(12) **PATENT**

(19) NO (11) **332316** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20034312(332316)	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.02.18 PCT/JP2002/01361
(22)	Inng.dag	2003.09.26	(85)	Videreføringsdag	2003.09.26
(24)	Løpedag	2002.02.18	(30)	Prioritet	2001.03.27, JP, 89158/01 2002.01.29, JP, 19291/02
(41)	Alm.tilgj	2003.11.24			
(45)	Meddelt	2012.08.27			

(73) Innehaver Japan Tobacco Inc., 2-1, Toranomon, Minato-ku, JP-105-8422 TOKYO, Japan
(72) Oppfinner Mamoru Watanabe, 2-25-4, Eifuku, Suginami-ku, Tokyo 168-0064, Japan
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Benevnelse **Farmasøytisk preparat inneholdende anti-AILIM antistoff for bruk ved behandling av kolitt eller Crohn`s sykdom.**

(56) Anførte publikasjoner WO 0115732 A1, WO 0112658 A2, WO 0046240 A2

(57) Sammendrag

Det har blitt funnet at et antistoff mot AILIM (også betegnet ICOS og 8F4) i signifikant grad inhiberer utløsning av inflammatoriske tarmsykdommer (nærmere bestemt Crohns sykdom og kolitt, for eksempel ulcerøs kolitt), og at dette antistoff utøver en signifikant terapeutisk virkning på forskjellige inflammatoriske tarmsykdommer.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse gjelder farmasøytiske preparater som omfatter en forbindelse med modulerende aktivitet på den biologiske aktivitet av "aktiverings-induserbart lymfocyttimmunmodulerende molekyl" (AILIM) (også betegnet "induserbar kostimulator" (ICOS)), fortrinnsvis signaloverføringen som formidles av AILIM.

Foreliggende oppfinnelse gjelder farmasøytiske preparater for undertrykkelse, behandling eller forebyggelse av Crohns sykdom.

Oppfinnelsens bakgrunn

Slimhinner i mage-tarmkanalen utsettes kontinuerlig ikke bare overfor antigener avledet fra kosten og bakteriefloraen i tarmen, men også overfor forskjellige antigener som foreligger i det ytre miljø og som er skadelige for den levende organisme, f. eks. patogene mikroorganismer. Slimhinnene i mage-tarmkanalen besitter derfor en cytotoksisk aktivitet for å kunne bekjempe slike antigener som er skadelige for organismen. Samtidig som de opprettholder evnen til å utskille antistoffer for nøytralisering av toksiner, har disse slimhinnene en enestående immunmekanisme for undertrykkelse av overdrevne immunreaksjoner mot antigener, f. eks. fra kost og tarmbakteriefloraen (denne mekanismen betegnes gastrointestinal mukøs immunitet eller tarmimmunitet). Nærmere bestemt etableres normal mukøs immunitet ved en balanse mellom positive immunresponser mot patogener og negative immunresponser mot ikke-patogene antigener. Dersom denne balanse av immunologisk homeostatisk vedlikehold bryter sammen, opptrer inflammasjon, allergier og infeksjoner, noe som utløser oppstart av tarmsykdommer som generelt betegnes inflammatoriske tarmsykdommer (IBD) og næringsmiddelallergier.

De mest representative inflammatoriske tarmsykdommene er Crohns sykdom (CD) og kolitt (fortrinnsvis ulcerøs kolitt (UC)). Begge er sykdommer for hvilke patogenet ikke kan spesifiseres og hvori kroniske og tilbakevendende anfall av buksmerter og diaré opptrer, noe som utgjør signifikante og langvarige hindringer i dagliglivet til pasientene, som gjerne er barn eller ungdommer. Siden kolitt (fortrinnsvis ulcerøs kolitt) kan være en årsak til kolonkreft, foreligger det videre et stort behov for å belyse patogenesen for kolitt og å utvikle effektive, terapeutiske fremgangsmåter.

Selv om forskjellige muligheter, f. eks. genetiske faktorer og miljøfaktorer, har blitt diskutert når det gjelder mekanismen for oppstart av inflammatoriske tarmsykdommer, tyder nyere undersøkelser på at det er svært sannsynlig at unormal immunitet i tarmkanalen (gastrointestinal mukøs immunitet) kan være årsaken. Nærmere bestemt opptrer inflammasjoner eller allergier i tarmens slimhinner grunnet induksjon av en overdreven immunrespons som av en eller annen grunn opptrer mot antigener i tarmen

som normalt er ikke-patogene og som har lav immunogenisitet, noe som fører til oppstart av en inflammatorisk tarmsykdom.

Det har videre blitt foreslått at unormal immunitet mot fremmede patogener, antigener avledet fra kosten eller autoantigener spiller en viktig rolle i slike inflammasjoner og allergier i tarmen. Videre peker nyere undersøkelser på muligheten for at unormale immunresponser mot visse endogene bakterier manifesterer seg som kroniske inflammatoriske reaksjoner.

Denne mekanismen for oppstart av inflammasjoner og allergier i tarmen grunnet unormal immunitet i tarmkanalen understøttes av analyser av funksjon og differensiering av T-celler i pasienter, så vel som cytokinproduksjonsmønsteret i lesjoner eller serum. Videre viser analyse av forskjellige nylig utviklede dyremodeller for inflammatoriske tarmsykdommer også at unormal slimhinneimmunitet gir kronisk inflammasjon i tarmen (Gastroenterology, bind 109, s. 1344-1367,1995).

Det er f. eks. klart at T-celler spiller en viktig rolle i oppstart av kronisk enteritt, siden inflammasjon i tarmen utvikles spontant hos T-cellereseptor (TCR)-α-kjede-"knock out"-mus (TCRα $^{-/-}$) (Cell, bind 75, s. 275-282, 1993, J. Exp. Med., bind 183, s. 847-856, 1996). Ved kolitt hos disse TCRα$^{-/-}$-mus er produksjonen av IFN-γ i tarmen forhøyet, og i inflammasjonens innledende stadier, observeres et forhøyet nivå av IL-1α og IL-1β (Laboratory Investigation, bind 76, s. 385-397, 1997). Videre kan TCRβ (β^{dim})-T-celler som har en spesifikk undergruppe av Vβ og som danner IL-4, observeres i tarmkanal og lymfeknuter (Gastroenterology, bind 112, s. 1876-1886, 1997). I denne modellen antas det at mangel på TCRαβ-T-celler gir en økt andel unormale T-celler, som så forårsaker unormal regulering av cytokinproduksjonen og formidler inflammasjonen.

I en modell hvor CD4$^+$/CD45RB^{high}-T-celler tilføres mus med alvorlig kombinert immundefisiens (SCID-mus) induseres alvorlig enteritt sammen med hyperplasi av slimhinnelaget og infiltrasjon av lymfocytter i tarmen. Denne enteritt opptrer imidlertid ikke dersom ikke-fraksjonerte CD4$^+$-T-celler tilføres samtidig (J. Exp. Med., bind 178, s. 237-244, 1993, Int. Immunol., bind 5, s. 1461-1471, 1993). CD4$^+$-T-celler fra SCID-mus som har utviklet enteritt danner IFN-γ. På den annen side, siden enteritt undertrykkes ved tilførsel av antistoffer mot IFN-γ, antas T-celler av Th1-type å forårsake inflammasjonen (Immunity, bind 1, s. 553-562, 1994).

Basert på disse fakta er det tilsynelatende ingen tvil om at CD4$^+$-T-celler i tarmen og overdreven aktivering av disse, er viktige faktorer ved inflammatoriske tarmsykdommer.

Regresjon av en enteritt med redusert antall CD4$^+$-T-celler hos pasienter som lider av både en inflammatorisk tarmsykdom og HIV, understøtter videre også den store betydning av unormale CD4$^+$-T-celler i inflammatoriske tarmsykdommer (J. Clin. Gastroenterology, bind 23, s. 24-28, 1996). Basert på dette funn, har det blitt gjort forsøk på å behandle inflammatoriske tarmsykdommer ved anvendelse av et anti-CD4-antistoff,

og det har blitt rapportert at inflammatoriske lesjoner undertrykkes ved tilførsel av et anti-CD4-antistoff (Gut, bind 40, s. 320-327, 1997).

På den annen side betyr en slik unormal funksjonell regulering av T-cellene at balansen for dannelse av regulatoriske cytokiner har brutt sammen.

Det har faktisk også blitt rapportert at enteritt utvikles spontant hos IL-2-"knockout"-mus og i IL-10-"knockout"-mus (Cell, bind. 75, s. 235-261, 1993, Cell, bind 75, s. 263-274, 1993). Videre observeres i disse modellene også overdreven dannelse av IFN-γ, noe som understøtter det faktum at en overdreven Th1-type T-cellereaksjon har opptrådt. Overproduksjonen av IFN-γ i disse modellene er i samsvar med observasjonen vedrørende forhøyet ekspresjon av IFN-γ i lesjoner som observeres ved Crohns sykdom. Enteritt kan behandles i IL-10-mangelmus ved tilførsel av IL-10. Det har blitt rapportert at enteritt kan undertrykkes ved denne fremgangsmåten i SCID-mus til hvilke $CD4^+/CD45RB^{high}$-T-celler har blitt tilført (Immunity, bind 1, s, 553-562, 1994).

Som nevnt ovenfor har analysen av mekanismen for oppstart av inflammatoriske tarmsykdommer utviklet seg fra tanken om unormal gastrointestinal mukøs immunitet, noe som antyder muligheten av å behandle inflammatoriske tarmsykdommer ved å undertrykke forhøyet aktivering av $CD4^+$-T-celler og overproduksjon av cytokiner. Den faktiske patogenese for inflammatoriske tarmsykdommer har imidlertid ennå ikke blitt avslørt, og videre har en effektiv terapeutisk fremgangsmåte ikke blitt tilveiebrakt.

Aktiveringen av T-celler (ervervelse av antigenspesifisitet) innledes når T-cellene gjenkjenner antigener som presenteres av antigenpresenterende celler (APC), f. eks. makrofager, B-celler eller dendrittceller. APC prosesserer de inkorporerte antigener, og de prosesserte antigenene bindes til vevstypekomplekset (MHC) og presenteres. T-cellene mottar det første signal for celleaktivering (ervervelse av spesifisitet) som en følge av gjenkjennelse av det prosesserte antigen som presenteres av APC via et kompleks som dannes mellom T-cellereseptoren (TCR) på T-cellemembran-overflaten og antigenet (TCR/CD3-komplekset).

For tilstrekkelig aktivering av T-cellene er et andre signal som betegnes det kostimulerende signal nødvendig i tillegg til det første signal. T-cellene aktiveres antigenspesifikt ved mottakelse av dette kostimulerende signal etter at de har mottatt det første signalet.

For denne andre signaloverføringen er interaksjonen (nærmere bestemt den intercellulær adhesjon som formidles via bindinger som dannes mellom de påfølgende molekyler), mellom CD28 (også betegnet Tp44, T44 eller 9.3-antigen), som er et celleoverflatemolekyl som hovedsakelig uttrykkes på T-celler og brysselceller, CD80 (også betegnet som B7-1, B7, BB1 eller B7/BB1), som er et celleoverflatemolekyl som uttrykkes av antigenpresenterende celler (makrofager, monocytter, dendrittceller) og CD86 (også betegnet B7-2 eller B70), som også er et celleoverflatemolekyl på antigen-presenterende celler, ekstremt viktig.

Det har videre blitt eksperimentelt vist at interaksjonen (nærmere bestemt den intercellulære adhesjon som formidles via bindinger som dannes mellom de påfølgende molekyler) mellom cytolytisk T-lymfocyttassosiert antigen 4 (CTLA-4), hvis ekspresjon forhøyes avhengig av det andre signalet, CD80 (B7-1) og CD86 (B7-2) også spiller en viktig rolle i reguleringen av T-celleaktiveringen via dette andre signalet. Nærmere bestemt har reguleringen av T-celleaktiveringen via denne andre signaloverføringen blitt vist å omfatte minst interaksjonen mellom CD28 og CD80/CD86, forhøyet ekspresjon av CTLA-4, som anses å være avhengig av denne interaksjonen, og interaksjonen mellom CTLA-4 og CD80/CD86.

I tillegg har det nylig, tilsvarende som for CTLA4 og CD28 som beskrives ovenfor, blitt påvist et molekyl som betegnes aktiveringsinduserbart lymfocyttimmun-modulerende molekyl (AILIM; menneske, mus og rotte, Int. Immunol., 12(1), s. 51-55, 2000) også betegnet induserbar kostimulator (ICOS; menneske; Nature, 397 (6716), s. 263-266, 1999); J. Immunol., 166(1), s. 1, 2001; J. Immunol., 165 (9), s. 5035, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun., 276(1), s. 335, 2000; Immunity, 13(1), s. 95, 2000; J. Exp. Med., 192(1), s. 53, 2000; Eur. J. Immunol., 30(4), s. 1040, 2000) som det tredje kostimulerende overføringsmolekyl som overfører et andre signal (kostimulerende signal) som er nødvendig for aktivering av lymfocytter som T-celler, og som koblet til signalet regulerer funksjonen av aktiverte lymfocytter, for eksempel aktiverte T-celler.

Videre har et nytt molekyl som betegnes B7h, B7RP-1, GL50 eller LICOS, som anses å være en ligand som interagerer med det kostimulerende transmisjonsmolekylet AILIM, blitt påvist (Nature, bind 402, nr. 6763, s. 827-832, 1999; Nature Medicine, bind 5, nr. 12, s. 1365-1369, 1999; J. Immunology, bind 164, s. 1653-1657, 2000; Curr. Biol., bind 10, nr. 6, s. 333-336, 2000).

Omfattende undersøkelser er i gang når det gjelder de biologiske funksjonene av disse to nye molekylene og den funksjonelle kontrollen av lymfocytter, f.eks. T-celler, via den tredje kostimulerende signaloverføringen via disse molekylene.

Det har imidlertid ikke en gang blitt foreslått en sammenheng mellom AILIM (ICOS), som er det tredje kostimulerende overføringsmolekylet som anses essensielt for aktivering av T-celler, for eksempel $CD4^+$-T-celler, og oppstart av den ovenfor nevnte unormale immuniteten i tarmens slimhinner og inflammatoriske tarmsykdommer (Crohns sykdom og kolitt (ulcerøs kolitt og liknende)). Heller ikke har det blitt foreslått å forsøke å behandle inflammatoriske tarmsykdommer ved å regulere funksjonen av dette AILIM-molekylet

EP 1125585 A1 omtaler et anti-AILIM antistoff som er nyttig for behandling eller forebyggelse av forskjellige autoimmune sykdommer, allergiske sykdommer eller inflammatoriske sykdommer forårsaket av aktiveringen av lymfocytter slike som T-celler og unormaliteten av reguleringen av aktiverte lymfocytt funksjoner.

WO 0112658 angir at TH2-celle-aktivering er nødvendig for behandling av TH1-avhengige sykdommer ved å benytte et agens som induserer ICOS signaltransduksjon og IL-10 produksjon.

WO 0046240 identifiserer to polypeptider som betegnes CD28 relatert protein-(CRP1) og B7 relatert protein-1 (B7RP1). Polypeptidene er involvert i T-celle kostimulering og proliferering og er nyttige i forbindelse med forebygging og behandling av sykdommer relatert til kontroll av T-celle responser herav immunforstyrrelser.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Nærmere bestemt er et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe farmasøytiske midler og bruk av dem for undertrykkelse, behandling eller forebyggelse av Crohns sykdom og kolitt (ulcerøs kolitt og liknende) ved, via antistoffer, å modulere den biologiske funksjon av det nye molekyl AILIM, som antas å overføre det andre signalet som er nødvendig for aktivering av lymfocytter, for eksempel T-celler (det kostimulerende signal), og regulere funksjonen av aktiverte lymfocytter, for eksempel aktiverte T-celler.

Et videre formål er å anvende slike antistoffer for tilveiebringelse av fremgangsmåter for å forsterke den terapeutiske virkningen av foreliggende farmasøytiske midler som hyppig anvendes for behandling av inflammatoriske tarmsykdommer (binyrebark-hormoner, salazosulfapyridin).

Omfattende undersøkelser av fremgangsmåter for undertrykkelse av den biologiske funksjonen av AILIM (ICOS) hos pattedyr og tarmallergier og inflammatoriske tarmsykdommer hvor den unormale immuniteten i tarmkanalen kan spille en viktig rolle (fortrinnsvis Crohns sykdom og kolitt (ulcerøs kolitt og liknende)), førte til at de foreliggende oppfinnere oppdaget at farmasøytiske midler som regulerer funksjonen av AILIM i signifikant grad undertrykker inflammatoriske tarmsykdommer (fortrinnsvis Crohns sykdom og kolitt (ulcerøs kolitt og liknende)). Således ble foreliggende oppfinnelse utført.

Et farmasøytisk preparat ifølge foreliggende oppfinnelse er anvendbart som et farmasøytisk middel for modulering av forskjellige reaksjoner *in vivo* i hvilke overføringen av et kostimulerende signal til AILIM-uttrykkende celler formidlet av AILIM inngår (for eksempel proliferasjon av AILIM-uttrykkende celler, dannelse av ett eller flere cytokiner fra AILIM-uttrykkende celler, immuncytolyse eller celledød, apoptose eller fjerning av AILIM-uttrykkende celler, og induserende aktivitet på antistoffavhengig cellulær cytoksisitet mot AILIM-uttrykkende celler), og/eller som et farmasøytisk middel for å forhindre oppstart og/eller utvikling av forskjellige sykdommer i hvilke signaloverføringen som formidles av AILIM inngår, og for behandling eller profylakse av sykdommene.

