



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **316024**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 07 K 19/00, 14/725, 16/28

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19930521	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1993.02.12	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	1993.02.12	(30) Prioritet	1992.02.14, US, 835799
(41) Alm. tilgj.	1993.08.16		
(45) Meddelt dato	2003.12.01		
(83) Mikroorganisme deponert: ATCC nr. HB11048			

(71) Patenthaver	Bristol-Myers Squibb Co, 345 Park Avenue, New York, NY 10154, US Trustees of Dartmouth College, 6210 Raven House, Hanover, NH 03755, US The General Hospital Corp, 55 Fruit Street, Warren 408, Boston, MA 02108, US
(72) Oppfinner	Alejandro A. Aruffo, Edmonds, WA, US Jeffrey A. Ledbetter, Seattle, WA, US Randolph Noelle, Plainfield, NH, US Ivan Stamenkovic, Brookline, MA, US
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Fusjonsprotein og antistoff som spesifikt binder til CD40CR**

(56) Anførte publikasjoner Aruffo et al., Cell, 1990, 61:1303-1313
Stamenkovic et al., Embo J. 1989, 8:1403-1410
Dillman, Annals of Int.Med., 1989, 111:592-603

(57) Sammendrag

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en mot-reseptor betegnet CD40CR for CD40 B-celleantigenet og løselige ligander for denne reseptor inklusive fusjonsmolekyler som består av minst en del av CD40 protein. Den er i det minste delvis basert på oppdagelsen at et løselig CD40/immunglobulin fusjonsprotein var istand til å hemme hjelpe-T-celle formidlet B-celle aktivering ved å binde til en ny 39kD proteinreseptor på hjelpe-T-cellemembraner. Den foreliggende oppfinnelsen omfatter en vesentlig rensset CD40CR reseptor, løselig ligander for CD40CR, inklusive antistoffer såvel som fusjonsmolekyler som består av i det minste en del av CD40 protein; og fremgangsmåter for å kontrollere B-celleaktivering, hvilket kan være spesielt anvendbart ved behandling av allergi eller autoimmun sykdom.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et fusjonsprotein og antistoff som spesifikt binder til CD40CR-reseptoren for CD40 B-celleantigen. Det er i det minste delvis basert på oppdagelsen at et løselig CD40/immunoglobulin fusjonsprotein var i stand til å hjelpe T-celle formidlet B-celleaktivering ved binding til en ny 39 kD proteinreseptor på T-celle membraner. Den foreliggende oppfinnelse omfatter et i det vesentlige rensset cellefritt fusjonsprotein som består av i det minste en del av CD40-protein, og antistoffer eller fragment derav som spesifikt binder til mus-CD40CR, et 39 kD mus-T-celleprotein som binder til CD40 B-celleantigenet.

Studier av Mitchison, Benacerraf og Raff antydte først at fysisk vekselvirkning mellom T_H og B-celler var vesentlig i utviklingen av humorale immunreaksjoner. Senere studier underbygget at T_H dannet fysiske konjugater med klasse II hovedvevsforlikighetskompleks (MHC) forenlige, antigen-presenterende B-celler (Vitetta et al., (1987) Immunol Rev 99 193-239) og at det var B-cellene i disse konjugatene som svarte på T_H (Bartlett et al., (1989) J Immunol 143 1745-1754). Med oppdagelsen at T_H -avlede lymfokiner viste kraftig vekst og differensieringseffekter overfor B-celler, ble det foreslått at løselig(e) faktor(er) friggitt i nærheten av aktivert T_H formidlet aktiveringen av den reagerende B-celle. Imidlertid viste ingen av de molekylært klonede lymfokinene, alene eller i kombinasjon, evne til å stimulere B-syklusinngang. Til forskjell fra løselige faktorer, stimulerte plasmamembranfraksjoner fra aktiverte T_H B-cellesyklusinngang (Hodgkin et al., (1990) J Immunol 145 2025-2043, Noelle et al., (1991) J Immunol 146 1118-1124). Studier som benyttet rensede plasmamembranfraksjoner fra aktivert T_H antydte at et protein som var uttrykt på membranen av aktivert T_H var ansvarlig for igangsettingen av humoral immunitet (Noelle et al., (1991) J Immunol 146 1118-1124, Bartlett et al., (1990) J Immunol 145 3956-3962).

Rensede membraner fra aktivert T_H (PM^{Act}) har vært benyttet for å undersøke opphavet til denne effektorfunksjon (Hodgkin et al. (1990) J Immunol 145 2025-2034, Noelle et al., (1991) J Immunol 146 1118-1124). PM^{Act} fra aktivert T_H , men ikke-hvilende T_H (PM^{rest}) uttrykte en aktivitet som stimulerte B-

celle syklusinngang på en antigen, ikke-spesifikk, klasse II ikke-begrenset måte. I tillegg ble det vist at aktiviteten som var uttrykt av PM^{Act} krever 4 - 6 timer for aktivering, *de novo* RNA-syntese og var av natur lik protein (Bartlett et al., (1990) J Immunol 145 3956-3962)

5 Den foreliggende oppfinnelse vedrører løselige ligander for CD40CR-reseptoren, inklusive fusjonsproteiner som omfatter minst en del av CD40-protein. Den er i det minste delvis basert på oppdagelsen at et løselig CD40-immunglobulinfusjonsprotein var i stand til å hemme hjelpe-T-celle-formidlet B-celleaktivering ved å binde til et nytt 39 kD reseptorprotein (betegnet "CD40CR" for CD40 mot-reseptor) på hjelpe-T-cellemembran, og på oppdagelsen at et
10 monoklonalt antistoff betegnet MR1, rettet mot denne 39 kD reseptor, var i stand til å hemme T-celle formidlet aktivering av B-celler.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer vesentlig renset cellefritt fusjonsprotein som spesifikt binder til CD40CR, som består av minst en del av
15 CD40-protein inklusive antistoffer.

B-celleaktivering hos en person kan bli hemmet ved å la hjelpe-T-celler fra personen komme i kontakt med effektive mengder av en løselig ligand for CD40CR. Slik hemming av B-celleaktivering kan være spesielt nyttig i
behandlingen av allergi eller autoimmun sykdom.

20 En fordel med foreliggende oppfinnelse er at den tillater å gripe inn i et område av immunresponsen som ikke er antigenspesifikt. Mange foreliggende behandlinger for allergi omfatter desensitivisering overfor spesielle antigener, og krever at hver pasient kan undersøkes for å identifisere antigener som er forbundet med sensitivitet. Som en praktisk erkjennelse, er utstrakt analyse av en
25 pasients svar overfor alle mulige allergener ganske umulig. Videre, i de fleste autoimmunsykdommer er det fremkallende antigen vanligvis ukjent eller endog irrelevant for sykdomsprosessen. Den foreliggende oppfinnelse, som vedrører antigen ikke-spesifikk CD40/CD40CR-reaksjon, forbigår behovet for å karakterisere antigenet som er forbundet med allergi eller autoimmunitet. Derfor
30 kan den foreliggende oppfinnelse bli benyttet med spesiell fordel i behandlingen av allergiske tilstander hvor immunogene ikke er kjent eller har multiple bestanddeler, f.eks. i høysnue eller i procainamid forårsaket lupus. Den kan også være nyttig i akutte behandling av immunaktivering, f.eks. i behandling av anafylaksis.

Forkortelser

Ig	immunoglobulin
mab	monoklonalt antistoff
PM ^{Act}	plasmamembraner fremstilt fra aktiverte hjelper T-celler
PM ^{rest}	plasmamembraner fremstilt fra hvilende hjelper T-celler
PAGE	polyakrylamidgel elektroforese
rIL4	rekombinant interleukin 4
rIL5	rekombinant interleukin 5
SN	supernatant
T _h	hjelper T-celle
T _h 1	refererer seg til D 1,6 en I-A ^d -begrenset kanin immunoglobulinspesifikk-klon

5 **Beskrivelse av figurene**

Figur 1 Virkning av monoklonale antistoffer og CD40-Ig på PM^{Act} stimulert B-celle RNA-syntese

Panel A Hvilende B-celler ble dyrket med PM^{rest} eller PM^{Act} fra T_h1 25 μ g/ml anti-CD4, anti-LFA-1 eller anti-ICAM-1 eller en kombinasjon av hver av disse (hver i 25 μ g/ml) ble tilsatt brønner som inneholdt PM^{Act}, og B-celle RNA-syntese ble målt ved inkorporering av [³H]-undin B-celle RNA-syntese ble målt fra 42 til 48 timer etter-kulturen Resultatene som er vist er de aritmetriske gjennomsnitt av triplikate kulturer +/- s d , og er representative for 5 eksperimenter

Panel B Hvilende B-celler ble dyrket med PM^{Act} fra T_h1 (●, ▲) eller T_h2 (□) Til T_h1-PM^{Act} inneholdende kulturer (●,▲), ble økende mengder av CD40-Ig (▲) eller kontrollprotein CD7E-Ig (●) tilsatt Til T_h2-PM^{Act} inneholdende kultur (□),

ble økende mengder CD40-Ig tilsatt B-celle RNA-syntese ble målt fra 42 til 48 timer etter kulturen. Resultatene som er vist er de aritmetriske gjennomsnitt av triplikate kulturer +/- s.d., og er representative for 3 eksperimenter.

Panel C Hvilende B-celler ble dyrket med LPS (50 µg/ml) eller PMA^{Act}. Til kulturene, ble CD40-Ig (25 µg/ml, skravert) eller CD7E-Ig (25 µg/ml, helfarget) tilsatt. RNA-syntese ble bestemt som beskrevet i panel A. Resultatene ble presentert som de aritmetriske gjennomsnitt av triplikate kulturer +/- s.d., og er representative for 3 eksperimenter.

Figur 2 CD40-Ig hemmet B-celle differensiering og vekst

Panel A Hvilende B-celler ble dyrket med PMA^{Act}, rIL4 (10 ng/ml) og rIL5 (5 ng/ml). Enten ved starten av kulturen, eller på dagene 1, 2 eller 3 etter start-kulturen, ble CD40-Ig eller CD7E-Ig (25 µg/ml) tilsatt. På dag seks av kulturen, ble SN fra individuelle brønner høstet og kvantitet for IgM (■) og IgG₁ (●) ved bruk av anti-isotype spesifikke ELISA, som beskrevet i (Noelle et al., (1991) J Immunol 146 1118-1124). I nærvær av PMA^{Act}, var IL4 og IL5, (i fravær av tilsatt CD40-Ig) konsentrasjonene av IgM og IgG₁ henholdsvis 4,6 µg/ml og 126 ng/ml. Kulturene som mottok CD7E-Ig (25 µg/ml) på dag 0 laget henholdsvis 2,4 µg/ml og 89 ng/ml og IgM og IgG₁. I fraværet av IL4 og IL5, ble ikke noe IgM eller IgG₁ påvist. Resultatene er representative for 3 slike eksperimenter.

