

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 961285 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 961285

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 16/28
C12P 21/08
C12N 15/13

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 02.09.1994

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 20.03.1996

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 20.03.1996

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 02.09.1994 PCT/US1994/009984
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

01.10.1993 US 130541

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Immunex Corporation, 51 University Street, Seattle, WA 98101, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Fanslow, William C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Zappone, JoDee, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Alderson, Mark, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • Armitage, Richard J., Bainbridge Island, WA 98110, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

CD40:n vasta-aineita

Antikroppar mot CD40

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

11459 ATCC

CD40:n vasta-aineita**Tekninen alue**

5 Tämä keksintö koskee yleisesti vasta-aineita ja tarkemmin määriteltynä CD40:n vastaisia vasta-aineita.

Keksinnön tausta

10 CD40 on B-soluilla, dendriittisillä soluilla, joillakin karsinoomasolulinjoilla ja ihmisen kateenkorvan epi-
teelillä esiintyvä 50 kDa:n pinta-antigeeni. CD40:llä tie-
detään olevan tärkeä rooli B-lymfosyyttien proliferaatios-
sa ja erilaistumisessa. Aminohapposekvenssin samankaltai-
suuksien perusteella CD40 on todettu TNF-reseptorien pro-
teiiniryhmän jäseneksi, johon ryhmään kuuluu sellaisia
15 molekyylejä kuin hermokasvutekijän affiniteetiltään heikko
reseptori, TNF-reseptorien molemmat muodot, CD27, OX40 ja
Hodgkinin lymfooma -markkeri CD30. Jokin aika sitten on
kloonattu yhden CD40:een liittyvän ligandin (CD40L) sekä
ihmisessä että hiiressä esiintyvät muodot ja osoitettu
20 niiden olevan tyyppin II olennaisia kalvoproteiineja, joita
esiintyy pääasiassa aktivoituneilla CD4+-T-soluilla. CD40L
antaa voimakkaan stimuloivan signaalin sekä ihmisen että
hiiren B-soluille; CD40L-ilmentymisen säätelystä ja
CD40L:n vaikutuksista muihin solutyyppeihin on kuitenkin
olemassa vain vähän tietoja.

25 CD40-pinta-antigeenin vastaisten monoklonaalisten
vasta-aineiden on myös osoitettu välittävän erilaisia bio-
logisia toimintoja ihmisen B-soluilla. CD40 mAb indusoi
esimerkiksi homotyyppisiä ja heterotyyppisiä adheesioita
[Barret et al., J. Immunol. 146 (1991) 1722; Cordon et
30 al., J. Immunol. 140 (1988) 1425]; ja suurentaa solun ko-
koa [Cordon et al., J. Immunol. 140 (1988) 1425; Valle et
al., Eur. J. Immunol. 19 (1989) 1463]. CD40 indusoi anti-
LgM:llä, CD20 mAb:llä tai forboliesterillä aktivoitujen
B-solujen proliferaation yksin [Clark ja Ledbetter, Proc.
35 Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 4494; Cordon et al., LEUCO-

CYTE TYPING III, toim. A. J. McMichael, Oxford University Press, Oxford, s. 426; Paulie et al., J. Immunol. 142 (1989) 590] tai yhdessä IL-4:n kanssa [Valle et al., Eur. J. Immunol. 19 (1989) 1463; Cordon et al., Eur. J. Immunol. 17 (1987) 1535] ja tuottaa IgE:tä [Jabara et al., J. Exp. Med. 172 (1990) 1861; Gascan et al., J. Immunol. 147 (1991) 8], IgG:tä ja IgM:ää [Gascan et al., J. Immunol. 147 (1991) 8] IL-4-stimuloituista T-soluttomista viljelmistä. Lisäksi CD40 mAb:n on raportoitu edistävän IL-4-välitteistä liukoisen CD23/FcεRII:n vapautumista B-soluista [Gordon ja Guy, Immunol. Today 8 (1987) 339; Cairns et al., Eur. J. Immunol. 18 (1988) 349] ja edistävän B-solujen IL-6-tuotantoa [Clark ja Shu, J. Immunol. 145 (1990) 1400]. Jokin aika sitten on tarttuvien CD₃₂+ solujen läsnä ollessa kehitetty ihmisen B-solulinjoja IL-4:ää ja CD40 mAb:tä sisältävistä primaari-B-solupopulaatioista [Banchereau et al., Science 241 (1991) 70]. Lisäksi voidaan estää itukeskuksen sentrosyyttien apoptoosi, jos ne aktivoidaan CD40:n ja/tai Ag-reseptorien kautta [Liu et al., Nature 342 (1989) 929]. Kussakin edellä mainituista julkaisuista kuvataan CD40 mAb:tä, joka stimuloi B-solujen biologista aktiivisuutta.

Monoklonaalisia vasta-aineita, jotka estävät CD40:n sitoutumisen CD40-ligandiin, ei ole kuitenkaan vielä esitetty. Mainitunlaiset salpaavat vasta-aineet olisivat käyttökelpoisia esimerkiksi tutkimussovelluksissa CD40:n roolin selvittämiseksi tarkemmin ja myös terapiasovelluksissa, jotka vaativat CD40-välitteisen biologisen aktiivisuuden estoa. CD40-ligandin salpaavat mAb:t olisivat käyttökelpoisia myös kliinisisissä sovelluksissa, esimerkiksi CD40:een liittyvien sairauksien diagnosoimiseksi. Lisäksi vasta-aineita voidaan käyttää erilaisissa tutkimussovelluksissa, kuten yhdistelmä-DNA-menetelmin tuotetun CD40:n puhdistuksessa tai määrityksissä CD40:n läsnäolon detektoimiseksi.