Nærmere bestemt kan et farmasøytisk preparat ifølge foreliggende oppfinnelse modulere (undertrykke eller fremme) proliferasjon av AILIM-uttrykkende celler, apoptose, celledød eller cellefjerning, eller immuncytolyse, eller som kan modulere (inhibere eller fremme) dannelsen av cytokiner (for eksempel interferon γ eller interleukin 4) ved AILIM-uttrykkende celler, og som kan forhindre forskjellige sykdomstilstander som utløses av forskjellige fysiologiske fenomener i hvilke signaloverføringen som formidles av AILIM inngår, og som tillater behandling eller forebyggelse av forskjellige sykdommer.

En slik spesielt foretrukket utførelse av de farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse er farmasøytiske preparater som omfatter en forbindelse som induserer celledød, apoptose eller fjerning av AILIM-uttrykkende celler.

Ved anvendelse av de farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan sykdommer som skyldes unormal immunitet i tarmkanalen, nærmere bestemt inflammatoriske tarmsykdommer (fortrinnsvis Crohns sykdom og kolitt (ulcerøs kolitt og liknende)) og næringsmiddelallergier undertrykkes, forhindres og/eller behandles.

Videre kan de farmasøytiske preparater ifølge foreliggende oppfinnelse forsterke den terapeutiske virkning på inflammatoriske tarmsykdommer ved anvendelse i kombinasjon med et foreliggende farmasøytisk middel som foreskrives for behandling av slike inflammatoriske tarmsykdommer.

Nærmere bestemt er foreliggende oppfinnelse som beskrevet i de påfølgende punkter (1) til (4).

(1) Farmasøytisk preparat for undertrykkelse, behandling eller forebyggelse av kolitt eller Crohn's sykdom, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et antistoff som binder til AILIM, eller del av nevnte antistoff, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

(2) Det farmasøytisk preparatet ifølge (1), hvor nevnte antistoff, eller del av nevnte antistoff, har en aktivitet som induserer celledød i en AILIM-uttrykkende celle.

(3) Anvendelse av et antistoff som binder til AILIM, eller del av nevnte antistoff, for fremstilling av et medikament for undertrykkelse, behandling eller forebyggelse av kolitt eller Crohn's sykdom.

(4) Anvendelse ifølge (4), hvor nevnte antistoff, eller del av nevnte antistoff, har en aktivitet som induserer celledød av en AILIM-uttrykkende celle.

Foreliggende oppfinnelser beskrives i detalj nedenfor ved at begrepene og fremgangsmåtene for fremstilling av forbindelsene som anvendes i foreliggende oppfinnelse defineres.

Begrepet "pattedyr" betyr menneske, ku, geit, kanin, mus, rotte, hamster og marsvin, hvor menneske, ku, rotte, mus eller hamster foretrekkes, og menneske foretrekkes spesielt.

"AILIM" ifølge foreliggende oppfinnelse er en forkortelse for "Aktiverings-induserbart Lymfocyttimmunmodulerende Molekyl" og betegner et celleoverflatemolekyl hos et pattedyr med strukturen og funksjonen som beskrives i tidligere rapporter (J. Immunol., 166(1), s. 1, 2001; J. Immunol., 165 (9), s. 5035, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun., 276(1), s. 335, 2000; Immunity, 13 (1), s. 95, 2000; J. Exp. Med., 192 (1), s. 53, 2000; Eur. J. Immunol., 30 (4), s. 1040, 2000; Int. Immunol., 12 (1), s. 51, 2000; Nature, 397 (6716), s. 263, 1999; GenBank tilvekstnummer BAA82129 (menneske), BAA82128 (rotte), BAA82127 (mutant rotte), BAA82126 (mus)).

Spesielt foretrukket betyr begrepet AILIM isolert fra et menneske (for eksempel International Immunology, bind 12, nr. 1, s. 51-55, 2000; GenBank tilvekstnummer BAA82129).

Dette AILIM betegnes også ICOS (Nature, bind 397, nr. 6716, s. 263-266, 1999) eller JTT-1-antigen/JTT-2-antigen (ubehandlet publisert japansk patentsøknad nr. (JP-A) Hei 11-29599, internasjonal patentsøknad nr. WO98/38216), og disse betegnelser viser til samme molekyl.

I tillegg omfatter "AILIM" i foreliggende oppfinnelse aminosyresekvensene til AILIM fra hvert pattedyr som er beskrevet i den tidligere rapporterte litteratur, og spesielt foretrukket et polypeptid med, i det vesentlige, samme aminosyresekvens som humant AILIM. Humane AILIM-mutanter som tilsvarer den tidligere påviste AILIM-mutant avledet fra rotte (GenBank tilvekstnummer BAA82127) omfattes også av "AILIM" ifølge foreliggende oppfinnelse.

Her betyr uttrykket "med i det vesentlige samme aminosyresekvens" at "AILIM" ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter polypeptider med en aminosyresekvens i hvilken én eller flere aminosyrer, fortrinnsvis fra 1 til 10 aminosyrer, spesielt foretrukket fra 1 til 5 aminosyrer, har blitt substituert, delert, og/eller modifisert, og polypeptider med en aminosyresekvens i hvilken én eller flere aminosyrer, fortrinnsvis fra 1 til 10 aminosyrer, spesielt foretrukket fra 1 til 5 aminosyrer, har blitt addert, så lenge som disse polypeptidene i det vesentlige har de samme biologiske egenskapene som polypeptidet som omfatter aminosyresekvensen som er beskrevet i tidligere rapporter.

Slike substitusjoner, delesjoner eller insersjoner av aminosyrer kan oppnås ifølge sedvanlige fremgangsmåter (Experimental Medicine: SUPPLEMENT, "Handbook of Genetic Engineering" (1992)).

Eksempler er setestyrt mutagenese basert på syntetisk oligonukleotid (dupleks med gap-fremgangsmåten), punktmutagenese hvor en punktmutasjon innføres tilfeldig ved behandling med nitritt eller sulfitt, fremgangsmåten ved hvilken en delesjonsmutant fremstilles med Bal31-enzym, kassettmutagenese, linkerskanningsfremgangsmåten, feilinkorporeringsfremgangsmåten, feiltilpasset primerfremgangsmåten, DNA-segment-syntesefremgangsmåten.

Setestyrt mutagenese med syntetisk oligonukleotid (dupleks med gap-fremgangsmåten) kan for eksempel utføres som følger: Området man ønsker å mutagenisere klones inn i en M13-bakteriofagvektor med en amber-mutasjon for dannelse av et enkelttrådet bakteriofag-DNA. Etter linearisering av RF I-DNA fra en M13-vektor uten amber-mutasjon ved restriksjonsenzymbehandling sammenblandes dette DNA med det enkelttrådede bakteriofag-DNA som er nevnt ovenfor, denatureres og hybridiseres, hvorved det dannes et "dupleks med gap-DNA". Et syntetisk oligonukleotid i hvilket mutasjoner er innført hybridiseres til dette dupleks med gap-DNA, og et lukket, sirkulært, dobbelttrådet DNA fremstilles ved behandling med DNA polymerase og DNA ligase. *E. coli* mutS-celler, som mangler feiltilpasningsreparasjonsaktivitet, transfekteres med dette DNA. *E.coli*-celler uten suppressoraktivitet infiseres med de fremvokste bakteriofager, og kun bakteriofager uten amber-mutasjoner analyseres.

Fremgangsmåten ved hvilken en punktmutasjon innføres med nitritt, benytter for eksempel prinsippet som nevnes nedenfor: Dersom DNA behandles med nitritt deamineres nukleotider slik at adenin omdannes til hypoksantin, cytosin til uracil og guanin til xantin. Dersom deaminert DNA innføres i celler erstattes "A:T" og "G:C" med "G:C" henholdsvis "A:T", siden hypoksantin, uracil og xantin danner basepar med cytosin, adenin henholdsvis tymin under DNA-replikasjonen. I praksis hybridiseres enkelttrådede DNA-fragmenter behandlet med nitritt til "dupleks med gap-DNA", hvoretter mutante stammer separeres ved manipulering på samme måte som for setestyrt mutagenese med syntetisk oligonukleotid (dupleks med gap-fremgangsmåten).

Begrepet "cytokin", som i "dannelse av et cytokin ved AILIM-uttrykkende celler" i foreliggende oppfinnelse betyr et tilfeldig cytokin som dannes av AILIM-uttrykkende celler (fortrinnsvis T-celler).

Eksempler på T-celler er T-celler av Th1-type eller Th2-type, og et cytokin ifølge foreliggende oppfinnelse betyr nærmere bestemt et cytokin som dannes av T-celler av Th1-type og/eller et tilfeldig cytokin som dannes av T-celler av Th2-type.

Cytokiner som dannes av T-celler av Th1-type omfatter IFN-γ, IL-2, TNF og IL-3, og cytokiner som dannes av T-celler av Th2-celler av Th2-type omfatter IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, og TNF (Cell, bind 30, nr. 9, s. 343-346, 1998).

Uttrykket "forbindelse", "forbindelse med modulerende aktivitet på signal-overføringen som formidles av AILIM", "forbindelse med inhiberende aktivitet på proliferasjonen av AILIM-uttrykkende celler eller på dannelsen av et cytokin ved AILIM-uttrykkende celler" eller "forbindelse med en aktivitet som induserer celledød av AILIM-uttrykkende celler" som anvendt i foreliggende oppfinnelse betyr en naturlig forekommende forbindelse eller en kunstig fremstilt tilfeldig forbindelse.

En spesielt foretrukket utførelse av "forbindelsen" ifølge foreliggende oppfinnelse er en forbindelse med en aktivitet som induserer celledød, apoptose eller fjerning av AILIM-uttrykkende celler.

Her betyr uttrykket "signaloverføringen som formidles av AILIM" signaloverføringen via AILIM som fører til endring av enhver fenotype i de AILIM-uttrykkende celler som er beskrevet ovenfor eller i de påfølgende eksempler (endret celleproliferasjon, aktivering av celler, inaktivering av celler, apoptose og/eller evnen til å danne et tilfeldig cytokin fra AILIM-uttrykkende celler).

"Forbindelsen" kan hovedsakelig inndeles i en "proteinforbindelse" og en "ikke-proteinforbindelse".

Eksempler på "proteinforbindelser" er de påfølgende polypeptider, antistoffer (polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer eller deler av monoklonale antistoffer).

Dersom forbindelsen er et antistoff er den fortrinnsvis et monoklonalt antistoff. Dersom forbindelsen er et monoklonalt antistoff omfatter den ikke bare monoklonale antistoffer avledet fra ikke-menneskelige pattedyr, men også de påfølgende rekombinante, kimære monoklonale antistoffer, rekombinante humaniserte monoklonale antistoffer og humane monoklonale antistoffer.

Dersom forbindelsen er et polypeptid omfatter den følgende polypeptider, polypeptid (oligopeptid)-fragmenter, fusjonspolypeptider og kjemisk modifiserte polypeptider. Eksempler på oligopeptider er peptider som omfatter fra 5 til 30 aminosyrer, fortrinnsvis fra 5 til 20 aminosyrer. En kjemisk modifisering kan utformes avhengig av forskjellige formål, for eksempel for å forlenge halveringstiden i blod når det gjelder tilførsel *in vivo* eller for å forhøye toleransen overfor degradering eller å øke absorpsjonen i tarmkanalen ved oral tilførsel.

Eksempler på polypeptider er som følger:

(1) Et polypeptid som omfatter hele eller en del av det ekstracellulære område i AILIM,

(2) et fusjonspolypeptid som omfatter hele eller en del av det ekstracellulære område i AILIM og hele eller en del av immunglobulintungkjedens konstante område, eller

(3) et polypeptid som bindes til AILIM.

Eksempler på "ikke-proteinforbindelser" er DNA, RNA og kjemisk syntetiserte forbindelser.

Her betyr "DNA" "DNA som omfatter en partiell nukleotidsekvens fra et "antisens"-DNA utformet basert på nukleotidsekvensen til DNA (innbefattet cDNA og genomisk DNA) som koder for det ovenfor beskrevne AILIM (fortrinnsvis humant AILIM) eller et kjemisk modifisert DNA derav" som er anvendbart som et farmasøytisk "antisens"-DNA-middel. Nærmere bestemt kan "antisens"-DNA inhibere transkripsjon av DNA som koder for AILIM til mRNA eller translasjon av mRNA til et protein ved at det hybridiserer med DNA eller RNA som koder for AILIM.

Uttrykket "partiell nukleotidsekvens" som benyttet her viser til en partiell nukleotidsekvens som omfatter et tilfeldig antall nukleotider fra et tilfeldig område. En partiell nukleotidsekvens omfatter fra 5 til 100 på hverandre følgende nukleotider,

fortrinnsvis fra 5 til 70 på hverandre følgende nukleotider, mer foretrukket fra 5 til 50 på hverandre følgende nukleotider, og enda mer foretrukket fra 5 til 30 på hverandre følgende nukleotider.

Dersom dette DNA anvendes som et farmasøytisk "antisens"-DNA-middel kan DNA-sekvensen være delvis kjemisk modifisert for å forlenge halveringstiden (førhøye stabiliteten) i blod når DNA tilføres til pasienter, for å forhøye permeabilliteten av dette DNA i intracytoplasmatiske membraner eller for å forhøye resistensen overfor degradering eller absorpsjonen av oralt tilført DNA i fordøyelsesorganene. Kjemiske modifikasjoner omfatter for eksempel modifisering av en fosfatbinding, ribose, et nukleotid, sukkergruppen og 3'-enden og/eller 5'-enden i strukturen til et DNA-oligonukleotid.

Modifikasjoner av fosfatbindinger omfatter for eksempel overføring av én eller flere bindinger til fosfodiesterbindinger (D-oligo), fosforotioatbindinger, fosforoditioat-bindinger (S-oligo), metylfosfonat (MP-oligo)-bindinger, fosforoamidatbindinger, ikke-fosfatbindinger eller metylfosfonotioatbindinger, eller kombinasjoner av disse. Modifikasjon av ribose omfatter for eksempel overføring til 2'-fluorribose eller 2'-O-metylribose. Modifikasjon av et nukleotid omfatter for eksempel overføring til 5-propynyluracil eller 2-aminoadenin.

Her betyr begrepet "RNA" "RNA som omfatter en partiell nukleotidsekvens fra et "antisens"-RNA utformet basert på nukleotidsekvensen til RNA som koder for det ovenfor beskrevne AILIM (fortrinnsvis humant AILIM) eller et kjemisk modifisert RNA derav" som er anvendbart som et farmasøytisk "antisens"-RNA-middel. Dette "antisens"-RNA kan inhibere transkripsjonen av DNA som koder for AILIM til mRNA eller translasjonen av dette mRNA til et protein ved hybridisering med DNA eller RNA som koder for AILIM.

Uttrykket "partiell nukleotidsekvens" som anvendt her viser til en partiell nukleotidsekvens som omfatter et tilfeldig antall nukleotider fra et tilfeldig område. En partiell nukleotidsekvens omfatter fra 5 til 100 på hverandre følgende nukleotider, fortrinnsvis fra 5 til 70 på hverandre følgende nukleotider, mer foretrukket fra 5 til 50 på hverandre følgende nukleotider og enda mer foretrukket fra 5 til 30 på hverandre følgende nukleotider.

"Antisens"-RNA-sekvensen kan være delvis kjemisk modifisert for å forlenge halveringstiden (forhøye stabiliteten) i blodet når RNA tilføres til pasienter, for å forhøye permeabiliteten av RNA i intracytoplasmatiske membraner eller for å forhøye resistensen overfor degradering eller absorpsjonen av oralt tilført RNA i fordøyelsesorganene. Kjemiske modifikasjoner omfatter modifikasjoner som dem angitt for det ovenfor beskrevne "antisens"-DNA.

Eksempler på "en kjemisk syntetisert forbindelse" er en tilfeldig forbindelse, bortsett fra det ovenfor beskrevne DNA, RNA og proteinforbindelser, med en

molekylvekt på mellom tilnærmet 100 og tilnærmet 1000 eller mindre, fortrinnsvis en forbindelse med en molekylvekt på mellom tilnærmet 100 og tilnærmet 800, og mer foretrukket en molekylvekt på mellom 100 og tilnærmet 600.

Uttrykket "polypeptid" som inngår i definisjonen av den ovenfor beskrevne "forbindelse" betyr en del (et fragment) av en polypeptidkjede som utgjør AILIM (fortrinnsvis humant AILIM), fortrinnsvis hele eller en del av et ekstracellulært område fra polypeptidet som utgjør AILIM (1 til 5 aminosyrer kan om ønskelig adderes til områdets N-ende og/eller C-ende).

AILIM ifølge foreliggende oppfinnelse er et transmembranmolekyl som penetrerer cellemembranen og som omfatter 1 eller 2 polypeptidkjeder.