Panel B T_H1 ble hvilt eller aktivert med anti-CD3 i 16 timer, bestrålt og dyrket (1x10⁴/brønn) med hvilende B-celler (4x10⁴/kulturer) i nærvær av IL4 (10 ng/ml). Mellom 0 og 25 µg/ml av CD40-Ig (▲) eller CD7E-Ig (●) ble tilsatt til kulturene. Fra 66 - 72 timer etter-kulturen, ble brønnene pulsmarkert med et 1,0 µCi [³H]-tymidin og høstet. Den prikkete linjen viser svaret til B-celler overfor hvilende T_H1. Resultatene som er vist er de aritmetriske triplikate kulturer +/- s.d., og er representativt for to slike eksperimenter.

Figur 3 CD40-Ig påviste et molekyl som var uttrykt på aktiverte, men ikke hvilende T_H1. Hvilende og aktiverte T_H1 ble høstet og inkubert med fusjonsproteiner i 20 minutter ved 4°C, etterfulgt av FITC-konjugert geite anti-hIgG (25 µg/ml). Prosent positive celler og MFI ble bestemt ved analyse av minst 5000 celle/prøver. Resultatene er representative for 6 slike eksperimenter. CD40-Ig binding er vist med en utfylt profil.

Figur 4 CD40-Ig immunpresipitert 39 kD protein fra lysat av aktiverte T_H1 . T_H1 ble hvilt eller aktivert med uløseliggjort anti-CD3 i 16 timer. [^{35}S]-merkete proteiner fra hvilende eller aktiverende T_H ble immunpresipitert med rensede antistoffer eller fusjonsproteiner (1-10 μ). Gelprofilen er representativ for 3 slike eksperimenter

Figur 5 Et monoklonalt antistoff (mab), spesifikt for det stimulerede 39 kD T_H membranproteinet, hemmet induksjon av PM^{Act} stimulert B-celler RNA-syntese. Hvilede B-celler og PM^{Act} ble dyrket med 10 μ g/ml hver av anti- α/β , anti-CD3, CD40-Ig eller MR1. RNA-syntese ble bestemt som beskrevet i figur 1. Resultatene som er vist er de aritmetiske gjennomsnitt og triplikate kulturer +/- s.d., og er representative for 3 slike eksperimenter

Figur 6 MR1 og CD40-Ig gjenkjente det samme molekylet som var uttrykt på aktiverte T_H

Panel A aktiverte T_H ble farget fluorescensert med MR1 eller kontroll-Ig. For å vurdere hvis CD40-Ig og MR1 konkurrerte for binding av aktiverte T_H , ble graderte konsentrasjoner av MR1 eller kontroll hamster-Ig (anti- α/β TCR) tilsatt sammen med anti-CD40 (20 μ g/ml). Etter inkubasjon i 20 minutter ved 4°C, ble prøvene vasket, og inkubert med FITC-konjugerte, mab anti-humant IgG₁. Resultatene er representative for 3 slike eksperimenter

Panel B Proteiner fra [^{35}S]-metionin-merket, aktiverte T_H ble immunpresipitert med MR1 (10 μ g/prøve) eller CD40-Ig (10 μ g/prøve) og analysert ved hjelp av PAGE og fluorografi. Resultatene som er presentert er representative for 2 slike eksperimenter

Figur 7 Binding av CD40-Ig til humane cellelinjer. En rekke humane T-cellelinjer ble reagert med biotin-merket CD40-Ig, og binding vurdert ved hjelp av flow cytometri

Figur 8 Panel A Nukleotidsekvens til CD40-cDNA fra Stamenkovic et al., (1989) EMBO J 8 1403-1410. Transmembranområdet er understreket

Panel B skjematisk tegning av et plasmid som kan benyttes for å uttrykke CD40-Ig. Aminosyresekvensene på fusjonsstedet til Δ CD40 er vist under den diagrammatiske delen av CD40

Den foreliggende oppfinnelse omfatter et vesentlig rensset cellefritt fusjonsprotein som spesifikt binder til CD40CR reseptor, inklusive antistoffer som fusjonsmolekyler som består av CD40

Med formål å gi klarhet i beskrivelsen, og ikke med tanke på begrensning, er den detaljerte beskrivelse av oppfinnelsen delt inn i følgende underkapitler

- (i) ligander som binder CD40CR,
- (ii) fremgangsmåter benyttet for å karakterisere CD40CR,
- (iii) fremstilling av et rensset CD40CR,
- (iv) anvendelser av ligander som binder til CD40CR,
- og
- (v) anvendelser av CD40CR

(i) Ligander som binder til CD40CR

Den foreliggende oppfinnelse omfatter løselige ligander som fusjonsproteiner og antistoff for CD40CR, inklusive (i) fusjonsmolekyler som består av minst en del av (ii) antistoffer eller antistoff-fragmenter

Betegnelsen "løselig", som benyttet her, viser at ligandene i oppfinnelsen ikke er permanent bundet til en celleplasmamembran. Løselige ligander i oppfinnelsen kan imidlertid, bli bundet til ikke-cellulært fast underlag, inklusive et lipid, protein eller karbohydratmolekyl, en kule, en vesikkel, en magnetisk partikkel, en fiber, osv eller kan innebygges i et implantat eller vesikkel

Evnen til en slik ligand til å binde til CD40CR kan bekreftes ved å vise at liganden binder til det samme proteinet som CD40-Ig (infra) eller MR1 (infra)

Ligandene i oppfinnelsen kan omfattes av farmasøytiske blandinger sammen med en passende bærer

Fusjonsmolekyler

Den foreliggende oppfinnelse omfatter løselige fusjonsproteinmolekyler som er ligander for CD40CR. I ett aspekt av oppfinnelsen omfattes et vesentlig rensset cellefritt fusjonsprotein, kjennetegnet ved at det spesifikt binder til CD40CR, et 39 kD T-celleprotein som binder til CD40 B-celleantigen og stimulerer B-cellessyklusstart, proliferasjon og differensiering, nevnte fusjonsprotein

- (a) omfatter i det minste en ekstracellulær del av CD40-protein som har en sekvens som angitt i Fig. 8A, knyttet til et andre molekyl hvor det nevnte

andre molekylet er valgt fra gruppen bestående av peptider, proteiner, karbohydrater og lipider, og hvor nevnte andre molekyl er bundet til nevnte del på et sete som har aminosyresekvensen Gly-Pro-Gln-Asp, og

(b) er i stand til å binde nevnte CD40CR-protein på en aktivert hjelpe-T-celle og
5 inhibere aktiveringen av en hvilende B-celle av den aktiverte T-cellen

Slike fusjonsmolekyler består av minst en del av CD40-protein bundet til et annet molekyl. Delen av CD40 mangler fortrinnsvis CD40-transmembrane område. En del av CD40-protein som kan benyttes ifølge oppfinnelsen defineres som enhver del som er i stand til å binde CD40CR, f.eks. en slik del kan bli vist å
10 binde til samme proteinet som MR1 eller CD40-Ig

Andre molekyler som kan benyttes omfatter peptider og proteiner, lipider og karbohydrater, og, i foretrukne utførelsesformer i oppfinnelsen, kan være et immunoglobulinmolekyl, eller en del av dette, (slik som et Fv, Fab, F(ab')₂ eller Fab' fragment) eller CD8 eller et annet adhesjonsmolekyl slik som B7. Det andre
15 molekylet kan stamme fra enten en ikke-human eller en human kilde eller kan være kimær. Det andre molekylet kan også være et enzym, toksin, vekstfaktor, lymfokin, anti-vekstforbindelse, alkyliserende forbindelse, antimetabolitt, antibiotika, vinca alkaloid, platinum koordinert kompleks, radioisotop eller en fluorescerende forbindelse

Fusjonsmolekylene i oppfinnelsen kan fremstilles ved hjelp av kjemisyntese eller fortrinnsvis, ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker. F.eks. kan en nukleinsyresekvens som koder for minst en del av CD40-protein kombineres med en nukleinsyresekvens som koder for et annet molekyl i en passende ekspresjonsvektor, og så uttrykkes i et prokaryot eller, fortrinnsvis eukaryot fusjonsprotein, slik som gjær
20 baculovirus eller pattedyr ekspresjons-system, inklusive transgene dyr

Alternativt, kan minst en del av CD40-protein uttrykkes ved bruk av rekombinante DNA-teknikker og kan så kjemisk konjugeres til et annet molekyl

Fusjonsmolekylet som omfatter CD40 kan renses fra preprative blandinger ved bruk av elektroforetiske teknikker eller affinitetskromatografi ved bruk av
30 ligander som binder til enten CD40 eller til det andre molekylet. Ligander som binder til CD40 omfatter, men er ikke begrenset til, anti-CD40 antistoffer slik som G28-5, som fremstilt ved hjelp av hybridom, som har registreringsnummer HB9110 og deponert i American Type Culture Collection, og CD40CR, beskrevet mer fullstendig i seksjonene (ii) og (iii) infra. Hvis det andre molekylet er et

immunglobulin, eller globulinfragment, kan en affinitetskolonnesom består av anti-
immunglobulin antistoff benyttes, hvis det andre molekylet omfatter et F_C-
fragment, kan en protein A kolonne benyttes

Ifølge en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, kan en del av CD40
5 fremstilles ved bruk av en nukleinsyresekvens som koder for et CD40-protein som
er forkortet oppstrøms fra transmembranområdet. En slik nukleinsyresekvens kan
fremstilles ved å spalte et plasmid som inneholder et cDNA som koder for CD40-
antigen, slik som beskrevet i Stamenkovic et al., (1989), EMBO J 8 1403-1410,
med PstI (P) og Sau 3A (S3) restriksjonsenzymmer. Det resulterende P/S3 fragment
10 kan subklones i det samme plasmidet spaltet med P og Bam HI (B), for å fremstille
et forkortet CD40-gen (se figur 8A)

I spesielt, ikke-begrensede, utførelsesformer av oppfinnelsen, kan en
ekspresjonsvektor som benyttes for å fremstille ligander som inneholder minst en
del av CD40 så vel som immunglobulinsekvens omfatte fortrinnsvis en virus-basert
15 replikasjons-start, en bakteriell replikasjons-start, en bakteriell seleksjonsmarkør,
og eukaryot promoter- og "enhancer" sekvenser adskilt fra DNA-sekvensene som
koder for et immunglobulin konstant område ved hjelp av restriksjons
endonukleaseseter som tillater subkloning av DNA sekvensene som koder for
minst en del av CD40, etterfulgt av en polyadenylering-signalsekvens (se figur
20 8B)