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön mainitunlaisia vasta-aineita ja lisäksi muita niihin liittyviä etuja.

Keksinnön yhteenveto

5 Tämä keksintö tarjoaa käyttöön monoklonaalisia vasta-aineita, jotka sitoutuvat spesifisesti ihmisen CD40-molekyylisiin ja estävät CD40-molekyylin sitoutumisen CD40-ligandiin. Monoklonaalinen vasta-aine voidaan valita ihmisen ja hiiren monoklonaalisten vasta-aineiden joukosta. Vastaavasti CD40 voidaan valita hiiren ja ihmisen
10 CD40:iden joukosta. Käyttöön tarjotaan myös terapeutti-koostumus, joka käsittää edellä kuvatun kaltaista CD40:n vastaista monoklonaalista vasta-ainetta ja fysiologisesti hyväksyttävää kantaja- tai laimennusainetta.

Keksintö tarjoaa käyttöön myös sitoutuvan proteiinin, joka sitoutuu spesifisesti niska-CD40:een ja joka voi olla esimerkiksi vasta-ainefragmentti tai fuusioproteiini, joka käsittää vähintään yhden vasta-aineesta peräisin olevan alueen. Käyttöön tarjotaan myös terapeutti-
15 nen koostumus, joka käsittää niska-CD40:een spesifisesti sitoutuvaa proteiinia ja fysiologisesti hyväksyttävää kantaja- tai laimennusainetta.
20

Tämän keksinnön piiriin kuuluu myös menetelmä soluilla olevan CD40:n detektoimiseksi, joka käsittää vaiheet, joissa (a) inkuboidaan soluja yhdessä edellä kuvatun
25 kaltaisen, leimatun monoklonaalisen vasta-aineen kanssa ja (b) detektoidaan sitoutuneen vasta-aineen läsnäolo. Keksintö tarjoaa käyttöön myös menetelmän seerumissa olevan liukoisen CD40:n detektoimiseksi, joka käsittää vaiheet, joissa (a) inkuboidaan seerumia, jonka epäillään sisältävän
30 liukoista CD40:tä, yhdessä kiinteän kantajan kanssa, johon on sidottu edellä kuvatun kaltaisia monoklonaalisia vasta-aineita, sellaisissa olosuhteissa ja sellainen aika, että sitoutuminen pääsee tapahtumaan, (b) inkuboidaan
35 kiinteää kantajaa yhdessä toisen leimatun, CD40:lle spesifisen, monoklonaalisen vasta-aineen kanssa sellaisissa

olosuhteissa ja sellainen aika, että sitoutuminen pääsee tapahtumaan, ja (c) detektoidaan sitoutuneen leimatun vasta-aineen läsnäolo.

5 Tämän keksinnön nämä ja muut puolet käyvät ilmi seuraavasta yksityiskohtaisesta kuvauksesta ja oheisista piirustuksista.

Piirustusten lyhyt kuvaus

10 Kuvio 1 esittää CD40 mAb:eiden M2 ja M3 inhiboivaa vaikutusta ihmisen liukoisen CD40:n sitoutumiseen ihmisen CD40L:ään.

Kuvio 2 esittää CD40 mAb:eiden M2 ja M3 inhiboivaa vaikutusta ihmisen liukoisen CD40:n sitoutumiseen hiiren CD40L:ään.

15 Kuvio 3 on käyrästä, joka esittää annoksesta riippuvaa CD40L:n (CV-1/EBNA-solujen pinnalla) ja monosyyttien TNF- α -tuotannon välistä riippuvuutta GM-CSF:n, IL-3:n tai IFN- γ :n läsnä ollessa.

20 Kuvio 4 on diagrammi, joka osoittaa, että CD40.Fc tai CD40 mAb M2 inhiboi CD40L:n indusoimaa TNF- α -tuotantoa.

Kuvio 5 esittää tuloksia, joita saatiin proliferaatiomäärityksessä, jossa käytettiin anti-IgM:llä ja trimeerisellä CD40L-ligandilla stimuloituja ääreisveren B-soluja.

25 Kuvio 6 esittää tuloksia, joita saatiin proliferaatiomäärityksessä, jossa käytettiin pelkällä trimeerisellä CD40L-ligandilla stimuloituja ääreisveren B-soluja.

30 Kuvio 7 esittää tuloksia, joita saatiin proliferaatiomäärityksessä, jossa käytettiin IL-4:llä ja trimeerisellä CD40L-ligandilla stimuloituja ääreisveren B-soluja.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

35 Puhdistettua CD40:tä voidaan käyttää monoklonaalisten vasta-aineiden samoin kuin sitoutuvien proteiinien valmistukseen, joita voidaan konstruoida erityisellä tavalla käyttämällä yhdistelmä-DNA-menetelmiä. Nämä sitoutu-