Her betyr et "transmembranprotein" et protein som er festet til cellemembranen via et hydrofobt peptidområde som penetrerer lipiddobbeltlaget i membranen én eller flere ganger, og hvis struktur totalt sett består av tre hovedområder, dvs. et ekstracellulært område, et transmembranområde og et cytoplasmatisk område, som observert for mange reseptorer eller celleoverflatemolekyler. Et slikt transmembranprotein inngår i enhver reseptor eller celleoverflatemolekyl som en monomer eller som en homodimer, heterodimer eller oligomer, koblet til én eller flere kjeder med samme eller forskjellige aminosyresekvenser.

Her betyr et "ekstracellulært område" hele eller en del av en partiell struktur (et partielt område) i totalstrukturen til det ovenfor nevnte transmembranproteinet hvor den partielle strukturen foreligger utenfor membranen. Med andre ord betyr det hele eller en del av det område i transmembranproteinet som ikke omfatter området som er inkorporert i membranen (transmembranområdet) og området som foreligger i cytoplasma etter transmembranområdet (det cytoplasmatiske område).

"Et fusjonspolypeptid" som inngår i den ovenfor nevnte "proteinforbindelse" betyr et fusjonspolypeptid som omfatter hele eller en del av det ekstracellulære område i et polypeptid som utgjør AILIM (fortrinnsvis humant AILIM) og "hele eller en del av det konstante område i immunglobulintungkjeden (Ig, fortrinnsvis humant Ig)". Fusjonspolypeptidet er fortrinnsvis et fusjonspolypeptid som omfatter det ekstracellulære område fra AILIM og en del av det konstante område fra den humane IgG-tungkjede, og spesielt foretrukket et fusjonspolypeptid mellom det ekstracellulære område fra AILIM og et område (Fc) fra den humane IgG-tungkjede som omfatter et hengselområde, et C_H2-domene og et C_H3-domene. Som IgG foretrekkes IgG1, og som AILIM foretrekkes AILIM fra menneske, mus eller rotte (fortrinnsvis menneske).

Uttrykket "hele eller en del av det konstante område i immunglobulin (Ig)-tungkjeden "som anvendt heri betyr det konstante område eller Fc-området i humant avledet immunglobulintungkjede (H-kjede) eller en del derav. Immunglobulinet kan være ethvert immunglobulin tilhørende enhver klasse og enhver underklasse. Nærmere bestemt omfatter immunglobulinet IgG (IgG1, IgG2, IgG3, og IgG4), IgM, IgA (IgAl og IgA2),

IgD, og IgE. Immunglobulinet er fortrinnsvis IgG (IgG1, IgG2, IgG3, eller IgG4), eller IgM. Eksempler på spesielt foretrukne immunglobuliner ifølge foreliggende oppfinnelse er immunglobuliner som tilhører humant avledede IgG (IgG1, IgG2, IgG3, eller IgG4).

Immunglobuliner har en Y-formet strukturell enhet i hvilken fire kjeder omfattende to homologe lettkjeder (L-kjeder) og to homologe tungkjeder (H-kjeder) er sammenbundet via disulfidbindinger (S-S-bindinger). Lettkjeden er oppbygde av lettkjedens variable område (V_L) og lettkjedens konstante område (C_L). Tungkjeden er oppbygd av tungkjedens variable område (V_H) og tungkjedens konstante område (C_H).

Tungkjedens konstante område er oppbygd av noen domener med aminosyre-sekvenser som er enestående for hver klasse (IgG, IgM, IgA, IgD, og IgE) og hver underklasse (IgG1, IgG2, IgG3, og IgG4, IgA1, og IgA2.

Tungkjeden i IgG (IgG1, IgG2, IgG3, og IgG4) er oppbygd av V_H, C_H1-domenet, hengselområdet, C_H2-domenet og C_H3-domenet i denne rekkefølge fra N-enden.

På tilsvarende måte er tungkjeden i IgG1 oppbygd av V_H, $C\gamma_1 1$-domenet, hengselområdet, $C\gamma_1 2$-domenet og $C\gamma_1 3$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden. Tungkjeden i IgG2 er oppbygd av V_H, $C\gamma_2 1$-domenet, hengselområdet, $C\gamma_2 2$-domenet og $C\gamma_2 3$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden. Tungkjeden i IgG3 er oppbygd av V_H, $C\gamma_3 1$-domenet, hengselområdet, $C\gamma_3 2$-domenet og $C\gamma_3 3$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden. Tungkjeden i IgG4 er oppbygd av V_H, $C\gamma_4 1$-domenet, hengselområdet, $C\gamma_4 2$-domenet og $C\gamma_4 3$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden.

Tungkjeden i IgA er oppbygd av V_H, $C\alpha 1$-domenet, hengselområdet, $C\alpha 2$-domenet og $C\alpha 3$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden.

På tilsvarende måte er tungkjeden i IgA1 oppbygd av V_H, $C\alpha_1 1$-domenet, hengselområdet, $C\alpha_1 2$-domenet og $C\alpha_1 3$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden. Tungkjeden i IgA2 er oppbygd av V_H, $C\alpha_2 1$-domenet, hengselområdet, $C\alpha_2 2$-domenet, og $C\alpha_2 3$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden.

Tungkjeden i IgD er oppbygd av V_H, $C\delta 1$-domenet, hengselområdet, $C\delta 2$-domenet og $C\delta 3$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden.

Tungkjeden i IgM er oppbygd av V_H, $C\mu 1$-domenet, $C\mu 2$-domenet, $C\mu 3$-domenet og $C\mu 4$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden, og har intet hengselområde som observert i IgG, IgA og IgD.

Tungkjeden i IgE er oppbygd av V_H, $C\varepsilon 1$-domenet, $C\varepsilon 2$-domenet, $C\varepsilon 3$-domenet og $C\varepsilon 4$-domenet i denne rekkefølge fra N-enden, og har intet hengselområde som observert i IgG, IgA og IgD.

Dersom for eksempel IgG behandles med papain spaltes molekylet noe over mot N-enden, bortenfor disulfidbindingene som foreligger i hengselområdet hvor disulfid-bindingene sammenbinder de to tungkjedene, slik at det dannes to homologe Fab'er i hvilke et tungkjedefragment bestående av V_H og C_H1 er bundet til én lettkjede via en

disulfidbinding og ett Fc, hvori to homologe tungkjedefragmenter bestående av hengsel-området, C_H2-domenet og C_H3-domenet, er sammenbundet via disulfidbindinger. (se "Immunology Illustrated", den opprinnelige 2. utgave, Nankodo, s. 65-75 (1992); og "Focus of Newest Medical Science "Recognition Mechanism of Immune System", Nankodo, s. 4-7 (1991)).

Nærmere bestemt betyr "en del av det konstante område fra immunglobulin-tungkjeden" nevnt ovenfor en del av det konstante område fra en immunglobulin-tungkjede med de strukturelle egenskaper som er nevnt ovenfor, og er fortrinnsvis et konstant område uten C1-domenet eller Fc-området. Nærmere bestemt er et eksempel på dette et område som består av hengselområdet, C2-domenet og C3-domenet fra enten IgG, IgA eller IgD eller et område som består av C2-domenet, C3-domenet og C4-domenet fra enten IgM eller IgE. Et spesielt foretrukket eksempel er Fc-området fra humant avledet IgG1.

Fusjonspolypeptidet nevnt ovenfor har den fordel at det er ekstremt lett å rense ved anvendelse av affinitetskolonnekromatografi idet egenskapene til protein A, som bindes spesifikt til immunglobulinfragmentet, utnyttes, siden fusjonspolypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse har en del av et konstant område (for eksempel Fc) fra et immunglobulin, for eksempel IgG som nevnt ovenfor, som en fusjonspartner. Siden forskjellige antistoffer mot Fc i forskjellige immunglobuliner er tilgjengelige kan videre en immunanalyse for fusjonspolypeptidene lett utføres med antistoffer mot Fc.

"Et polypeptid som bindes til AILIM" omfattes av "et polypeptid" som inngår i definisjonen av den ovenfor nevnte "forbindelse".

Et spesifikt eksempel på "et polypeptid som bindes til AILIM" er hele eller en del av et polypeptid som utgjør et kjent molekyl som betegnes B7h, B7RP-1, GL50 eller LICOS, som er en ligand som interagerer med AILIM (Nature, bind 402, nr. 6763, s. 827-832, 1999; Nature Medicine, bind 5, nr. 12, s. 1365-1369, 1999; J. Immunology, bind 164, s. 1653-1657, 2000; Curr. Biol. bind 10, nr. 6, s. 333-336, 2000).

Polypeptidet er fortrinnsvis et polypeptid som omfatter hele eller en del av det ekstracellulære område i liganden nevnt ovenfor (B7h, B7RP-1, GL50, LICOS), eller et fusjonspolypeptid som omfatter polypeptidet og hele eller en del av det konstante område fra immunglobulintungkjeden (fortrinnsvis humant immunglobulin). Heri har uttrykkene "ekstracellulært område" og "konstant område fra immunglobulintungkjeden" samme betydning som nevnt ovenfor.

Polypeptidene, polypeptiddelene (fragmentene) og fusjonspolypeptidene som nevnes ovenfor kan ikke bare fremstilles ved rekombinant DNA-teknologi som nevnt nedenfor, men også ved en fremgangsmåte som er velkjent innen faget, for eksempel en kjemisk syntesefremgangsmåte eller en celledyrkningsfremgangsmåte eller en modifikasjon av disse.

"Antistoffet" ifølge foreliggende oppfinnelse kan være et polyklonalt antistoff (antiserum) eller et monoklonalt antistoff mot pattedyrs-AILIM (spesielt foretrukket humant AILIM) som definert ovenfor, og er fortrinnsvis et monoklonalt antistoff.

Nærmere bestemt er antistoffet et antistoff med en aktivitet som inhiberer proliferasjonen av AILIM-uttrykkende celler ved at det bindes til AILIM eller som inhiberer dannelsen av interferon-γ eller interleukin-4 ved AILIM-uttrykkende celler via binding til AILIM.

Antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være naturlige antistoffer erholdt ved å immunisere pattedyr som mus, rotter, hamstere, marsvin og kaniner med et antigen, for eksempel celler (naturlige celler, cellelinjer, tumorceller) som uttrykker AILIM ifølge foreliggende oppfinnelse, transformanter fremstilt ved anvendelse av rekombinant DNA-teknologi slik at AILIM overuttrykkes på deres overflate, polypeptider som inngår i AILIM eller de ovenfor nevnte fusjonspolypeptider som omfatter AILIM-polypeptidet eller det ekstracellulære område i AILIM. Antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også kimære antistoffer og humaniserte antistoffer (CDR-transplanterte antistoffer), som kan fremstilles ved rekombinant DNA-teknologi, og humane antistoffer, som kan fremstilles ved anvendelse av transgene dyr som danner humant antistoff.

Monoklonale antistoffer omfatter antistoffer med enhver isotype fra IgG, IgM, IgA, IgD, eller IgE. IgG eller IgM foretrekkes.

Et polyklonalt antistoff (antiserum) eller et monoklonalt antistoff kan fremstilles ved kjente fremgangsmåter. Nærmere bestemt immuniseres et pattedyr, fortrinnsvis en mus, en rotte, en hamster, et marsvin, en kanin, en katt, en hund, en gris, en geit, en hest eller en ku, mer foretrukket en mus, en rotte, en hamster, et marsvin eller en kanin, med for eksempel et antigen som nevnt ovenfor, om nødvendig sammen med Freunds adjuvans.

Et polyklonalt antistoff kan isoleres fra serum fra det således immuniserte dyr. I tillegg fremstilles monoklonale antistoffer som følger: Hybridomer fremstilles fra de antistoffproduserende celler isolert fra det således immuniserte dyr og myelomceller som ikke kan danne autoantistoffer. Hybridomene klones, og kloner som danner monoklonale antistoffer med spesifikk affinitet overfor antigenet som ble benyttet for immunisering av pattedyret utvelges.

Nærmere bestemt kan et monoklonalt antistoff fremstilles som følger: Immuniseringer utføres ved én eller flere gangers injeksjon eller implantering av et antigen som nevnt ovenfor som immunogen, om nødvendig sammen med Freunds adjuvans, subkutant, intramuskulært, intravenøst, via poten eller intraperitonealt i et ikke-menneskelig pattedyr, fortrinnsvis en mus, en rotte, en hamster, et marsvin eller en kanin, fortrinnsvis en mus, rotte eller hamster (innbefattet et transgent dyr fremstilt på en slik måte at det danner antistoffer avledet fra et annet dyr, for eksempel en transgen mus som

danner humant antistoff som nevnt nedenfor). Immuniseringene utføres vanligvis én til fire ganger fra hver dag til hver fjortende dag etter første immunisering. Antistoff-dannende celler isoleres fra det således immuniserte pattedyr tilnærmet én til fem dager etter siste immunisering. Antall immuniseringer og tidsrommet mellom dem kan arrangeres på egnet vis, for eksempel avhengig av egenskapene til det benyttede immunogen.

Hybridomer som utskiller et monoklonalt antistoff kan fremstilles ved fremgangsmåten til Köhler og Milstein (Nature, bind 256, s. 495-497 (1975)), eller en modifikasjon av denne. Nærmere bestemt fremstilles hybridomer ved å fusjonere antistoffdannende celler fra milt, lymfeknute, beinmarg eller tonsil isolert fra et ikke-menneskelig pattedyr immunisert som beskrevet ovenfor, fortrinnsvis en milt, med myelomer uten autoantistoffdannende evne, fortrinnsvis avledet fra et pattedyr som mus, rotte, marsvin, hamster, kanin eller menneske, mer foretrukket mus, rotte eller menneske.

For eksempel kan en museavledet myelom P3/X63-AG8.653 (653), P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1), P3/X63-Ag8.U1 (P3U1), SP2/0-Ag14 (Sp2/0, Sp2), PAI, F0, NSO eller BW5147, et rotteavledet myelom 210RCY3-Ag.2.3., eller en humant avledet myelom U-266AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 eller CEM-T15 anvendes som myelom for cellefusjonen.

Hybridomer som danner monoklonale antistoffer kan utvelges ved for eksempel å dyrke hybridomer i mikrotiterplater og måle reaktiviteten i dyrkningssupernatanten i brønner i hvilke hybridomvekst observeres overfor immunogenet som ble benyttet for den ovenfor nevnte immunisering, for eksempel ved en enzymimmunanalyse som RIA eller ELISA.

Monoklonale antistoffer kan fremstilles fra hybridomer ved å dyrke hybridomene *in vitro* eller *in vivo*, for eksempel i ascitesvæske hos mus, rotte, marsvin, hamster eller kanin, fortrinnsvis mus eller rotte, mer foretrukket mus, og isolere antistoffene fra den resulterende dyrkningssupernatant eller ascitesvæsken fra et pattedyr.

Dyrking av hybridomer *in vitro* kan utføres avhengig av for eksempel egenskapene til cellene som skal dyrkes, undersøkelsens formål og de forskjellige betingelser forbundet med dyrkningsfremgangsmåten, ved anvendelse av kjente næringsmedier eller ethvert næringsmedium avledet fra et kjent basalmedium for dyrking, opprettholdelse og lagring av hybridomene, slik at det dannes monoklonale antistoffer i dyrkningssupernatanten.

Eksempler på basalmedier er medier med lav kalsiumkonsentrasjon som Hams F12-medium, MCDB153-medium eller MEM-medium med lav kalsiumkonsentrasjon, og medier med høy kalsiumkonsentrasjon som MCDB104-medium, MEM-medium, D-MEM-medium, RPMI1640-medium, ASF104-medium eller RD-medium. Basalmediene kan for eksempel inneholde serum, hormoner, cytokiner og/eller forskjellige uorganiske eller organiske forbindelser avhengig av formålet.

Monoklonale antistoffer kan isoleres og renses fra den ovenfor nevnte dyrkningssupernatant eller ascitesvæske ved utfelling med mettet ammoniumsulfat, auglobulinutfellingsfremgangsmåten, kaproinsyrefremgangsmåten, kaprylsyre-fremgangsmåten, ionebytterkromatografi (DEAE eller DE52) og affinitetskromatografi ved anvendelse av en anti-immunglobulinkolonne eller en protein- A-kolonne.

Et "rekombinant, kimært monoklonalt antistoff" er et monoklonalt antistoff fremstilt ved genetisk modifisering og betyr nærmere bestemt et kimært antistoff, for eksempel et kimært monoklonalt mus/menneskeantistoff hvis variable områder er avledet fra et immunglobulin fra et ikke-menneskelig pattedyr (mus, rotte, hamster) og hvis konstante områder er avledet fra humant immunglobulin.

Et konstant område avledet fra humant immunglobulin har en aminosyresekvens som er enestående for hver isotype, for eksempel IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, og IgE. Det konstante område i det rekombinante, kimære monoklonale antistoff kan være et konstant område fra et humant immunglobulin tilhørende enhver isotype. Det er fortrinnsvis et konstant område fra humant IgG.

