandelten Th-Membranvesikeln gemäß den vorstehenden Angaben (Kehry et al., "Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation IV": Cellular Communications, Plenum Press, New York (1992), S. 139–148) oder zu löslichem CD40-Liganden und würde eine Costimulation zur Induktion der B-Zellproliferation erfordern.

[0090] Der CD40-Ligand wurde ferner vorübergehend als Membranform in Fibroblasten exprimiert. Obgleich dieses Material ebenfalls zur Induktion der B-Zellproliferation ausreichend ist, ist das Ausmaß der Reaktion im Vergleich zu der mit intakten Th-Zellen erhaltenen Reaktion stark verringert (Armitage et al., Nature, Bd. 357 (1992), S. 80–82; Grabstein et al., J. Immunol., Bd. 150 (1993), S. 3141–3147). In Gegenwart der geeigneten Lymphokine und des rekombinanten Membran-CD40-Liganden erfolgt eine B-Zelldifferenzierung (Grabstein et al., J. Immunol., Bd. 150 (1993), S. 3141–3147; Armitage et al., J. Immunol., Bd. 150 (1993), S. 3671–3680; Spriggs et al., J. Exp. Med., Bd. 176 (1992), S. 1543–1550; Maliszewski et al., Eur. J. Immunol., Bd. 23 (1993), S. 1044–1049). Es hat jedoch den Anschein, dass einige Unterschiede in den Lymphokin-Anforderungen zwischen B-Zellen, die mit Th-Zellen stimuliert sind und rekombinantem CD40-Liganden bestehen (Grabstein et al., J. Immunol., Bd. 150 (1993), S. 3141–3147; Armitage et al., J. Immunol., Bd. 150 (1993), S. 3671–3680). Neuere Untersuchungen haben eine Diskrepanz zwischen dem Grad der CD40-Ligandenexpression und der Fähigkeit von Th-Zellen, die B-Zellproliferation anzutreiben, ergeben (Castle et al., J. Immunol., Bd. 151 (1993), S. 1777–1788; Roy et al., J. Immunol., Bd. 151 (1993), S. 2497–2510). Es hat den Anschein, dass der neu synthetisierte CD40-Ligand in Th-Zellen nicht vollständig kompetent ist, um das Kontaktsignal an ruhende B-Zellen abzugeben. Möglicherweise gibt es bestimmte Erfordernisse für Assoziationen mit anderen Th-Zelloberflächenproteinen (d. h. ein Costimulator für B-Zellen aktivierende Moleküle) oder für die Aggregation des neu synthetisierten CD40-Liganden mit sich selbst oder mit dem Zytoskelett (Castle et al., J. Immunol., Bd. 151 (1993), S. 1777–1788). Es ist möglich, dass eine bestimmte Dichte des CD40-Liganden kritisch in Bezug auf die Induktion maximaler B-Zellreaktionen ist. Aus diesen Untersuchungen ergibt sich offensichtlich, dass weitere, B-Zellen aktivierende Moleküle noch aufgefunden werden können.

[0091] Die Eigenschaften des CD40-Liganden als ein B-Zellen aktivierendes Molekül stimmen auch mit der Unfähigkeit zur Rekonstitution der B-Zellen Proliferationsaktivität nach einer Detergenssolubilisierung von Th-Zellmembranen überein (vorstehend beschrieben). Die Homologien, die der CD40-Ligand mit TNF-α und TNF-β gemeinsam hat, beschränken sich auf spezielle β-Blattregionen der TNF-Moleküle, die bei der Bildung einer assoziierten, trimeren Struktur beteiligt sind (Farrah & Smith, Nature, Bd. 358 (1992), S. 26). Dies lässt darauf schließen, dass eine native quaternäre Struktur des Membran-CD40-Liganden ein Trimeres sein kann. Da der CD40-Ligand selbst nicht disulfidverknüpft ist, ist zu erwarten, dass eine derartige Struktur bei Detergenssolubilisierung dissoziiert und nur unter sehr speziellen Bedingungen wiederhergestellt wird. Wenn ferner nicht-kovalente Assoziationen mit anderen Th-Zellmembranproteinen oder Costimulatoren zur Induktion der Vernetzung der B-Zelloberfläche für eine maximale proliferative Reaktion erforderlich sind, können diese bei Detergenssolubilisierung ebenfalls leicht dissoziieren.

D. B-Zellen-Th-Zellen-Wechselwirkung in einem in vivo-Kontext

[0092] In der Milz verläuft eine B-Zellaktivierung und -proliferation an zwei Stellen, den proliferativen Foci und dem Keimzentrum. Zur Initiierung der Foci, die erstmals 2 bis 3 Tage nach der Immunisierung nachweisbar sind, wandert die antigenstimulierte B-Zelle zu der T-Zelle, die reicher an äußeren periartiolären, lymphoiden Scheidebereichen (PALS) der weichen Pulpa der Milz ist (Kupfer & Singer, J. Exp. Med., Bd. 170 (1991), S. 1697–1713). Wenn ein Kontakt mit einer geeigneten T-Zelle hergestellt wird, findet eine Proliferation sowohl von T- als auch von B-Zellen statt und die B-Zellen unterliegen einem Wechsel und sezernieren IgG-Unterklassen. Sie können auch entlang terminalen Arteriolen zur roten Pulpa wandern und dabei möglicherweise die Milz verlassen (N. Van Rooijen, Immunol. Today, Bd. 11 (1990), S. 436–439). Der Grossteil der primären Antikörper bei einer Immunreaktion entsteht aus B-Zellen in diesen Foci (Tsiagbe et al., Immunol. Rev., Bd. 126 (1992), S. 113–141). Die Reaktion des Keimzentrums wird wenige Tage nach der Bildung der Foci eingeleitet. B-Zellen des Keimzentrums leiten sich möglicherweise von B-Zellen, die in den Foci aktiviert worden sind, ab (Jacob & Kelsoe, J. Exp. Med., Bd. 176 (1992), S. 679–687). Beim Keimzentrum handelt es sich um eine Stelle von intensiver B-Zellproliferation, die für die Erzeugung und Selektion von B-Zellen notwendig ist, die hypermutierte Antikörper von höherer Affinität erzeugen.

[0093] Der Mechanismus der B-Zellaktivierung, der in vitro durch Th-Membranen und Lymphokine reproduziert wird, gleicht stark dem Mechanismus der B-Zellaktivierung in den primären proliferativen Foci, die in vivo zu erkennen ist (M. R. Kehry und P. D. Hodgkin, Sem. Immunol., Bd. 5 (1993), S. 393–400). Neuere elegante immunohistochemische Untersuchungen der in situ-Lokalisierung des CD40-Liganden in lymphoiden Organen von immunisierten Mäusen stimmen mit dieser Schlussfolgerung überein. Der CD40-Ligand wurde nur an T Zellen in der äußeren PALS-Region oder in Assoziation mit terminalen Arteriolen gefunden (van der Eertwegh et al., J. Exp. Med., Bd. 178, (1993), S.1555–1656). Ferner korrelierte die Kinetik des Auftretens des CD40-Liganden mit der Kinetik der Bildung von Foci statt mit der Kinetik der Bildung des Keimzentrums. Tatsächlich wurde in Keimzentren kein CD40-Ligand festgestellt.

E. Ein neues System zur Untersuchung der B-Zellen-T-Zellen-Wechselwirkung

[0094] Da es nicht möglich ist, normale, untransformierte B-Zellen in vitro über längere Zeitspannen hinweg am Leben zu erhalten (Tisch et al., Immunol. Today, Bd. 9 (1988), S. 145–150) verwenden die existierenden in vitro-Systeme zur Untersuchung von B-Zellreaktionen frisch isolierte B-Zellen aus Milz, Mandeln oder peripherem Blut. Diese B-Zellpopulationen sind von Natur aus unterschiedlich und heterogen. Diese Variabilität kann für zahlreiche differierende experimentelle Ergebnisse nicht nur zwischen verschiedenen Laboratorien, sondern auch zwischen Untersuchungen an murinen und humanen B-Zellen verantwortlich sein. Es war nicht möglich, B-Zelllinien zu erhalten, die analog zu T-Zellklonen sind (Tisch et al., Immunol. Today, Bd. 9 (1988), S. 145–150). Im Durchschnitt bleiben gezüchtete B-Zellen bei fehlender Stimulation weniger als 2 Tage am Leben. Nach einer in vitro-Aktivierung durch Th-Zellen unterliegen B-Zellen offensichtlich 2 bis 3 Runden der Zellteilung. Bei Gegenwart von Th2-Lymphokinen differenzieren sie zur Sekretion von Antikörper (Hodgkin et al., Eur. J. Immunol., Bd. 24 (1994), S. 239–246). Jedoch kommt es nach der anfänglichen Proliferationsperiode zu einem weitgehenden B-Zelltod, so dass die tatsächliche Lebensfähigkeit nach 7 Tagen weniger als 10 % betragen kann (Hodgkin et al., Eur. J. Immunol., Bd. 24 (1994), S. 239–246). Dadurch wurde es unmöglich, in vitro-Systeme zur Untersuchung der wenig verstandenen Aspekte der B-Zellreaktion einzuführen: beispielsweise bezüglich Signalen, die Gedächtnis-B-Zellen erzeugen, und bezüglich der molekularen Mechanismen, die die somatische Mutation und Selektion von Zellen, die Antikörper hoher Affinität erzeugen, antreiben. Ein System, bei dem IL-4 und anti-CD40-Antikörper in immobilisierter Form an Fc-Rezeptor-positiven Fibroblasten zur Züchtung von humanen B-Zellen über längere Zeiträume hinweg verwendet wurden (Rousset et al., J. Exp. Med., Bd. 173 (1991), S. 705–710; Banchereau et al., Science, Bd. 251 (1991), S. 70–72; Galibert et al., J. Immunol., Bd. 152 (1994), S. 22–29), näherte sich am stärksten einer B-Zelllinie an. Jedoch verlief die Verdopplung langsam (Galibert et al., J. Immunol., Bd. 152 (1994), S. 22–29) und die Notwendigkeit von IL-4 erzeugte Antikörper bildende Zellen in der heterogenen Kultur (Banchereau et al., Science, Bd. 251 (1991), S. 70–72).

Beispiel 2

Wirksame Proliferation und Differenzierung von B-Zellen unter Verwendung des hdmb-CD40-Liganden

Materialien und Methoden

[0095] Die Konstruktion und Isolierung eines rekombinanten Baculovirus-Vektors, der die Expression von hochdichtem, membrangebundenem Mäuse-CD40-Liganden dirigiert, erfolgte folgendermaßen. Bei dem bei dieser Untersuchung verwendeten Transfervektor handelte es sich um ein Derivat des Plasmids $ph_{\gamma 1}360$ (zur Verfügung gestellt von Dr. Charles Has und Dr. J. Donald Capra, Southwestern Medical Center, Dallas, TX) (Hasemann und Capra,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 87 (1990), S. 3942–3946). Plasmide, die die cDNA. die für den murinen CD40-Liganden kodieren, enthalten, und der murine CD40-Ligand sind aus dem Stand der Technik bekannt. Zur Insertion der CD40-Liganden-cDNA in den Transfervektor wurde eine PCR-Mutagenese herangezogen, um eine Nco I-Stelle in exakter Übereinstimmung mit dem ATG-Initiationscodon der CD40-Liganden-cDNA und eine Xba I-Stelle unmittelbar distal zum Translationsterminationscodon einzuführen. Die amplifizierte DNA wurde zunächst in PTZ19R geklont und sodann in $ph_{\gamma 1}1360$ subkloniert, nachdem die cDNA der schweren Immunoglobulinkette durch Nco I/Xba I-Verdau entfernt worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit AcMNPV-Virus-DNA durch das $CaCl_2$-Fällungsverfahren kotransfiziert. Okklusions negative, virale Plaques wurden isoliert und unter Anwendung üblicher Techniken gereinigt (Summers und Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin (1987), S. 1555).

[0096] Ein Virusvorrat von hohem Titer, der in SF9-Zellen unter Anwendung üblicher Techniken gezüchtet worden war (O'Reilly et al. Baculovirus expression vectors, a laboratory manual, W. H. Freemann and Company, New York, New York (1992)) wurde zur Infektion von Sf9-Zellen verwendet, die 66 Stunden bei 27 °C in Suspensionskultur gezüchtet worden waren (MOI-Wert 100). Infizierte Sf9-Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, 2-mal mit eiskalter Rinaldini-Salzlösung (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) mit einem Gehalt an 1,0 mM $CaCl_2$ gewaschen, und Membranen wurden gemäß Literaturangaben präpariert (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025; Brian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 85 (1988), S. 564; Maeda et al., Biochim. Biophys. Acta, Bd. 731 (1983), S. 115). Membranen mit der Bezeichnung hdmb-Maus-CD40-Ligand wurden gewaschen und in Dulbecco-PBS resuspendiert und unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Gesamtkonzentration an Membranprotein wurde für jedes Präparat bestimmt (Micro BCA-Test, Pierce). Membranchargen wurden in einem B-Zellproliferationstest (vergl. die nachstehenden Ausführungen) titriert.

[0097] Präparation von humanen B-Zellen. Hochgereinigte B-Zellen wurden gemäß Literaturangaben präpariert (Amoroso und Lipsky, J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 3155). Kurz zusammengefasst, PBMC wurden aus heparinisiertem Blut von gesunden Erwachsenen durch Zentrifugation über Natriumdiatrizoat/Ficoll-Gradienten präpariert (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ). PBMC wurde in serumfreiem RPMI 1640 resuspendiert und 45 Minuten bei Raumtemperatur mit 5 mM L-Leucin-methylester-HCl behandelt, um eine Verarmung an Monozyten und natürlichen Killerzellen durchzuführen. Sich nicht-absetzende Zellen, die weitgehend aus B-Zellen bestanden, wurden gewonnen und 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 µM L-Leucyl-leucin-methylester behandelt, um eine Verarmung an etwaigen verbleibenden NK-Zellen und Monozyten vorzunehmen (Thiele und Lipsky, J. Immunol., Bd. 136 (1986), S. 1038). Im Anschluss an diese Behandlung wurden die Zellen erneut rosettiert und die SRBC-Rosetten bildenden Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt. Auf diese Weise präparierte B-Zellen waren zu mehr als 90 % rein, wie sich durch Färbung mit mAb gegen CD20 oder CD19 zeigte. Alternativ lassen sich B-Zellen unter Verwendung von anti-CD19-beschichteten, magnetischen Perlen gemäß den Angaben des Herstellers reinigen (Dynabeads der Fa. Dynal).