vat proteiinit sisältävät vaihtelevat alueet geenistä,
 joka koodittaa spesifisesti sitoutuvaa monoklonaalista
 vasta-ainetta. Tämän keksinnön yhteydessä monoklonaalisten
 vasta-aineiden ja sitoutuvien proteiinien määrittämään
 5 olevan spesifisesti sitoutuvia, jos niiden sitoutumisen
 yhteydessä K_a on vähintään 10^7 (mol/l)⁻¹. Keksinnön edullis-
 ten puolten mukaisesti monoklonaaliset vasta-aineet estä-
 vät myös CD40:n sitoutumisen CD40-ligandiin (CD40L). Am-
 mattimies pystyy helposti määrittämään monoklonaalisen
 10 vasta-aineen tai sitoutuvan proteiinin affiniteetin [katso
 Dower et al., The Interaction of Monoclonal Antibodies
 with MHC Class I Antigens on Mouse Spleen Cells. I.
 Analysis of the Mechanism of Binding, J. Immunol 132
 (1984) 751]. Lyhyesti esitettynä saatetaan kasvavia määriä
 15 radioaktiivisesti leimattua vasta-ainetta tai sitoutuvaa
 proteiinia kosketukseen CD40:n kanssa. Vasta-aineen affi-
 niteetti voidaan määrittää laskemalla sen vasta-ainepitoi-
 suuden käänteisluku, jolla puolet vasta-aineista sitoutuu
 maksimaalisesti (katso Dower et al., supra). Kuten lienee
 20 ilmeistä ammattimiehelle, vasta-aineita voidaan muodostaa
 CD40:tä sisältäviä soluja, kokonaista CD40:tä tai CD40:n
 osia vastaan. Erityisen edullisia ovat vasta-aineet, joita
 on muodostettu CD40:tä vastaan käyttämällä liukoista
 CD40.Fc-molekyyliä. Tämän keksinnön yhteydessä monoklonaal-
 25 lisiin vasta-aineisiin kuuluvat lisäksi F(ab')₂- ja Fab-
 fragmentit, joita ammattimies pystyy helposti valmista-
 maan.

Ammattimies pystyy helposti muodostamaan polyklo-
 naalisia vasta-aineita erilaisista tasalämpöisistä eläi-
 30 mistä, kuten hevosista, lehmistä, eri siipikarjalajeista,
 kaniineista, hiiristä tai rotista. Lyhyesti esitettynä
 käytetään CD40:tä eläimen immunisointiin intraperitoneaa-
 listen, intramuskulaaristen, intraokulaaristen tai subku-
 taanisten injektoiden kautta. CD40:n immunogeenisyyttä
 35 voidaan lisätä käyttämällä tehosteainetta, kuten Freundin

täydellistä tai epätäydellistä tehosteainetta. Muutamien tehosteimmunisoitintien jälkeen otetaan pieniä seeruminäytteitä ja testataan niiden reaktiivisuus CD40:n suhteen millä tahansa monista menetelmistä, joita ovat mm. sellaiset määritykset kuin ELISA-, ABC- tai muunnetut ABC-määritykset, tai täplätestillä. Erityisen edulliset polyklonaaliset antiseerumit antavat jossakin näistä määrityksistä signaalin, joka vähintään kolme kertaa suurempi kuin tausta. Kun eläimessä esiintyvä pitoisuus on saavuttanut vakioarvon CD40-reaktiivisuuden suhteen, on helppo saada suuria määriä polyklonaalisia antiseerumeja joko ottamalla verta viikoittain tai lopettamalla eläin.

Myös monoklonaalisia vasta-aineita voidaan muodostaa helposti käyttämällä tavanomaisia menetelmiä (US-patenttijulkaisut RE 32 011, 4 902 614, 4 543 439 ja 4 411 993, jotka mainitaan tässä viitteinä; katso myös Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, toim. Kennett, McKearn ja Bechtol, Plenum Press 1980 ja Antibodies: A Laboratory Manual, toim. Harlow ja Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988, jotka myös mainitaan tässä viitteinä). Lyhyesti esitettynä yhdessä suoritusmuodossa kohteena olevaan eläimeen, kuten rottaan tai hiireen, injektoidaan CD40:n muotoa, joka soveltuu immuunivasteen kehittämiseen CD40:tä vastaan. Tämä voidaan tehdä immunisoimalla erilaisilla CD40:n muodoilla, mm. soluilla, joilla esiintyy CD40:tä, viruksilla, kuten lehmänrokkoviruksella, jolla esiintyy CD40:tä, CD40:n liukoisilla muodoilla, kuten CD40.Fc:llä tai CD40-sekvenssiin perustuvilla peptideillä. Lisäksi alalla tunnetaan monia menetelmiä tuloksena olevan immuunireaktion voimistamiseksi, esimerkiksi liukoisen reseptorin tai peptidiin kytkeminen toiseen proteiiniin, kuten ovalbumiiniin tai tulivuorikotilohemosyaniiniin (KLH), tai tehosteaineiden, kuten Freundin täydellisen tai epätäydellisen tehosteaineen, käyttö. Alkuimmunisoitinta voidaan

tehdä intraperitoneaalisesti, intramuskulaarisesti, intraokulaarisesti tai subkutaanisesti.

Eläin voidaan immunisoida uudelleen toisella tehosteimmunisoinnilla 1 - 3 viikon kuluttua ensimmäisestä immunisoinnista. Eläimestä voidaan ottaa sitten verinäyte ja testata seerumin immuunireaktiivisuus CD40:n suhteen käyttämällä sellaisia määrittäyksiä kuin ELISA, täplätesti, ABC tai tai muunnettu ABC. Voidaan myös tehdä lisäämmunisoiteja, kunnes eläimen reaktiivisuus CD40:n suhteen on asettunut vakiotasolle. Eläimelle voidaan antaa sitten viimeinen tehosteannos liukoista CD40:tä ja lopettaa se 3 - 4 päivän kuluttua. Tässä vaiheessa elimet, jotka sisältävät suuria määriä B-soluja, perna ja imusolmukkeet, voidaan ottaa talteen ja hajottaa yksittäissolususpensioksi johtamalla elimet verkon läpi tai rikkomalla pernan tai imusolmukkeiden kalvot, jotka sulkevat solut sisäänsä. Yhden suoritusmuodon mukaisesti punasolut hajotetaan sitten lisäämällä hypotonista liuosta, minkä jälkeen palauteaan välittömästi isotonisuustila.