Et kimært monoklonalt antistoff kan for eksempel fremstilles som følger:
Et kimært monoklonalt mus/menneskeantistoff kan fremstilles i henhold til Experimental Medicine: SUPPLEMENT, bind 1.6, nr. 10 (1988) og den behandlede, publiserte japanske patentsøknad nr. (JP-B) Hei 3-73280. Det kan nærmere bestemt fremstilles ved å sette inn C_H-genet (C-genet som koder for H-kjedens konstante område) isolert fra et DNA som koder for humant immunglobulin nedstrøms for aktive V_H-gener (rearrangert VDJ-gen som koder for H-kjedens variable område) isolert fra et DNA som koder for et monoklonalt museantistoff isolert fra et hybridom som danner det monoklonale museantistoff, og C_L-genet (C-genet som koder for L-kjedens konstante område) isolert fra et DNA som koder for humant immunglobulin nedstrøms for aktive V_L-gener (rearrangert VJ-gen som koder for L-kjedens variable område) isolert fra et DNA som koder for et monoklonalt museantistoff isolert fra et hybridom, i samme vektor eller i forskjellige vektorer på en uttrykkbar måte, fulgt av transformasjon av vertsceller med ekspresjonsvektoren og dyrking av transformantene.

Nærmere bestemt ekstraheres først DNA fra hybridomer som danner monoklonale museantistoffer ved den sedvanlige fremgangsmåten, kuttes med egnede restriksjonsenzymer (for eksempel EcoRI og HindIII), fraksjoneres ved elektroforese (ved for eksempel anvendelse av 0,7 % agarosegel) og analyseres ved Southern-blotting. Etter farging av en elektroforesegel, for eksempel med etidiumbromid, og fotografering påføres gelen markørposisjoner, vaskes to ganger med vann og legges i 0,25 M HCl i 15 minutter. Gelen legges så i en 0,4 N NaOH-løsning i 10 minutter under forsiktig omrøring. DNA'ene overføres til et filter over 4 timer ved den sedvanlige fremgangsmåte. Filteret tas av og vaskes to ganger med 2x SSC. Etter tilstrekkelig tørking av filteret bakes det ved 75 °C i 3 timer. Etter bakingen behandles filteret med 0,1x SSC/0,1 % SDS

ved 65 °C i 30 minutter. Det legges så i 3x SSC/0,1 % SDS. Det erholdte filteret behandles med en prehybridiseringsløsning i en plastpose ved 65 °C i 3 til 4 timer.

Deretter tilsettes ^{32}P-merket probe-DNA og en hybridiseringsløsning til posen, og filteret får reagere ved 65 °C i tilnærmet 12 timer. Etter hybridiseringen vaskes filteret under en egnet saltkonsentrasjon, reaksjonstemperatur og tid (for eksempel 2x SSC/0,1 % SDS, romtemperatur, 10 minutter). Filteret overføres til en plastpose med et lite volum 2x SSC og analyseres ved autoradiografi etter forsegling av posen.

Rearrangert VDJ-gen og VJ-gen som koder for H-kjede og L-kjede for et monoklonalt museantistoff påvises ved Southern-blotting som nevnt ovenfor. Området som omfatter det påviste DNA-fragment fraksjoneres ved sukrosetetthetsgradient-sentrifugering og innsettes i en bakteriofagvektor (for eksempel Charon 4A, Charon 28, λEMBL3, og λEMBL4). *E. coli* (for eksempel LE392 og NM539) transformeres med bakteriofagvektoren slik at det dannes et genomisk bibliotek. Det genomiske biblioteket gjennomsøkes ved en plakkhybridiseringsteknikk som Benton-Davis-fremgangsmåten (Science, bind 196, s. 180-182 (1977)) og anvendelse av egnede prober (H-kjede-J-genet, L-kjede (κ) J-genet) for isolering av positive kloner som omfatter rearrangert VDJ-gen eller VJ-gen. Ved å fremstille et restriksjonskart og bestemme nukleotinsekvensen til de isolerte klonene bekreftes det hvorvidt gener som omfatter det ønskede, rearrangerte V_H (VDJ)-genet eller V_L (VJ)-genet har blitt isolert.

Humant C_H-gen og humant C_L-gen for anvendelse i kimeriseringen isoleres separat. For eksempel, dersom et kimært antistoff med humant IgG1 skal fremstilles isoleres Cγ1-genet som et C_H-gen og Cκ-genet som et C_L-gen. Disse genene kan isoleres fra et humant genomisk bibliotek med muse-Cγ1-genet og muse-Cκ-genet, tilsvarende det humane Cγ1-genet henholdsvis det humane Cκ-genet, som prober, idet det dras fordel av den høye homologien mellom nukleotidsekvensen til museimmunglobulingenet og det humane immunglobulingenet.

Nærmere bestemt isoleres DNA-fragmenter som omfatter humant Cκ-gen og et enhanceområde fra et humant genomisk λ Charon 4A HaeIII-AluI-bibliotek (Cell, bind 15, s. 1157-1174 (1978)), for eksempel ved anvendelse av et HindIII-BamHI-fragment på 3 kb fra klon Ig146 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, bind 75, s. 4709-4713 (1978)) og et EcoRI-fragment på 6,8 kb fra klon MEP10 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, bind 78, s. 474-478 (1981)) som prober. I tillegg, for eksempel etter kutting av humant føtalt hepatocytt-DNA med HindIII og fraksjonering ved agarosegelelektroforese, innsettes et fragment på 5,9 kb i λ788, hvoretter det humane Cγ1-genet isoleres med probene som er nevnt ovenfor.

Ved anvendelse av det således isolerte muse-V_H-genet, muse-V_L-genet, humane C_H-genet og humane C_L-genet og idet promotorområdet og enhanceområdet tas i betraktning innsettes det humane C_H-genet nedstrøms for muse-V_H-genet og det humane C_L-genet nedstrøms for muse-V_L-genet i en ekspresjonsvektor, for eksempel pSV2gpt

eller pSV2neo, ved hjelp av egnede restriksjonsenzymer og DNA ligase ved den sedvanlige fremgangsmåte. I dette tilfelle kan kimære gener omfattende muse-V_H-genet/det humane C_H-genet og muse-V_L-genet/det humane C_L-genet enten innsettes i samme ekspresjonsvektor eller i forskjellige ekspresjonsvektorer.

Den eller de således fremstilte ekspresjonsvektorene med innsatt kimært gen innføres i myelomer som ikke danner antistoffer, for eksempel P3X63·Ag8·653-celler eller SP210-celler, ved protoplastfusjonsfremgangsmåten, DEAE-dekstranfremgangsmåten, kalsiumfosfatfremgangsmåten eller elektroporeringsfremgangsmåten. Transformantene utvelges ved dyrking i medium som inneholder et medikament som tilsvarer medikamentresistensgenet som er innsatt i ekspresjonsvektoren, hvorved celler som danner ønskede kimære monoklonale antistoffer isoleres.

De ønskede kimære monoklonale antistoffene isoleres fra dyrkningssupernatanten fra således utvalgte antistoffproduserende celler.

Det "humaniserte monoklonale antistoff (CDR-transplanterte antistoff)" ifølge foreliggende oppfinnelse er et monoklonalt antistoff fremstilt ved genetisk modifisering og betyr nærmere bestemt et humanisert monoklonalt antistoff i hvilket en del av eller alle de komplementaritetsbestemmende områder i det hypervariable område er avledet fra de komplementaritetsbestemmende områder i det hypervariable område fra et monoklonalt antistoff fra et ikke-menneskelig pattedyr (mus, rotte, hamster), rammeverksområdene i det variable område er avledet fra rammeverksområdene i det variable område i humant immunglobulin og det konstante område er avledet fra et konstant område fra humant avledet immunglobulin.

De komplementaritetsbestemmende områder i det hypervariable område foreligger i det hypervariable område i det variable område i et antistoff og betyr tre områder som direkte og komplementært bindes til et antigen (komplementaritetsbestemmende aminosyrerester, CDR1, CDR2 og CDR3). Rammeverksområdene i det variable område betyr fire relativt konserverte områder som ligger oppstrøms, nedstrøms eller mellom de tre komplementaritetsbestemmende områder (rammeverksområdene FR1, FR2, FR3 og FR4).

Med andre ord betyr et humanisert monoklonalt antistoff et antistoff i hvilket alle områder bortsett fra en del av eller alle de komplementaritetsbestemmende områder i det hypervariable område i et monoklonalt antistoff avledet fra et ikke-menneskelig pattedyr er erstattet med de tilsvarende områder avledet fra et humant immunglobulin.

Det konstante område avledet fra humant immunglobulin har en aminosyresekvens som er spesiell for hver isotype, for eksempel IgG, (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, og IgE. Det konstante område i et humanisert monoklonalt antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse kan være et konstant område fra et humant immunglobulin tilhørende enhver isotype. Det er fortrinnsvis et konstant område fra humant IgG.

Rammeverksområdene i det konstante område avledet fra humant immunglobulin er ikke spesielt begrensede.

Et humanisert monoklonalt antistoff kan for eksempel fremstilles som følger: For eksempel kan et rekombinant humanisert monoklonalt antistoff avledet fra et monoklonalt museantistoff fremstilles ved genetisk modifisering idet det henvises til den publiserte japanske oversettelse av internasjonalt patentskrift (JP-WA) nr. Hei 4-506458 og JP-A Sho 62-296890. Nærmere bestemt isoleres minst ett muse-H-kjede-CDR-gen og minst ett muse-L-kjede-CDR-gen tilsvarende muse-H-kjede-CDR-genet fra hybridomer som danner monoklonalt museantistoff, og et humant H-kjedegen som koder for hele området bortsett fra det humane H-kjede-CDR som tilsvarer muse-H-kjede-CDR nevnt ovenfor og det humane L-kjedegen som koder for hele området bortsett fra det humane L-kjede-CDR som tilsvarer muse-L-kjede-CDR nevnt ovenfor isoleres fra humane immunglobulingener.

De således isolerte muse-H-kjede-CDR-gener og humane H-kjedegener innsettes operativt i en egnet vektor slik at de kan uttrykkes. På tilsvarende måte innsettes muse-L-kjede-CDR-genene og de humane L-kjedegenene operativt i en annen egnet vektor slik at de kan uttrykkes. Alternativt kan muse-H-kjede-CDR-genene/de humane H-kjedegener og muse-L-kjede-CDR-genene/de humane L-kjedegener innsettes operativt i samme ekspresjonsvektor på en uttrykkbar måte. Vertsceller transformeres med den således fremstilte ekspresjonsvektor for isolering av transformanter som danner humanisert monoklonalt antistoff. Ved dyrking av transformantene isoleres et ønsket humanisert monoklonalt antistoff fra dyrkningssupernatanten.

Det "humane monoklonale antistoff" er et immunglobulin i hvilket hele området som omfatter det variable og konstante område i H-kjeden og det variable og konstante område i L-kjeden som utgjør immunglobulinet er avledet fra gener som koder for humant immunglobulin.

Det humane antistoff (fortrinnsvis det humane monoklonale antistoff) kan fremstilles ved velkjente fremgangsmåter, for eksempel på samme måte som ved produksjonsfremgangsmåten for polyklonale eller monoklonale antistoffer nevnt ovenfor, ved å immunisere med et antigen et transgent dyr fremstilt ved å integrere minst ett humant immunglobulingen i det angjeldende genlocus hos et ikke-menneskelig pattedyr, for eksempel en mus.

For eksempel fremstilles en transgen mus som danner humane antistoffer ved fremgangsmåtene som beskrives i Nature Genetics, bind 7, s. 13-21 (1994); Nature Genetics, bind 15, s. 146-156 (1997); JP-WA Hei 4-504365; JP-WA Hei 7-509137; Nikkei Science, nr. 6, s. 40-50 (1995); WO94/25585; Nature, bind 368, s. 856-859 (1994); og JP-WA nr. Hei 6-500233.

I tillegg kan en nylig utviklet teknikk for fremstilling av et humant avledet protein fra melken fra en transgen ku eller gris også benyttes (Nikkei Science, s. 78-84 (april, 1997)).

Uttrykket "del av et antistoff" som anvendt i foreliggende oppfinnelse betyr et delområde fra et monoklonalt antistoff som nevnt ovenfor. Det betyr nærmere bestemt $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv (variabelt antistoffragment), sFv, dsFv (disulfidstabilisert Fv) eller dAb (enkeltdomeneantistoff) (Exp. Opin. Ther. Patents, bind 6, nr. 5, s. 441-456 (1996)).

"$F(ab')_2$" og "Fab" kan fremstilles ved å behandle immunglobulin (monoklonalt antistoff) med en protease som pepsin og papain, og betyr et antistoffragment fremstilt ved å spalte immunglobulinet nær disulfidbindingene i hengselområdene som foreligger mellom de to H-kjeder. For eksempel spalter papain IgG oppstrøms for disulfid-bindingene i hengselområdene som foreligger mellom de to H-kjedene slik at det dannes to homologe antistoffragmenter i hvilke en L-kjede bestående av V_L (L-kjedens variable område) og C_L (L-kjedens konstante område) og et H-kjedefragment som består av V_H (H-kjedens variable område) og $C_H\gamma1$ ($\gamma1$-området fra H-kjedens konstante område) er sammenbundet i sine C-terminale områder via en disulfidbinding. De to således fremstilte homologe antistoffragmentene betegnes Fab'. Pepsin spalter også IgG nedstrøms for disulfidbindingene i hengselområdene som foreligger mellom de to H-kjedene slik at det dannes et antistoffragment som er noe større enn fragmentet i hvilket de to ovenfor nevnte Fab' er sammenbundet i hengselområdet. Dette antistoffragment betegnes Fab'_2.

Uttrykkene "immunitet i tarmkanalen", "gastrointestinal immunitet" og "mukøs immunitet" ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes for å uttrykke omtrent samme mening.

Et foretrukket eksempel på en "sykdom som ledsager unormal immunitet i tarmkanalen" ifølge foreliggende oppfinnelse kan være en inflammatorisk tarmsykdom eller en næringsmiddelallergi.

Et representativt eksempel på en "inflammatorisk tarmsykdom" ifølge foreliggende oppfinnelse er kolitt (fortrinnsvis ulcerøs kolitt (UC)) eller Crohns sykdom (CD), hvor disse for eksempel har følgende egenskaper:

Inflammatoriske tarmsykdommer (IBD) kan inndeles i kolitt (fortrinnsvis ulcerøs kolitt) og Crohns sykdom. Disse sykdommene utvikles hyppig hos ungdommer og anses å være kroniske inflammatoriske sykdommer som er vanskelige å behandle, med gjentatte tilbakefall og gjentatt tilbakevending og med ukjente årsaker.

Crohns sykdom er en sykdom i hvilken kroniske granulomatøse inflammasjoner og ulcere opptrer i hele fordøyelseskanalen fra spiserør til anus, hovedsakelig i tynntarm og tykktarm, og med symptomer som buksmerte, diaré, feber, unormal anus, innbefattet hemorroider, og/eller redusert kroppsvekt. Histologisk observeres en kraftig infiltrasjon

av lymfocytter og ikke-caseus epiteloid granulom, noe som tyder på en unormal reaksjon mellom T-celler og antigenpresenterende celler.

Kolitt (fortrinnsvis ulcerøs kolitt) er en kronisk inflammasjon som utvikles lokalt i tykktarmen. Den påvirker hovedsakelig slimhinnen og danner sår og ulcerasjoner. Histologisk observeres en signifikant infiltrasjon av lymfocytter, plasmaceller, makrofager og mastceller i slimhinnen og lamina propria mucosae, og kryptiske ulcere som ledsager en infiltrasjon av neutrofile celler og en forsvinning av begerceller opptrer.

De eksisterende farmasøytiske midler som anvendes for behandling av inflammatoriske tarmsykdommer ifølge foreliggende oppfinnelse viser til ett eller flere tilfeldige farmasøytiske midler som foreskrives klinisk for behandling av kolitt (ulcerøs kolitt og lignende) og Crohns sykdom, og eksempler er binyrebarkhormoner og salazosulfapyridin.

Uttrykket "farmasøytisk aksepterbart bærestoff" ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en eksipiens, et fortynningsmiddel, et fyllmiddel, et dekomponeringsmiddel, en stabilisator, et konserveringsmiddel, en buffer, et emulsjonsmiddel, et aromatisk middel, et fargestoff, et søtningsmiddel, et viskositetsøkende middel, et smaksstoff, et solubilitetsøkende middel eller et annet tilsetningsstoff. Ved anvendelse av ett eller flere slike bærestoffer kan et farmasøytisk preparat utformes til tabletter, piller, pulvere, granulater, injeksjonsløsninger, løsninger, kapsler, trokéer, eliksirer, suspensjoner, emulsjoner, siruper.

Det farmasøytiske preparat kan tilføres oralt eller parenteralt. Andre former for parenteral tilførsel omfatter en løsning for ekstern påføring, en stikkpille for rektal tilførsel og et pessar, foreskrevet ved den sedvanlige fremgangsmåte, som omfatter én eller flere aktive bestanddeler.

Dosen kan variere avhengig av pasientens alder, kjønn, vekt og symptomer, virkningen av behandlingen, tilførselsveien, behandlingstidsrommet, typen aktiv bestanddel ("forbindelsen" ifølge foreliggende oppfinnelse som nevnt ovenfor) som inngår i det farmasøytiske preparat. Vanligvis kan det farmasøytiske preparat tilføres til et voksent individ i en dose på mellom 10 μg og 1000 mg (eller mellom 10 μg og 500 mg) pr. tilførsel. Avhengig av forskjellige betingelser kan en dose som er mindre enn dosen nevnt ovenfor være tilstrekkelig i noen tilfeller, mens en dose som er høyere enn dosen nevnt ovenfor kan være nødvendig i andre.