I en spesiell utførelsesform ved oppfinnelsen, kan det forkortede CD40-
genet bli subklonet i et immunglobulin fusjonsplasmid, slik som beskrevet i Aruffo
et al., 1990, Cell 61 1303-1313, ved bruk av Mlu I og B spalting, slik at plasmid
pCD40-Ig, fremstilles, som koder for fusjonsmolekylet CD40-Ig (se figur 8B)
25 CD40-Ig fusjonsprotein kan så fremstilles ved å transfektere pCD40-Ig plasmidet i
COS-celler for å lage et forbigående ekspresjonssystem. Fremstilt CD40-Ig kan
samles fra COS-cellesupernatanten og renses ved hjelp av protein A kolonne-
kromatografi som beskrevet i Aruffo et al., 1990, Cell 161 1303-1313

30 **Antistoffer**

De løselige ligandene i oppfinnelsen kan omfatte antistoffmolekyler,
monoklonale antistoffmolekyler eller fragmenter av disse antistoffmolekylene som
inneholder et antigen kombinasjons-sete som bindes til CD40CR

I et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse omfattes et vesentlig rensset antistoff eller fragment derav, kjennetegnet ved at det spesifikt binder til musCD40CR, et 39 kD musT-celleprotein som binder til CD40 B-celleantigenet og stimulerer B-cellesyklusstart, proliferasjon og differensiering, nevnte antistoff er i stand til å binde nevnte CD40CR-protein på en aktivert hjelpe-T-celle og inhibere 5 aktivering av en hvilende B-celle av den aktiverte T-cellen

Slike ligander kan videre omfatte et annet molekyl som kan være protein, lipid, karbohydrat, enzym, toksin, vekstfaktor, lymfokin, antivekstforbindelse, alkylerende forbindelse, antimetabolitt, antibiotika, vincaalkaloid, platinum- 10 koordinert kompleks, radioisotop, eller en fluorescerende forbindelse og kan være bundet til antistoffmolekylet eller fragmentet

Der liganden er et monoklonalt antistoff, eller et fragment av dette, kan det monoklonale antistoffet være fremstilt mot CD40CR ved bruk av enhver fremgangsmåte som gir antistoff-molekylproduksjon av kontinuerlig cellelinje i kultur F eks , hybridomteknikken som opprinnelig var utviklet av Kohler og Milstein 15 (1975, Nature 256 495-497) så vel som andre teknikker som har mer nylig blitt tilgjengelige, slik som den humane B-celle hybridomteknikken (Kozbar et al , 1983, Immunology Today 4 72) og EBV-hybridomteknikken for å fremstille menneske monoklonale antistoffer (Cole et al , 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer 20 Therapy, Alan R Liss, Inc , sidene 77-96) og lignende er innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen

Antistoff-fragmenter som inneholder idiotypen av molekylet kunne fremstilles ved hjelp av kjente fremgangsmåter F eks slike fragmenter omfatter, men er ikke begrenset til F(ab')₂-fragmentet som kan fremstilles ved å behandle 25 antistoffmolekylet med pepsin, Fab'-fragmentene som kan fremstilles ved å redusere disulfidbroene i F(ab')₂-fragmentet, F(ab')₂-fragmentet som kan fremstilles ved å behandle antistoffmolekylet med papain, og 2Fab eller Fab-fragmentet som kan dannes ved å behandle antistoffmolekylet med papain og en reduserende forbindelse for å redusere disulfidbroene

Den foreliggende oppfinnelse omfatter også kimære antistoffer fremstilt ved 30 hjelp av teknikkene kjent i feltet, slik som de beskrevet av Morrison et al , (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81 6851-6855 eller europeisk patentansøking nr 85305604 2, publikasjonsnummer 0173494 av Morrison et al , utlagt 5 mars 1986

Immunogen for fremstilling av antistoffer kan være enhver kilde som inneholder CD40CR F eks , aktiverte T_H kan benyttes som en immunogen

Alternativt, kan i det vesentlige rensede CD40CR, fremstilt som beskrevet i kapittel (iii) infra, benyttes Hvis aktivert T_H benyttes som immunogen, kan

5 antiserum undersøkes for reaktivitet mot aktiverte, men ikke hvilende T_H -celler

I en foretrukket utførelsesform ved oppfinnelsen er den løselige ligand MR1 monoklonalt antistoff Den følgende fremgangsmåte ble benyttet for å fremstille MR1 monoklonalt antistoff, og kan benyttes for å fremstille andre antistoffer rettet mot CD40CR

10 Hamster ble immunisert intraperitonealt med $5 \cdot 10^6$ aktiverte T_H1 -celler (D1 6) i ukentlige intervaller i 6 uker Når serumtiter mot gnager T_H1 var større enn 1 10,000, ble cellefusjoner utført med polyetylglykol ved bruk av immun hamster splenocytter og NSI SN fra brønner som inneholdt voksne hybridomer ble undersøkt ved flowcytometri på hvilende og aktiverte T_H1 Et spesielt hybridom,

15 som fremstilte et mab som selektivt gjenkjente aktiverte T_H , ble videre undersøkt og subklonet for å lage MR1 MR1 ble fremstilt i bukhulevæske (ascites) og rensed ved ionebytte-HPLC

Den foreliggende oppfinnelse gir også ligander som omfatter monoklonale antistoffer, og fragmenter av disse som er i stand til konkurrerende hemming av

20 bindingen av MR1 til dets mål-antigen eller CD40-Ig til sin reseptor

(ii) Fremgangsmåter benyttet for å karakterisere CD40CR

CD40CR kan karakteriseres ved (a) dens evne til å binde CD40, fusjonsmolekyler som omfatter minst en del av CD40, og antistoffer slik som MR1,

25 (b) dens funksjonelle egenskap som går ut på å stimulere B-celle syklusinngang, vekst og differensiering, og (c) dens cellulære fordeling

Evne til å binde ligander

CD40CR kan karakteriseres ved dens evne til å binde til ligander slik som

30 CD40, fusjonsmolekyler som består av CD40, og antistoffer rettet mot CD40CR

Som diskutert i større detalj infra, flere fremgangsmåter ble benyttet for å karakterisere CD40CR F eks CD40-Ig og MR1 ble valgt til å gjenkjenne det samme 39 kd molekylet Både CD40-Ig og MR1 ble funnet å immunpresipitere et

39 kD protein fra radioaktivt merket T_H -lysater (figur 5b) Videre immunpresipitering av 39 kD proteinet med CD40-Ig fjernet antigenet som var gjenkjent av MR1 fra T_H -lysatene

5 Evne til å stimulere B-celler

CD40CR kan også karakteriseres ved dets evne til å stimulere B-celle syklusinngang, vekst og differensiering

F eks , plasmamembran (PM) fra aktiverte (PM^{Act}), men ikke-hvilende (PM^{rest}) T_H -celler ble funnet å stimulere B-celle RNA-syntese (Figur 1a), denne
10 stimulering, som indikerer B-celleaktivering, ble ikke påvirket av antistoffer slik som anti-LFA-1, anti-CD4, anti-ICAM-1 CD40-Ig eller MR1, ble imidlertid funnet å kunne hemme PM^{Act} -indusert B-celleaktivering, som vist i figur 1b og figur 6

Stimulering av B-celle-aktivering kan måles ved hjelp av fremgangsmåter slik som [3H]-undin innebygging i RNA (såsom B-celler differensierer, RNA-
15 syntese øker), eller [3H]-tymidin innebygging, som måler DNA-syntese forbundet med cellevekst For optimal måling av effekten til CD40CR når det gjelder B-cellevekst, kan interleukin-4 (IL-4) tilsettes kulturmediet i en konsentrasjon på omtrent 10 ng/ml

Alternativ, kan B-celle-aktivering måles som en funksjon av immunoglobulinsekresjon F eks , kan CD40CR, i vesentlig ren form, eller som tilstede i PM, eller
20 på annen måte, tilsettes hvilende B-celler sammen med IL-4 (10 ng/ml) og IL-5 (5 ng/ml) Etter tre dager med kultur, kan et ytterligere volum kulturmedium tilsettes På dag 6 i kulturen, kan supernatant (SN) fra individuelle kulturer høstes og måles med hensyn på IgM og IgG, beskrevet i Noelle et al , (1991) J Immunol 146 1118-
25 1124

Cellulær fordeling

CD40CR kan også karakteriseres ved dets cellulære fordeling F eks , ble CD40-Ig observert å binde til aktiverte, men ikke hvilende T_H1 , som bedømt ved
30 flowcytometri (figur 3) Videre, CD40-Ig ble observert ved å binde Jurkat celler, HSB2-celler og aktiverte T-celler fra human perifert blod, men bandt ikke

tilsynelatende nevneverdig til CEM-celler, HPBALL celler eller gnager tymomceller

F eks , og ikke tenkt som begrensende, kan tilstedeværelsen av CD40CR for spesiell celletype ("testceller") evalueres ved hjelp av flowcytometri som følge

5 Testceller kan undersøkes parallelt med hvilende (negativ kontroll) og aktiverte (positiv kontroll) T_H-celler. Alle celler kan inkuberes i en konsentrasjon på omtrent 1×10^5 celler/50 μ l med ligand (f eks CD40-Ig eller MR1) i 20 minutter i 4°C, etterfulgt av FITC-konjugerte anti-ligand antistoff. Propidium iodid kan tilsettes alle prøvene til en endelig konsentrasjon på 2 μ g/ml. Flowcytometrisk analyse kan så

10 utføres f eks på en BD FACSCAN. Etter positiv analyse av cellene ved hjelp av forover mot sidespredning og ved rød negativitet (for propidium-iodid eksklusjon), kan log grønn fluorescensen til levedyktige celler bestemmes.

(iii) Fremstilling av rensset CD40CR

15 Den foreliggende oppfinnelse gir et vesentlig rensset CD40CR. Slik CD40CR kan fremstilles fra celler som bærer CD40CR, slik som aktiverte hjelpe-T-celler, Jurkat, og HSB2-celler, ved hjelp av den følgende fremgangsmåten:

Plasmamembraner kan fremstilles fra passende celler, slik som aktiverte T_H1-celler, ved hjelp av diskontinuerlig sukrosegradientsentrifugering som

20 beskrevet i Noelle et al , 1991, J Immunol 146 1118-1124. CD40CR kan så isoleres ved avspalting av det grove membranekstraktet med mild detergenty, og så utføre størrelseseksklusjonskromatografi etterfulgt av affinitetskromatografi ved bruk av passende ligander (f eks MR1 eller CD40-Ig) bundet til et fast underlag, immunpresipitering (f eks ved CD40-Ig eller MR1), og/eller gelelektroforese.