[0098] Präparation von Mäuse-B-Zellen. Mäuse-B-Zellen wurden gemäß den Angaben von Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034 präpariert. Cytokine. Überstand von aktivierten D10.G4.1 (D10)-Zellen wurden gemäß Literaturangaben erhalten (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd.145 (1990), S. 2025). Kurz zusammengefasst, D10-Th2-Zellen, die 3 Wochen nach der Stimulation in Petri-Schalen gezüchtet worden waren, wurden geerntet, 2-mal in Medium ohne IL-2 gewaschen und mit 5 µg/ml Concanavalin A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 9 Stunden stimuliert. Nach Entfernen der Zellen durch Zentrifugation mit niedriger Drehzahl wurde der Überstand mit 95 000 × g zentrifugiert, durch eine 0,22 µm-Membran filtriert und an einer Mannose-Agarose-Säule absorbiert (E-Y Laboratories, San Mateo, CA). Der D10-Überstand wurde in B-Zellproliferations- und Antikörpererzeugungs-Tests titriert und in einer endgültigen Verdünnung von 1/100 verwendet. Ferner können den Kulturen Cytokine zugesetzt werden, die durch andere Zelltypen erzeugt worden sind, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf) dendritische Zellen, follikuläre, dendritische Zellen und andere Antigene aufweisende Zellen, und zwar in Gegenwart oder Abwesenheit eines spezifischen Antigens.

[0099] Kulturbedingungen. B-Zellen wurden in B-Zellmedium (BCM) gezüchtet:: 10 % fötales Kälberserum (Hyclone-charakterisiert); 10 mM Hepes, pH-Wert 7.3; L-Glutamin; Penicillin/Streptomycin; nicht-essentielle Aminosäuren; Natriumpyruvat; und 5×10^{-5} M2-Mercaptoethanol, in RPMI-1640. Das Medium und 100 × Ergänzungen wurden von Gibco erhalten.

[0100] Für Langzeitzüchtungsversuche wurden B-Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit V-Boden (001-010-2701, Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) in 150 µl BCM bei 37 °C und 5,5 % CO_2 gezüchtet. Zunächst wurde hdmb-Mäuse-CD40-Ligand (3 µg/ml Endkonzentration) mit oder ohne D10 sn (1/100 endgültige Verdünnung) in 100 µl BCM zugegeben. B-Zellen geringer Dichte (1 000/Vertiefung) wurden in 50 µl BCM zugegeben. Alle 48 Stunden wurden die Platten gemäß folgenden Angaben mit frischen Medienkomponenten versorgt.

Die Platten wurden 7 Minuten mit 1600 U/min zentrifugiert (GS-6KR-Zentrifuge, Beckman), das Medium wurde unter Zurücklassen von ~15 µl abgesaugt und frisches Medium (150 µl) wurde zugegeben.

[0101] Antikörpermessung. Überstände der Kulturen wurden für Antikörpertests geerntet, indem 150 µl Kulturüberstand von 3 Vertiefungen mit Wiederholungsproben entnommen wurden. 140 µl BCM wurden in die Vertiefungen zurückgegeben und 140 µl für die verbleibende Antikörperkonzentration entfernt. Diese Vertiefungen wurden nicht mehr verwendet. Die Konzentrationen an IgM, IgG und IgE wurden durch isotypenspezifischen ELISA-Test gemäß Literaturangaben gemessen (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025–2034; Hodgkin et al., Eur. J. Immunol., Bd. 24 (1994), S. 239–246). Die Restkonzentrationen der einzelnen Isotypen in jeder Vertiefung nach Ersetzen mit frischem Medium (Übertrag zum nächsten Zeitpunkt) wurden von jedem Wert subtrahiert.

Ergebnisse

[0102] SF9-Zellen wurden mit einem rekombinanten Baculovirus mit einem Gehalt an Mäuse-CD40-Ligand für verschiedene Zeitspannen infiziert (**Fig.** 2). Eine angereicherte Plasmamembranfraktion wurde präpariert und jede Membranpräparation in einem B-Zellproliferationstest titriert (2×10^4 B-Zellen/Vertiefung für 72 h). Unter Einbau einer radioaktiv markierten Verbindung als Marker für die Zellteilung wurde ein maximaler Einbau von ^{3}H-TdR (4 h-Puls) bei Membranen beobachtet, die aus 66 h infizierten SF9-Zellen präpariert worden waren (66 h-hdmb-CD40-Ligand). Wenn der hdmb-CD40-Ligand zur Stimulation von B-Zellen in Gegenwart von D10-sn (1/100; Lymphokin enthaltender Überstand von 9 h stimuliertem D10.G4.1-Th2-T-Zellklon, Hodgkin et al., 1990) verwendet wurde, waren Plasmamembranen aus 42 h, 66 h und 90 h infizierten SF9-Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Stimulation von B-Zellen gleichwertig (Fig. 2B).

[0103] Zum Nachweis, dass die beobachtete Proliferationsreaktion durch den hdmb-CD40-Liganden vermittelt wurde, wurden B-Zellen (2×10^4/Vertiefung) mit einer konstanten Menge an hdmb-CD40-Ligand (1/200) in Gegenwart und Abwesenheit eines CD40-IgG1-Fusionsproteins stimuliert (Castle et al., J. Immunol., Bd. 151 (1993), S. 1777–1788) (Fig. 3). Ausgefüllte Kreise, CD40-IgG zugesetzt (35 µg/ml in der höchsten Konzentration); leere Quadrate, kein CD40-IgG. Die durch den hdmb-CD40-Liganden erzeugte Proliferation konnte spezifisch durch CD40-IgG gehemmt werden, was beweist, dass die Proliferation durch den hdmb-CD40-Liganden induziert wurde.

[0104] Zur Bestimmung der Einflüsse der Dichte auf die Zellproliferation wurden B-Zellen mit hdmb-CD40-Ligand (1/80) und D10-sn (1/100) auf Platten mit 96 Vertiefungen gebracht (1×10^4/Vertiefung). Die Zellen wurden ausgezählt und das Medium wurde alle 48 Stunden ersetzt. An den Tagen 5 und 8 wurden die Zellen resuspendiert und 1/8 aufgeteilt (Fig. 4). Ausgefüllte Dreiecke, Zellen nicht aufgeteilt; ausgefüllte Kreise, 1/8-Aufteilung am Tag 5; ausgefüllte Quadrate, 1/8-Aufteilung am Tag 8; leere Kreise, 1/8-Aufteilung, multipliziert mit dem Faktor 8; leere Quadrate, zweite 1/8-Aufteilung, multipliziert mit dem Faktor 64. Bei Eingangszellkonzentrationen über 5×10^4/ml, war eine Verringerung der Zellzahl erforderlich, um eine maximale Proliferation zu erzielen.

[0105] Zum Test verschiedener Kulturformate wurden B-Zellen auf Platten mit 96 Vertiefungen, die entweder einen flachen Boden oder einen "V"-Boden aufwiesen, gegeben (1×10^3 Zellen/Vertiefung). Die Zellen wurden entweder mit hdmb-CD40-Ligand und D10-sn (++) oder hdmb-CD40-Ligand allein (+–) inkubiert. Alle 48 Stunden wurden die Zellen ausgezählt und das Medium wurde entfernt und ersetzt (Fig. 5). Ausgefüllte Quadrate, hdmb-CD40-Ligand und D10-sn auf Platten mit flachem Boden; leere Kreise, hdmb-CD40-Ligand und D10-sn auf Platten mit "V"-Boden; leere Quadrate, hdmb-CD40-Ligand auf Platten mit flachem Boden; ausgefüllte Kreise, hdmb-CD40-Ligand auf Platten mit "V"-Boden. Wie in Fig. 5 dargestellt, wurde bei Abwesenheit von Lymphokinen eine höhere Anzahl an B-Zellen aus Platten mit Vertiefungen mit "V"-Boden gewonnen.

[0106] Zum Testen der Antikörpersekretion aus proliferierten und differenzierten B-Zellen wurden B-Zellen auf Platten mit 96 Vertiefungen mit "V"-Boden (1×10^3 Zellen/Vertiefung) mit hdmb-CD40-Ligand (1/300) und D10-sn (1/100) gebracht. Alle 48 Stunden wurden Zellen entfernt und ausgezählt und das Medium wurde nicht ersetzt (Fig. 6A). Leere Quadrate, Gesamtzahl an lebensfähigen Zellen; ausgefüllte Kreise, Bruchteil von lebensfähigen Zellen.

[0107] Das Medium aus 3 Vertiefungen (Wiederholungsversuchen) wurde entnommen und die Antikörperkonzentration wurde durch quantiativen ELISA-Test gemessen (Fig. 6B). Ausgefüllte Kreise, IgM; ausgefüllte Quadrate, IgG1; ausgefüllte Dreiecke, IgE. Die kumulativen Antikörperkonzentrationen sind in ng/ml angegeben. Die maximale Zellzahl trat nach etwa 8 Tagen auf (50-fache Zunahme der Zellzahl), während der Großteil der IgM-Erzeugung zwischen den Tagen 8 und 12 erfolgte (Fig. 6B).

[0108] Zur Bestimmung des Einflusses, den der Ersatz des Mediums auf die B-Zellproliferation und -differenzierung hatte, wurden B-Zellen auf Platten mit 96 Vertiefungen mit "V"-Boden (1×10^3 Zellen/Vertiefung) mit hdmb-CD40-Ligand (1/300) und D10-sn

(1/100) gebracht. Alle 48 Stunden wurden Zellen entnommen und ausgezählt und das alte Medium wurde entfernt und durch frisches Medium ersetzt (Fig. 7A). Leere Quadrate, Gesamtzahl der lebensfähigen Zellen; ausgefüllte Kreise, Bruchteil von lebensfähigen Zellen.

[0109] Das Medium von Vertiefungen mit Wiederholungsversuchen wurde entnommen und die Antikörperkonzentration wurde durch quantitativen ELISA-Test gemessen (Fig. 7B). Ausgefüllte Kreise, IgM; ausgefüllte Quadrate, IgG1; ausgefüllte Dreiecke, IgE. Die kumulativen Antikörperkonzentrationen sind in ng/ml angegeben. Die maximale Zellzahl trat nach etwa 10 Tagen auf (200-fache Zunahme der Zellzahl), während der Großteil der IgM-Erzeugung zwischen den Tagen 8 und 22 erfolgte.

[0110] Um die Einflüsse eines mehrstufigen Proliferationsverfahrens auf die Antikörpersekretion zu testen, wurden B-Zellen auf Platten mit 96 Vertiefungen mit "V"-Boden (1×10^3 Zellen/Vertiefung) mit hdmb-CD40-Ligand (1/300) und D10-sn (1/100) gegeben (**Fig.** 8). Alle 48 Stunden wurden Zellen entfernt und ausgezählt und das alte Medium wurde entfernt und durch frisches Medium ersetzt (**Fig.** 8); +–, das Medium enthielt hdmb-CD40-Ligand; —, das Medium enthielt keine Zusätze; ++, das Medium enthielt hdmb-CD40-Ligand und D10-sn. Leere Quadrate, Gesamtzahl an lebensfähigen Zellen; ausgefüllte Kreise, Bruchteil an lebensfähigen Zellen.

[0111] Das Medium aus Vertiefungen mit Wiederholungsversuchen wurde entnommen und die Antikörperkonzentration wurde durch quantitativen ELISA-Test gemessen. Ausgefüllte Kreise, IgM; ausgefüllte Quadrate, IgG1; ausgefüllte Dreiecke IgE. Die kumulativen Antikörperkonzentrationen sind in ng/ml angegeben (**Fig.** 8). Die maximale Zellzahl trat nach etwa 18 Tagen auf(100-fache Zunahme der Zellzahl), während der Großteil der IgM-Erzeugung zwischen den Tagen 16 und 34 erfolgte.

[0112] Um die Häufigkeit zu bestimmen, mit der B-Zellen auf den hdmb-CD40-Liganden reagieren, wurden B-Zellen in Mengen von 1, 3, 10 und 30 Zellen/Vertiefung auf Platten mit 96 Vertiefungen mit "V"-Boden entweder mit hdmb-CD40-Ligand (1/300) oder hdmb-CD40-Ligand (1/300) und D10-sn (1/100) ausgestrichen (Fig. 9). Nach 6 Tagen wurden die Zellen resuspendiert, auf Platten mit flachem Boden übertragen und auf die Anwesenheit von geteilten lebensfähigen Zellen bewertet. In Kulturen, die mit dem hdmb-CD40-Liganden stimuliert worden waren, wuchsen etwa 1/8 der B-Zellen; in Kulturen, die mit dem hdmb-CD40-Liganden und D10-sn stimuliert worden waren, wuchsen etwa 1/2 der B-Zellen.

[0113] Um den proliferativen Einfluss des hdmb-CD40-Liganden auf humane B-Zellen zu testen, wurden humane B-Zellen gemäß den vorstehenden Angaben für Mäusezellen isoliert und gezüchtet (Fig. 10). Humane B-Zellen expandierten mindestens 100-fach und die Ig-Erzeugung wurde am Tag 10–14 beobachtet.

Beispiel 3

Proliferation und Differenzierung von humanen B-Zellen

[0114] In der früheren Studie wurde ein Verfahren zur Proliferation und Differenzierung von normalen Mäuse-B-Lymphozyten bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltete die Verwendung von rekombinantem hdmb-Mäuse-CD40-Ligand, der in Insektenzellen in Kombination mit einer Quelle für Cytokine, die zur Unterstützung der B-Zelldifferenzierung befähigt waren, exprimiert worden war. Unter diesen Bedingungen expandierten Mäuse-B-Lymphozyten 250-fach und konnten mit hoher Frequenz als individuelle Klone gezüchtet werden (1 von 2 Zellen reagierten). Sämtliche B-Zellklone, die expandierten, differenzierten auch unter Sekretion von hohen Konzentrationen an IgM- und/oder IgG-Antikörper. Der Zweck der vorliegenden Untersuchung besteht darin, den Nachweis zu führen, dass eine ähnliche zelluläre Expansion und Differenzierung unter Verwendung von normalen, humanen B-Lymphozyten erreicht werden kann, indem man sich der hier beschriebenen Verfahren bedient. Unter Verwendung der vorliegenden Verfahren ergaben humane B-Zellen eine wirksame proliferative Reaktion auf rekombinanten, humanen hdmb-CD40-Liganden, der in Insektenzellen in Kombination mit humanen Cytokinen exprimiert worden war. Es war möglich, humane B-Zellklone mit hoher Frequenz zu züchten und eine Differenzierung zur Immunoglobulin-Sekretion zu erreichen.