Yhden toisen suoritusmuodon mukaisesti monoklonaalisten vasta-aineiden valmistukseen soveltuvia soluja saadaan käyttämällä *in vitro* -immunisointimenetelmiä. Lyhyesti esitettynä eläin lopetetaan ja perna- ja imusolmukkesolut poistetaan edellä kuvatulla tavalla. Valmistetaan yksittäissolususpensio ja laitetaan solut viljelmään, joka sisältää CD40-muotoa, joka soveltuu edellä kuvatun kaltaisen immuunireaktion kehittämiseen. Sen jälkeen otetaan talteen lymfosyytit ja fuusioidaan ne jäljempänä kuvattavalla tavalla.

Soluista, joita saadaan edellä kuvatulla tavalla käyttämällä *in vitro* -immunisointia tai immunisoidusta eläimestä, voidaan tehdä kuolemattomia transfektoimalla viruksella, kuten Epstein bar -viruksella (EBV) [katso Glasky ja Reading, Hybridoma 8(4) (1989) 377 - 389]. Yhden edullisen suoritusmuodon mukaisesti talteen otettujen per-

na- ja/tai imusolmukesolujen suspensioille tehdään vaihtoehtoisesti fuusiointi sopivan myeloomasolun kanssa monoklonaalista vasta-ainetta erittävän "hybridooman" aikaansaamiseksi. Soveltuvat myeloomalinjat ovat edullisesti puutteellisia vasta-aineiden konstruoinnin tai ilmentymisen suhteen ja lisäksi syngeneesiä immunisoidusta eläimestä peräisin olevien solujen kanssa. Alalla tunnetaan monia tällaisia myeloomasolulinjoja ja niitä on saatavissa sellaisista lähteistä kuin the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland (katso Catalogue of Cell Lines & Hybridomas, 6. p., ATCC 1988). Myeloomalinjojen edustajiin kuuluvat ihmisen ollessa kyseessä UC 729-6 (ATCC nro CRL 8061), MC/CAR-Z2 (ATCC nro CRL 8147) ja SKO-007 (ATCC nro CRL 8033), hiiren ollessa kyseessä SP2/0-AG14 (ATCC nro CRL 1581) ja P3X63Ag8 (ATCC nro TIB 9) ja rotan ollessa kyseessä Y3-Ag1.2.3 (ATCC nro CRL 1631) ja YB2/0 (ATCC nro CRL 1662). Erityisen edullisiin fuusiolinjoihin kuuluvat NS-1 (ATCC nro TIB 18) ja P3X63-Ag 8.653 (ATCC nro CRL 1580), joita voidaan käyttää fuusioihin joko hiiri-, rotta- tai ihmissolulinjojen kanssa. Fuusio myeloomasolulinjan ja immunisoidusta eläimestä peräisin olevien solujen välillä voidaan tehdä erilaisin menetelmin, mukaan luettuna polyeteeniglykolin (PEG) käyttö (katso Antibodies: A Laboratory Manual, toim. Harlow ja Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988) tai elektrofusio [katso Zimmerman ja Vienken, J. Membrane Biol. 67 (1982) 165 - 182].

Solut voidaan fuusioinnin jälkeen laittaa viljelymaljoihin, jotka sisältävät sopivaa kasvualustaa, kuten RPMI 1640:tä tai DMEM:ää (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas). Alusta voi sisältää myös muita aineosia, kuten naudan sikiöseerumia (Fetal Bovine Serum, FBS; valmistaja Hyclone, Logan, Utah tai JRH Biosciences), tymosyyttejä, jotka on otettu talteen olevasta hyvin nuoresta eläimestä, joka on samaa la-

jia kuin immunisointiin käytetty, tai agarialustan jäähmettämiseksi. Alustan tulisi lisäksi sisältää reagenssia, joka mahdollistaa selektiivisesti fuusioitujen ja myeloomasolujen kasvun. Erityisen edullisesti käytetään HAT:tä (hypoksantiini, aminopteriini ja tymidiini) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Tuloksena olevat fuusioituneet solut eli hybridoomat voidaan tutkia noin 7 päivän kuluttua CD40:n tunnistavien vasta-aineiden läsnäolon määrittämiseksi. Muutamien kloonilaimennusten ja uusintamääritysten jälkeen voidaan eristää CD40:een sitoutuvia vasta-aineita sisältävä hybridooma.

Myös muita menetelmiä voidaan käyttää monoklonaalisten vasta-aineiden muodostamiseen [katso William D. Huse et al., Generation of a Large Combinational Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda, *Science* 246 (joulukuu 1989) 1275 - 1281; katso myös L. Sastry et al., Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (elokuu 1989) 5728 - 5732; katso myös Michelle Alting-Mees et al., Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas, *Strategies in Molecular Biology* 3 (tammikuu 1990) 1 - 9; nämä viitteet kuvaavat kaupallista järjestelmää, jota myy Stratacyte, La Jolla, Kalifornia, ja joka mahdollistaa vasta-aineiden tuotannon yhdistelmä-DNA-menetelmin). Lyhyesti esitettynä eristetään mRNA B-solupopulaatiosta ja käytetään sitä raskas- ja kevytketjuista immunoglobuliinia vastaavien cDNA-ilmentymiskirjastojen muodostamiseen kImmunoZap(H)- ja kImmunoZap(L)-vektoreissa. Nämä vektorit voidaan tutkia yksitellen tai saattaa ilmentymään yhdessä Fab-fragmenttien tai vasta-aineiden tuottamiseksi (katso Huse et al., *supra*; katso myös Sastry et al., *supra*). Positiiviset pesäkkeet voidaan sitten muuttaa hajottamattomaksi plasmidiksi, joka mahdol-

listaa monoklonaalisten vasta-ainefragmenttien tehokkaan ilmentämisen *E. colista* käsin.