25 Det resulterende proteinet kan forventes å ha en molekylvekt på 39 kD.

Det beskrives et løselig CD40CR (det vil si cellefritt) som kan omfattes i farmasøytiske blandinger sammen med en passende bærer. Det gir videre CD40CR som er bundet til et annet molekyl som kan være et peptid, protein, lipid, karbohydrat, enzym, toksin, vekstfaktor, lymfokin, anti-vekstforbindelser,

30 alkylende forbindelser, antimetabolitt, antibiotika, vincaalkaloid, platinum-koordineringskompleks, radioisotop, eller en fluorescerende forbindelse.

Det beskrives et vesentlig rensset CD40CR som er blitt fremstilt ved hjelp av kjemisk syntese eller genteknologi, f eks , genet for CD40CR kan isoleres ved å

sette inn cDNA fremstilt fra aktiverte hjelpe T-celler i λ gt10 ekspresjons-system, og så undersøke med MR1 eller CD40-Ig binding for å identifisere CD40CR-uttrykkende kloner. Alternativt kan cDNA fremstilt fra aktiverte hjelpe-T-celler transfekteres inn i COS-celler, supernatantene av disse kan undersøkes med MR1 eller CD40-Ig for å identifisere CD40CR-producenter. Genet for CD40CR kan så benyttes for å uttrykke CD40CR ved bruk av ekspresjonssystemer kjent i feltet

(iv) Anvendelser for ligander som binder til CD40CR

Det beskrives fremgangsmåter for å kontrollere B-celleaktivering som

benytter ligander som binder til CD40CR. Spesielt beskrives en fremgangsmåte for å hemme B-celleaktivering som omfatter å reagere en blanding av B-celler og T_H-celler med en effektiv konsentrasjon av ligand som binder CD40CR. Ligander som kan benyttes er beskrevet *supra* i kapittel (i). Fremgangsmåten i kan utføres *in vitro* eller *in vivo*. En effektiv konsentrasjon refererer seg til en konsentrasjon av en ligand som hemmer B-celleaktivering målt ved enhver teknikk kjent i feltet inklusive de beskrevet i kapittel (ii), *supra*) ved minst 30%, og fortrinnsvis ved ca 75%. CD40-Ig kan benyttes som ligand, i hvilket tilfelle kan en effektiv konsentrasjon være minst omtrent 10 μ g/ml. I en annen utførelse, kan det monoklonale antistoffet bli benyttet, i det tilfelle kan en effektiv konsentrasjon være minst 10 μ g/ml. Hvis fremgangsmåten blir praktisert *in vivo*, kan en effektiv konsentrasjon av ligand refereres av plasmakonsentrasjon av ligand eller til en lokal konsentrasjon. F.eks., kan det være ønskelig å hemme B-celleaktivering i et lokalisert område for å begrense effektene på immunsystemet som et hele

En fremgangsmåte for å behandle en person som lider av en sykdom forbundet med B-celleaktivering, kan omfatte tilførsel til personen av en terapeutisk mengde ligand som binder til CD40CR. En person kan være et ikke-menneske, eller fortrinnsvis et menneske

Sykdommer forbundet med B-celleaktivering omfatter, men er ikke begrenset til, allergi (omfattende anafylaksis), autoimmune tilstander som omfatter legemiddel utløst lupus, systemisk lupus erytematosus, voksen reumatoid artritt, juvenil reumatoid artritt, scleroderma, Sjögrens syndrom, osv og virus-sykdommer som omfatter B-celler, inklusive Epstein-Barr infeksjon, og retrovirusinfeksjon som omfatter infeksjon med et humant immunsviktivirus

Fordi det er antydnet at B-celleaktivering er forbundet med stimuleringen av humant immunsviktivirus-formering fra latens (inaktivitet) kan det være ønskelig å tilføre ligandene i oppfinnelsen til HIV-positive individer som ennå ikke har utviklet AIDS eller ARC

5 Ligander kan tilføres i en passende farmasøytisk bærer, ved enhver metode kjent i feltet, inklusive intravenøs, intraperitoneal, subkutan, intratekal, intra-artikulært eller intramuskulær injeksjon, og oralt, intranasalt, intraokulært og rektal tilførsel, og kan omfattes i mikrokuler, liposomer og/eller forlenget frigjørings-implantater

10 En terapeutisk mengde ligand defineres som en mengde som på en signifikant måte reduserer de alvorlige kliniske virkningene av B-celleaktivering, og kan variere blant ligander som benyttes og tilstander som behandles Hvis CD40-Ig benyttes, kan terapeutisk konsentrasjon være omtrent 10 $\mu\text{g/ml}$ enten systemisk (plasmakonsentrasjon) eller lokal Hvis MR1 benyttes, kan en terapeutisk
15 konsentrasjon være omtrent 10 $\mu\text{g/ml}$ enten systemisk (plasmakonsentrasjon) eller lokal

De ovenfor nevnte fremgangsmåtene kan benytte en ligand som består av et toksin eller antimetabolitt slik at T_H -cellene drepes eller ødelegges og B-celleaktivering reduseres som et resultat av T_H -celledestruksjon

20 Ligandene i oppfinnelsen kan også benyttes for å merke aktiverte T-celler, en fremgangsmåte som kan være nyttig i diagnosen av T-cellesykdommer I denne forbindelse, kan ligand som omfatter et enzym, radioisotop, fluorescerende forbindelse eller annen påvisbar markør utsettes for T-celler *in vitro* eller *in vivo* og mengdebinding bestemmes

25 Liganden i oppfinnelsen kan også benyttes for å avlevere forbindelser, f eks vekstfaktorer til aktiverte T-celler

(v) **Anvendelse for CD40CR**

30 Det beskrives fremgangsmåte for å kontrollere B-celleaktivering som benyttes CD40CR eller et molekyl som består av CD40CR, fremstilt som beskrevet i seksjon (iii), *supra* Spesielt beskrives en fremgangsmåte for å stimulere B-celleaktivering som omfatter å la B-celler reagere med en effektiv konsentrasjon CD40CR Fremgangsmåten kan praktiseres *in vivo* eller *in vitro* En

effektiv konsentrasjon refererer seg til en konsentrasjon av reseptor som stimulerer B-celleaktivering, må ved enhver teknikk kjent i feltet (inklusive de beskrevet i kapittel (iii), *supra*) ved minst omtrent 30% I spesifikke, ikke-begrensede utførelsesformer av oppfinnelsen, kan konsentrasjonen av CD40CR
5 være omtrent 10 $\mu\text{g/ml}$ lokalt eller systemisk

En person som lider av en immunsviktsykdom forbundet med nedsatt humoral immunitet kan behandles ved tilførsel til personen av en terapeutisk mengde CD40CR Et målsubjekt må ikke være et menneske, men er fortrinnsvis et menneske

10 Immunsviktsykdommer forbundet med nedsatt humoral aktivitet omfatter ervervet immunsviktsyndrom, immunsvikt forbundet med ondartete sykdommer eller cacheksi, iatrogen immunsvikt, forårsaket f.eks. av kjemoterapi eller strålebehandling, så vel som genetiske sykdommer som omfatter humoral immunitet

CD40CR kan tilføres, i en passende farmasøytisk bærer, ved hjelp av en
15 hver kjent fremgangsmåte i feltet inklusive intravenøs, intraperitoneal, subkutan, intratekal, intraartikulært eller intramuskulær injeksjon, og oralt, intranasal, intraokulær og rektal tilførsel og kan omfattes mikrokuler, liposomer, og/eller forlenget frigjørings-implantater

En terapeutisk mengde CD40CR for CD40 defineres som mengden som
20 øker immunoglobulinproduksjonen ved minst omtrent 30%

CD40CR kan konjugeres til et toksin og tilføres en person under betingelser hvor det ville være ønskelig å ødelegge B-celler og uttrykke CD40 Eksempler på slike omstendigheter omfatter pasienter som mottar organtransplantanter eller lider av multippel myeloma eller andre B-celle ondartede sykdommer eller av
25 autoimmun sykdommer

CD40CR kan også benyttes til å merke B-celler som uttrykker CD40, en teknikk som kan være nyttig i diagnosen av B-cellesykdommer For å oppnå dette, kan reseptor bundet til et enzym, radioisotop, fluorescerende forbindelse eller annen påvisbar markør reageres med B-celler *in vivo* eller *in vitro* og mengde
30 binding bestemmes

CD40CR kan også benyttes til å avlevere bundne molekyler til B-celler

Eksempel 1: en ny reseptor, CD40CR, på aktiverte hjelper T-celler binder CD40 og overfører signalet for gjenkjennelsesaktivering av B-celler

1 1 Materialer og fremgangsmåter

1 1.1 Dyr

5 Hunn DBA/2J-mus (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) ble benyttet for fremstillingen av "fyll"-celler for å understøtte veksten av T_H -kloner og i fremstillingen av hvilende B-celler

1 1 2 Hjelper T-celler kloner (T_H)

10 D1 6, en 1- A^d -begrenset kanin Ig-spesifikk T_H1 -klon (Kurt-Jones et al , (1987) J Exp Med 166 1774-1787) ble oppnådd fra Dr David Parker, University of Mass , Worcester D1 6 vil heri henvises til som T_H1

1 1 3 Aktivering av T_H ved hjelp av anti-CD3

15 T_H1 ble dyrket (8×10^6 /brønn) i brønner (6 brønner, Corning, NY) dekket med $40 \mu\text{g}/4 \text{ ml}$ PBS/brønn med anti-CD3 i 16 timer, som beskrevet i (Noelle et al , (1991) J Immunol 146 1118-1124)

1 1 4 Fremstilling av T_H -plasmamembraner

20 Plasmamembraner ble fremstilt ved diskontinuerlig sukrose gradient sentrifugering, som beskrevet i (Noelle et al , (1991) J Immunol 146 1118-1124)

1 1 5 Fremstilling av hvilende B-celler

25 Hvilende milde B-celler ble fremstilt ved sentrifugering på diskontinuerlig Percoll gradienter, som beskrevet i (Defranco et al , (1982) J Exp Med 155 1523) Celler isolert fra 70 - 75% (tetthet på 1,087 - 1,097) Percoll mellomfase var typisk over 95% mlg^+ , hadde en jevn, lav grad av nær forover lys-spredning og svarte ikke på Con-A