Når det gjelder et injeksjonsmiddel kan dette fremstilles ved å løse eller suspendere et antistoff i et ikke-toksisk, farmasøytisk aksepterbart bærestoff, for eksempel fysiologisk saltvann eller kommersielt tilgjengelig destillert injeksjonsvann idet konsentrasjonen justeres innenfor området mellom 0,1 μg antistoff/ml bærestoff til 10 mg antistoff/ml bærestoff. Det således fremstilte injeksjonsmiddel kan tilføres til en menneskelig pasient med behov for behandling i et doseringsområde fra 1 μg til 100 mg/kg kroppsvekt, fortrinnsvis i området fra 50 μg til 50 mg/kg kroppsvekt, én eller flere

ganger daglig. Eksempler på tilførselsveier er medisinsk egnede tilførselsveier som intravenøs injeksjon, subkutan injeksjon, intradermal injeksjon, intramuskulær injeksjon, intraperitoneal injeksjon eller lignende, fortrinnvis intravenøs injeksjon.

Injeksjonsmidlet kan også fremstilles i et ikke-vandig fortrynningsmiddel (for eksempel propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabilsk olje som olivenolje og alkohol, for eksempel etanol), som en løsning, en suspensjon eller en emulsjon.

Injeksjonsmidlet kan steriliseres ved filtrering gjennom et bakteriefiltrerende filter, ved innblanding av et bakteriedrepende middel eller ved bestråling. Injeksjonsmidlet kan fremstilles på en slik måte at det ferdiggjøres på brukstidspunktet. Nærmere bestemt frysetørkes det slik at det er et sterilt, fast preparat som kan løses i sterilt destillert injeksjonsvann eller et annet løsemiddel før bruk.

Ved anvendelse av de farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan sykdommer som kan skyldes unormal immunitet i fordøyelseskanalen, nærmere bestemt inflammatoriske tarmsykdommer (fortrinnsvis Crohns sykdom og kolitt (fortrinnsvis ulcerøs kolitt)) og næringsmiddelallergier undertrykkes, forebygges og/eller behandles.

Ved anvendelse av det farmasøytiske preparat ifølge foreliggende oppfinnelse er det videre mulig å forsterke den terapeutiske virkning av eksisterende farmasøytiske midler som foreskrives for behandling av slike inflammatoriske sykdommer.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1 viser den undertrykkende virkning av et anti-AILIM-antistoff på oppstart av en inflammatorisk tarmsykdom dersom antistoffet tilføres kontinuerlig (før oppstart av sykdommen eller etter sykdomsutviklingen), og den terapeutiske virkning på den inflammatoriske tarmsykdommen ved tilførsel av anti-AILIM-antistoffet, bestemt ved å anvende vekttap, som er et særpreg ved kolitt, som mål.

Fig. 2 er et fotografi som viser tilstanden i tykktarmen hos normale mus som ikke har utviklet den inflammatoriske tarmsykdommen, hos mus som lider av den inflammatoriske tarmsykdommen og hos mus hvor oppstart av den inflammatoriske tarmsykdommen finnes å være undertrykket ved tilførsel av anti-AILIM-antistoffet.

Fig. 3 viser den undertrykkende virkning av anti-AILIM-antistoffet på oppstart av den inflammatoriske tarmsykdommen dersom antistoffet tilføres kontinuerlig, bestemt ved å anvende vekttap, som er et særpreg ved kolitt, som mål.

● : negativt kontrollantistoff (n=20)

o : anti-AILIM/ICOS-antistoff (n=20)

□ : anti-B7RP-1-antistoff (n=7)

■ : tilførsel av negativt kontrollantistoff til en BALB/c scid/scid-mus i hvilken $CD4^{+}CD45RB^{low}$ -T-celler har blitt innført istedenfor $CD45RB^{high}$-T-celler (n=7)

Fig. 4 viser omfanget av kolitten uttrykt ved histologiske poeng.

Fig. 5 viser antall $CD4^+$-celler som infiltrerte slimhinnelaget i kolon (lamina propria).

Fig. 6 viser graden av apoptose av celler i kolonvev.

Fig. 7 viser den terapeutiske virkning av tilførsel av anti-AILIM-antistoffet (tilførsel etter sykdomsutviklingen) på den inflammatoriske tarmsykdom, bestemt ved å anvende vekttap, som er et særpreg ved kolitt, som mål.

● : negativt kontrollantistoff

○ : anti-AILIM/ICOS-antistoff

Fig. 8 viser omfanget av kolitten uttrykt ved histologiske poeng.

Fig. 9 viser antall $CD4^+$-celler som infiltrerte slimhinnelaget i kolon (lamina propria).

Fig. 10 viser den undertrykkende virkning av det kontinuerlig tilførte anti-AILIM/antistoff på oppstart av den inflammatoriske tarmsykdommen, bestemt ved å benytte vekttap, som er et særpreg ved kolitt, som mål.

● : negativt kontrollantistoff (n=7)

○ : anti-AILIM/ICOS-antistoff (n=7)

Fig. 11 viser omfanget av kolitten uttrykt ved histologiske poeng.

Fig. 12 viser antall $CD4^+$-celler som infiltrerte slimhinnelaget i kolon (lamina propria).

Den beste utførelse av oppfinnelsen

I det påfølgende vil foreliggende oppfinnelse illustreres spesifikt ved henvisning til eksempler.

[Eksempel 1] Den terapeutiske virkning på kolitt i en musekolittmodell

<Forsøk 1>

<1-1> Dyr

BALB/c scid/scid-mus, mus med alvorlig immundefisiens (6-8 uker gamle hunnmus, CLEA Japan) og normale BALB/c-mus (6-8 uker gamle hannmus, CLEA Japan) ble benyttet.

<1-2> Fremstilling av et monoklonalt anti-muse-AILIM-antistoff.

Fremstillingen ble utført som følger:

Ved å anvende cDNA som koder for hele aminosyresekvensen til det tidligere rapporterte muse-AILIM (Int. Immunol., bind 12, nr. 1, s.51-55, 2000), ble en transformert celle som uttrykte muse-AILIM fremstilt ifølge standardfremgangsmåter og anvendelse av genetisk rekombinasjonsteknologi.

Den transformerte celle ble homogenisert og ultrasentrifugert (100000x g), og det sentrifugert materiale som inneholdt cellemembranfraksjonen ble oppsamlet og

suspendert i PBS. Den isolerte cellemembranfraksjon ble injisert i fotputen til en Wistar-rotte sammen med komplett Freunds adjuvans for den innledende immunisering (dag 0). I tillegg ble cellemembranfraksjonen tilført som antigen i fotputen på dag 7, dag 14 og dag 28. To dager etter siste immunisering ble lymfeknuteceller oppsamlet.

Lymfeknutecellene og musemyelomcellene PAI (JCR nr. B0113; Res. Disclosure, bind 217, s. 155, 1982) ble blandet sammen i et forhold på 5:1, og et hybridom som dannet monoklonalt antistoff ble fremstilt ved å fusjonere cellene ved anvendelse av polyetylenglykol 4000 (Boehringer Mannheim) som fusjonsmiddel. Hybridomseleksjonen ble utført ved dyrking i et HAT-holdig ASF104-medium (Ajinomoto) inneholdende 10 % føtalt bovint serum og aminopterin.

Flourescensintensiteten til celler, som var farget ved å la dyrkningssupernatanten fra hvert hybridom reagere med de ovenfor nevnte transfekterte cellene som uttrykte rekombinant muse-AILIM og deretter reagere med FITC-merket anti-rotte-IgG (Cappel) ble målt ved anvendelse av et EPICS-ELITE flowcytometer for å bekrefte reaktiviteten overfor muse-AILIM av de monoklonale antistoffene som dannes i dyrknings-supernatanten fra hvert hybridom. Som et resultat ble flere hybridomer som dannet monoklonale antistoffer med reaktivitet mot muse-AILIM isolert.

Én av disse hybridomene ble betegnet "B10.5". Dette hybridomet (10^6 til 10^7 celler/0,5 ml/mus) ble injisert intraperitonealt i en ICR nu/nu-mus (hunnmus, 7 til 8 uker gammel). Ti til tjue dager senere ble musen laparotomisert under bedøvelse, og en stor mengde monoklonalt anti-muse-AILIM-antistoff fra rotte (IgG2a) ble isolert fra ascitesvæsken ifølge standardfremgangsmåter. I det påfølgende betegnes dette antistoff for enkelhets skyld "anti-AILIM-antistoff".

<1-3> Induksjon av den inflammatoriske tarmsykdom

Som beskrevet nedenfor ble en inflammatorisk tarmsykdom (kolitt) indusert ved å introdusere $CD45RB^{high}$ til en BALB/c scid/scid-mus ifølge en tidligere rapportert fremgangsmåte. Ledsagende start og utvikling av den inflammatoriske tarmsykdommen er et signifikant vekttap kjent å opptre 3 til 5 uker etter introduksjon av $CD45RB^{high}$-T-celler i denne modell for inflammatorisk tarmsykdom.

$CD4^+$-T-celler ble separert og isolert fra mononukleære celler isolert fra milt fra friske BALB/c-mus ved å anvende et MACS magnetisk separasjonssystem (Miltenyi Biotec) med et anti-CD4-antistoff (L3T4). Nærmere bestemt ble miltceller isolert fra musene dyrket ved 4 °C i 30 minutter med magnetiske kuler til hvilke et anti-CD4-antistoff er bundet, hvoretter cellene ble vasket og anriket ved å la dem passere gjennom en magnetisk gjennomstrømningskolonne.

Etter merking av de isolerte $CD4^+$-T-cellene (renheten ble bekreftet å være 96-97 % ved å benytte et flowcytometer) med et anti-muse-CD4-antistoff (RM4-5, PharMingen) merket med phycoerythrin (PE) og et anti-CD4-antistoff (16A; PharMingen) merket med fluoresceinisotiocyanat (FITC) ble cellene sortert ved

anvendelse av en FACS Vantage (Becton Dickinson) og fraksjonert i T-celler med høy ekspresjon av CD45RB ($CD45RB^{high}$) og T-celler med lav ekspresjon av CD45RB ($CD45RB^{low}$).

For induksjon av kolitt i BALB/c scid/scid-musen ble deretter de isolerte $CD45RB^{high}$-T-celler (5x 10^5 celler/200 µl PBS) tilført intraperitonealt (i.p.) til musene.

<1-4> Tilførsel av anti-AILIM-antistoffet

Hver gruppe av de ovenfor nevnte SCID-mus til hvilke $CD45RB^{high}$-T-celler hadde blitt introdusert ble behandlet som følger:

Gruppe 1

Anti-AILIM-antistoffet (250 µg/259 µl PBS) ble tilført intraperitonealt umiddelbart etter innføring av $CD45RB^{high}$-T-celler (første tilførsel), og deretter kontinuerlig tre ganger ukentlig.

Gruppe 2

Det negative kontrollantistoff (rotte-IgG, Sigma, 250 µg/250 µl PBS) ble tilført intraperitonealt umiddelbart etter innføring av $CD45RB^{high}$-T-celler (første tilførsel) og deretter kontinuerlig med en hyppighet på 3 ganger ukentlig. 8 uker etter innføring av $CD45RB^{high}$-T-cellene (første gangs tilførsel) og i de påfølgende uker ble i tillegg til det negative kontrollantistoff, anti-AILIM-antistoffet (250 µg/250 µl PBS) tilført intraperitonealt med samme tilføringshyppighet.

Gruppe 3

Det negative kontrollantistoff (rotte-IgG, Sigma, 250 µg/250 µl PBS) ble tilført intraperitonealt umiddelbart etter innføring av $CD45RB^{high}$-T-cellene (første gangs tilførsel) og deretter kontinuerlig med en hyppighet på 3 ganger ukentlig.

Utviklingsgraden av den inflammatoriske tarmsykdom og graden av undertrykkelse og behandling når det gjelder oppstart og utvikling av sykdommen grunnet anti-AILIM-antistoffet ble analysert ved å måle kroppsvekten i hver gruppe over tid fra umiddelbart før innføringen av T-cellene.

Resultatene er vist i Fig. 1.

Som forventet opptrådte et signifikant vekttap som ledsaget utviklingen av den inflammatoriske tarmsykdom i gruppen som kun ble tilført negativt kontrollantistoff (Gruppe 3). Imidlertid ble absolutt intet vekttap observert og oppstarten av inflammatorisk tarmsykdom var fullstendig undertrykket i gruppen som ble tilført anti-AILIM-antistoff kontinuerlig med start like etter innføringen av $CD45RM^{high}$-T-cellene (Gruppe 1).

I gruppen som ble tilført det negative kontrollantistoff alene fra umiddelbart etter innføringen av $CD45RB^{high}$-T-cellene til uke 7 og som fra uke 8 ble tilført anti-AILIM-

antistoffet i tillegg til det negative kontrollantistoff (Gruppe 2) ble en signifikant økning (gjenvinning) av kroppsvekten observert umiddelbart etter påbegynt tilførsel av anti-AILIM-antistoff, sammenlignet med gruppen som kun ble tilført negativt kontrollantistoff alene, selv etter uke 8 (Gruppe 3). Anti-AILIM-antistoffet ble således funnet å kurere inflammatorisk tarmsykdom.

Videre ble utviklingsgraden av den inflammatoriske tarmsykdom samt graden av undertrykkelse og behandling når det gjelder oppstart og utvikling av sykdommen ved anti-AILIM-antistoffet analysert ved å oppsamle tykktarmen fra noen mus i Gruppe 1 og Gruppe 3 6 uker etter innføring av T-celler og undersøke tarmens tilstand med det blotte øye. Som normal kontroll ble en tilsvarende observasjon utført på tykktarm oppsamlet fra BALB/c scid/scid-mus som ikke var tilført $CD45RB^{high}$-T-celler og ikke var tilført antistoff.

Resultatene er vist i Fig. 2.

Resultatet var at en involusjon av tykktarmen (fortykning og forkortning av tarmkanalen) som ledsaget utviklingen av inflammatorisk tarmsykdom og ubehandlet tarminnhold ble observert i gruppen som ble tilført det negative kontrollantistoff (Gruppe 3). Tykktarmens tilstand hos gruppen som ble tilført anti-AILIM-antistoff (Gruppe 1) tilsvarte tilstanden hos tykktarm fra den normale kontroll, og anti-AILIM-antistoffet viste seg i signifikant grad å undertrykke oppstart og utvikling av inflammatorisk tarmsykdom.

[Eksempel 2] Terapeutisk virkning på inflammatorisk tarmsykdom i musemodellen for kolitt <Forsøk 2>

<2-1> Dyr

Immundefisiente BALB/c scid/scid-mus, C57BL/6 scid/scid-mus og normale BALB/c-mus (alle 6 til 8 uker gamle hannmus fra CLEA Japan) ble anvendt.

<2-2> Monoklonale antistoffer

Et monoklonalt antistoff mot muse-AILIM (ICOS), et monoklonalt antistoff mot muse-B7RP-1, som er en ligand for muse-AILIM (ICOS), og et negativt kontrollantistoff ble anvendt.

B10.5 fremstilt som beskrevet ovenfor ble anvendt som monoklonalt anti-muse-AILIM/ICOS-antistoff.

Det monoklonale anti-muse-B7RP-1-antistoff ble fremstilt på følgende måte: En SD-rotte ble immunisert med rekombinante L-celler som uttrykte B7RP-1, fremstilt ifølge standardfremgangsmåter. Miltceller ble isolert fra den immuniserte rotten og hybridomer ble fremstilt ved fusjon med myelomceller ifølge standardfremgangsmåter. Ved å anvende dyrkningssupernatanten fra hvert hybridom ble bindingsgraden av monoklonalt anti-muse-B7RP-1-antistoff som forelå i dyrkningssupernatanten overfor rekombinante celler (NRK-celler) som uttrykker muse-B7RP-1 målt ved EIA, og hybridomer som dannet et antistoff som ble bundet til muse-B7RP-1 ble utvalgt.

Monoklonalt anti-muse-B7RP-1-antistoff som ble anvendt i undersøkelsen ble fremstilt fra dyrkningssupernatanten fra de utvalgte hybridomer. Det ble videre bekreftet at det monoklonale anti-muse-B7RP-1-antistoff har inhiberende virkning på bindingen av muse-AILIM-Ig (fusjonspolypeptid som omfatter det løselige område fra muse-AILIM/ICOS og Fc fra et immunglobulin) til rekombinante celler som uttrykker muse-B7RP-1.

Rotte-IgG (Sigma) som ikke reagerer med muse-AILIM/ICOS eller B7RP-1 ble anvendt som negativt kontrollantistoff.

<2-3> Induksjon av kolitt (inflammatorisk tarmsykdom)

Den inflammatoriske tarmsykdom kolitt ble indusert ved å introdusere $CD4^+CD45RB^{high}$-T-celler i BALB/c scid/scid-mus ifølge en eksisterende rapport (J. Immunol., bind 164, s. 4878-4882, 2000).

$CD4^+$-T-celler ble separert fra miltcellene fra normale BALB/c-mus ved å benytte det magnetiske separasjonssystem anti-CD4 (L3T4) MACS (Miltenyi Biotec) ifølge de vedlagte instruksjoner. $CD4^+$-T-cellene (renhet 96-97 % analysert ved FACS) ble merket med et PE-merket anti-muse-CD4-antistoff (RM4-5; PharMingen) og et FITC-merket anti-CD45RB-antistoff (16A; PharMingen), og sortert i $CD45RB^{high}$-T-celler og $CD45RB^{low}$-T-celler ved anvendelse av FACS Vantage (Becton Dickinson).