Sitoutuvia proteiineja voidaan vastaavasti konstruoida myös käyttämällä yhdistelmä-DNA-menetelmiä erilaisten alueiden sisällyttämiseksi geenistä, joka koodittaa spesifisesti sitoutuvaa vasta-ainetta, joka estää CD40:n sitoutumisen CD40L:ään. Ammattimies pystyy helposti konstruimaan näitä proteiineja (katso James W. Larrick et al., Polymerase Chain Reaction Using Mixed Primers: Cloning of Human Monoclonal Antibody Variable Region Genes From Single Hybridoma Cells, *Biotechnology* 7 (syyskuu 1989) 934 - 938; Riechmann et al., Reshaping Human Antibodies for Therapy, *Nature* 332 (1988) 323 - 327; Roberts et al., Generation of an Antibody with Enhanced Affinity and Specificity for its Antigen by Protein Engineering, *Nature* 328 (1987) 731 - 734; Verhoeyen et al., Reshaping Human Antibodies: Grafting an Antilysozyme Activity, *Science* 239 (1988) 1534 - 1536; Chaudhary et al., A Recombinant Immunotoxin Consisting of Two Antibody Variable Domains Fused to *Pseudomonas* Exotoxin, *Nature* 339 (1989) 394 - 397) tässä esitettyjen tietojen perusteella. Lyhyesti esitettyinä monistetaan antigeenisitoutumiskohtia tai CD40-sitoutumisaluetta, joka on peräisin spesifisesti sitoutuvaa ja salpaavaa monoklonaalista vasta-ainetta tuottavasta solusta, ja insertoidaan ne suoraan ihmisen vasta-aineita tuottavan solun genomiin (katso Verhoeyen et al., *supra*; katso myös Reichmann et al., *supra*). Tämä menetelmä mahdollistaa hiiren tai rotan spesifisesti sitoutuvan monoklonaalisen vasta-aineen antigeenisitoutumiskohdan siirtämisen ihmisen vasta-aineeseen. Mainitunlaiset vasta-aineet ovat edullisia käytettäväksi terapeuttisesti ihmisillä, koska ne eivät ole yhtä antigeenisia kuin rotan tai hiiren vasta-aineet. Vaihtoehtoisesti antigeenisitoutumiskohtia (vaihteleva alue) voidaan joko kytkeä tai insertoida toiseen, täysin erilaiseen proteiiniin (katso Chaudhary et

al., supra), jolloin tuloksena oli uusi proteiini, jossa on vasta-aineen antigeenisitoutumiskohtia samoin kuin täysin eri proteiinin funktionaalinen aktiivisuus. Kuten ammattimies ymmärtänee, vasta-aineen antigeenisitoutumiskohdat tai CD40-sitoutumiskohta ovat löydettävissä vasta-aineen vaihtelevalta alueelta. Lisäksi tämän keksinnön yhteydessä voidaan käyttää DNA-sekvenssejä, jotka koodittavat pienempiä vasta-aineen osia tai vaihtelevia alueita, jotka sitoutuvat spesifisesti nisäkkään CD40:een. Näistä osista voidaan helposti testata sitoutumisspesifisyys CD40:n suhteen käyttämällä alalla tunnettuja määrityksiä, mukaan luettuina esimerkiksi ELISA-, ABS- tai täplätestit.

Yhdessä edullisessa suoritusmuodossa monistetaan geenejä, jotka koodittavat kiinnostuksen kohteena olevaa monoklonaalista vasta-ainetta tuottavasta hybridoomasta peräisin olevaa vaihtelevaa aluetta, käyttämällä vaihtelevaa aluetta varten valmistettuja nukleotidialukkeita. Ammattimies voi syntetisoida näitä alukkeita, niitä voidaan ostaa kaupallisista lähteistä. Stratacyte (La Jolla, Kalifornia) myy hiiren ja ihmisen vaihtelevia alueita varten valmistettuja alukkeita, mukaan luettuina alukkeet alueita V_{Ha} , V_{Hb} , V_{Hc} , V_{Hd} , C_{H1} , V_L ja C_L varten. Näitä alukkeita voidaan käyttää monistettaessa raskaan tai kevyen ketjun vaihtelevien alueita, joita voidaan sitten insertoida vektoreihin, kuten vektoriin ImmunoZAP*H tai vastaavasti ImmunoZAP*L (Stratacyte). Näitä vektoreita voidaan sitten viedä *E. coli*in ilmentymisen aikaansaamiseksi. Käyttämällä näitä menetelmiä voidaan valmistaa suuria määriä yksiketuista proteiinia, jotka sisältää V_H - ja V_L -alueiden fuusion [katso Bird et al., Science 242 (1988) 423 - 426].

Yhdessä toisessa suoritusmuodossa sitoutuva proteiini fuusioidaan ilmentymisvektorissa toiseen proteiiniin, kuten toksiiniin. Solut, joihin sitoutuva proteiini sitoutuu, voidaan siten tappaa sisällyttämällä toksiinia (katso Chaudhary et al.). Sitoutuva proteiini voidaan vaihtoeh-

toisesti fuusioida CD40L-antagonistiin (ts. proteiiniin, joka sitoo CD40:n muttei synnytä biologista aktiivisuutta), jolloin mahdollistetaan suurten paikallisten antagonistipitoisuuksien kehittyminen CD40-pitoisten solujen ympärille. Vaikutus kohdistuu vain antagonistia sitomaan kykeneviin soluihin, mikä pienentää mahdollisesti terapeuttisiin tarkoituksiin tarvittavaa annosta.

Kun on saatu aikaan sopivia vasta-aineita tai sitoutuvia proteiineja, ne voidaan eristää tai puhdistaa monin ammattimiesten tuntemin menetelmin (katso Antibodies: A Laboratory Manual, toim. Harlow ja Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988). Sopiviin menetelmiin kuuluvat peptidi- tai proteiiniaffiniteettikolonnit, HPLC tai RP-HPLC, puhdistus proteiini A tai proteiini G -kolonneilla tai näiden menetelmien mikä tahansa yhdistelmä.