Materialien und Methoden

[0115] Antikörper und Reagenzien. Monoklonales anti-human-CD3 (64.1) wurde von Dr. John Hansen (Fred Hutchison Cancer Center, Seattle, WA) hergestellt. Monoklonales anti-human-CD3, das für das Panning verwendet wurde, anti-human-CD8, anti-human-CD14 und anti-human-CD19 wurden von der Fa. PharMingen (San Diego, CA) bezogen. Zur quantitativen Bestimmung von humanen Antikörperkonzentrationen durch ELISA-Test wurden $F(ab')_2$-Ziegen-anti-human-IgM (gereinigt und Biotin-konjugiert) und $F(ab')_2$ Ziegen-anti-human-IgG (Fc-spezifisch) (gereinigt und Biotin-konjugiert) und Streptavidin-HRP von Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) bezogen. Für ELISPOT-Tests an Mäuse-B-Zellen wurden Biotin-konjugiertes Ziegen-anti-Maus-IgM von Zymed (So. San Francisco, CA) und Biotin-Ziegen-anti-Maus-IgG von Southern Biotechnology, Inc. (Birmingham, Al) bezogen. Gereinigtes, humanes Myelom-IgM, -IgG1, -IgG2, -IgG3 und

-IgG4, die als ELISA-Standards verwendet wurden, wurden von The Binding Site, Ltd. (Birmingham, England) bezogen. Gereinigtes Napfschnecken-Schlüsselloch-Hämocyanin (Imject KLH) wurde von Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) bezogen.

[0116] Cytokine. Rekombinantes humanes IL-1a, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-11 wurden von Genzyme (Cambridge, MA) bezogen. Vorratslösungen wurden hergestellt, indem die einzelnen Bestandteile in B-Zellmedium (BCM; vergl. die nachstehenden Ausführungen), verdünnt, mit 0,2 µm-Filtern filtriert und in Aliquotanteilen bei –80 °C aufbewahrt wurden.

[0117] Überstände von aktivierten, humanen, peripheren Blut-T-Zellen wurden folgendermaßen erhalten. Periphere, mononukleare Blutzellen, die nach Zentrifugation über Ficoll-Hypaque erhalten worden waren, wurden nacheinander auf Platten, die über Nacht mit anti-CD14 (5 µg/ml), anti-CD14 und anti-CD19 (jeweils 2,5 µg/ml) und anti-CD8 (5 µg/ml) beschichtet worden waren, ausgestrichen. Das Ausstreichen erfolgte in ausgewogener Hank-Salzlösung mit einem Gehalt an 5 % FBS, 10 mM HEPES, pH-Wert 7,3, 1 Stunde bei 4 °C. Nicht-haftende Zellen wurden gewaschen und in einer Menge von 4×10^6 Zellen/ml in warmem BCM (RPMI 1640, ergänzt mit 10 % FBS, 10 mM HEPES (pH-Wert 7,3), 2 mM L-Glutamin (GIBCO, Grand Island, NY), 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (GIBCO), 1 mM Natriumpyruvat, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 100 U/ml jeweils an Penicillin und Streptomycin (GIBCO)) resuspendiert. Für die anti-CD3-Stimulation wurden Zellen auf Gewebekulturschalen gebracht, die mit 4 µg/ml anti-CD3 48 Stunden bei 37 °C beschichtet worden waren. Zur Stimulation mit PHA/PMA wurden Zellen mit 2,5 µg/ml PHA und 10 ng/ml PMA 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, gewaschen und 46 Stunden bei 37 °C in frischem warmem BCM inkubiert. Nach Entfernen von Zellen durch Zentrifugation mit geringer Drehzahl wurden die Überstände mit 100 000 × g zentrifugiert, durch eine 0,2 µM Membran filtriert und in Aliquotanteilen bei –80 °C aufbewahrt.

[0118] Ferner können Cytokine, die durch andere Zelltypen, einschließlich dendritische Zellen, follikuläre dendritische Zellen und andere Antigene aufweisende Zellen, in Gegenwart oder Abwesenheit eines spezifischen Antigens erzeugt worden sind, den Kulturen als Stimuli zugesetzt werden.

[0119] Baculovirus-Wachstum, Infektion von Insektenzellen und Präparation von Membranen. Ein rekombinantes Baculovirus, das für den humanen CD40-Liganden von voller Länge kodiert, wurde durch übliche Techniken konstruiert (D. R. O'Reilly, L. K. Miller und V. A. Luckow (1992), Baculovirus expression vectors, a laboratory manual, W. H. Freeman and Company, New York, New York). Ein Vorrat von Virus von hohem Titer, das in SF9-Zellen unter Anwendung üblicher Techniken (D. R. O'Reilly L. K. Miller und V. A. Luckow (1992), Baculovirus expression vectors, a laboratory manual, W. H. Freeman and Company, New York, New York) gezüchtet worden war, wurde zur Infektion von SF9-Zellen verwendet, die in Suspensionskultur 48 Stunden bei 27 °C (MOI-Wert 1) gezüchtet worden waren. Infizierte SF9-Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und 2-mal mit eiskalter Rinaldini-Salzlösung (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) mit einem Gehalt an 1,0 mM $CaCl_2$ gewaschen und Membranen wurden gemäß Literaturangaben präpariert (Hodgkin et al., J. Immunol., Bd. 145 (1990), S. 2025, A. A. Brian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 85 (1988), S. 564, T. Maeda et al., Biochim. Biophys. Acta, Bd. 731 (1983), S. 115). Membranen und humaner hdmb-CD40-Ligand wurden gewaschen und in Dulbecco-PBS resuspendiert und unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die gesamte Konzentration an Membranprotein wurde für jede Präparation bestimmt (Micro BCA-Test, Pierce). Chargen von Membranen wurden in einem B-Zellproliferationstest titriert (vergl. die nachstehenden Ausführungen).

[0120] Fließzytometrie. Die Expression des CD40-Liganden an der Oberfläche von SF9-Insektenzellen wurde quantitativ durch Fließzytometrie bestimmt. SF9-Zellen, die verschiedene Male mit einem in Bezug auf humanen CD40-Liganden rekombinanten Baculovirus infiziert worden waren, wurden in Insekten-FACS-Puffer (Rinaldini-Salzlösung mit einem Gehalt an 2 % BSA und 0,2 % Natriumazid) gewaschen und 30 Minuten bei 4 °C mit 5 µg/ml nicht-spezifischem Mäuse-IgG1 in Insekten-FACS-Puffer vorinkubiert. Die Zellen wurden mit 10 µg/ml CD40-IgG1 (Castle et al., J. Immunol., Bd. 151 (1993), S. 1777) oder humanem Kontroll-IgG1 unter anschließender Zugabe von biotinyliertem, monoklonalem Mäuse-anti-human-IgG1 (10 µg/ml; Zymed) und Phycoerythrin (PE)-Streptavidin (20 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) gefärbt. Sämtliche Färbungen wurden in Insekten-FACS-Puffer mit einem Gehalt an 5 µg/ml nicht-spezifischen Mäuse-IgG1 durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde in einem einzigen logarithmischen Farbmodus an einem FACScan-Fließzytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) analysiert.

[0121] Präparation von humanen B-Zellen. Humane, periphere, mononukleare Blutzellen, die nach Zentrifugation über Ficoll-Hypaque erhalten worden waren, wurden mit biotinyliertem anti-CD19 (CeIIPro, Bothell, WA) inkubiert, an Avidinkonjugierte Perlen (CEPRATE LC-19-Säule; CeIIPro) gebunden und gemäß den Angaben des Herstellers eluiert. Eluierte Zellen wurden auf Petri-Schalen, die über Nacht mit 5 µg/ml jeweils an anti-CD3 und anti-CD14 beschichtet worden waren, ausgestrichen. Nicht-haftende Zellen (~1×10^6/100 ml Blut) waren zu 84 % bis 93 % B-Zellen, gemäß Bestimmung durch Zweifachfärbung mit PE-anti-CD3 und FITC-anti-CD19 und

durch Zweifachfärbung mit PE-anti-CD20 und FITC-anti-IgM, gemäß Literaturangaben (Kehry et al., Cell. Immunol., Bd. 118 (1989), S. 504). Die Fluoreszenz wurde im logarithmischen Zweifarbenmodus an einem FACScan-Fließzytometer analysiert. B-Zellen können auch aus Mandeln, Milz und Knochenmark durch ähnliche Techniken oder durch Sortieren an einem Fließzytometer nach Färbung mit fluoreszierend markiertem anti-CD19 oder anti-CD20 oder spezifischem Antigen isoliert werden.

[0122] B-Zelltests. Für Proliferationsuntersuchungen wurden B-Zellen (zwischen 5 × 10^3 und 1 × 10^4/Vertiefung) 96 Stunden bei 37 °C mit Reihenverdünnungen von Membranen in 100 µl BCM (Falcon 3072 Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen) inkubiert. Die Endkonzentrationen der verwendeten rekombinanten Lymphokine betrugen 1 ng/ml IL-1α, 5 ng/ml IL-11 und 10 ng/ml jeweils für IL-2, IL-4, IL-6 und IL-10. Während der letzten 6 Stunden der Züchtung wurde [Methyl-1',2'-^{3}H]-Thymidin (120 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL) zugegeben (1 µCi/Vertiefung). Die Kulturen wurden an einem automatisierten Zell-Erntegerät für 96 Vertiefungen (Tomtec, Orange, CT) zur Durchführung der Szintillationszählung (Beckman, Fullerton, CA) geerntet. Die Bestimmung der Anzahl an lebensfähigen B-Zellen wurde durch Zellzählung vorgenommen. Zellen aus Dreifachversuchen in verschiedenen Vertiefungen wurden vereinigt, durch Zentrifugation geerntet, in 50 µl BCM resuspendiert und mit einem gleichen Volumen an 0,4 % Trypanblau in 0,85 % NaCl vermischt. Lebende Zellen wurden unter einem Hämozytometer gezählt. Die durchschnittliche Anzahl für die Vertiefungen mit Wiederholungsversuchen wurde berechnet.

[0123] Für Langzeit-Züchtungsexperimente wurden B-Zellen (5 × 10^2 oder 1 × 10^3/Vertiefung) in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit V-Boden (001-010-2701, Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) in 150 µl BCM bei 37 °C und 5,5 % CO_2 gezüchtet. Humaner hdmb-CD40-Ligand und T-Zellüberstände mit einem Gehalt an Lymphokinen wurden in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt; rekombinante Lymphokine wurden in den vorstehend aufgeführten Konzentrationen zugesetzt. Die Kulturzellen wurden an den nachstehend angegebenen Tagen mit frischen Medienkomponenten versetzt. Die Platten wurden 7 Minuten mit 1600 U/min zentrifugiert (GS-6KR-Zentrifuge, Beckman), das Medium wurde unter Zurücklassen von ~15 µl abgesaugt und frisches Medium (150 µl) wurde zugegeben.

[0124] Die IgM- und IgG-Konzentrationen wurden durch den vorstehend beschriebenen isotypspezifischen Sandwich-ELISA-Test (Hodgkin, et al., Eur. J. Immunol. Bd. 24 (1994), S. 239 unter Verwendung der vorstehenden beschriebenen Reagenzien gemessen. Monoklonales humanes IgM (50 ng/ml) und äquimolare Gemische von monoklonalem humanem IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 (insgesamt 50 ng/ml) wurden als Standard verwendet. Kulturmediumproben (140 µl/Vertiefung) wurden aus den Vertiefungen der Mehrfachversuche mit wachsenden B-Zellen geerntet.

[0125] ELISPOT-Tests zum Nachweis von Zellen, die antigenspezifische Antikörper sezernierten, wurden gemäß Literaturangaben durchgeführt (Hodgkin et al., Eur. J. Immunol., Bd. 24 (1994), S. 239, Czerkinsky, et al., J. Immunol. Methods, Bd. 110 (1988), S. 29). Multiscreen-HA-Filterbodenplatten mit 96 Vertiefungen (Millipore, Bedford, MA) wurden über Nacht bei 4 °C mit 5 µg/ml KLH beschichtet. Platten mit einem Gehalt an wachsenden B-Zellen wurden zentrifugiert und die Zellen wurden 2-mal gewaschen, bevor sie in 100 µl frischem BCM resuspendiert wurden. Zellen aus jeder Vertiefung wurden in Zweifachversuchen auf beschichtete Multiscreen-Platten übertragen und 16 Stunden bei 37 °C in 100 µl BCM/Vertiefung inkubiert. Platten wurden unter Verwendung von biotinylierten anti-Maus-IgM- oder anti-Maus-IgG-Reagenzien gemäß Literaturangaben (Hodgkin et al., Eur. J. Immunol., Bd. 24 (1994), S. 239) entwickelt. Nach Stoppen der Reaktion wurden die Vertiefungen im Dunkeln mehrere Stunden getrocknet. Die Flecken, die spezifischen IgM- oder IgG-Antikörpern entsprachen, wurden unter einem Schneidemikroskop gezählt.

Ergebnisse

Humaner CD40-Ligand in Insektenzellmembranen stimuliert in wirksamer Weise die humane B-Zellproliferation.

[0126] Die optimale Expression von humanem CD40-Liganden in SF9-Insektenzellen wurde bestimmt, indem SF9-Zellen verschiedene Male mit rekombinantem Baculovirus infiziert wurden und die Expressionsniveaus durch Fließzytometrie bestimmt wurden. Die Expression des humanen CD40-Liganden wurde nach 48-stündiger Infektion als maximal festgestellt. Eine angereicherte Plasmamembranfraktion wurde aus 48 Stunden infizierten SF9-Zellen präpariert und für anschließende Experimente verwendet (humaner hdmb-CD40-Ligand). Gereinigte humane B-Zellen proliferierten in wirksamer Weise in Reaktion auf den humanen hdmb-CD40-Liganden. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Gemisches von rekombinantem humanem 1L-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-11 verstärkt (Fig. 11). In Abwesenheit des humanen hdmb-CD40-Liganden teilten sich humane B-Zellen nicht (Fig. 11).