Den inflammatoriske tarmsykdom (kolitt) ble indusert ved intraperitoneal tilførsel av $CD45RB^{high}$-T-celler ($5x\ 10^5$ celler/200 µl PBS) til BALB/c scid/scid-mus.

<2-4> Behandling av inflammatorisk kolitt med anti-AILIM-antistoff

Det monoklonale anti-muse AILIM/ICOS-antistoff (250 µg/250 µl PBS), det monoklonale anti-muse-B7RP-1-antistoff (250 µg/250 µl PBS), eller kontrollantistoffet (250 µg/250 µl PBS) ble tilført intraperitonealt 3 ganger ukentlig i 7 uker fra tidspunktet for innføring av $CD45RB^{high}$-T-celler (uke 0) til mus fremstilt som beskrevet ovenfor i hvilke inflammatorisk kolitt ble indusert.

For på den annen side å undersøke den terapeutiske virkning av anti-AILIM/-ICOS-antistoffet under en tilstand med utviklet inflammatorisk kolitt ble det monoklonale anti-AILIM/ICOS-antistoff tilført (ved en konsentrasjon på 250 µg/mus, 3 ganger ukentlig, i.p.) under betingelser som tilsvarer dem nevnt ovenfor fra 3 uker etter innføringen av $CD45RB^{high}$-T-celler i mus fremstilt som beskrevet ovenfor i hvilke inflammatorisk kolitt var blitt indusert. Syv uker etter innføringen av $CD45RB^{high}$-T-cellene ble forsøksdyrene avlivet, og inflammasjonstilstanden i tykktarmen ble analysert.

<2-5> Innføring av patogene $CD4^+$-T-celler fra mus med kolitt til mus.

Fra lamina propria (LP) i tykktarmen hos BALB/c scid/scid-mus i hvilke $CD4^+$ $CD45RB^{high}$-T-celler var blitt introdusert (adoptiv overføring) ble $CD4^+$-celler (LP $CD4^+$-T-celler) isolert ved å anvende de ovenfor nevnte magnetiske MACS-kulene 7 uker etter innføringen av T-cellene. Renheten av de isolerte LP $CD4^+$-T-cellene ble bekreftet å være 95 % eller høyere ved FACS.

LP $CD4^+$-T-cellene (1x 10^6 celler/200 µl PBS, i.p.) ble tilført til BALB/c scid/scid-mus. Deretter ble anti-AILIM/ICOS-antistoffet (250 µg/250 µl PBS) eller det negative kontrollantistoff (rotte-IgG; 250 µg/250 µl PBS) tilført 3 ganger ukentlig til forsøksmusene. Fire uker etter tilførselen av LP $CD4^+$-T-cellene ble musene avlivet, og tykktarmen ble fjernet og analysert histologisk.

<2-6> Histologisk undersøkelse og immunhistokjemisk farging

Vevsprøver fra tykktarm oppsamlet fra de ovenfor nevnte forsøksdyr ble fiksert i PBS tilsatt 6 % formalin. Parafinfikserte vevssnitt fra tykktarmen (5 µm) ble farget med hematoksylin og eosin (HE-farging). Alle de fremstilte vevssnittsprøver ble analysert. Graden av inflammasjon i tykktarmen ble overført til poengtall ifølge en foreliggende rapport (Gastroenterology, bind 119, s. 715-723, 2000).

På den annen side ble tykktarmsprøver for analyse ved immunhistokjemisk farging fiksert i OCT-forbindelse, nedfrosset i flyende nitrogen og lagret ved -80 °C. Farging av vevssnittene ble utført ved avidin-biotinkompleksfremgangsmåten.

Vevssnittene (6 µm) ble inkubert med biotinylert monoklonalt anti-muse-AILIM/ICOS-antistoff, biotinylert monoklonalt anti-muse-B7RP-1 antistoff, biotinylert monoklonalt anti-muse-CD4-antistoff (RM4-5; rotte-IgG1; PharMingen), biotinylert monoklonalt anti-muse-F4/80-antistoff (rotte-IgG2; PharMingen), eller biotinylert isotypetilpasset kontrollantistoff (PharMingen). Det biotinylerte antistoff ble påvist med streptavidin-biotinylert pepperrotperoksidasekompleks (Vectastain ABC Kit; Vector), og synliggjort med diaminobenzidin. Deretter ble alle snitt motfarget med hematoksylin.

<2-7> Påvisning av apoptotiske celler

Apoptotiske celler i frosne vevssnitt ble påvist ved anvendelse av settet ApoTag (Intergen) ifølge den tidligere rapporterte TUNEL-fremgangsmåte. Ved observasjon under et mikroskop ble TUNEL-positive celler i vevssnittene kvantifisert ved å beregne antall TUNEL-positive celler blant 500 mononukleære lamina propria-celler (LPMC) som hadde infiltrert 5 deler av et snitt. Prosentandelen av TUNEL-positive celler blant 500 LPMC ble benyttet som apoptosemål.

<2-8> Resultater

Resultatene er vist i Fig. 3 til Fig. 12.

<2-8-1> Undertrykkelse av kolitt ved tilførsel av anti-AILIM/ICOS-antistoff.

I forsøksmusene (kontrollmusene) som var tilført negativt kontrollantistoff (rotte-IgG) ble alvorlig kolitt utviklet 4 til 7 uker etter innføring av $CD45RB^{high}$-T-celler, og ikke bare et signifikant vekttap (Fig. 3), men også en signifikant fortykkelse av tarmveggen i tykktarmen ledsaget av diaré og inflammasjon, ble observert.

I kontrollmusene var gjennomsnittsverdien (i uke 7) for histologiske poeng (et mål på omfanget av kolitten) særpreget ved transmural inflammasjon i hvilken et stort antall lymfocytter observeres i lamina propria og det submucosale vev og en fremtredende epitelhyperplasi ledsaget av et redusert antall begerceller, 5,9±1,2 (Fig. 4).

Mus behandlet med anti-AILIM/ICOS-antistoffet var derimot fullstendig friske, tegn på kolitt og fortykket kolonvegg ble ikke observert og en vektøkning ble observert over tid (Fig. 3). Videre var det histologiske poengtall for kolonveggvevet 0,8±0,7 i disse anti-AILIM/ICOS-antistoffbehandlede mus (n=7), og klare morbide endringer kunne ikke observeres. (Fig. 4).

Det gjennomsnittlige antall $CD4^+$-T-celler som ble observert i lamina propria i tykktarmen hos mus med kolitt (kontrollmus) som hadde utviklet en inflammasjon var 44±9x 10^5 celler/tykktarm, mens det i mus behandlet med anti-AILIM/ICOS-antistoffet var 21±3x 10^5 celler/tykktarm ($p<0,01$) (Fig. 5).

<2-8-2> Induksjon av apoptose i vevsinfiltrerende mononukleære celler ved anti-AILIM/ICOS-antistoff

I tykktarmen hos mus som var tilført anti-AILIM/ICOS-antistoffet ble en signifikant økning av apoptopiske celler (hvorav de fleste var vevsinfiltrerende mononukleære celler) observert, sammenlignet med tallet hos mus behandlet med negativt kontrollantistoff (kontrollmus).

Apoptosegraden, målt ved kvantitativ analyse av de apoptopiske cellene i tykktarmen, var signifikant høy hos mus som var tilført anti-AILIM/ICOS-antistoffet (n=5) sammenlignet med graden hos mus som var tilført kontrollantistoff (kontrollmus) (Fig. 6).

Disse resultatene viste at den undertrykkende virkning på kolitt oppnådd ved behandling med anti-AILIM/ICOS-antistoff kan tilskrives en fjerning av patogene T-celler som uttrykker AILIM (ICOS).

<2-8-3> Undertrykkende virkning på kolitt ved tilførsel av anti-AILIM/ICOS-antistoff etter utvikling av symptomer.

Vekttap og infiltrasjon av lymfocytter i kolonvevene, dvs. en tæringssykdom som er ett av symptomene i den ovenfor nevnte kolittmodellmus, starter rundt 3 uker og rundt 2 uker etter tilførselen av $CD45RB^{high}$-T-celler. Som nevnt ovenfor ble derfor tilførselen av anti-AILIM/ICOS-antistoff innledet 3 uker etter innføringen av T-cellene.

I gruppen tilført anti-AILIM/ICOS-antistoff ble en signifikant forbedring av vekttapet observert (Fig. 7), og diaré ble ikke observert.

Histologisk analyse av kolonvevssnitt fra mus fra hver gruppe viste at granulomatøs inflammasjon, lymfocytisk infiltrasjon og fortykning av epitelet var signifikant redusert i kolonvevene hos gruppen som ble tilført anti-AILIM/ICOS-antistoff, sammenlignet med musene som ble tilført negativt kontrollantistoff (kontrollmusene). Endringer i inflammasjonen ble observert i lamina propria og i visse tilfeller i lesjoner som ledsaget en mild infiltrasjon av lymfocytter i submucosa, men ikke i muskellaget. Videre var det ovenfor nevnte histologiske poengtall, som måler omfanget av kolitten (tykktarmen ble uttatt i uke 7) signifikant redusert i gruppen bestående av mus behandlet med anti-AILIM/ICOS-antistoff (1,62±0,81), sammenlignet med gruppen med

mus tilført negativt kontrollantistoff (kontrollmus, 5,93±1,23) ($p<0,05$; Fig. 8). Videre var antall infiltrerende $CD4^+$-T-celler (uke 7) signifikant redusert i musene tilført anti-AILIM/ICOS-antistoff (5,50±0,7x 10^6 celler), sammenlignet med kontrollmusene (31,3±7,7x 10^6 celler) ($p<0,05$; Fig. 9).

<2-8-4> Undertrykkende virkning av anti-AILIM/ICOS-antistoffet på kolitt indusert ved innføring av lamina propria $CD4^+$-T-celler avledet fra en kolittdonor.

For å undersøke den terapeutiske virkning av anti-AILIM/ICOS-antistoff på patogene T-celler som beskrevet ovenfor ble kolitt indusert ved tilførsel av LP $CD4^+$-T-celler avledet fra mus med kolitt til BALB/c scid/scid-mus, fulgt av tilførsel av anti-AILIM/ICOS-antistoffet.

Hos de anti-AILIM/ICOS-antistofftilførte mus var vekttapet (Fig. 10) signifikant forbedret. I tillegg var det histologiske poengtall, som måler omfanget av kolitten (tykktarmen ble uttatt i uke 4, Fig. 11) og infiltrasjonen av $CD4^+$-celler i lamina propria i kolon (uke 4) (Fig. 12) også signifikant redusert sammenlignet med de tilsvarende verdier hos musene tilført kontrollantistoff (kontrollmus).

Industriell anvendbarhet

De farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse (som spesielt foretrukket omfatter en forbindelse med induserende aktivitet på celledød, apoptose eller fjerning av celler som uttrykker AILIM/ICOS) er ekstremt anvendbare for å undertrykke, forebygge og/eller behandle sykdommer som kan skyldes unormal immunitet i fordøyelseskanalen, nærmere bestemt inflammatoriske tarmsykdommer (særlig Crohns sykdom og kolitt (ulcerøs kolitt og lignende)) og næringsmiddelallergier.

De farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan forsterke den terapeutiske virkningen på inflammatoriske tarmsykdommer og næringsmiddelallergier ved anvendelse i kombinasjon med eksisterende farmasøytiske midler som foreskrives for behandling av slike inflammatoriske sykdommer og næringsmiddelallergier.

Videre er et farmasøytisk preparat som omfatter et humant antistoff mot AILIM, som inngår som en del av det farmasøytiske preparat ifølge foreliggende oppfinnelse, ekstremt anvendbart som medikament siden det ikke gir bivirkninger, for eksempel allergier, som observeres ved tilførsel av antistoffer avledet fra mus til mennesker.

Patentkrav

1. Farmasøytisk preparat for undertrykkelse, behandling eller forebyggelse av kolitt eller Crohn's sykdom,
karakterisert ved at det omfatter et antistoff som binder til AILIM, eller del av nevnte antistoff, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

2. Farmasøytisk preparat ifølge krav 1, hvor nevnte antistoff, eller del av nevnte antistoff, har en aktivitet som induserer celledød i en AILIM-uttrykkende celle.

3. Anvendelse av et antistoff som binder til AILIM, eller del av nevnte antistoff, for fremstilling av et medikament for undertrykkelse, behandling eller forebyggelse av kolitt eller Crohn's sykdom.

4. Anvendelse ifølge krav 3, hvori nevnte antistoff, eller del av nevnte antistoff, har en aktivitet som induserer celledød av en AILIM-uttrykkende celle.

Fig. 1

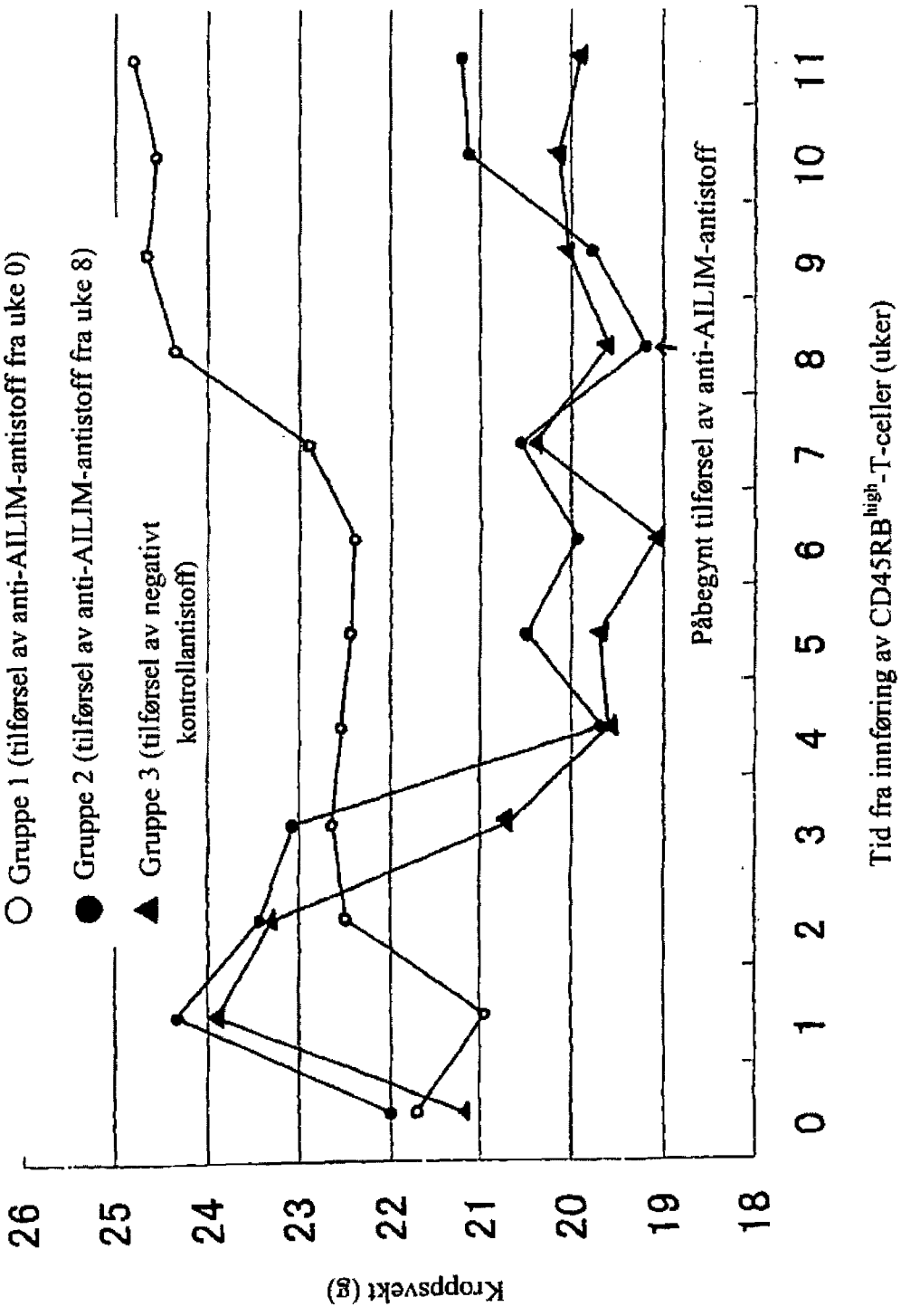

○ Gruppe 1 (tilførsel av anti-AILIM-antistoff fra uke 0)
● Gruppe 2 (tilførsel av anti-AILIM-antistoff fra uke 8)
▲ Gruppe 3 (tilførsel av negativt kontrollantistoff)
Kroppsvekt (g)
26
25
24
23
22
21
20
19
18
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Påbegynt tilførsel av anti-AILIM-antistoff
Tid fra innføring av CD45RB^{high}-T-celler (uker)