Tämän keksinnön mukaisilla vasta-aineilla ja sitoutuvilla proteiineilla on monia käyttötarkoituksia. Vasta-aineita voidaan käyttää esimerkiksi virtaussytometriassa CD40-pitoisten solujen lajitteluun tai CD40-pitoisten solujen histokemialliseen värjäykseen. Lyhyesti esitettynä soluilla olevan CD40:n detektoimiseksi soluja inkuboidaan yhdessä leimatun monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, joka sitoutuu spesifisesti nisäkkään CD40:een, minkä jälkeen detektoidaan sitoutuneen vasta-aineen läsnäolo. Nämä vaiheet voidaan toteuttaa myös yhdistettyinä lisävaiheisiin, kuten pesuihin sitoutumattoman vasta-aineen poistamiseksi. Tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi soveltuvat merkkiaineet ovat alalla tunnettuja, ja niihin kuuluvat mm. fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC), fykoerytriini (PE), piparjuuriperoksidaasi (HRP) ja kolloidinen kulta. Erityisen edullinen virtaussytometriassa käytettäväksi on FITC, joka voidaan liittää puhdistettuun vasta-aineeseen Keltkampin menetelmällä [Conjugation of Fluorescein Isothiocyanate to Antibodies I. Experiments on the Conditions of Conjugation, Immunology 18 (1970) 865 - 873]. [Katso myös

Keltekamp, Conjugation of Fluorescein Isothiocyanate to Antibodies II. A Reproducible Method, *Immunology* 18 (1970) 875 - 881; Goding, Conjugation of Antibodies with Fluorochromes: Modification to the Standard Methods, *J. Immunol. Methods* 13 (1970) 215 - 226.] Histokemiallisen värjäyksen yhteydessä on edullinen HRP, joka voidaan liittää puhdistettuun vasta-aineeseen Nakanen ja Kawaoin menetelmällä [Peroxidase-Labeled Antibody: A New Method of Conjugation, *J. Histochem. Cytochem.* 22 (1974) 1084 - 1091]. [Katso myös Tijssen ja Purstak, Highly Efficient and Simple Methods for Preparation of Peroxidase and Active Peroxidase Antibody Conjugates for Enzyme Immunoassays, *Anal. Biochem.* 136 (1984) 451 - 457.]

Puhdistettuja vasta-aineita tai sitoutuvia proteiineja voidaan käyttää myös terapeuttisesti estämään CD40-L:n sitoutuminen CD40:een *in vivo* tai CD40-pitoisten solujen hävittämiseen *in vivo*. Edullisissa suoritustavoissa vasta-ainetta muunnetaan immunologisen tunnistuksen välttämiseksi esimerkiksi siirtämällä hiiren spesifisen monoklonaalisen vasta-aineen antigeenisitoutumiskohta ihmisen monoklonaaliseen vasta-aineeseen, kuten edellä käsiteltiin. Erityisen edullisesti käytetään terapeuttisia koostumuksia, jotka käsittävät CD40:n vastaista vasta-ainetta tai CD40:een sitoutuvaa proteiinia ja fysiologisesti hyväksyttävää kantaja- tai laimennusainetta. Soveltuviin kantaja- tai laimennusaineisiin kuuluvat mm. neutraali puskuroitu fysiologinen suolaliuos tai fysiologinen suolaliuos, johon on sekoitettu epäspesifistä albumiinia. Terapeuttinen koostumus voi lisäksi sisältää muita jatke- tai stabilointiaineita, kuten puskureita, hiilihydraatteja, mukaan luettuina esimerkiksi glukosi, sakkaroosi tai dekstroosi, kelaatinmuodostajia, kuten EDTAa, tai erilaisia säilytettäviä. Sopivat annostukset voidaan määrittää kliinisissä kokeissa, vaikka määrä ja antotiheys voivat riippua sellaisista tekijöistä kuin hoidettavan tilan luonne ja vakavuus, haluttu vaste ja potilaan kunto.

Vasta-aineita voidaan käyttää myös potilaalle annetun verenkierrrossa olevan liukoisen CD40:n läsnäolon seuraamiseen tai CD40:n *in vivo* -pitoisuuksien mittamiseen potilaista. Yhdessä edullisessa suoritusmuodossa käytetään

5 kaksideterminanttista eli kerrosmäärittystä CD40:n detektointiin. Lyhyesti esitettynä seerumia, jonka epäillänsä sisältävän liukoista CD40:tä, inkuboidaan yhdessä kiinteään kantajan kanssa, johon on kiinnitetty edellä kuvatuskaltaista monoklonaalista vasta-ainetta, sellaisissa olosuhteissa ja sellainen aika, että sitoutuminen pääsee tapahtumaan. Alalla tunnetaan monia kiinteitä kantajia, mukaan

10 luettuina ELISA-levyt (Linbro, McLean, Va.), nitroselluloosa (Millopore Corp., Bendford, Mass.), helmet (Poly-sciences, Warrington, Penn.) ja magneettiset helmet (Robbin Scientific, Mountain View, Calif.). Lisäksi monoklonaalinen vasta-aine voidaan helposti kiinnittää kiinteään kantajaan käyttämällä alalla tunnettuja menetelmiä (katso Antibodies: A Laboratory Manual, toim. Harlow ja Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988). Kiinteää

15 kantajaa inkuboidaan sitten yhdessä toisen leimatun monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, joka on spesifinen nisäkkään CD40:n suhteen, sellaisissa olosuhteissa ja sellainen aika, että sitoutuminen pääsee tapahtumaan, minkä jälkeen voidaan detektoida sitoutuneen leimatun vasta-aineen läsnäolo.