Klonale Frequenz von humanem B-Zellwachstum und -differenzierung

[0127] Eine Frequenzanalyse von reagierenden

B-Zellen, die in Grenzverdünnung ausgestrichen worden war, zeigte nach 14 Tagen bei etwa 1 von 2,5 B-Zellen ein Wachstum in Reaktion auf den humanen hdmb-CD40-Liganden und das Gemisch von rekombinanten humanen Lymphokinen, das vorstehend verwendet wurde (Fig. 12A). Zahlreiche B-Zellklone enthielten etwa 20 bis 50 Zellen. Um die Frequenz der B-Zelldifferenzierung zu erhalten, wurden Kulturüberstände der Kulturen in Grenzverdünnung am 11. Tag geerntet und durch ELISA-Test auf die Gegenwart von humanem IgM und IgG abgesucht. Etwa eine von 70 B-Zellen differenzierte unter Sekretion entweder zu IgM oder IgG in Reaktion auf den humanen hdmb-CD40-Liganden und rekombinante humane Lymphokine (Fig. 12B). Zusammen mit der Wachstumsfrequenz lässt dies darauf schließen, dass etwa eine von 28 B-Zellen, die wuchsen, unter Sekretion von Antikörpern differenzierten.

Optimierung der humanen B-Zelldifferenzierung zur Immunoglobulin-Sekretion

[0128] Da die Frequenz des klonalen Wachstums von humanen B-Zellen in Reaktion auf den humanen hdmb-CD40-Liganden sehr ähnlich wie bei Mäuse-Milz-B-Zellen war, bestanden als Möglichkeiten für die unterschiedlichen Frequenzen der Immunoglobulin-Sekretion zwischen den beiden Spezies von B-Zellen entweder die B-Zellquelle (peripheres Blut gegenüber Milz) oder die erforderlichen Lymphokine (rekombinante Lymphokine gegenüber dem Überstand von aktivierten Helfer-T-Zellen). Um die für die humane B-Zelldifferenzierung erforderlichen Lymphokine zu optimieren, wurden Überstände von peripheren Blut-T-Zellen, die 48 Stunden entweder mit immobilisiertem anti-CD3 oder einem Impuls von PHA oder PMA aktiviert worden waren, präpariert. Die humanen T-Zellüberstände wurden auf die Fähigkeit zur Unterstützung der Differenzierung von humanen B-Zellen, die durch den humanen hdmb-CD40-Liganden stimuliert worden waren, getestet. Die Überstände wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von zusätzlichen rekombinanten, humanen Lymphokinen getestet. Lymphokine, die durch PHA- und PMA-aktivierte T-Zellen sezerniert worden waren, unterstützen die Differenzierung der mit humanem hdmb-CD40-Liganden stimulierten B-Zellen nicht und erwiesen sich bei Zugabe zu einer Kombination von rekombinanten humanen IL-2, IL-4, IL-6 und IL-10 als hemmend (Fig. 13). Im Gegensatz dazu unterstützten Lymphokine, die durch anti-CD3-aktivierte T-Zellen sezerniert worden waren, die Differenzierung von mit humanem hdmb-CD40-Liganden stimulierten B-Zellen ebenso wie rekombinante Lymphokine. Geringfügig niedrigere Konzentrationen an IgM und höhere Konzentrationen an IgG wurden durch B-Zellen gebildet, die mit humanem hdmb-CD40-Liganden und anti-CD3-Überstand stimuliert worden waren, relativ zu Zellen, die mit humanem hdmb-CD40-Liganden und rekombinanten IL-2, IL-4, IL-6 und IL-10 stimuliert worden waren (Fig. 13). Die Mengen an IgM und IgG, die durch mit humanem hdmb-CD40-Liganden stimulierte humane B-Zellen erzeugt wurden, stiegen in dosisabhängiger Weise mit zunehmenden Mengen an Lymphokinen, die durch anti-CD3-aktivierte T-Zellen sezerniert wurden, an (Fig. 14). Ferner schien die Bildung an IgM und IgG von der Anwesenheit von Lymphokinen abhängig zu sein und war in Gegenwart des humanen hdmb-CD40-Liganden allein nicht nachweisbar. Die Konzentrationen des gebildeten humanen Immunoglobulins, die bei dem in den Fig. 13 und Fig. 14 dargestellten Experiment erhalten wurden, waren zwar ~10-fach niedriger als die durch Mäuse-Milz B-Zellen, die unter analogen Bedingungen stimuliert worden waren, erzielten Konzentrationen, sind aber ähnlich den Konzentrationen an humanem Immunoglobulin, die in der Literatur bei Sekretion durch 20- bis 100-fach höhere Anzahlen an humanen B-Zellen angegeben werden (Rousset et al., J. Exp. Med., Bd. 173 (1991), S. 705, Armitage et al., J. Immunol., Bd. 150 (1993), S. 3671, Nonoyama, et al., J. Exp. Med., Bd. 178 (1993), S. 1097).

Frequenz der antigenspezifischen B-Zelldifferenzierung in einer nicht dem Priming unterworfenen Population

[0129] Ein Ziel dieser Arbeit besteht in der Expansion von antigenspezifischen B-Zellklonen zur anschließenden Isolierung eines antigenspezifischen Antikörpers. Zur Bestimmung der Frequenz von antigenspezifischen B-Zellen in einer nicht dem Priming unterworfenen Population von Zellen wurden Mäuse-Milz-B-Zellen in einer Grenzverdünnung in Gegenwart einer suboptimalen Dosis von Mäuse-hdmb-CD40-Liganden und D10-Überstand ausgestrichen und die Frequenz von KLH-spezifischem Antikörper sezernierenden Zellen wurde nach 14 Tagen gemessen. Etwa 1 von 2 500 Zellen sezernierte KLH-spezifisches IgM und 1 von 10 000 Zellen sezernierte KLH-spezifisches IgG (Fig. 15). Diese Frequenzen entsprechen den Erwartungen aufgrund einer Analyse von Kulturüberständen aus willkürlichen Vertiefungen bei Ausstreichen von 1 000 Zellen/Vertiefung für KLH-spezifische Antikörper (1 von 8 positiv).

[0130] Dieser Befund beweist, dass aufgrund der hohen Frequenz von B-Zellen, die auf den humanen hdmb-CD40-Liganden und Lymphokine reagieren, antigenspezifische, reagierende Zellen in einer vernünftigen Frequenz in B-Zellpräparaten mit einem Gehalt von nur 1×10^6 Zellen identifiziert werden können. Ferner lässt sich das ELISPOT-Verfahren, das zur Identifizierung von B-Zellen, die antigenspezifischen Antikörper sezernieren, verwendet wird, so modifizieren, dass antigenspezifische B-Zellen durch Ausstreichen auf antigenbeschichtete Vertiefungen isoliert werden können. Auf diese Weise lassen sich

expandierte B-Zellen aufgrund der Spezifität ihres Oberflächenimmunoglobulins gewinnen, unabhängig davon, ob sie einer Differenzierung zur Immunoglobulin-Sekretion unterworfen worden sind.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Proliferation von B-Zellen, umfassend den Schritt der Kultivierung von einer oder mehreren B-Zellen in Gegenwart von hochdichtem, Membran-gebundenem CD40-Liganden, wobei die Membran CD40-Ligand in einer mindestens 10fach größeren Dichte enthält, als sie auf Zellen gefunden wird, die CD40-Ligand natürlich exprimieren, und die B-Zellen mindestens 100fach vermehrt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der hochdichte, Membran-gebundene CD40-Ligand auf den Zellmembranen in einer mindestens 100fach größeren Dichte vorhanden ist als auf Zellen, die CD40-Ligand natürlich exprimieren.

3. Verfahren zur Differenzierungs-Proliferation von B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Zellen, umfassend den Schritt der Kultivierung der B-Zellen in Gegenwart von einem oder mehreren Cytokinen und hochdichtem, Membran-gebundenem CD40-Ligand, wobei die Membran CD40-Ligand in einer mindestens 10fach größeren Dichte enthält, als sie auf Zellen gefunden wird, die CD40-Ligand natürlich exprimieren, und die B-Zellen mindestens 100fach vermehrt werden.

4. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die B-Zellen etwa 250fach vermehrt werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der hochdichte, Membran-gebundene CD40-Ligand produziert wird durch kultivierte Insektenzellen, die mit einem Vektor bestehend aus einer für CD40-Ligand kodierenden Nucleotidsequenz transfiziert sind.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die B-Zellen humane B-Zellen sind.

7. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Cytokine die Th2-Lymphokine sind.

8. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Cytokine rekombinante humane Interleukin-1α (IL-1α), IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-11 sind.

9. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Cytokine der Überstand von anti-CD3-stimulierten humanen peripheren Blut-T-Zellen sind.

10. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die B-Zellen während der Proliferation in Gegenwart eines Antigens inkubiert werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Antigen während der Ruhephase eines mehrstufigen Kultivierungsverfahrens zugegeben wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Antigen kovalent an die Membran, die den hochdichten, Membran-gebundenen CD40-Liganden enthält, gebunden ist.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Murin

```
CTTTCAGTCA GC ATG ATA GAA ACA TAC AGC CAA CCT TCC CCC AGA TCC
              Met Ile Glu Thr Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ser

GTG GCA ACT GGA CTT CCA GCG AGC ATG AAG ATT TTT ATG TAT TTA CTT
Val Ala Thr Gly Leu Pro Ala Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu

ACT GTT TTC CTT ATC ACC CAA ATG ATT GGA TCT GTG CTT TTT GCT GTG
Thr Val Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Val Leu Phe Ala Val
              TM

TAT CTT CAT AGA AGA TTG GAT AAG GTC GAA GAG GAA GTA AAC CTT CAT
Tyr Leu His Arg Arg Leu Asp Lys Val Glu Glu Glu Val Asn Leu His

GAA GAT TTT GTA TTC ATA AAA AAG CTA AAG AGA TGC AAC AAA GGA GAA
Glu Asp Phe Val Phe Ile Lys Lys Leu Lys Arg Cys Asn Lys Gly Glu

GGA TCT TTA TCC TTG CTG AAC TGT GAG GAG ATG AGA AGG CAA TTT GAA
Gly Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Met Arg Arg Gln Phe Glu

GAC CTT GTC AAG GAT ATA ACG TTA AAC AAA GAA GAG AAA AAA GAA AAC
Asp Leu Val Lys Asp Ile Thr Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Glu Asn

AGC TTT GAA ATG CAA AGA GGT GAT GAG GAT CCT CAA ATT GCA GCA CAC
Ser Phe Glu Met Gln Arg Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His

GTT GTA AGC GAA GCC AAC AGT AAT GCA GCA TCC GTT CTA CAG TGG GCC
Val Val Ser Glu Ala Asn Ser Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala

AAG AAA GGA TAT TAT ACC ATG AAA AGC AAC TTG GTA ATG CTT GAA AAT
Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu Asn

GGG AAA CAG CTG ACG GTT AAA AGA GAA GGA CTC TAT TAT GTC TAC ACT
Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr

CAA GTC ACC TTC TGC TCT AAT CGG GAG CCT TCG AGT CAA CGC CCA TTC
Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe

ATC GTC GGC CTC TGG CTG AAG CCC AGC ATT GGA TCT GAG AGA ATC TTA
Ile Val Gly Leu Trp Leu Lys Pro Ser Ile Gly Ser Glu Arg Ile Leu
```

FIG 1A

```
CTC AAG GCG GCA AAT ACC CAC AGT TCC TCC CAG CTT TGC GAG CAG CAG
Leu Lys Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu Cys Glu Gln Gln

TCT GTT CAC TTG GGC GGA GTG TTT GAA TTA CAA GCT GGT GCT TCT GTG
Ser Val His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val

TTT GTC AAC GTG ACT GAA GCA AGC CAA GTG ATC CAC AGA GTT GGC TTC
Phe Val Asn Val Thr Glu Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe
                          ---CHO-----
TCA TCT TTT GGC TTA CTC AAA CTC TGAACAGTGC GCTGTCCTAG GCTGCA      818
Ser Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu END                               260
```

Human

```
CCATTTCAAC TTTAACACAG C ATG ATC GAA ACA TAC AAC CAA ACT TCT CCC
                       Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro
                          ---CHO-----
CGA TCT GCG GCC ACT GGA CTG CCC ATC AGC ATG AAA ATT TTT ATG TAT
Arg Ser Ala Ala Thr Gly Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr

TTA CTT ACT GTT TTT CTT ATC ACC CAG ATG ATT GGG TCA GCA CTT TTT
Leu Leu Thr Val Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe
          TM
GCT GTG TAT CTT CAT AGA AGG TTG GAC AAG ATA GAA GAT GAA AGG AAT
Ala Val Tyr Leu His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn

CTT CAT GAA GAT TTT GTA TTC ATG AAA ACG ATA CAG AGA TGC AAC ACA
Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr

GGA GAA AGA TCC TTA TCC TTA CTG AAC TGT GAG GAG ATT AAA AGC CAG
Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln

TTT GAA GGC TTT GTG AAG GAT ATA ATG TTA AAC AAA GAG GAG ACG AAG
Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys

AAA GAA AAC AGC TTT GAA ATG CAA AAA GGT GAT CAG AAT CCT CAA ATT
Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile

GCG GCA CAT GTC ATA AGT GAG GCC AGC AGT AAA ACA ACA TCT GTG TTA
Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu
```

FIG.1B

```
CAG TGG GCT GAA AAA GGA TAC TAC ACC ATG AGC AAC AAC TTG GTA ACC
Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr

CTG GAA AAT GGG AAA CAG CTG ACC GTT AAA AGA CAA GGA CTC TAT TAT
Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr

ATC TAT GCC CAA GTC ACC TTC TGT TCC AAT CGG GAA GCT TCG AGT CAA
Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln

GCT CCA TTT ATA GCC AGC CTC TGC CTA AAG TCC CCC GGT AGA TTC GAG
Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu

AGA ATC TTA CTC AGA GCT GCA AAT ACC CAC AGT TCC GCC AAA CCT TGC
Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys

GGG CAA CAA TCC ATT CAC TTG GGA GGA GTA TTT GAA TTG CAA CCA GGT
Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly

GCT TCG GTG TTT GTC AAT GTG ACT GAT CCA AGC CAA GTG AGC CAT GGC
Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly
                  --- CHO ---
ACT GGC TTC ACG TCC TTT GGC TTA CTC AAA CTC TGAACAGTGT CACCTTGCAG
Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu END                    261

GCTGTGGTGG AGCTGA                                                  840
```