30 1 1 6 Antistoffer

De følgende mabs ble rensset ved ionebytter-HPLC fra bukhevæske (ascites) fra mus som hadde blitt bestrålt og benmargen gjenoppbygget anti-

CD3 145-2C11 (Leo et al , (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84 1374-1378), anti-
 α , β H57-597, anti-CD4 GK1 5 (Wilde et al , (1983) J Immunol 131 2178-2183),
 anti-ICAM YN1/1 7 4 (Prieto et al , (1989) Eur J Immunol 19 1551-1557), anti-
 LFA-1 FD441 8 (Sarmiento et al, (1982) Immunol Rev 68 135), og anti-
 5 rat/hamster κ chain RG-7 (Springer, (1982) Hybrid 1 257-273)

1.1 7 Fremstilling av CD40 rekombinant-globulinet (CD40-Ig)

CD40-fusjonsprotein ble fremstilt ved å spalte et plasmid som inneholdt et
 cDNA som kodet for CD40-antigenet (Stamenkovic og Seed, (1989) EMBO J
 10 8 1493-1410) med restriksjonsenzymet Pst I (P) og Sau 3A (S3) Dette P/S3
 fragment ble subklonet i det samme plasmidet spaltet med P og Bam H1 (B)
 Dette tillot fremstillingen av CD40 Δ som kodet for et CD40-protein forkortet
 oppstrøms fra transmembranområdet DNA-fragmentet som kodet for et CD40 Δ
 ble så subklonet i immunglobulinfusjonsplasmidet (Aruffo et al (1990), Cell
 15 61 1303-1313) ved bruk av MluI og B-spaltning CD40-Ig-fusjonsproteinet ble
 fremstilt ved forbigående transfeksjon i COS-celler og renset på en protein A-søyle
 som beskrevet i (Aruffo et al , (1990) Cell 61 1303-1313)

1 1 8 Lymfokiner

20 Interleukin-4 (IL4) rekombinant mus-IL4 ble generøst gitt av Drs C
 Maliszewski og K Grabstein, Immunex Corporation, Seattle, WA

Interleukin-5 (IL5) rekombinant muse IL5 ble kjøpt fra RD Research,
 Sarrento, CA

25 1 1 9 Stimulering av B-celle RNA-syntese ved hjelp av aktiverte T_H-plasma- membraner

3 x 10⁴ hvilende B-celler ble dyrket i 50 μ l cRPMI i A/2 mikroliters brønner
 (Costar, Cambridge, MA) Til disse brønnene, ble 0,5 μ g T_H1 eller T_H2-membran-
 protein tilsatt Fra 42 til 48 timer, ble brønnene pulsmerket med 2,5 μ Ci med ³H-
 30 uridin (New England Nuclear, Boston MA) høstet, og radioaktiviteten bestemt ved
 hjelp av væskescintillasjonspektroskopi Resultatene ble uttrykt som cpm/kultur +/-
 s d

1 1.10 Stimulering av B-celleimmunglobulinsekresjon ved hjelp av aktiverte T_H -plasmamembraner og lymfokiner

Hvilende B-celler ble dyrket som beskrevet ovenfor. Til kulturbrønner ble 0,5 μ g T_H1 -membranprotein, IL4 (10 ng/ml) og IL5 (5 ng/ml) tilsatt. På dag tre av kulturen, ble ytterligere 50 μ l av cRPMI tilsatt. På dag seks i dyrkningen, ble SN fra individuelle brønner høstet og målt med hensyn til IgM og IgG₁, som beskrevet i (Noelle et al., (1991) J Immunol 146 1118-1124)

1 1.11 Stimulering av B-celledeling ved hjelp av aktivert T_H og IL4

4 x 10⁴ hvilende B-celler ble dyrket i 50 μ l cRPMI i A/2 mikroliter brønner (Costar, Cambridge, Ma). Til disse brønnene, ble 1 x 10⁴ hvilende eller aktiverte, bestrålte (500 rads) T_H1 og IL4 (10 ng/ml) tilsatt. På dag 3 av dyrkningen, ble brønnene pulsmarkert med 1 μ Ci ³H-tymidin, som beskrevet i (Noelle et al., (1991) J Immunol 146 1118-1124)

1.1.12 Fremstilling av monoklonale antistoffer spesifikke for membran proteiner stimulert på aktiverte T_H1

Hamstere ble immunisert intraperitonealt med 5-10 x 10⁶ aktiverte T_H1 (D1 6) i ukentlige intervaller i seks uker. Når serumtitre mot gnager T_H1 var større enn 1 10 000, ble celledusjonen utført med polyetylen glykol ved bruk av immun hamstersplenocytter og en NS1. SN fra brønner som inneholdt voksende hybridomer ble undersøkt ved flowcytometri på hvilende og aktiverte T_H1 . Bare spesielle hybridomer som produserte en mab som selektivt gjenkjente aktiverte T_H ble undersøkt videre og subklonet for å oppnå MR1. MR1 ble fremstilt i ascites og rensset med ionebytte-HPLC.

1 1.13 Flowcytofluorimetrisk analyse av aktiveringsmolekyler uttrykt på T_H

Hvilende og aktiverte T_H (16 timer med anti-CD3) ble høstet og inkubert med 1 x 10⁵ celler/50 μ l med fusjonsprotein i 20 minutter ved 4°C, etterfulgt av FITC-konjugert geite anti-human (h)IgG (25 μ g/ml, Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Til alle prøvene, ble propidiumiodid tilsatt i en endelig konsentrasjon på 2 μ g/ml. Flowcytofluorimetrisk analyse ble utført på en BD

FACSCAN Etter positiv atskillelse av cellene ved hjelp av forover mot sidespredning, og ved rød negativitet (for propidiumiodid eksklusjon), ble log grønn fluorescens av levende celler. Minst 5 000 levende celler ble analysert for bestemmelsen av prosent positive celler og MF1. Farging med MR1 benyttet

5 FITC-konjugert RG7, en mus anti-rotte/hamster κ kjede mab

1.1 14 Biosyntetisk merking, immunpresipitering, SDS-PAGE og fluorografi

T_H1 var ubehandlet eller aktivert med uløselig anti-CD3 i 16 timer. Proteinet fra hvilende og aktiverte $T_H(20 \times 10^6/ml)$ ble merket med 1 mCi [^{35}S]-metionin/-cystein i en time, på den tid ble den vasket to ganger med RPMI/10%FCS og cellebunnfallet lysert i ekstraksjonsbuffer som beskrevet (Noelle et al., (1986) J Immunol 137 1718-1726). Rensede antistoffer eller fusjonsproteinet (1-10 μg) ble tilsatt 500 μl lysat (5×10^6 celle-ekvivalente) ved 4°C i 16 timer, på den tid, ble lysatene overført til rør som inneholdt 50 μl pakket protein A-Sepharose. Den bunnfelte protein A-Sepharose ble suspendert og rørene ble inkubert ved 4°C i 15 time med omrøring. Prøvene ble så vasket tre ganger med høy stringens vaskebuffer. Den bunnfelte protein A-Sepharosen ble resuspendert i 30 μl SDS prøvebuffer og analysert på 10% polyakrylamidgel. Etter elektroforese ble gelen fiksert og fluorografi ble utført

20

1 2 Resultater

1 2 1 Effekt av monoklonale antistoffer på stimuleringen av B-celle RNA-syntese av PM^{Act}

For å definere celleoverflatemolekylene som formidlet stimuleringen av B-cellesyklusinngang av PM^{Act} , ble mabs mot T_H -membranproteinet tilsatt kulturene av PM^{Act} og B-celler. PM^{Act} stimulerte B-celle RNA-syntese åtte ganger over den som var observert med PM^{rest} , (Figur 1a). Tilsetning av anti-LFA-1, anti-CD4, anti-ICAM-1, alene eller i kombinasjon, hemmet ikke stimuleringen av B-celle RNA-syntese med PM^{Act}

25

1 2 2 CD40-Ig hemmet T_H -indusert B-celle- syklusinnngang, differensiering og deling

I det humane systemet, har det vært vist at anti CD40 mab stimulerte B-celledeling (Clark and Lane, (1991) Ann Rev Immunol 9 97-127) hvilket
5 impliserte CD40 som et viktig utløsningsmolekyl for B-celle For å bestemme hvis CD40 spilte en rolle i stimuleringen av B-celle RNA-syntese med PM^{Act} , ble et løselig fusjonsprotein fra de ekstracellulære områdene i human CD40 og F_C til human-IgG₁ (CD40-Ig) tilsatt kulturer av PM^{Act} og B-celler PM^{Act} som stammer fra T_H1 og T_H2 ble fremstilt og benyttet for å stimulere B-celle RNA-syntese
10 Tilsetning av CD40-Ig til kulturen forårsaket en dose-avhengig hemming av B-celle RNA-syntese som ble stimulert ved PM^{Act} fra T_H1 og T_H2 (figur 1b) Halv maksimal hemming av B-celle RNA-syntese stimulert av PM^{Act} fra T_H1 og T_H2 var omtrent 5 μ g/ml CD40-Ig Et CD7E-Ig fusjonsprotein (Damle og Aruffo, (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88 6403-6407) var uten virkning selv når brukt ved 25
15 μ g/ml

For å undersøke hvorvidt CD40-Ig hemmet aktiveringen av B-celler med T-uavhengig aktivatorer, ble B-celler dyrket i nærvær av LPS og CD40-Ig På dag 2, ble RNA-syntese målt (figur 1c) CD40-Ig var ineffektiv når det gjaldt å hemme B-celleaktivering av LPS, men hemmet svaret til B-celler overfor PM^{Act}

20 I nærvær av PM^{Act} , IL4 og IL5, differensierte B-celler polyklonalt og produserte Ig (Hodgkin et al, (1990) J Immunol 145 2025-2034, Noelle et al, (1991) J Immunol 146 1118-1124) For å vurdere kravene til CD40 signalering i denne prosess ble CD40-Ig tilsatt ved start av kulturen eller på etterfølgende dager Tilsetning av CD40-Ig (figur 2a) i starten av kulturen hemmet polyklonal IgM og IgG₁-produksjon sammenlignet med kontrollnivåene i dens fravær I
25 motsetning, viste tilsetning av CD40-Ig på dag en og to i kulturen liten, hvis noen, hemmende virkning på IgM og IgG₁-produksjonen Disse resultatene viste at etter 25 timer, er signalering via CD40 ikke lenger vesentlig for differensiering en av B-celler til Ig-sekresjon

30 Resultater så langt viste at CD40 spilte en rolle i aktiveringen av B-celler med PM^{Act} Studier ble også utført for å sikre at CD40 også var innblandet i

aktiveringen av B-celler ved hjelp av intakt, levende, aktiverte T_H T_H1 ble aktivert i 16 timer med uløseliggjort anti-CD3, høstet og bestrålt. De bestrålte T_H1 ble dyrket med B-celler i nærvær av IL4 og B-celledeling ble bestemt på dag tre i dyrkingen. En utenfra tilsetning av IL4 var nødvendig for å oppnå B-celledeling med T_H1 , fordi T_H1 ikke produserer IL4 (Noelle et al., (1989) J Immunol 143 1807-1814). CD40-Ig hemmet stimuleringen av B-celledeling ved hjelp av bestrålte T_H på en doseavhengig måte, likt det som ble funnet med PM^{Act} (figur 2b). Den negative kontrollen, CD7E-Ig, viste ingen nevneverdig virkning.