Fig. 2

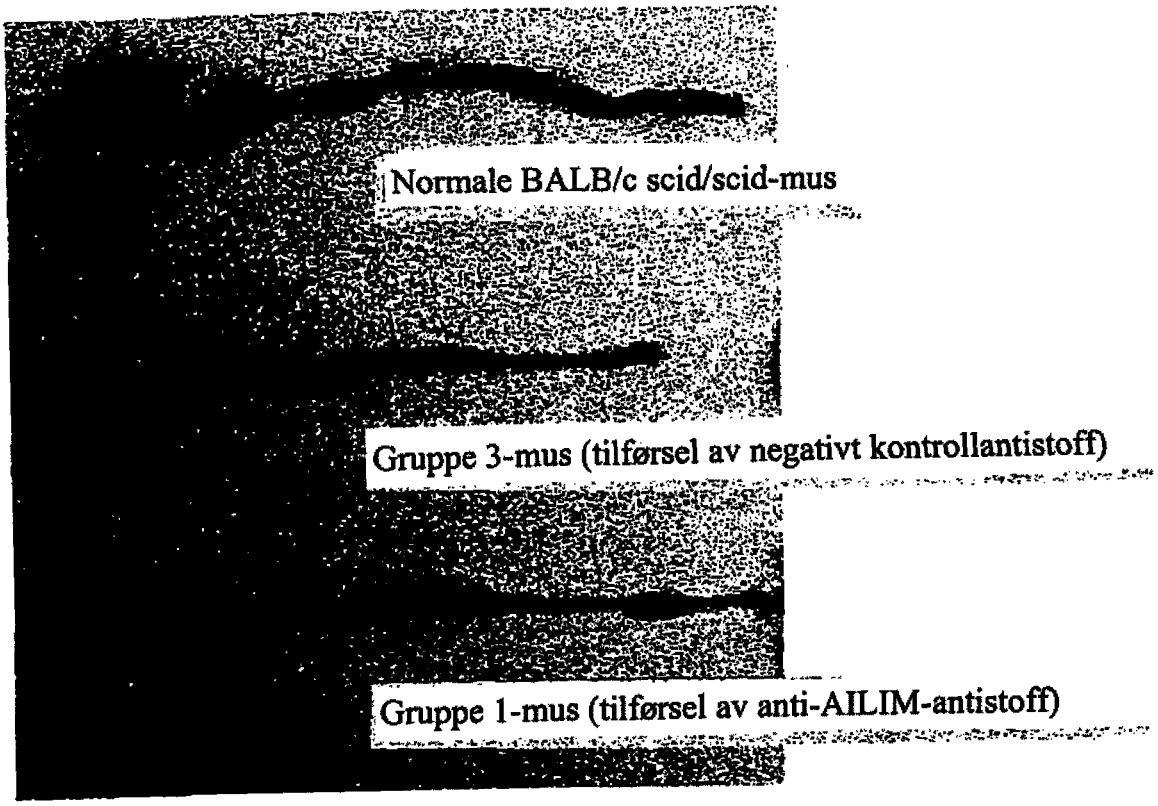

Normale BALB/c scid/scid-mus
Gruppe 3-mus (tilførsel av negativt kontrollantistoff)
Gruppe 1-mus (tilførsel av anti-AILIM-antistoff)

Fig. 3

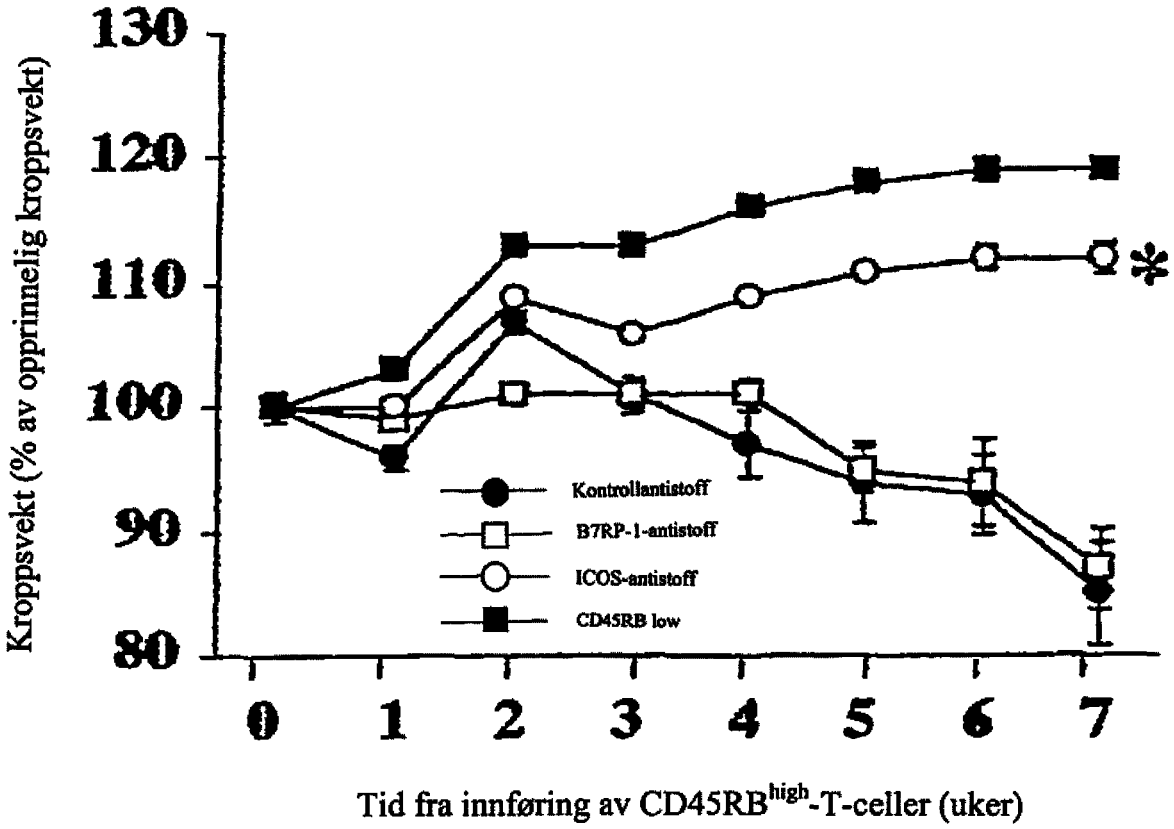

130
120
110
100
90
80
Kroppsvekt (% av opprinnelig kroppsvekt)
0
1
2
3
4
5
6
7
Kontrollantistoff
B7RP-1-antistoff
ICOS-antistoff
CD45RB low
*
Tid fra innføring av CD45RB^high-T-celler (uker)

Fig. 4

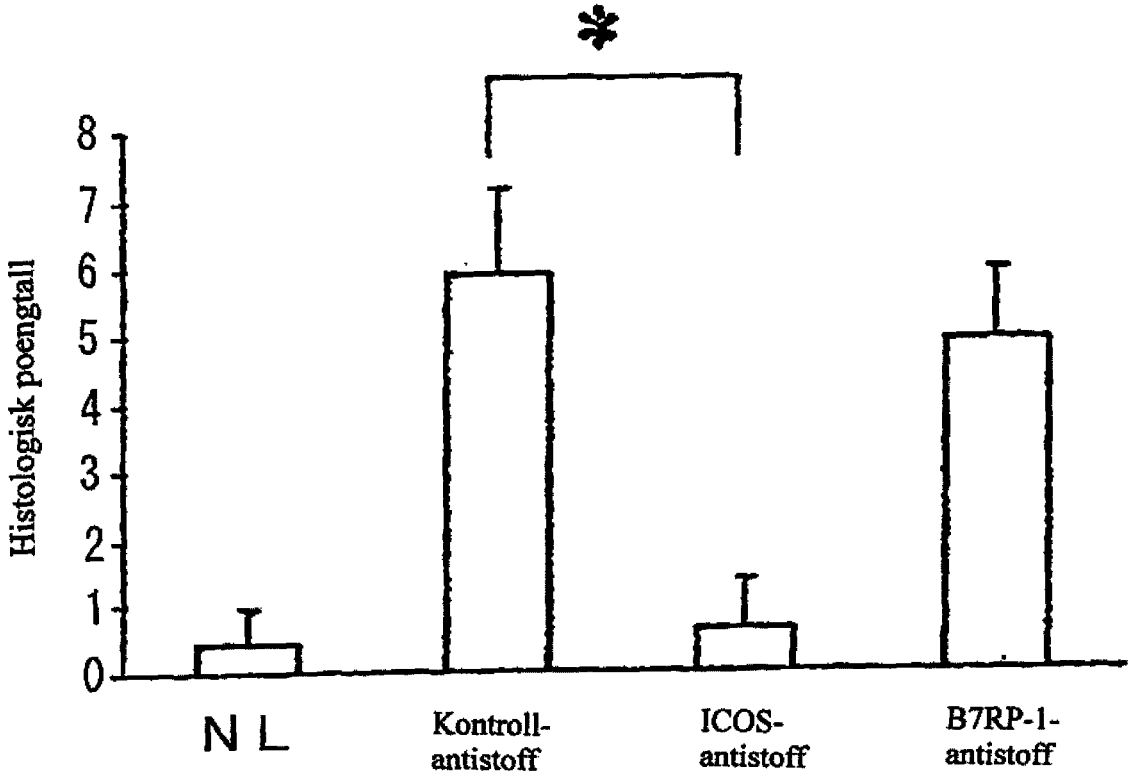

*
Histologisk poengtall
8
7
6
5
4
3
2
1
0
N L
Kontroll-antistoff
ICOS-antistoff
B7RP-1-antistoff

Fig. 5

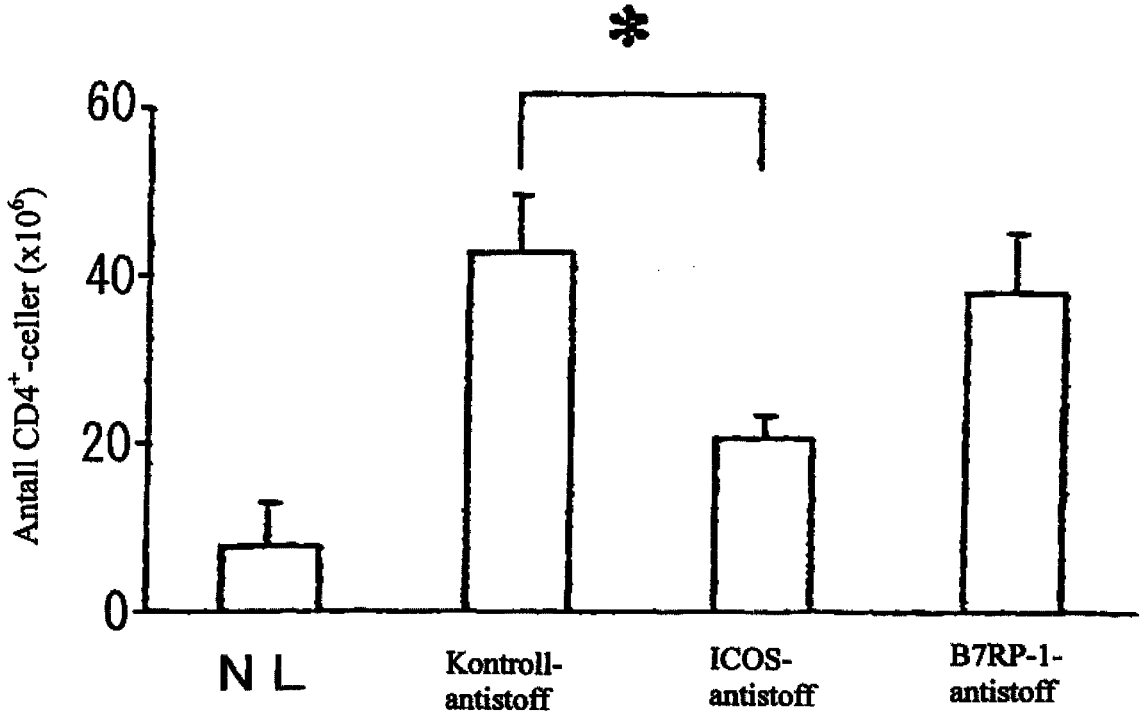

*
60
40
20
0
Antall CD4+-celler (x10^6)
N L
Kontroll-antistoff
ICOS-antistoff
B7RP-1-antistoff

Fig. 6

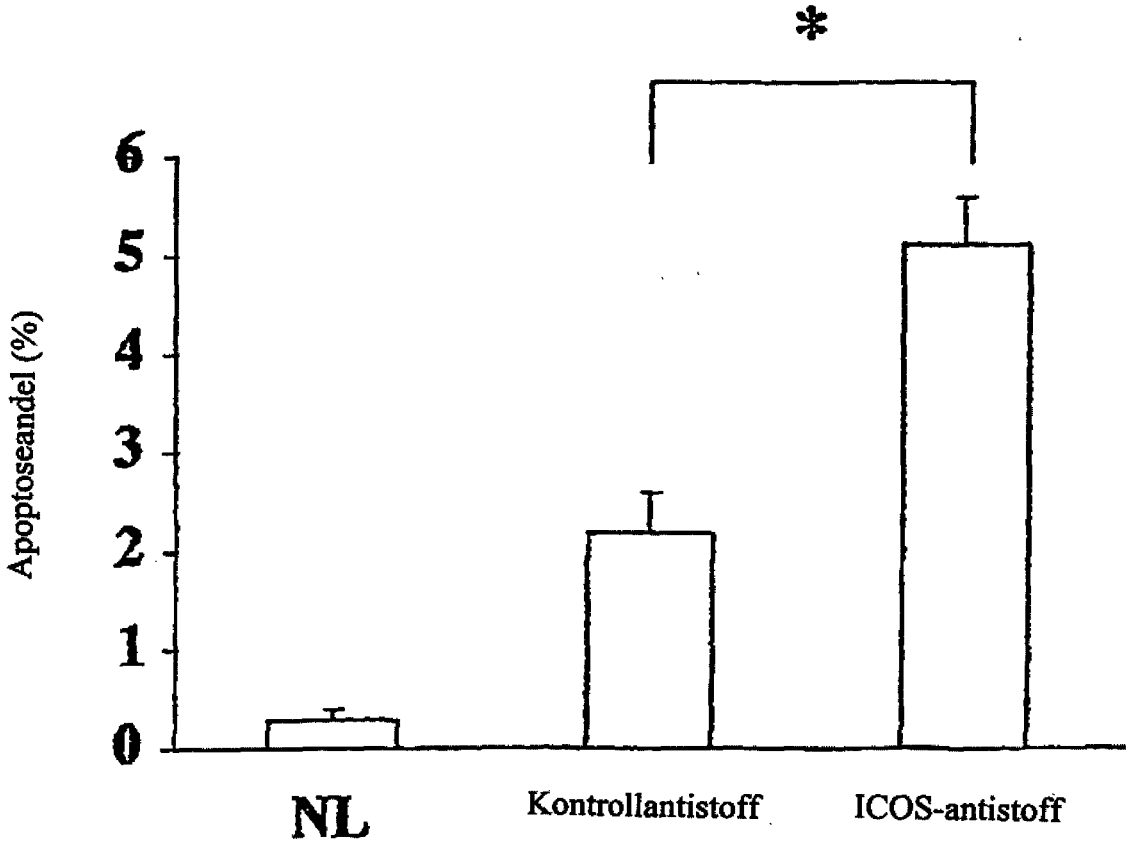
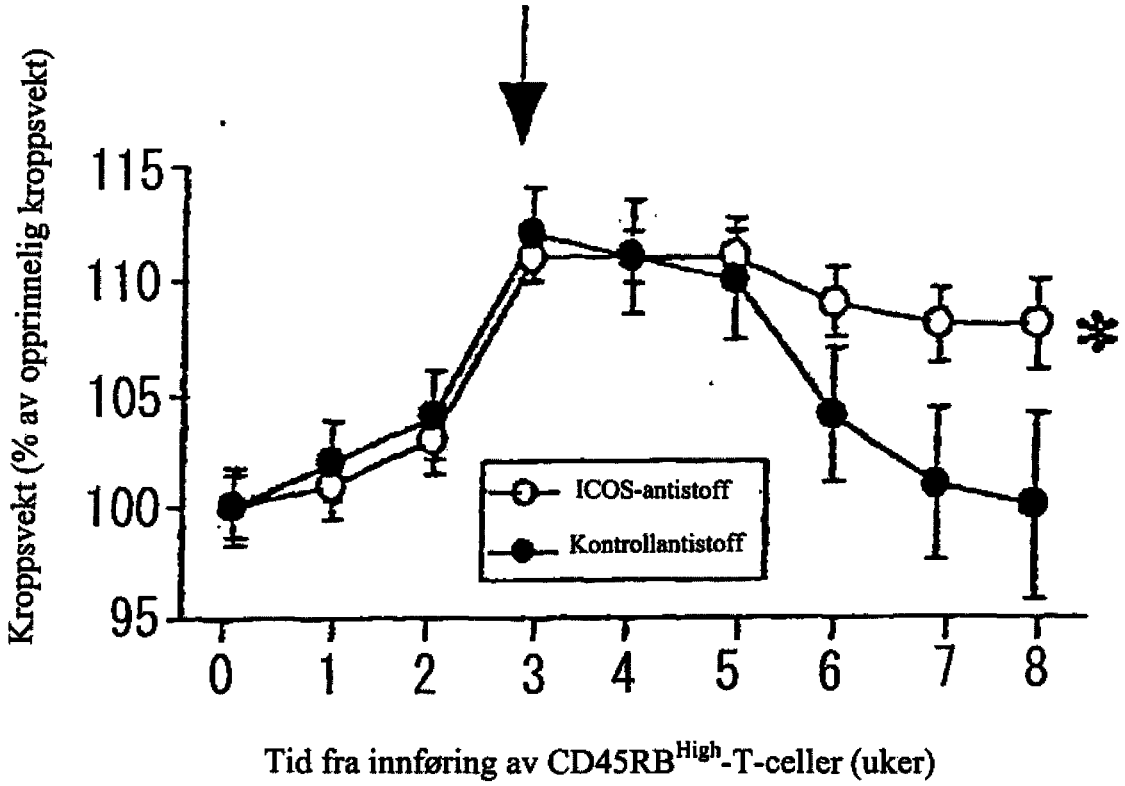