FIG. 1C

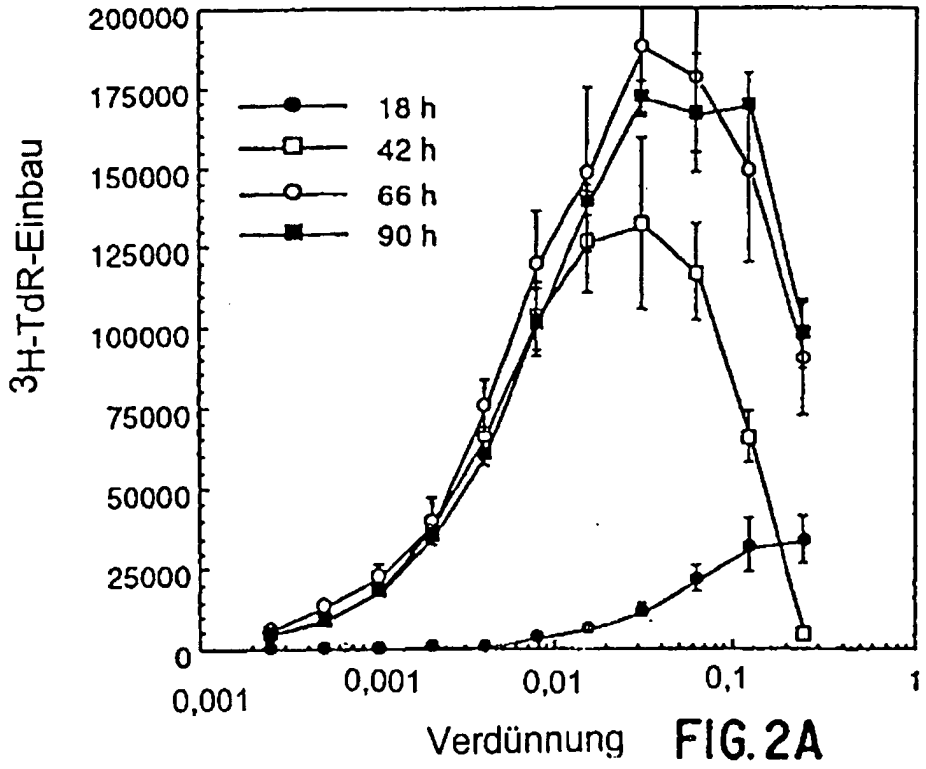

200000
175000
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
3H-TdR-Einbau
18 h
42 h
66 h
90 h
0,001
0,01
0,1
1
Verdünnung

FIG. 2A

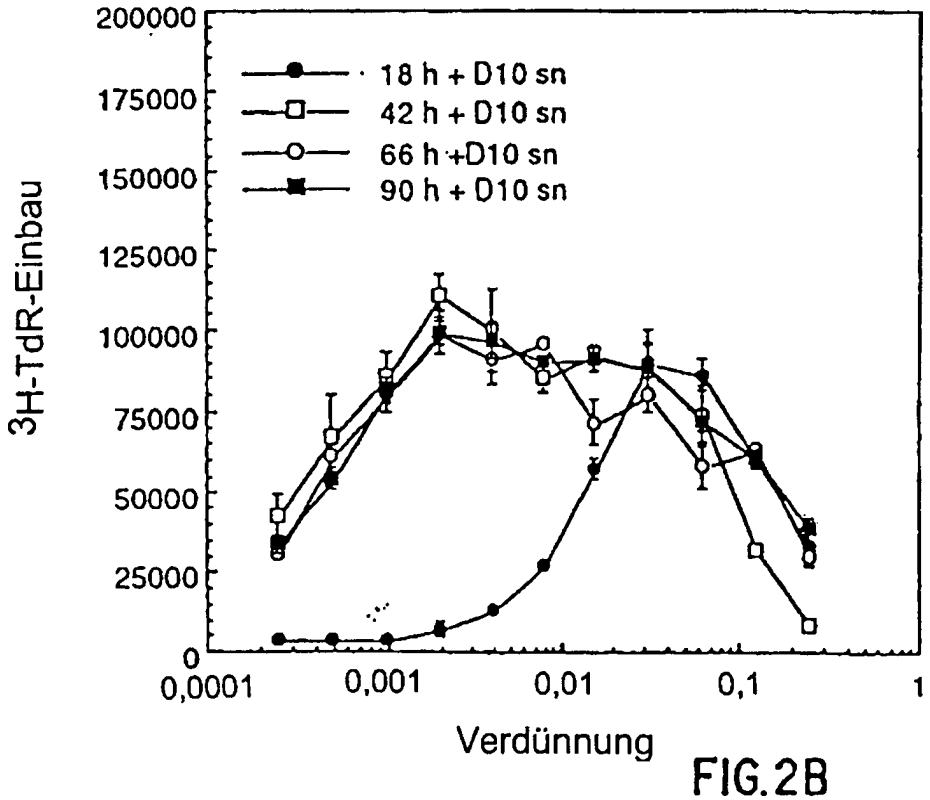

200000
175000
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
3H-TdR-Einbau
18 h + D10 sn
42 h + D10 sn
66 h +D10 sn
90 h + D10 sn
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
Verdünnung

FIG. 2B

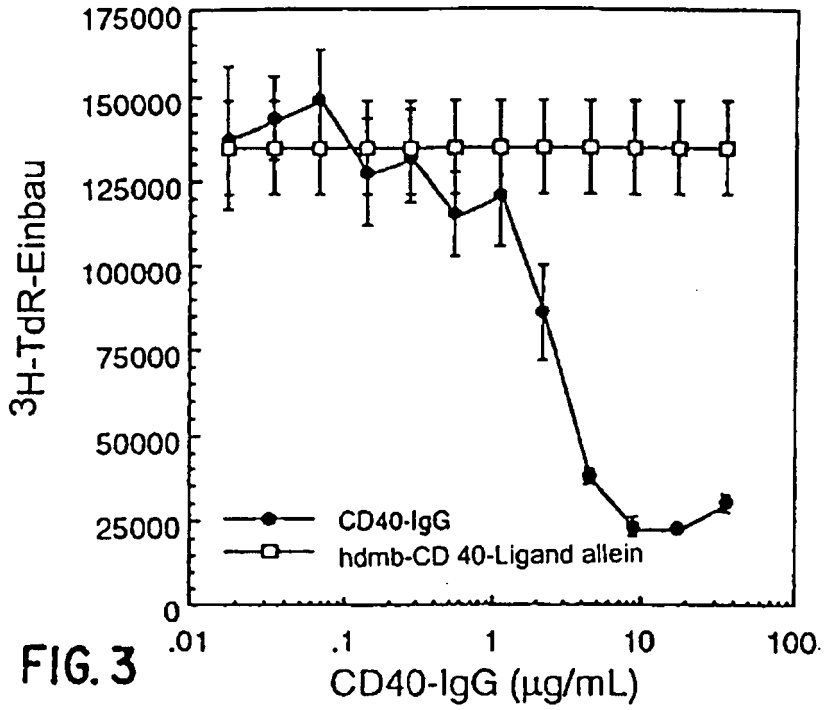

175000
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
3H-TdR-Einbau
CD40-IgG
hdmb-CD 40-Ligand allein
.01
.1
1
10
100
CD40-IgG (µg/mL)

FIG. 3

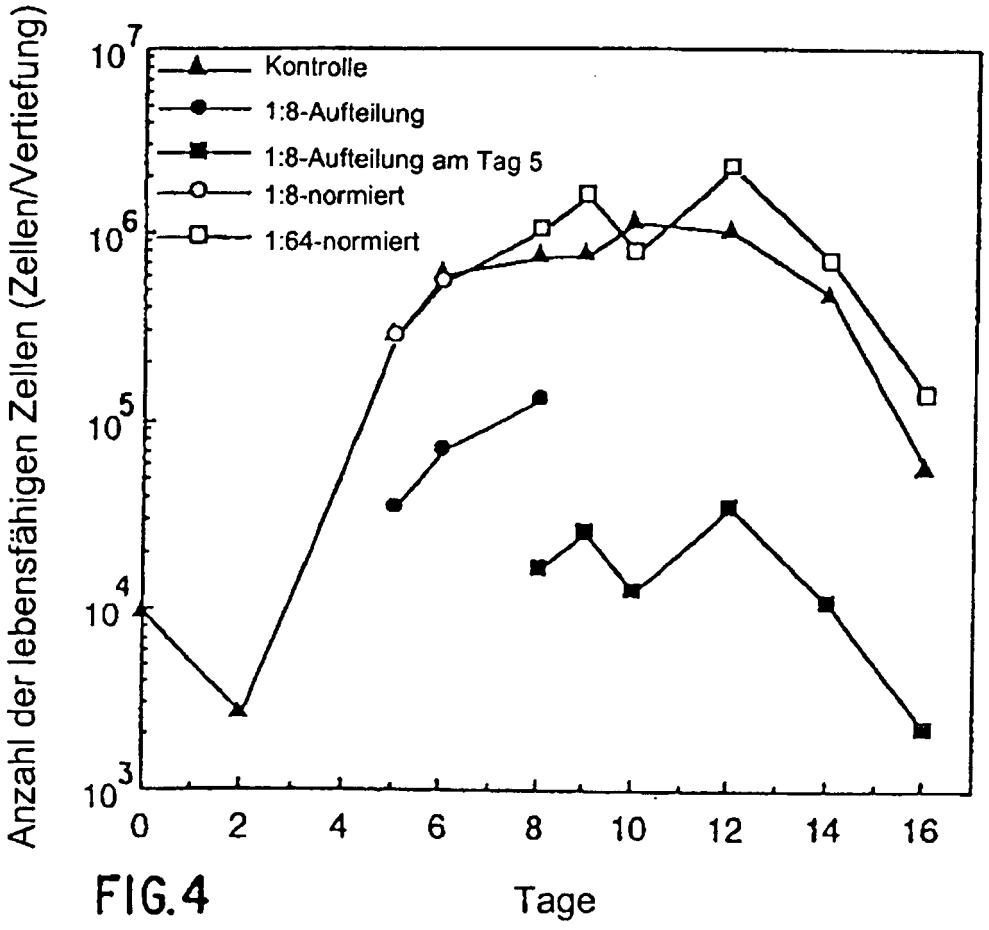

Anzahl der lebensfähigen Zellen (Zellen/Vertiefung)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
Kontrolle
1:8-Aufteilung
1:8-Aufteilung am Tag 5
1:8-normiert
1:64-normiert
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tage

FIG. 4

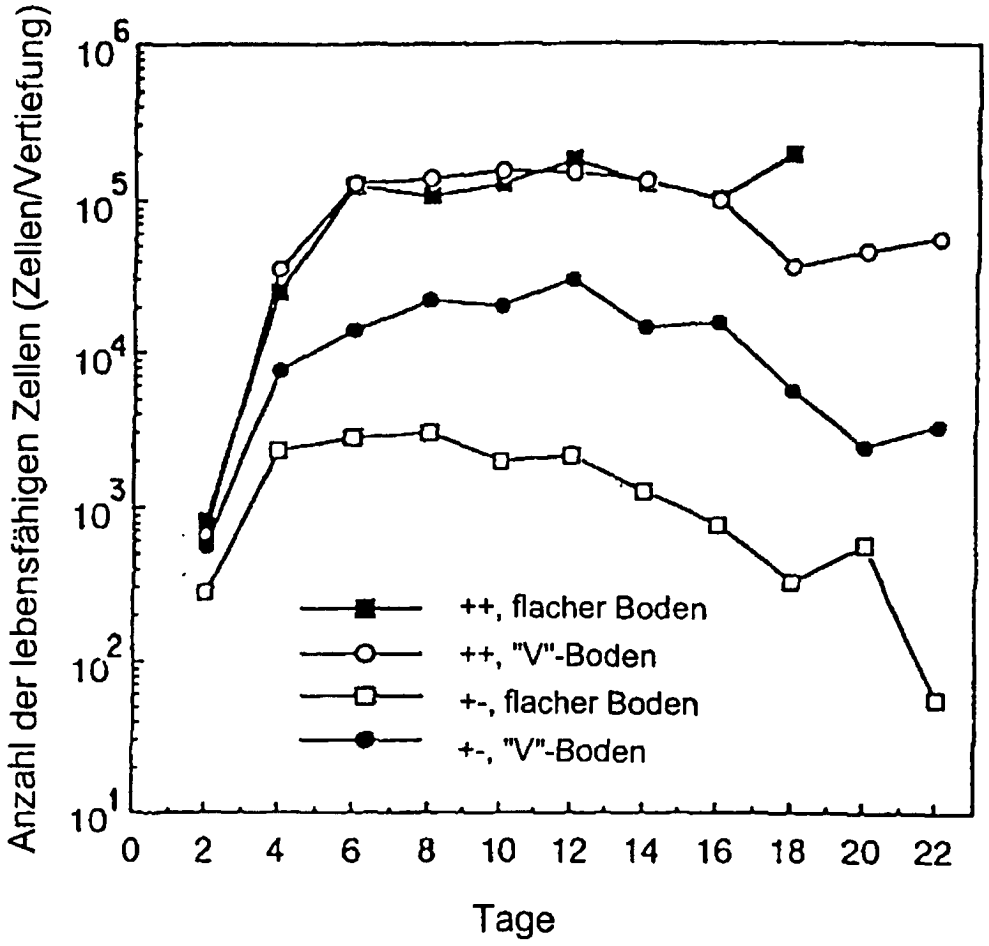

Anzahl der lebensfähigen Zellen (Zellen/Vertiefung)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Tage
++, flacher Boden
++, "V"-Boden
+-, flacher Boden
+-, "V"-Boden