1 2 3 CD40-Ig påviste et molekyl uttrykt på aktiverte, men ikke hvilende T_H

For å undersøke hvorvidt aktiverte T_H1 uttrykker et bindingsprotein CD40, ble hvilende og aktiverte (16 timer) T_H1 farget med CD40-Ig eller CD7E-Ig, etterfulgt av FITC-anti-HlgG. Binding av CD40-Ig ble bedømt ved flowcytometri (fig. 3). T_H1 som ble aktivert i 16 timer med anti-CD3, men ikke hvilende T_H1 , farget 56% positivt med CD40-Ig, men ikke med kontrollen CD7E-Ig. For å identifisere CD40-Ig bindingsprotein, ble T_H1 proteinet biosyntetisk merket med [^{35}S]-metionin/cystein og proteiner immunbunnfelt med CD40-Ig eller CD7E-Ig. De immunbunnfelle proteinene ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE og fluorografi (figur 4). Et fremtredende bånd med tilsynelatende molekylvekt på 39 kD immunpresipiterte på en doseavhengig måte med 1 og 10 μ g CD40/prøve. Som kontroller, immunpresipiterte anti-klasse I mab-bånd ved 55 kD og et lavt molekylvektbånd, β 2 mikroglobulin. I fravær av mab, var ingen sterke bånd synlig. Et 39 kD bånd ble også immunpresipitert fra aktiverte T_H som var vektorielt merket med [^{125}I], hvilket bekreftet at 39kD proteinet var et membranprotein.

1 2.4 Monoklonalt antistoff MR1, spesifikt ovenfor 39Kd T_H -membran-

protein, hemmet stimuleringen av B-celle RNA-syntese med PM^{Act}

"Mabs" spesifikke overfor antigener som selektivt var uttrykt på aktiverte, men ikke-hvilende T_H ble utviklet for å identifisere T_H -molekyl(ene) ansvarlige for T_H -effektorfaseaktiviteten. Et slikt mab, MR1, gjenkjente et antigen som var selektivt uttrykt på aktiverte T_H1 . For å undersøke hvorvidt MR1 og CD40-Ig

gjenkjente samme molekylet, ble flowcytometri og blokkerende studier utført CD40-Ig og MR1 farget henholdsvis omtrent 56% og 61%, av aktiverte, men ikke hvilende T_H (figur 5a) MR1, men ikke et annet hamster anti-T-celle mab, anti- α/β TCR, blokkerte fargingen av aktiverte T_H1 med CD40-Ig, på en doseavhengig
5 måte Disse resultatene viste at CD40-Ig og MR1 gjenkjente overlappende eller identiske epitoper på 39 kD T_H -proteiner For videre å demonstrere at CD40-Ig og MR1 gjenkjente det samme molekylet, ble antigenet som bandt MR1 identifisert ved immunpresipitering av proteiner fra radioaktivt merkete T_H -lysater Både
10 CD40-Ig og MR1 immunbunnet et 39 kD protein (figur 5) Endelig, immunpresipitering av 39 kD protein med CD40-Ig fjernet antigenet som ble gjenkjent av MR1 fra radioaktivt merkete lysater av aktiverte T_H , hvilket støtter hypotesen at MR1-antigenet og CD40-bindingsproteinene var identiske

Funksjonelle studier ble utført med MR1 for å undersøke hvorvidt MR1 nøytraliserte aktiviteten som ble uttrykt av PM^{Act} PM^{Act} og B-celler ble dyrket
15 alene, eller i nærvær av hamstere "mabs" eller CD40-Ig To hamster "mabs", anti- α/β TCR og α -CD3 hemmet ikke aktivering av hvilende B-celler med PM^{Act} I motsetning, hemmet MR1 eller CD40-Ig B-celleaktivering (figur 6)

1.3 Diskusjon

20 Resultatene viser at blokkering av fremtredende T_H -overflatemolekyler (LFA-1, CD4, ICAM-1, CD3, α/β TCR) med mabs hindret ikke evnen til aktiverte T_H å stimulere B-cellesyklusinngang I motsetning, blokkerte CD40-Ig eller et mab spesifikt for CD40 bindingsproteinet, T_H -avhengig B-celleaktivering på en doseavhengig måte Videre, ble CD40-bindingsproteinet identifisert som et 39 kD
25 protein som er selektivt uttrykt på membranene til aktiverte, men ikke hvilende T_H Både CD40-Ig og et mab som er spesifikt for 39 kD CD40-bindingsproteinet blokkerte B-celleaktivering av PM^{Act}

Skjønt et antall membranproteiner har vært omtalt i T_H -avhengig B-celle signalering, avkrefter beviset som er presentert her at visse molekyler (LFA-1,
30 CD4, CD3, α/β TCR, ICAM-1) bidrar, og impliserer CD40 som B-cellereseptoren for gjenkjennelses-signalering med T_H Resultatene viser at CD40-Ig og et mab

som er spesifikt for CD40 bindingsproteinet hemmer T_H -avhengig B-celle-aktivering

Liganden for CD40 er et 39Kd protein som uttrykkes på aktiverte, men ikke hvilende T_H Biokjemiske studier viser at 39 kD proteinet er et enkeltkjedet molekyl siden elektroforetisk vandring ikke var påvirket av reduserende forbindelser basert på de funksjonelle studiene presentert i denne undersøkelsen, uttrykker både aktivert T_H1 og T_H2 39kD CD40-bindingsproteinet Dette er overensstemmende med de funksjonelle studiene som viser at både T_H1 og T_H2 stimulerer B-cellesyklusinngang I et forsøk på å karakterisere videre 39kD proteinet, ble et cDNA som kodet for CD-proteiner i Mw-området av 39kD (CD53, CD27 og CD69) forbigående transfektert inn i COS-celler og cellene ble undersøkt med tanke på CD40-Ig binding Ingen av de transfekterte COS-cellene uttrykte proteiner som bandt CD40-Ig Det er derfor antatt at 39 kD proteinet ikke er et av disse CD-proteinene

Den biokjemiske basis for signaloverføring av T_H og B-celler har vært lite kjent Identifisering av CD40 som det signaloverførende molekylet for T-celler er til hjelp for å rette oppmerksomheten mot spesifikke biokjemiske reaksjonsveier som er kjent for å bli koblet til CD40-molekylet CD40 er et medlem av nerve vekstfaktor-reseptoren (NGFR) familien i kraft av nærværet av fire cysteinrike områder i dens ekstracellulære region Signalering gjennom CD40 ved hjelp av mab har vært vist (Uckun et al , (1991) J Biol Chem 266 17478-17485) å omfatte aktiveringen av tyrosinkinase hvilket resulterer i den økende fremstilling av inositoltrisfosfat og aktiveringen av minst fire adskilte serin/treoninkinaser Basert på informasjon oppnådd ved signalering gjennom andre medlemmer av NGF-reseptorfamilien, blir det antatt at reaksjonen mellom aktivert T_H og B vil resultere i mange av de samme biokjemiske prosessene

Eksempel 2 binding av CD40-Ig til humane T-cellelinjer

For immunfluorescensbindings-studier, ble CD40-Ig fusjonsprotein konjugert med biotin ved bruk av biotin-succinimid (Sigma) Flowcytometrisk analyse ble så utført i en totrinns fargereaksjon ved bruk av fycoerytrin (PE)-strep-avidin (Bectin-Dickinson) med et Coulter Epics C instrument Representative resultater fra å undersøke mange T-cellelinjer er presentert nedenfor Jurkat og

HSB2-cellelinjene ble funnet å binde spesifikt, mens andre T-cellelinjer som omfatter CEM, HPBALL og gnagertymom ikke bandt CD40-Ig fusjonsproteinet (figur 7)

Forskjellige publikasjoner er sitert her og er herved inntatt som referanse i

5 sin helhet

PATENTKRAV

1 Vesentlig rensset cellefritt fusjonsprotein, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
spesifikt binder til CD40CR, et 39 kD T-celleprotein som binder til CD40 B-
5 celleantigen og stimulerer B-cellesyklusstart, proliferasjon og differensiering,
nevnte fusjonsprotein

(a) omfatter i det minste en ekstracellulær del av CD40-protein som har en
sekvens som angitt i Fig 8A, knyttet til et andre molekyl hvor det nevnte
andre molekylet er valgt fra gruppen bestående av peptider, proteiner,
10 karbohydrater og lipider, og hvor nevnte andre molekyl er bundet til nevnte
del på et sete som har aminosyresekvensen Gly-Pro-Gln-Asp, og

(b) er i stand til å binde nevnte CD40CR-protein på en aktivert hjelpe-T-celle og
inhibere aktiveringen av en hvilende B-celle av den aktiverte T-cellen

15 2 Fusjonsprotein ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det andre
molekylet er i det minste en del av et immunoglobulinmolekyl

3 Fusjonsprotein ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er CD40-Ig
som fremstilt av plasmidet pCD40-Ig som angitt i Figur 8B

20 4 Vesentlig rensset cellefritt CD40/immunoglobulin-fusjonsprotein ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikt binder til musCD40CR, et 39 kD musT-
celleprotein som binder til CD40 B-celle-antigenet og stimulerer B-cellesyklus-
start, proliferasjon og differensiering, nevnte fusjonsprotein omfatter i det minste
25 en del av CD40-protein som har en sekvens som angitt i Figur 8A bundet til i det
minste en del av et immunoglobulinmolekyl

5 Fusjonsprotein ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikt
konkurrerende inhiberer bindingen av CD40 til nevnte musCD40CR