25

Yhden edullisen suoritusmuodon mukaisesti monoklonaalisella vasta-aineella päällystetään kiinteä kantaja, kuten 96-syvennyksinen malja. Sen jälkeen malja suojataan käsittelemällä proteiinilla, kuten naudan seerumialbumiinilla tai rasvattomalla maitojauheella, noin 30 minuuttia. Potilaasta peräisin oleva seerumi laimennetaan fosfaattipuskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella ja sitä inkuboidaan syvennyksissä sellaisissa olosuhteissa ja sellainen aika, yleensä noin 30 minuuttia, että sitoutuminen

30 pääsee tapahtumaan. Sitten malja pestään, leimattua toista

35

monoklonaalista vasta-ainetta, joka on spesifistä eri CD40-epitopille, lisätään syvennyksiin ja inkuboidaan edellä kuvatulla tavalla. Eri CD40:n vasta-aineet voidaan määrittää käyttämällä ristisuojausmäärittystä. Syvennyksestä tutkitaan sitten toisen leimatun vasta-aineen läsnäolo. Toisen leimatun vasta-aineen läsnäolo osoittaa CD40:n läsnäolon potilaan seerumissa. Kuten ammattimies ymmärtäne, edellä kuvatussa määrittäksessä käytettävä monoklonaaliset vasta-aineet voidaan korvata polyklonaalisilla vasta-aineilla tai sitoutuvilla proteiineilla, jotka ovat CD40-spesifisiä.

Seuraavat esimerkit annetaan keksinnön valaisemiseksi sitä rajoittamatta.

Esimerkit

Esimerkki 1

CD40:n vastaisen monoklonaalisten vasta-aineiden valmistus

Monoklonaalisia vasta-aineita, jotka sitoutuvat ihmisen CD40:een ja estävät CD40:n sitoutumisen CD40-ligandiin, muodostettiin seuraavasti. Ihmisen CD40-immunogeeni, joka koostuu CD40:n ekstrasellulaarisesta alueesta fuusioituna ihmisen IgG1 Fc -molekyyliin (ja josta käytetään tässä lyhennettä HuCD40.Fc), valmistettiin olennaisilta osiltaan Fanslowin et al. kuvaamalla tavalla [J. Immunol. 149 (1992) 655].

BALB/c-hiiriin injektoitiin sekä intraperitoneaalisesti että subkutaanisesti 10 µg huCD40.Fc:tä, joka oli emulgoitu yhdessä Freundin täydellisen tehosteaineen kanssa. Hiiriin injektoitiin 13 ja 19 päivän kuluttua subkutaanisesti 10 µg huCD40.Fc:tä (joka oli emulgoitu yhdessä Freundin epätäydellisen tehosteaineen kanssa). Otettiin 6 päivän kuluttua seeruminäytteitä silmäkuopan takaa. Seeruminäytteet tutkittiin täplätestillä, vasta-ainesieppausmaljamäärittäyksellä ja FACS-analyysillä (käyttämällä joko kalvoon sitoutunutta huCD40:tä tai liukoista Flag

HuCD40:tä). Flag HuCD40:ssä on N-terminaalinen "flag"-peptidi Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys [Hopp et al., Bio/Technology 6 (1988) 1204], joka on voimakkaasti antigeeninen ja tarjoaa epitoopin, johon spesifinen monoklonaalinen vasta-aine sitoutuu reversiibelisti, mikä mahdollistaa nopean määrittämisen ja ilmenneen yhdistelmäproteiinin helpon puhdistuksen. Tämä sekvenssi lohkeaa myös spesifisesti naudan limakalvon enterokinaasin vaikutuksesta Asp-Lys-paria välittömästi seuraavan ryhmän kohdalta. Seeruminäytteiden pitoisuudet olivat > 1:2100 täplätestissä (jossa käytettiin 25 µg Flag huCD40:tä täplää kohden) ja noin 1:1600 vasta-ainesieppausmuotoisessa ELISA-määrittämisessä (jossa käytettiin biotiinilla leimattua Flag huCD40:tä pitoisuutena 150 ng/ml) ja > 1:1600 vasta-ainesieppausmaljämäärittämisessä (jossa käytettiin ¹²⁵I-leimattua Flag huCD40:tä pitoisuutena 3000 min⁻¹/µl). Seerumit testattiin myös FACS-määrittäyksellä laimennettuina suhteessa 1:400 käyttämällä soluja, joiden pinnalla on huCD40:tä, ja havaittiin, että niiden keskimääräinen fluoresenssisiirtymä on 4 kertaa suurempi kuin hiiren normaaliseerumien.

Hiirten annettiin levätä noin 8 viikkoa ja ne immunoitiin subkutaanisesti käyttämällä 7 µg huCD40.Fc:tä (emulgoituna yhdessä Freundin epätäydellisen tehosteaineen kanssa). Yhdelle hiirelle annettiin 4,5 viikon kuluttua 2 µg huCD40.Fc:tä laskimonsisäisesti ilman tehosteainetta. Tämä hiiri lopetettiin 3 päivän kuluttua. Sitten otettiin talteen pernasoluja ja fuusioitiin ne hiiren myeloomasolulinjan (Ag 8.653) kanssa. Fuusioseos siirrostettiin 96-syvennyksisiin maljoihin selektiiviseen HAT-alustaan (hypoksantiinia, aminopteriiniä ja tymidiiniä) fuusioitumattomien solujen, myeloomahybridien ja pernasoluhybridien proliferointin estämiseksi.