*
Apoptoseandel (%)
6
5
4
3
2
1
0
NL
Kontrollantistoff
ICOS-antistoff

Fig. 7



Tid fra innføring av $CD45RB^{High}$-T-celler (uker)

Fig. 8

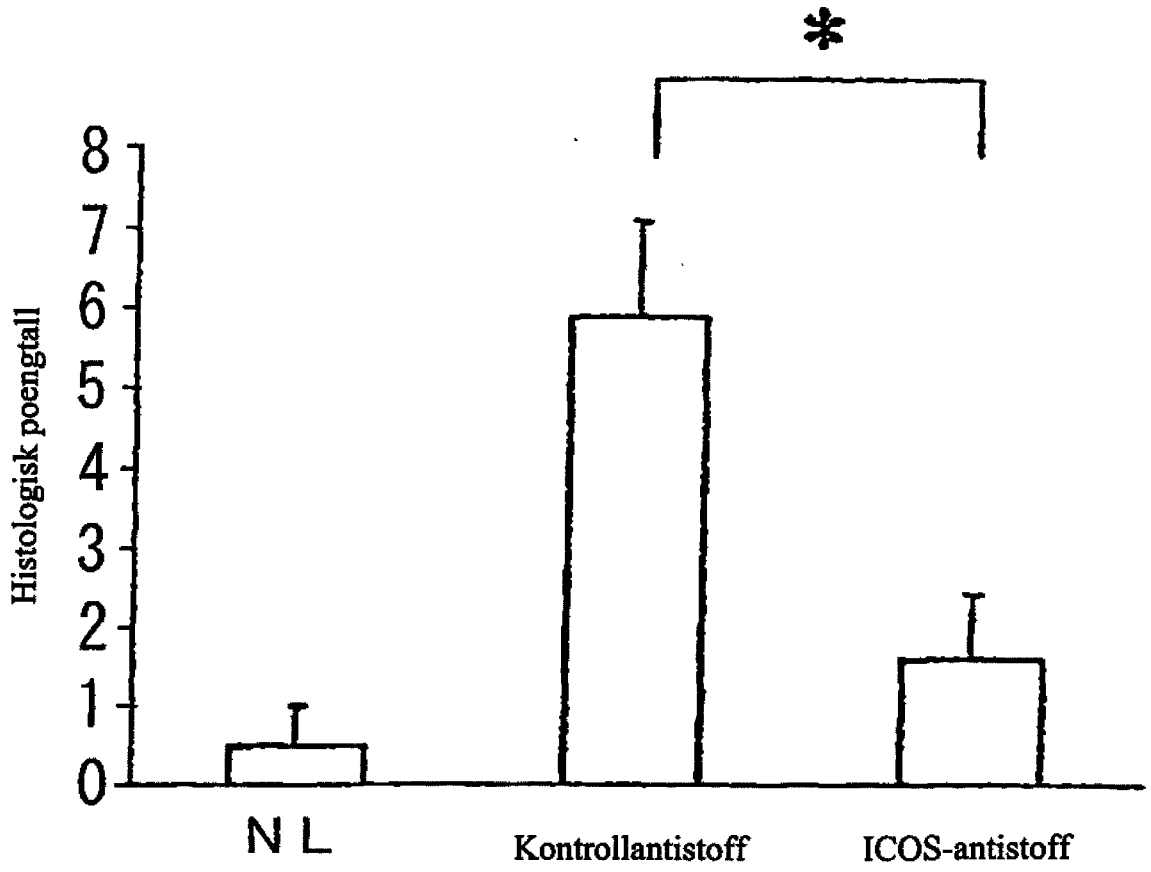

*
Histologisk poengtall
0
1
2
3
4
5
6
7
8
N L
Kontrollantistoff
ICOS-antistoff

Fig. 9

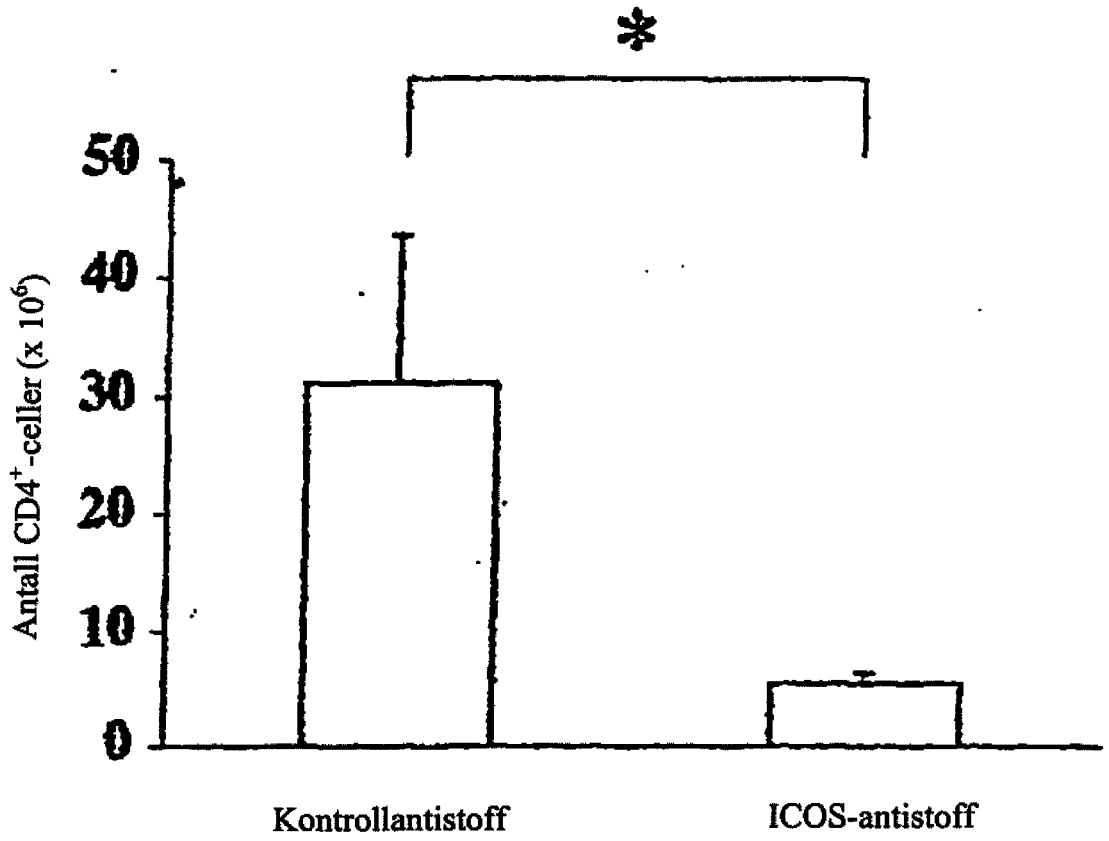

*
50
40
30
20
10
0
Antall CD4+-celler (x 10^6)
Kontrollantistoff
ICOS-antistoff

Fig. 10

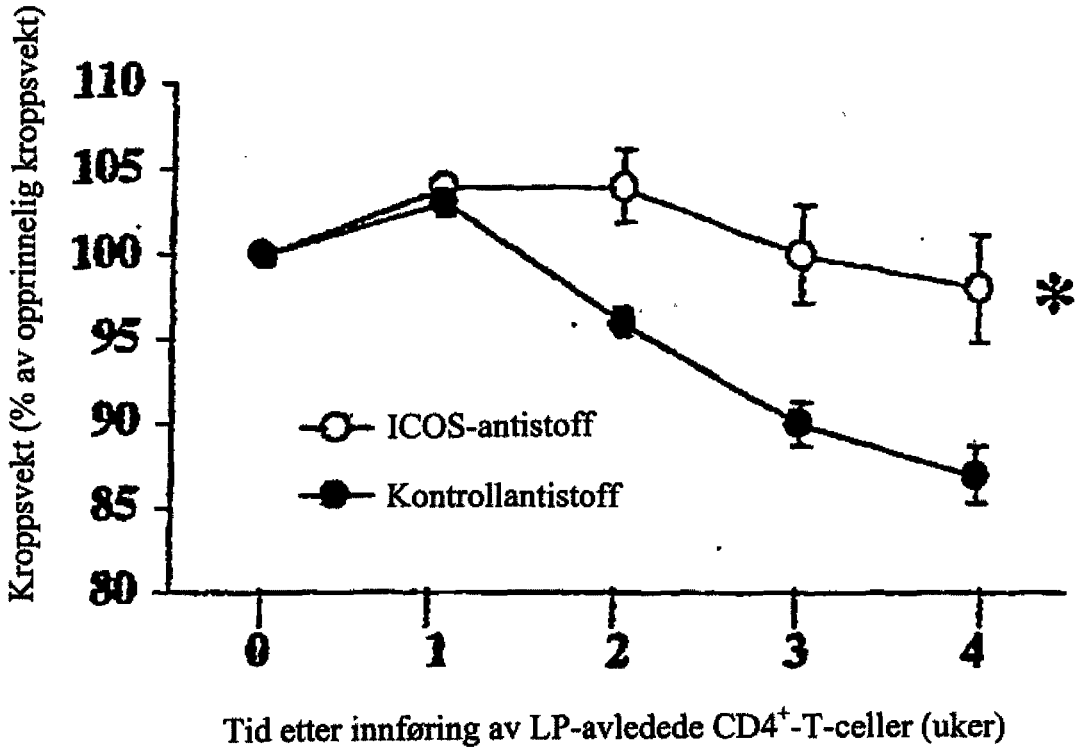

Kroppsvekt (% av opprinnelig kroppsvekt)
110
105
100
95
90
85
80
0
1
2
3
4
*
ICOS-antistoff
Kontrollantistoff
Tid etter innføring av LP-avledede CD4+-T-celler (uker)

Fig. 11

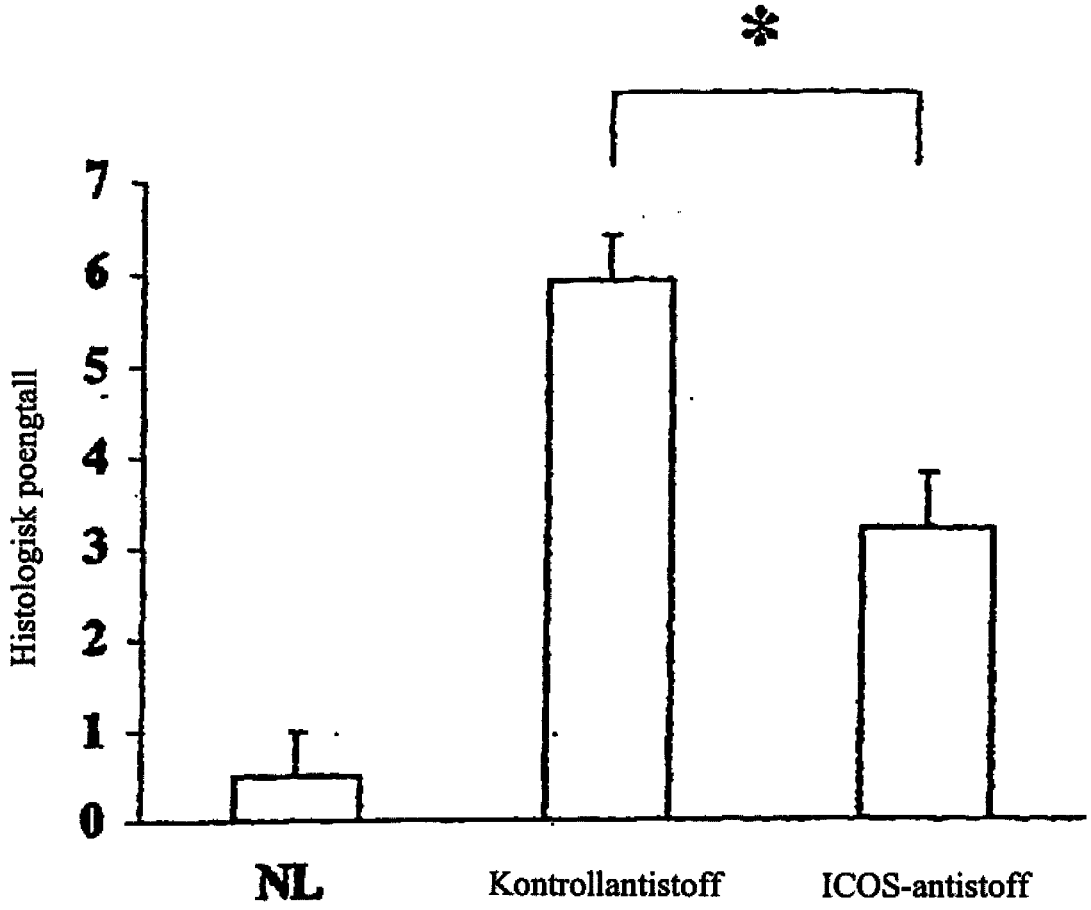
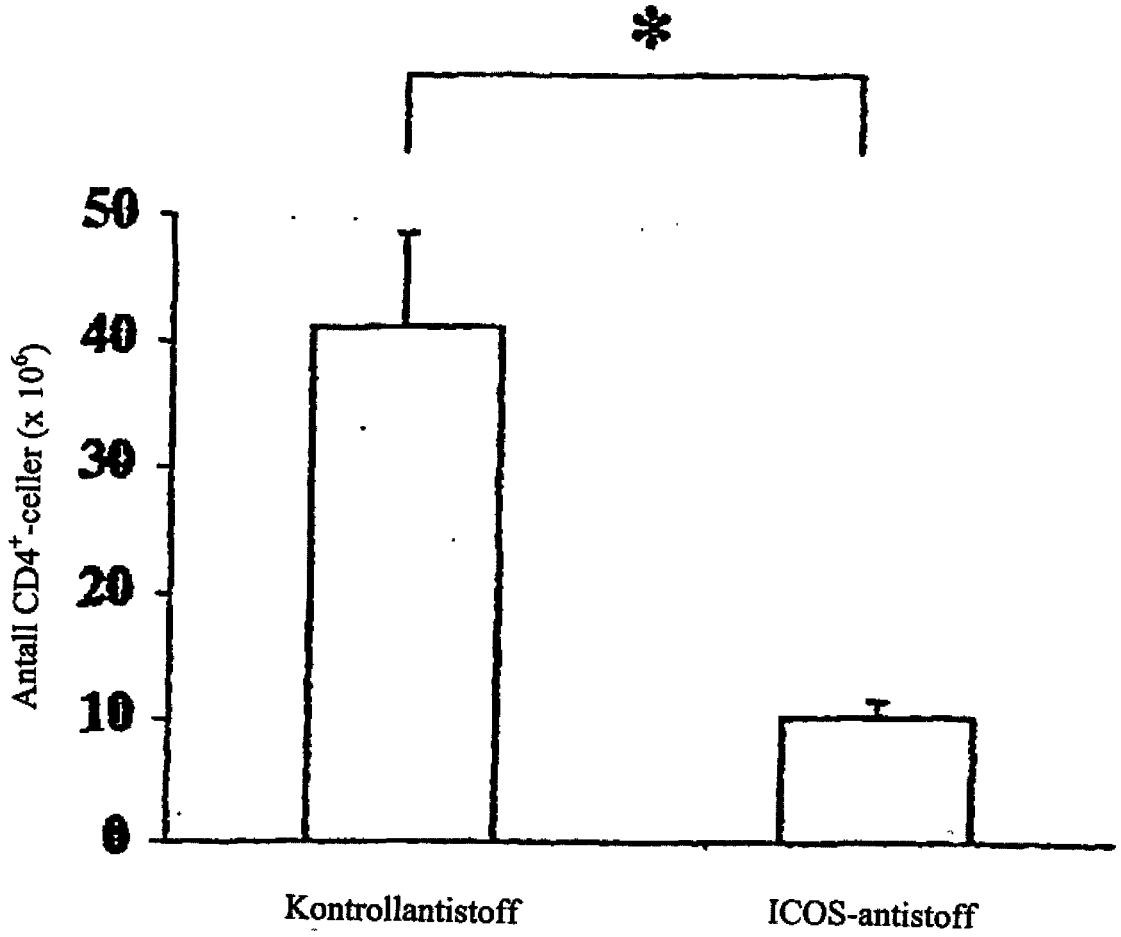

*
Histologisk poengtall
0
1
2
3
4
5
6
7
NL
Kontrollantistoff
ICOS-antistoff

Fig. 12


*
50
40
30
20
10
0
Antall CD4+-celler (x 10^6)
Kontrollantistoff
ICOS-antistoff