30 6 Fusjonsprotein ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikt
konkurrerende inhiberer bindingen av et monoklonalt antistoff, fremstilt av
hybridomen MR1, deponert i ATCC med tilgangsnummer HB11048 til dets mål-
antigen

7 Vesentlig rensset antistoff eller fragment derav, k a r a k t e r i s e r t v e d
at det spesifikt binder til musCD40CR, et 39 kD musT-celleprotein som binder til
CD40 B-celleantigenet og stimulerer B-cellesyklusstart, proliferasjon og
5 differensiering, nevnte antistoff er i stand til å binde nevnte CD40CR-protein på en
aktivert hjelpe-T-celle og inhibere aktivering av en hvilende B-celle av den
aktiverede T-cellen

8 Antistoff eller fragment derav ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
10 det spesifikt konkurrerende inhiberer bindingen av CD40 til nevnte musCD40CR

9 Antistoff eller fragment derav ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
det spesifikt konkurrerende inhiberer bindingen av et monoklonalt antistoff, som
fremstilt av hybridomen MR1, deponert i American Type Culture Collection og
15 tildelt tilgangsnummeret HB 11048, til dets målantigen

10 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det ytterligere omfatter et andre molekyl som er et
antiproliferativt middel

20

11 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det ytterligere omfatter et andre molekyl som er et
alkylerende middel

25 12 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det ytterligere omfatter et andre molekyl som er en
antimetabolitt

13 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d a t det ytterligere omfatter et andre molekyl som er et
antibiotika

14 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
karakterisert ved at det ytterligere omfatter et andre molekyl som er et
vinca alkaloid

5 15 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
karakterisert ved at det ytterligere omfatter et andre molekyl som er et
enzym

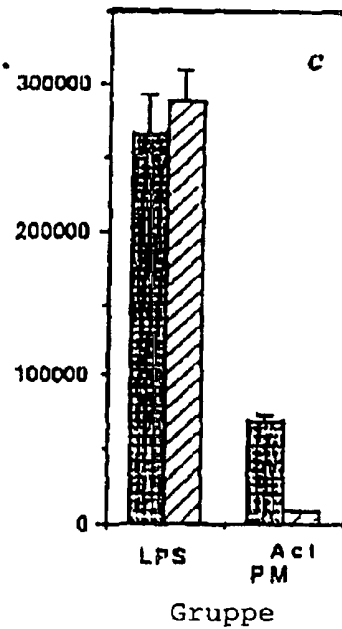
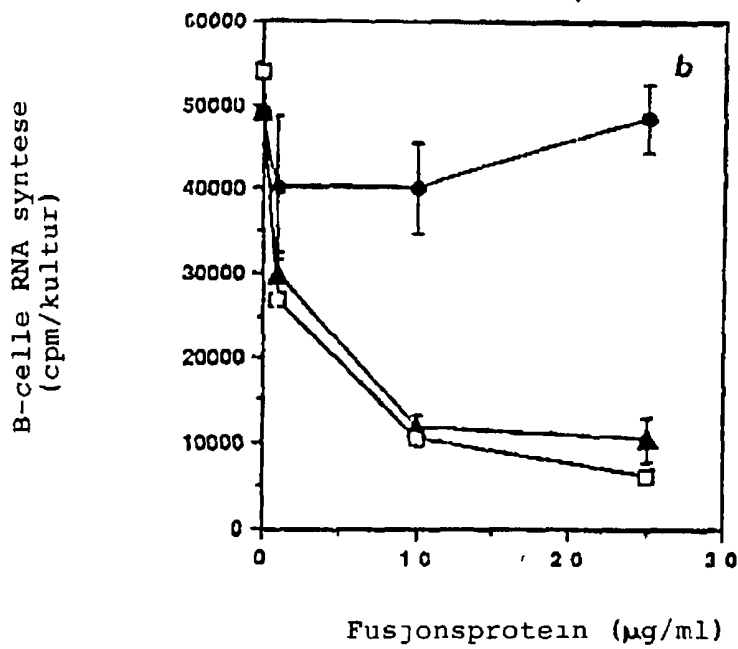
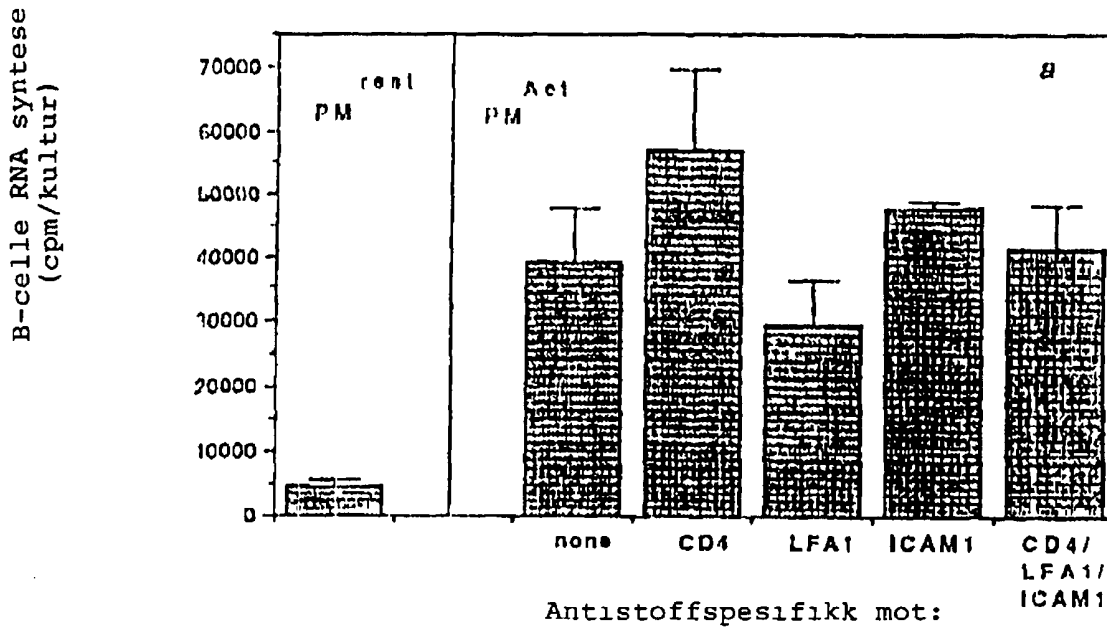
16 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
10 karakterisert ved at det ytterligere omfatter et andre molekyl som er et
platina-koordinert kompleks

17 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
karakterisert ved at det ytterligere omfatter et andre molekyl som er en
15 radioisotop

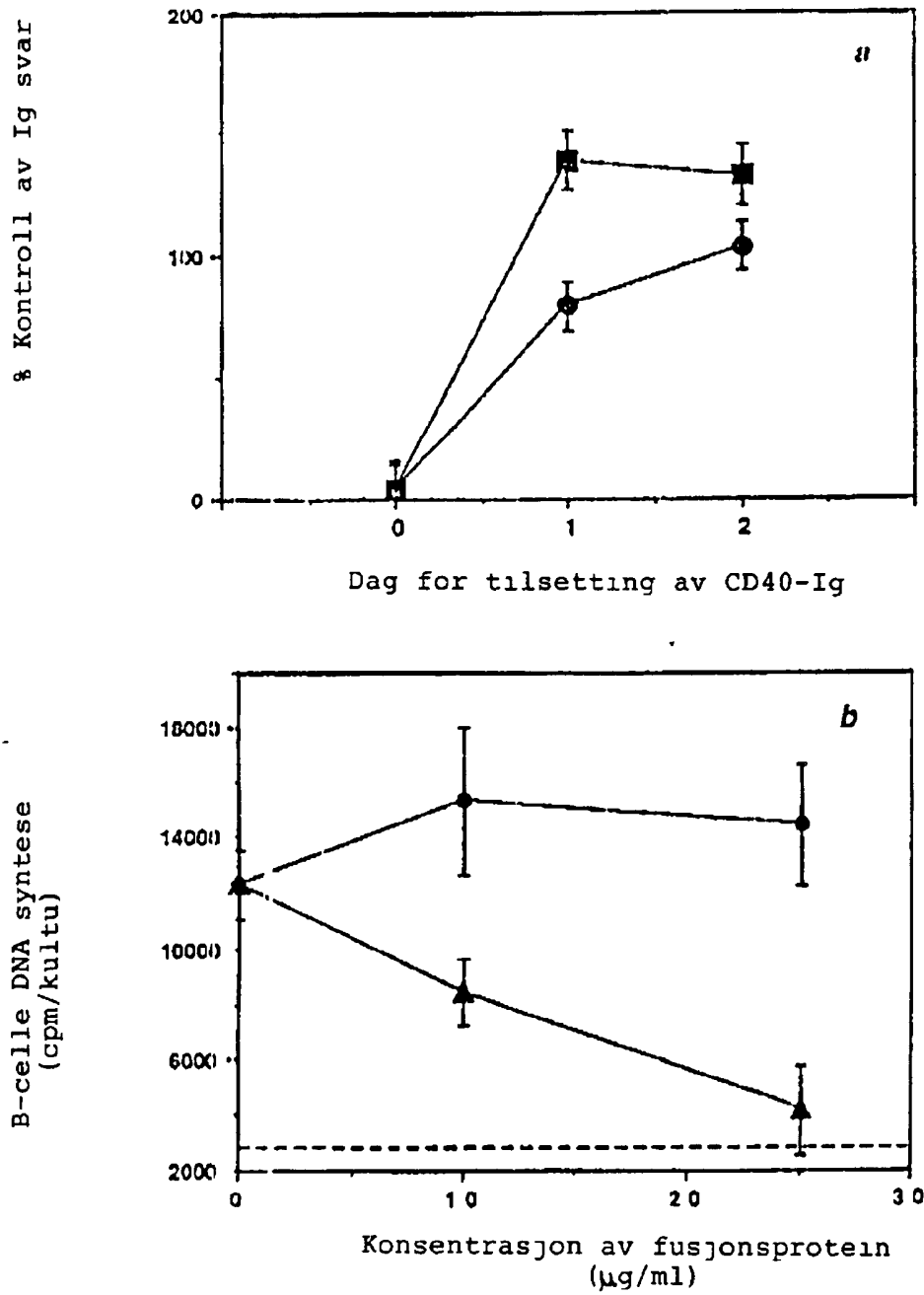
18 Antistoff eller fragment derav ifølge kravene 7, 8 eller 9,
karakterisert ved at det ytterligere omfatter et andre molekyl som er en
fluorescerende forbindelse