FIG.5

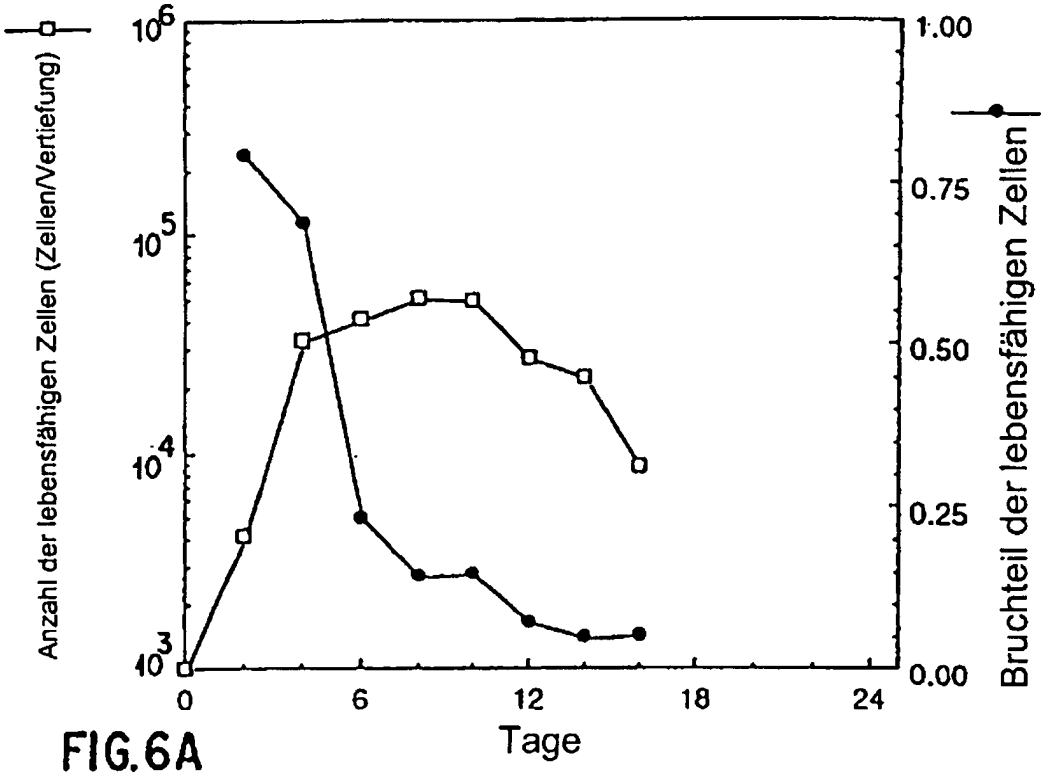

Anzahl der lebensfähigen Zellen (Zellen/Vertiefung)
Bruchteil der lebensfähigen Zellen
10^6
10^5
10^4
10^3
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
6
12
18
24
Tage

FIG.6A

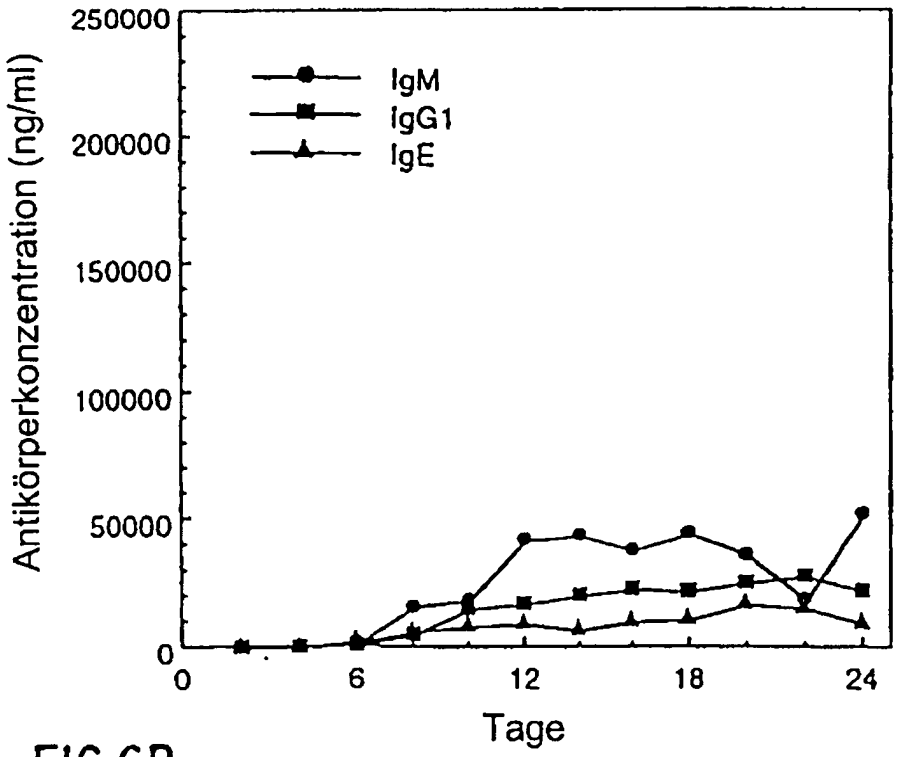

Antikörperkonzentration (ng/ml)
IgM
IgG1
IgE
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
6
12
18
24
Tage

FIG.6B

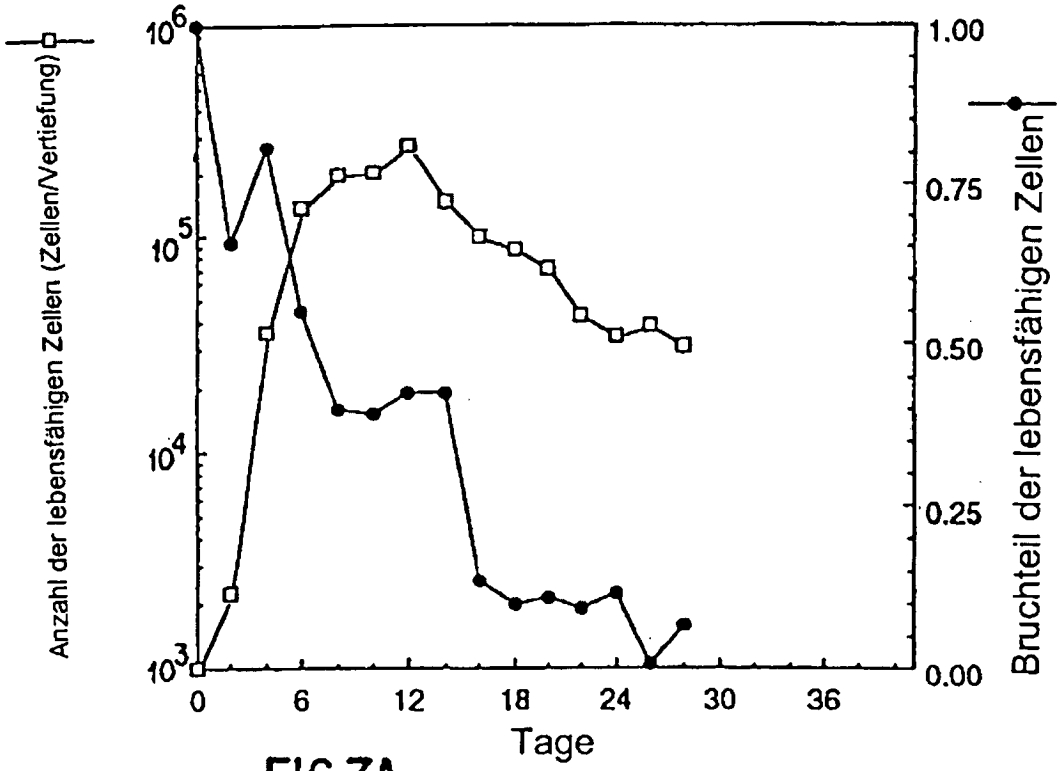

Anzahl der lebensfähigen Zellen (Zellen/Vertiefung)
Bruchteil der lebensfähigen Zellen
10^6
10^5
10^4
10^3
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
6
12
18
24
30
36
Tage

FIG.7A

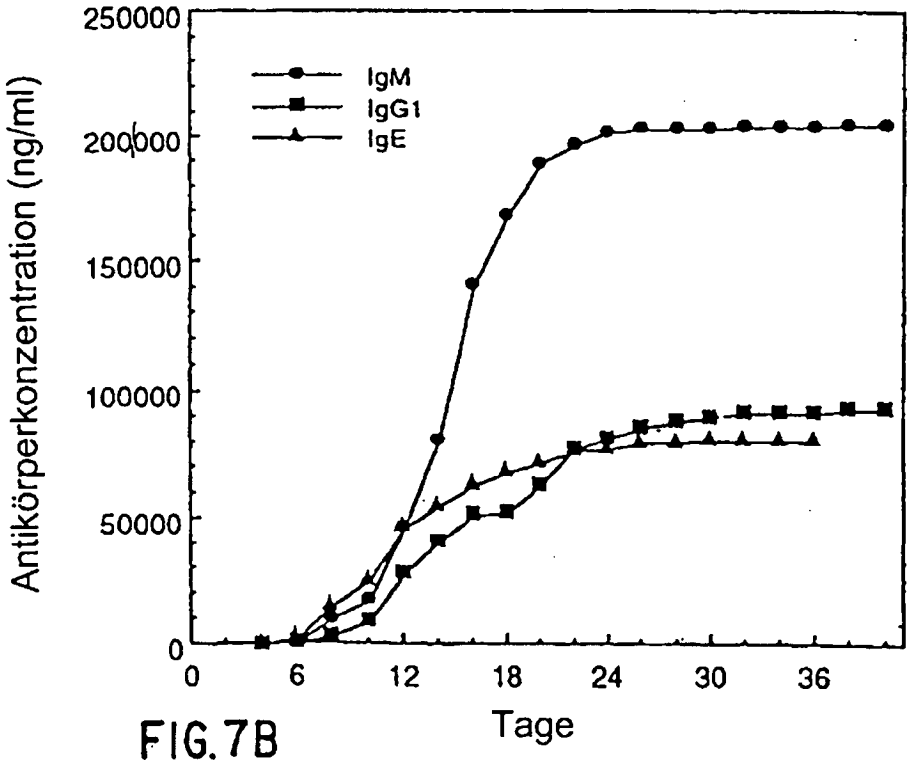

Antikörperkonzentration (ng/ml)
IgM
IgG1
IgE
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
6
12
18
24
30
36
Tage

FIG.7B

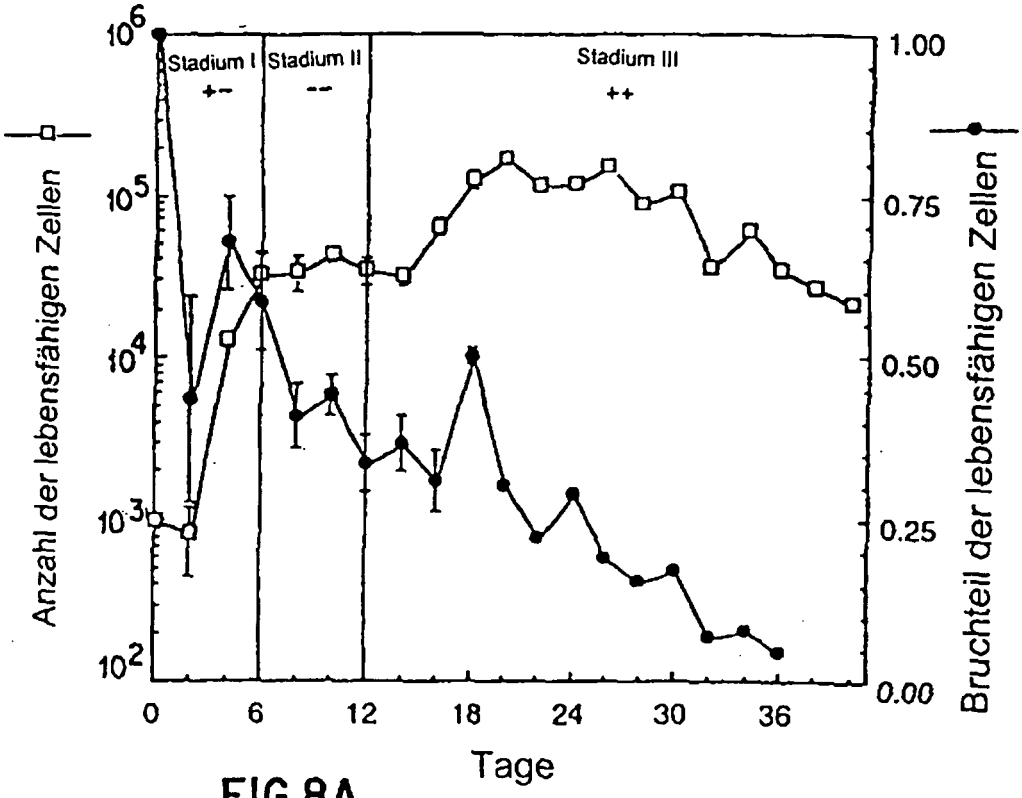

Stadium I
+-
Stadium II
--
Stadium III
++
Anzahl der lebensfähigen Zellen
Bruchteil der lebensfähigen Zellen
Tage

FIG.8A

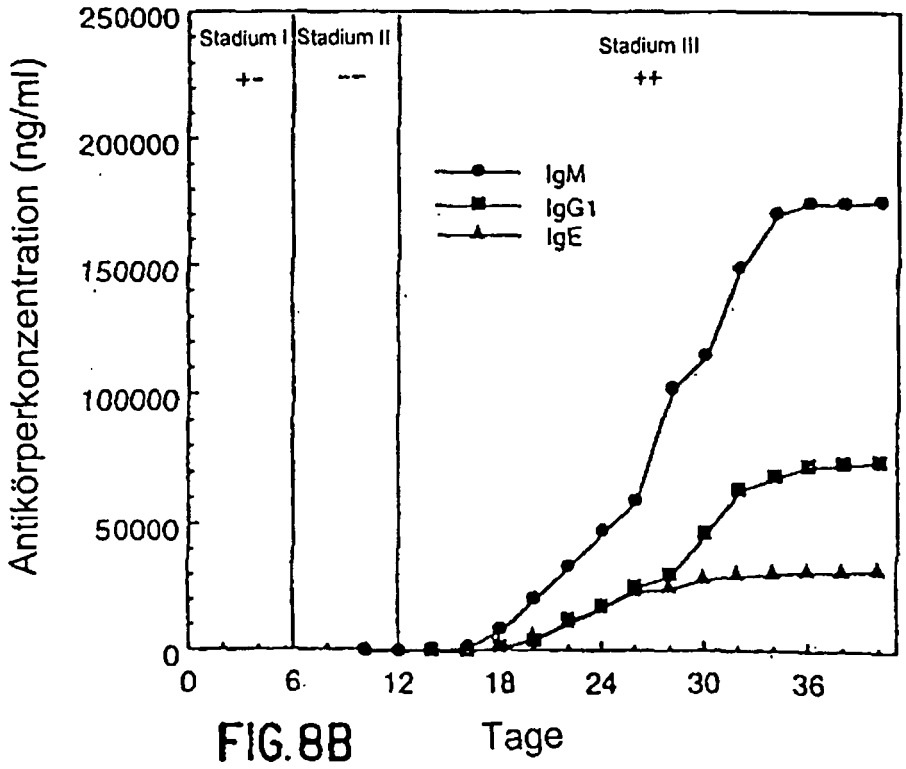

Stadium I
+-
Stadium II
--
Stadium III
++
IgM
IgG1
IgE
Antikörperkonzentration (ng/ml)
Tage