20 19 Antistoff ifølge krav 7, karakterisert ved at det er monoklonalt og
fremstilt av hybridomen MR1, deponert i American Type Culture Collection og
tildelt tilgangsnummeret HB11048, eller et fragment derav som binder til mus
CD40CR, et 39 kD musT-celleprotein som binder til CD40 B-celleantigenet og
25 stimulerer B-cellesyklusstart, proliferasjon og differensiering

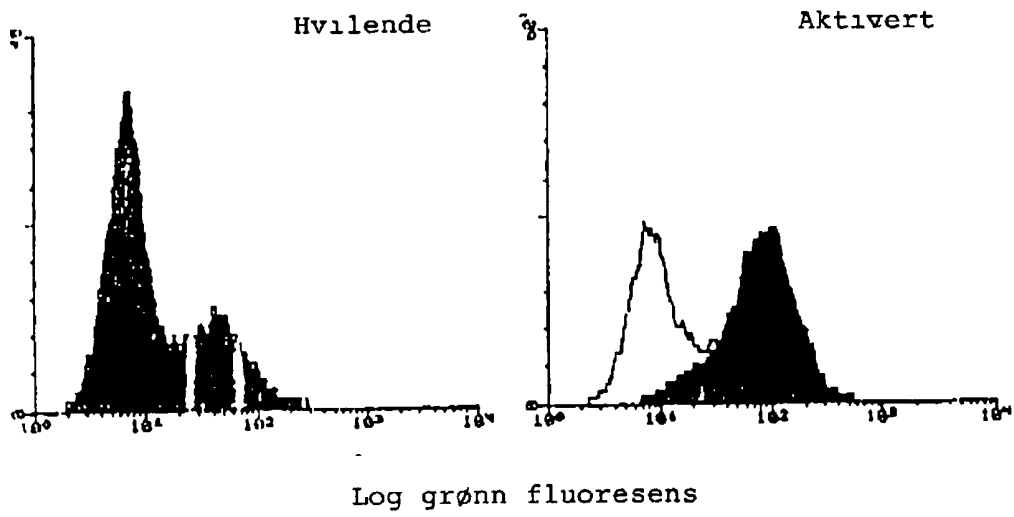
Figur 1.

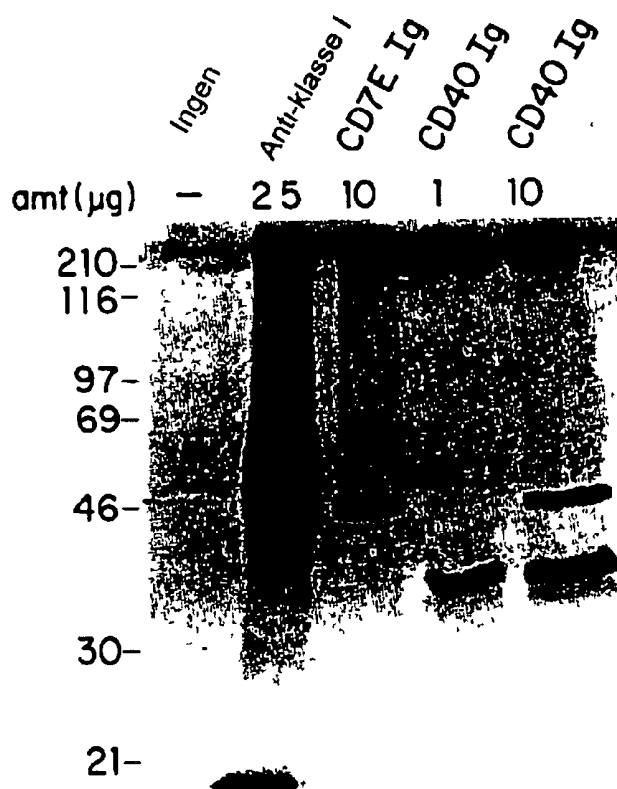


Figur 2.



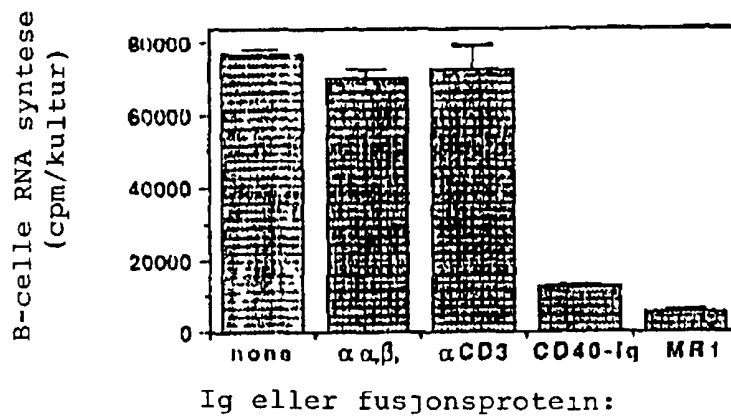
Figur 3





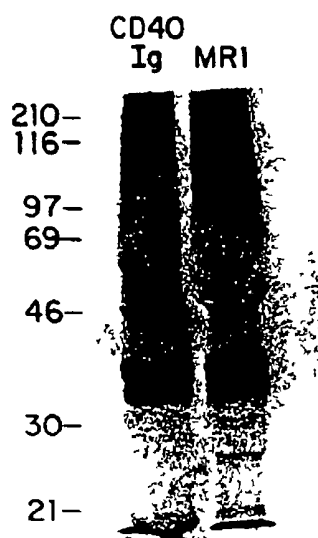
Figur 4

Figur 5



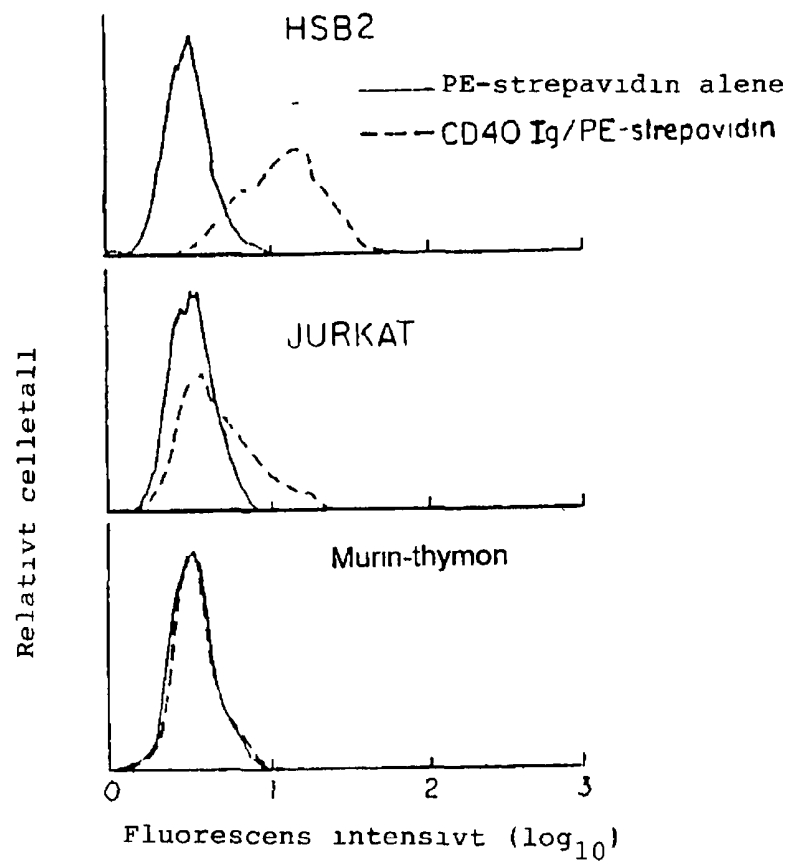
a

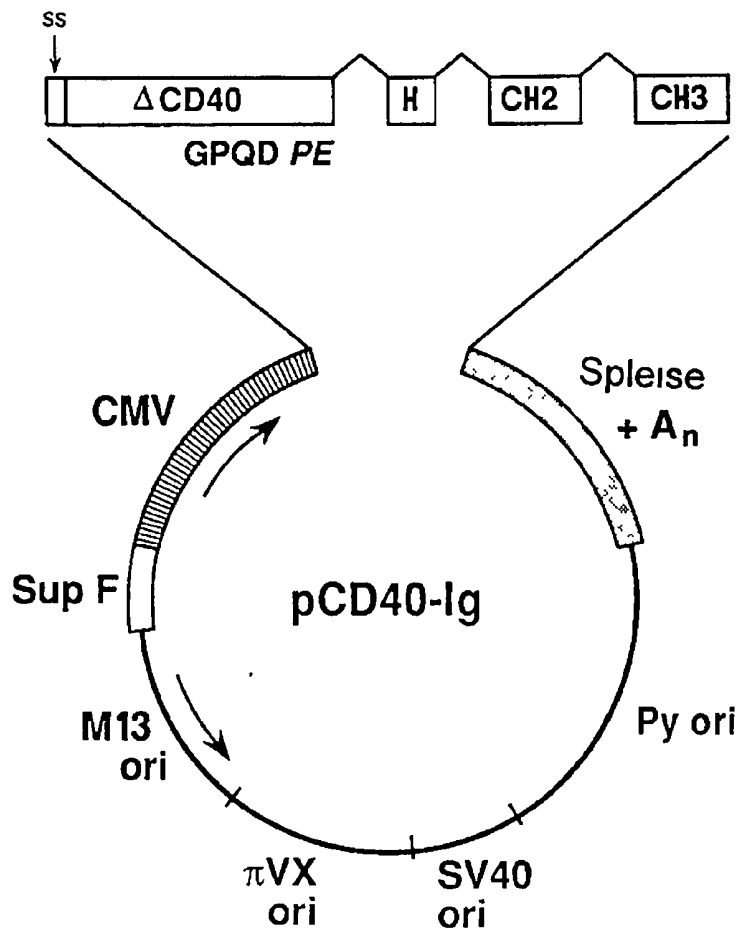
Farget anti-stoff Eller fusjonsprotein	Blokkeringsmiddel Antistoff	Hvilende T _{h1}	Aktivert T _h
CD40 (50 µg/ml)	---	4.9	56.5
MR1 (50 µg/ml)	---	5.7	61.8
CD40 (50 µg/ml)	MR1 (50 µg/ml)	5.0	11.7
CD40 " "	MR1 (25 µg/ml)	---	20.7
CD40 " "	MR1 (10 µg/ml)	---	30.3
CD40 " "	MR1 (5 µg/ml)	---	49.5
CD40 " "	α-α,β (50 µg/ml)	---	63.0

b

Figur 6

Figur 7





FIGUR 8B