FIG.8B

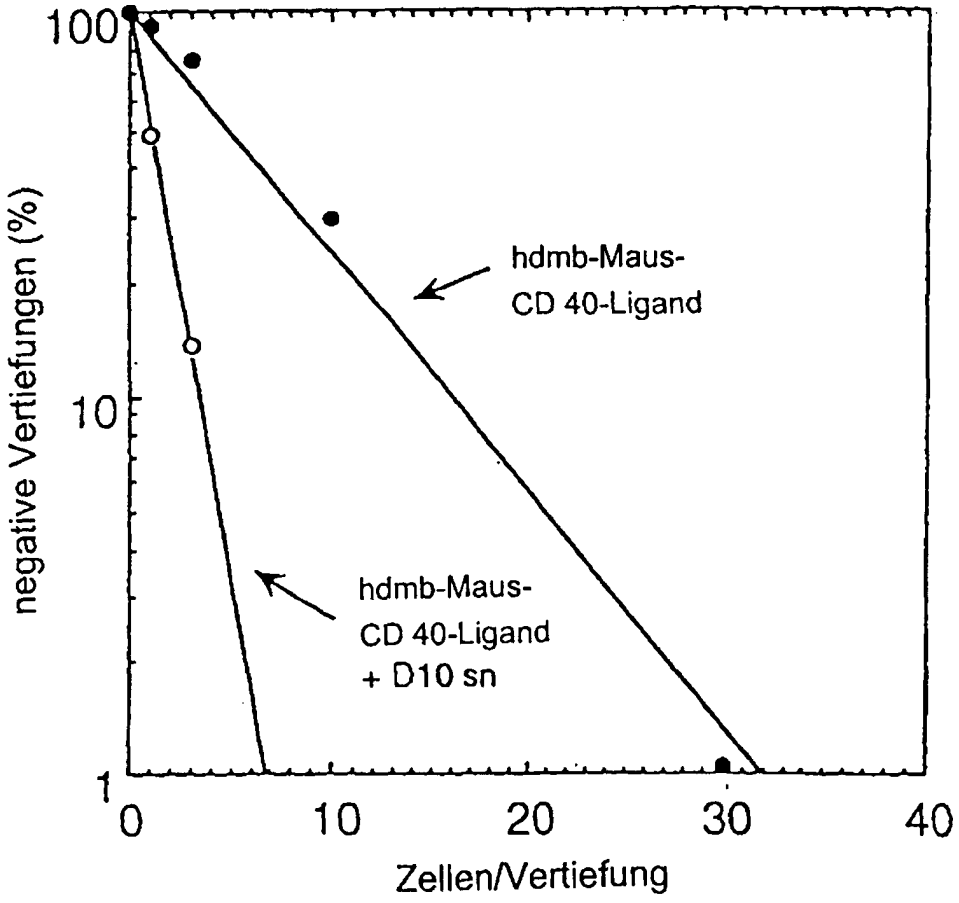

100
10
1
negative Vertiefungen (%)
0
10
20
30
40
Zellen/Vertiefung
hdmb-Maus-
CD 40-Ligand
hdmb-Maus-
CD 40-Ligand
+ D10 sn

FIG. 9

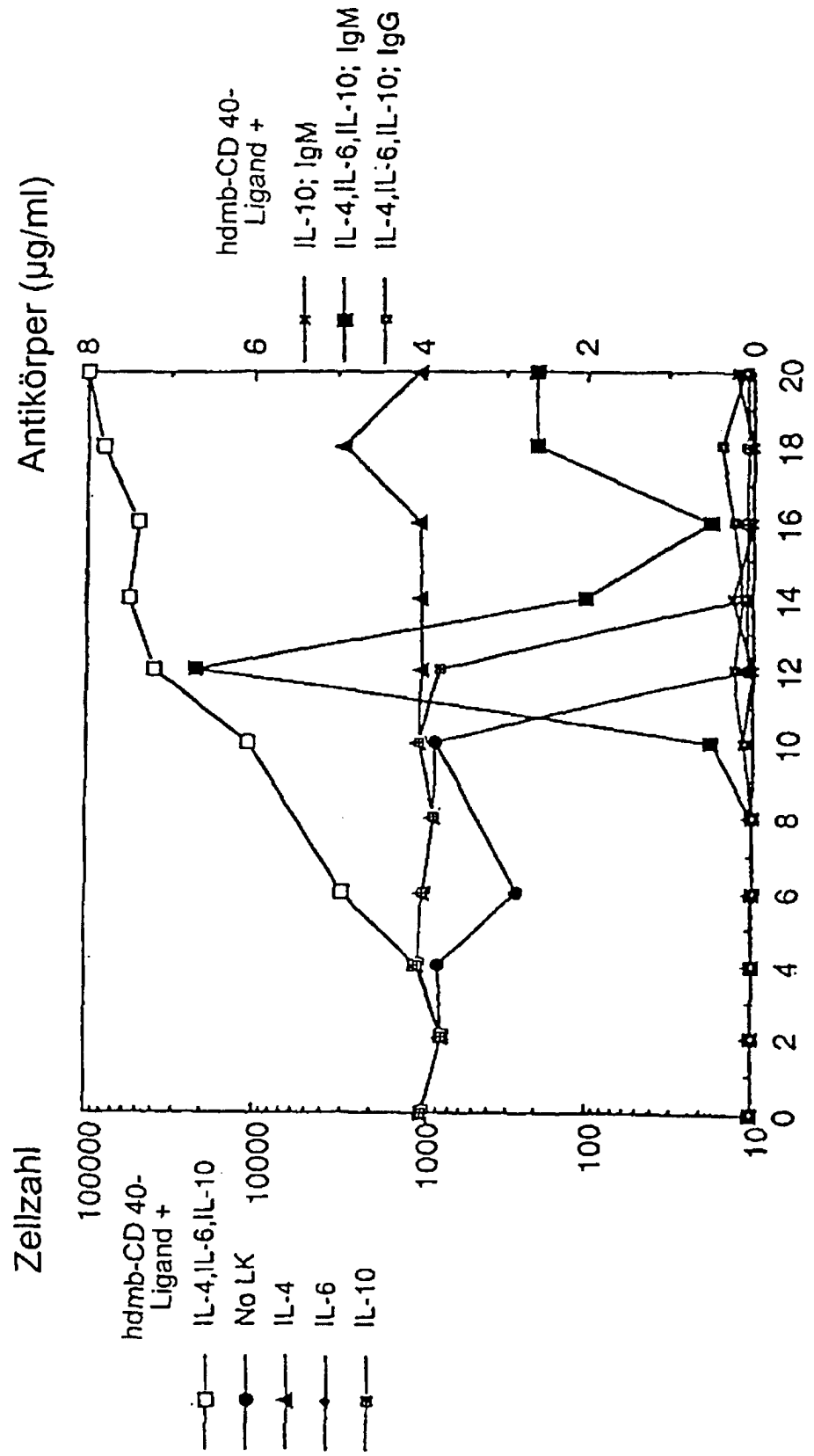

Zellzahl
Antikörper (µg/ml)
Tage
hdmb-CD 40-Ligand +
IL-4,IL-6,IL-10
No LK
IL-4
IL-6
IL-10
hdmb-CD 40-Ligand +
IL-10; IgM
IL-4,IL-6,IL-10; IgM
IL-4,IL-6,IL-10; IgG
100000
10000
1000
100
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20

FIG. 10

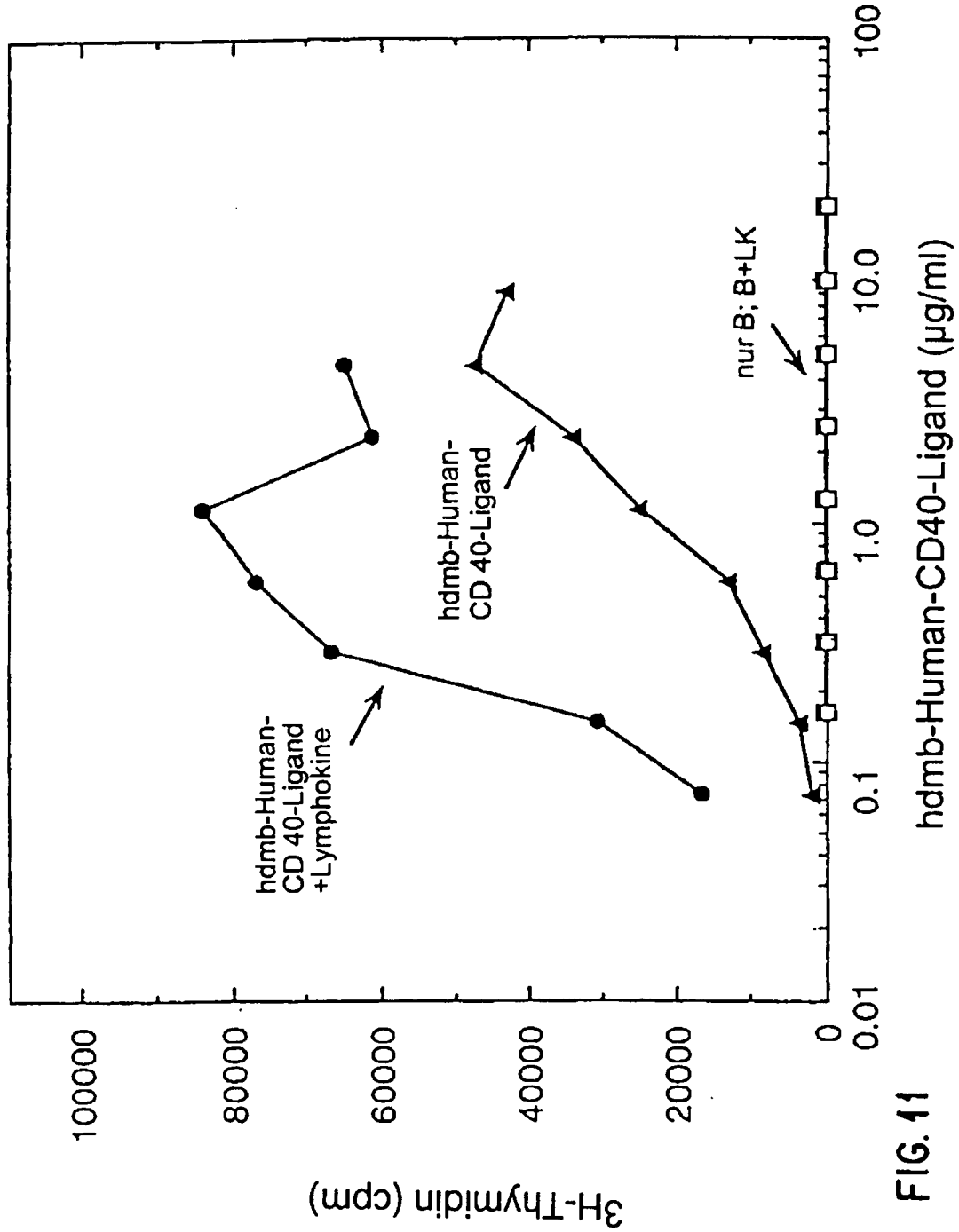

3H-Thymidin (cpm)
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1.0
10.0
100
hdmb-Human-CD40-Ligand (µg/ml)
hdmb-Human-CD 40-Ligand +Lymphokine
hdmb-Human-CD 40-Ligand
nur B; B+LK

FIG. 11

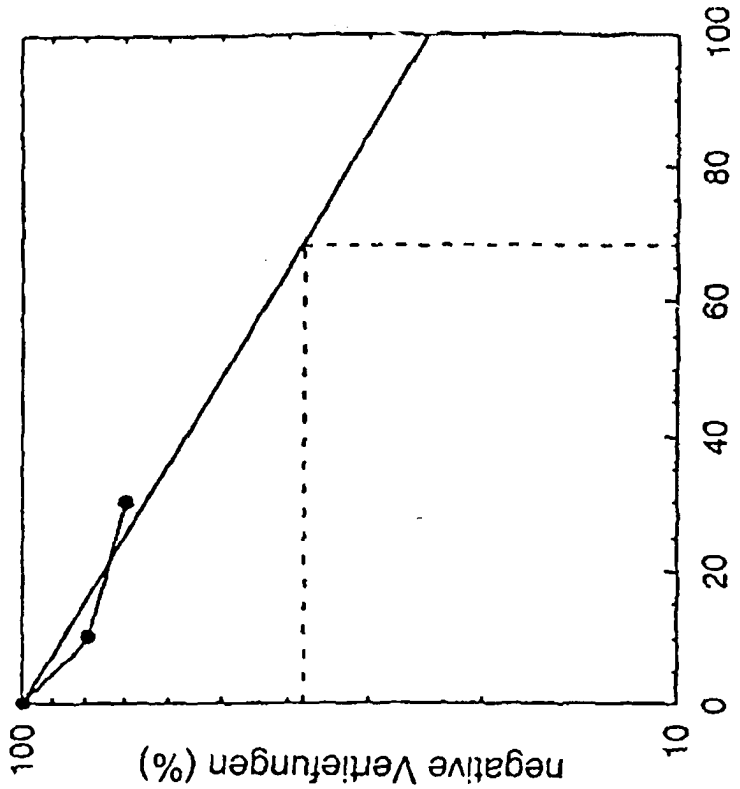


FIG.12B

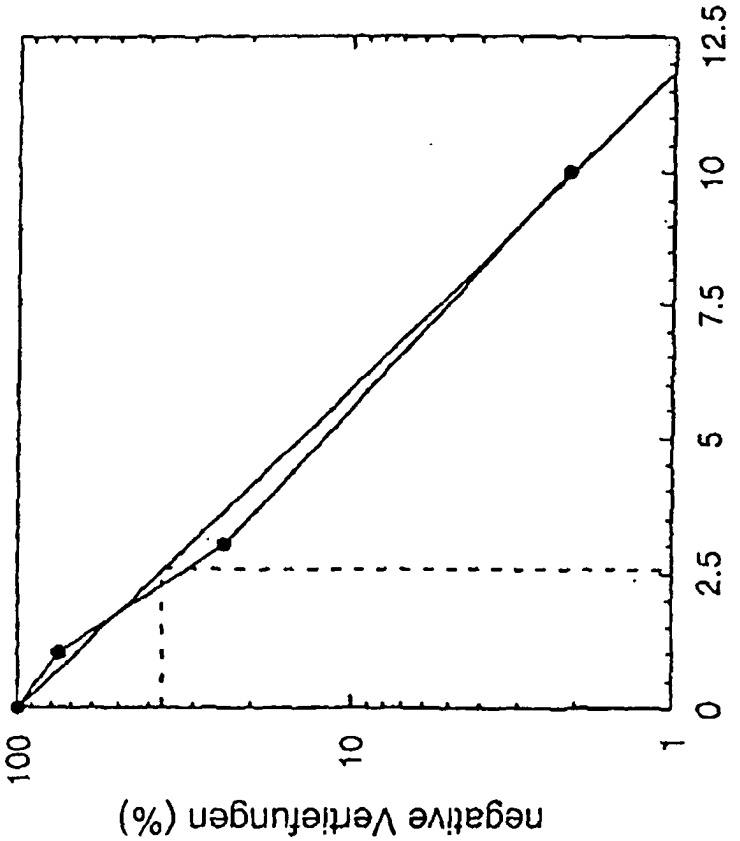


FIG.12A

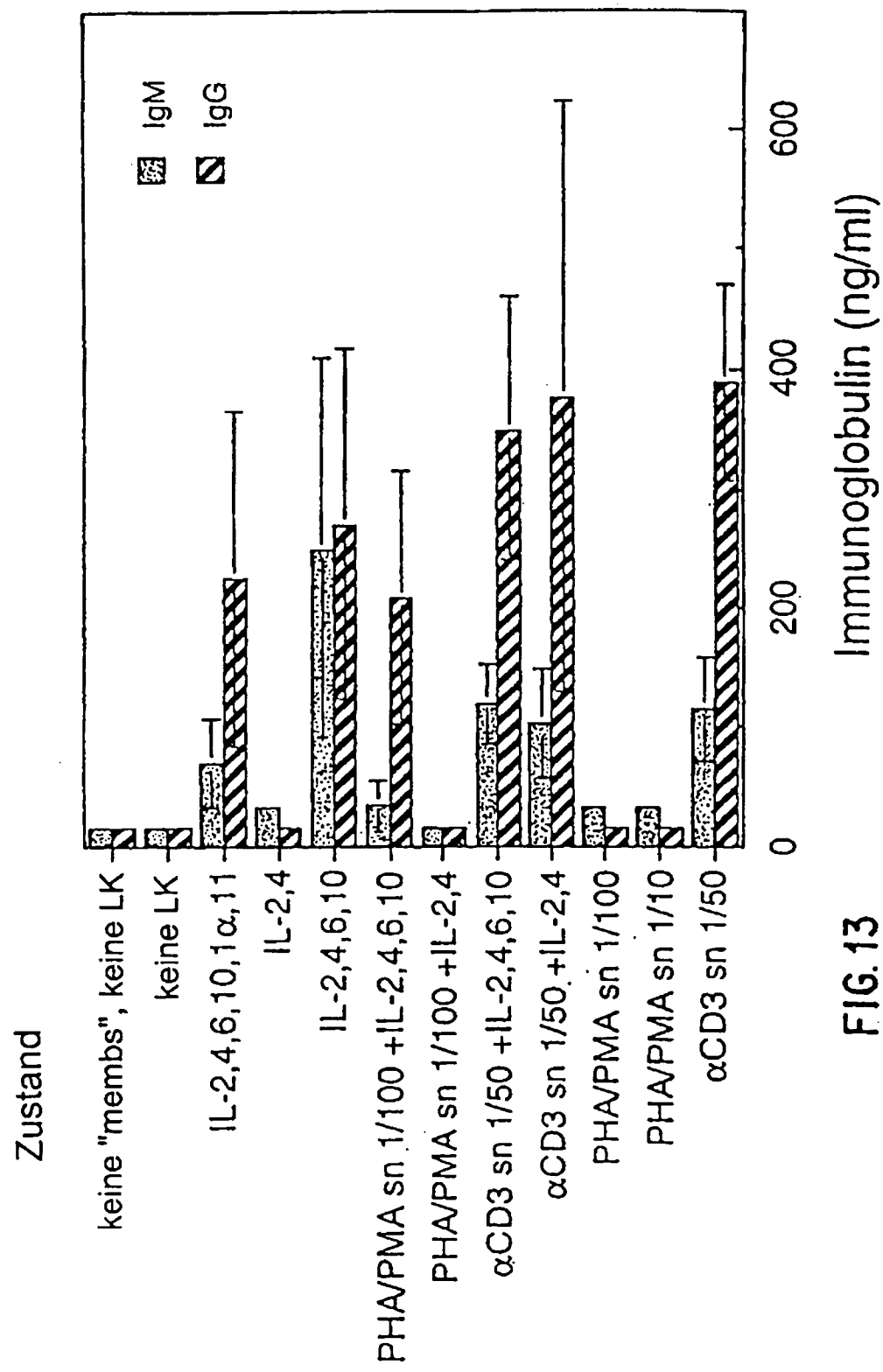

IgM
IgG
Zustand
keine "membs", keine LK
keine LK
IL-2,4,6,10,1α,11
IL-2,4
IL-2,4,6,10
PHA/PMA sn 1/100 +IL-2,4,6,10
PHA/PMA sn 1/100 +IL-2,4
αCD3 sn 1/50 +IL-2,4,6,10
αCD3 sn 1/50 +IL-2,4
PHA/PMA sn 1/100
PHA/PMA sn 1/10
αCD3 sn 1/50
0
200
400
600
Immunoglobulin (ng/ml)

FIG. 13

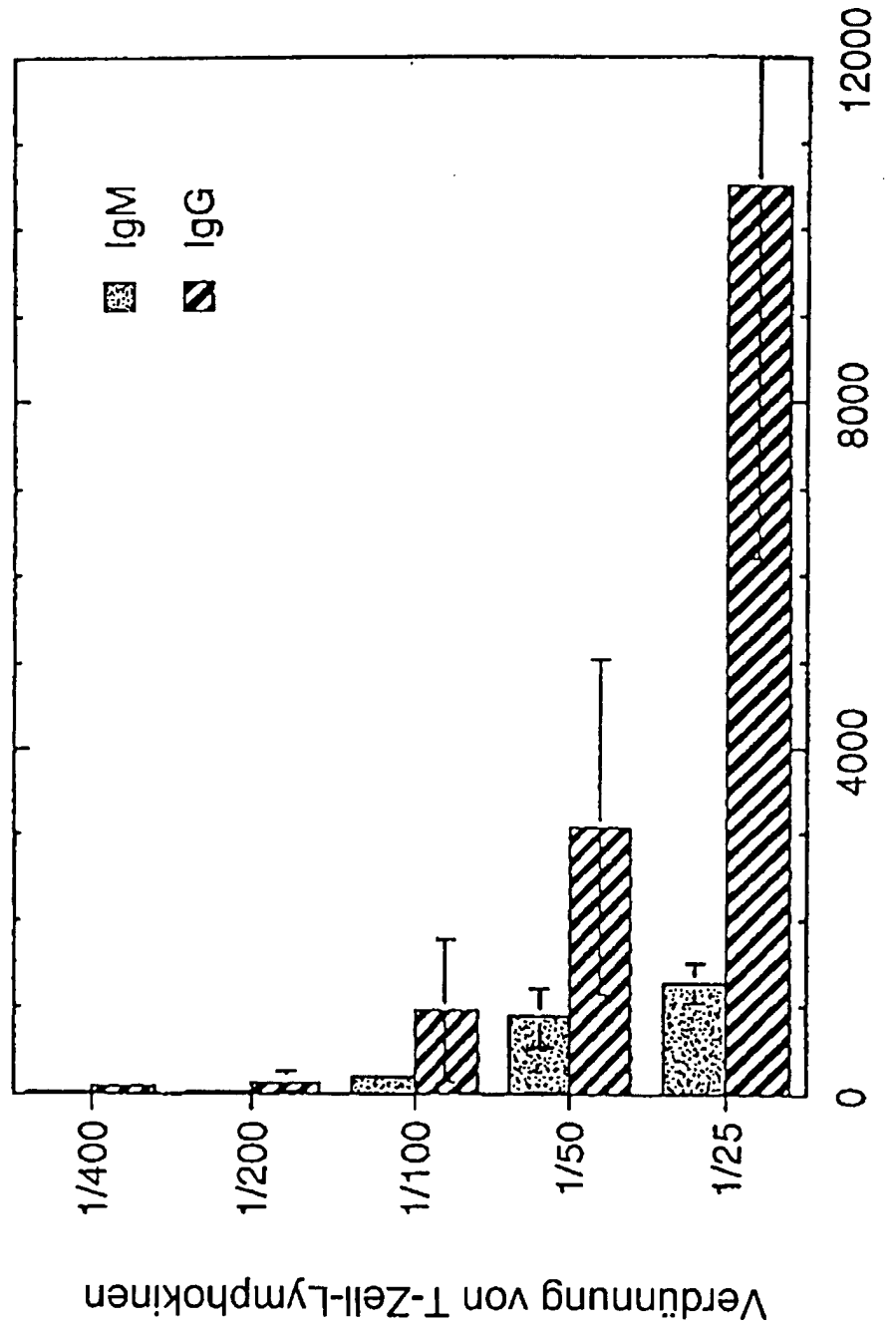

IgM
IgG
0
4000
8000
12000
Immunoglobulin (ng/ml)
1/400
1/200
1/100
1/50
1/25
Verdünnung von T-Zell-Lymphokinen

FIG.14

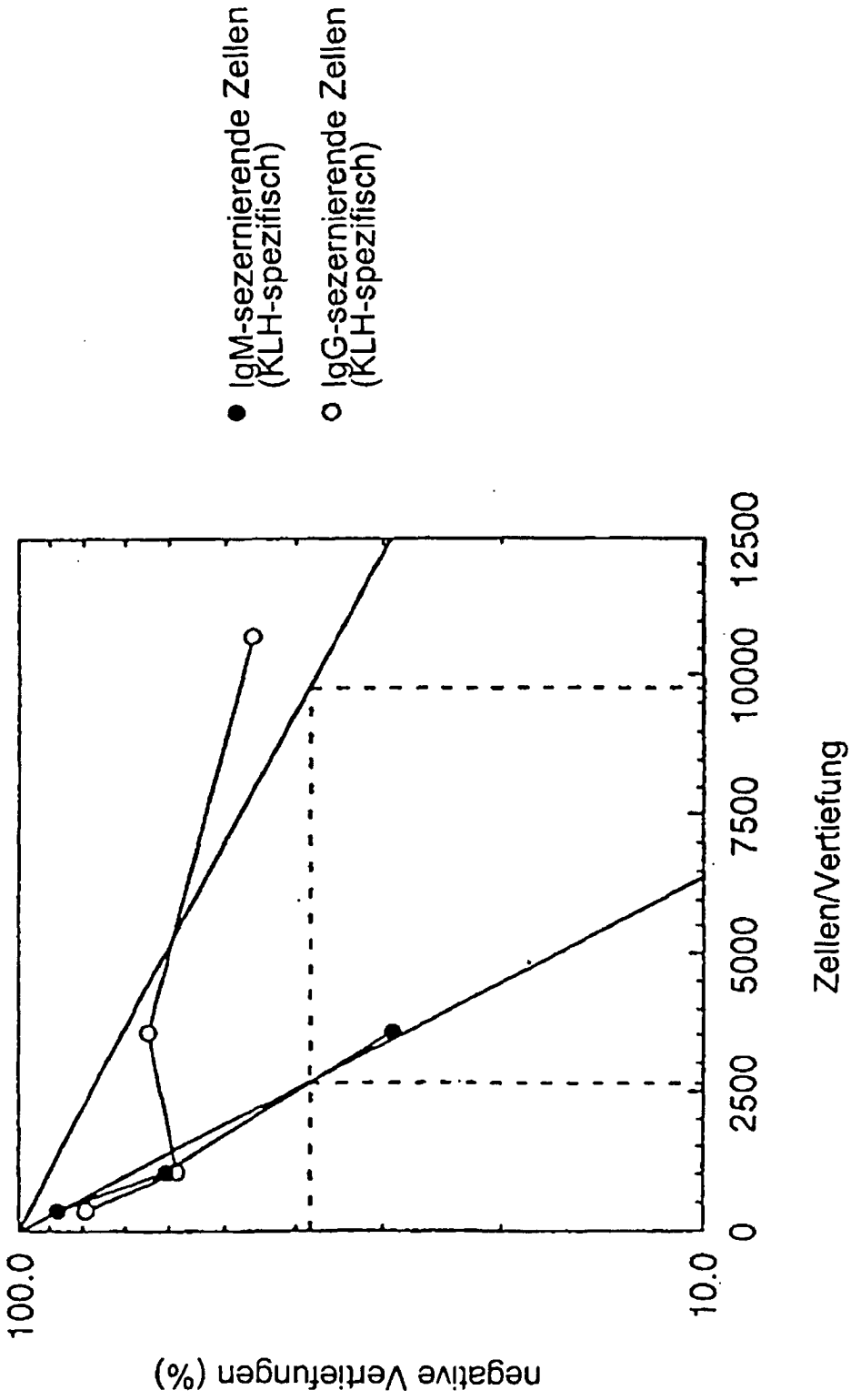

● IgM-sezernierende Zellen (KLH-spezifisch)
○ IgG-sezernierende Zellen (KLH-spezifisch)
100.0
10.0
negative Vertiefungen (%)
0
2500
5000
7500
10000
12500
Zellen/Vertiefung

FIG. 15