Hybridoomasolujen supernatantit tutkittiin kahdella määrittäyksellä. Kumpikin määrittäminen tehtiin 96-syvennyksis-

sä maljoissa, jotka oli päällystetty vuohen anti-hiirivas-
 ta-aineella (10 µg/ml). Testi positiivisen huCD40.Fc-reak-
 tiivisuuden toteamiseksi tehtiin lyhyesti esitettynä seu-
 raavasti. Päällystetyt ja suojatut maljat pestiin, lisät-
 tiin primaarivasta-ainetta (hybridoomasolusupernatanteja)
 ja inkuboitiin. Maljat pestiin uudelleen, lisättiin bio-
 tiinilla leimattua huCD40.Fc:tä ja inkuboitiin. Maljat
 pestiin jälleen, lisättiin streptavidini-HRP:tä (pipar-
 juuriperoksidaasikonjugaatti) ja inkuboitiin. Viimeisenä
 10 vaiheena maljat pestiin ja lisättiin TMB (3,3',5,5'-tetra-
 metyylibentsidiini) -peroksidaasisubstraattia. Annettiin
 värin kehittyä ja otettiin lukemat käyttämällä ELISA-mal-
 janlukulaitetta.

Testi negatiivisen Fc-reaktiivisuuden toteamiseksi
 15 tehtiin seuraavasti. Päällystetyt ja suojatut maljat pes-
 tiin, lisättiin primaarivasta-ainetta (hybridoomasolusu-
 pernatanteja) ja inkuboitiin. Maljat pestiin uudelleen,
 lisättiin huIgG1 HRP:tä (piparjuuriperoksidaasikonjugaat-
 ti) ja inkuboitiin. Viimeisenä vaiheena maljat pestiin ja
 20 lisättiin TMB-peroksidaasisubstraattia. Annettiin värin
 kehittyä ja otettiin lukemat käyttämällä ELISA-maljanluku-
 laitetta.

Hybridoomasupernatanteista testattiin toissijaises-
 ti myös niiden kyky estää biotiinilla leimatun huCD40.Fc:n
 25 sitoutuminen soluihin, joiden pinnalla on huCD40-ligandia,
 käyttämällä FACS-analyysiä sekä ensisijaisena (positiivi-
 sena) kokeena vaikutus biotiinilla leimattuun Flag
 huCD40:een samalla määrittymällä.

Käyttämällä edellä kuvattuja menetelmiä eristettiin
 30 kaksi muista erottuvaa hybridoomakloonista, jotka sitovat
 CD40:tä ja estävät CD40:n sitoutumisen CD40L:ään. Näistä
 kahdesta kloonista käytetään merkintöjä huCD40m2 (M2) ja
 huCD40m3 (M3). Edellä kuvatulla menettelyllä muodostettu
 hybridoomakloonin muCD40m2 on talletettu kokoelmaan the
 35 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive,

Rockville, MD 20852, USA, (saantinumero HB 1459) 6 loka-
kuuta 1993 Budapestin sopimuksen ehtojen mukaisesti.

Hybridoomaklooneista voidaan tutkia ELISA:lla reaktiivisuus CD40:n kanssa esimerkiksi soveltamalla Engvallin et al. julkaisussa *Immunochemistry* 8 (1971) 871 ja US-patenttijulkaisussa 4 703 004 esitettyjä menetelmiä. Positiivisia klooneja injektoidaan sitten syngeneeisten BALB/c-hiirten vatsainteloihin monoklonaalista anti-CD40-vasta-ainetta suurina pitoisuuksina (> 1 mg/ml) sisältävän vesivatsanesteen tuottamiseksi. Tuloksena oleva monoklonaalinen vasta-aine voidaan puhdistaa ammoniumsulfaattisaostuksella ja sitä seuraavalla geelielektroforeesikromatografialla ja/tai affiniteettikromatografialla, joka perustuu vasta-aineen sitoutumiseen *Staphylococcus aureus*in proteiini A:han.

Esimerkki 2

CD40:n estäminen sitoutumasta CD40L:ään

CD40 mAb M2:n ja M3:n osoitettiin estävän huCD40.Fc:n sitoutuminen huCD40L:ään seuraavasti. Ihmisen ääreisveren puhdistettuja T-soluja stimuloitiin 18 tuntia PMA:lla ja ionomysiinillä ihmisen CD40L:n ilmentymisen indusoimiseksi. T-solut sidottiin sitten käyttämällä negatiivisena vertailuproteiininä toimivaa IL-4R.Fc:tä (5 µg/ml) tai huCD40.Fc:tä (5 µg/ml) ja sitoutumisen inhibointi tehtiin irrelevantilla ms IgG:llä (20 µg/ml), CD40 mAb M2:lla (20 µg/ml) tai CD40 mAb·M3:lla (20 µg/ml). Sitoutunut CD40.Fc detektoitiin virtausytometrisellä analyysillä käyttämällä anti-ihmis-Fc-Ab-biotiinia ja streptavidini-fykoerytriiniä. Kuten kuviossa 1 osoitetaan, sekä CD40 M2 että M3 estivät näinä pitoisuuksina CD40.Fc:n sitoutumisen yli 90-%:isesti verrattuna irrelevanttiin ms IgG:hen.

CD40mAb M2:n ja M3:n osoitettiin estävän huCD40.Fc:n sitoutuminen muCD40:een seuraavasti. EL40.0-soluja, jotka ilmentävät konstitutiivisesti muCD40L:ää, sidottiin käyttämällä vertailuproteiinia tai optimaalista pienempänä

pitoisuutena huCD40.Fc-biotiinia (2,5 µg/ml) ja tehtiin sitoutumisen inhibointi irrelevantilla ms IgG:llä (50 µg/ml), ms IgG1 mAb G28.5 -vertailuaineella (50 µg/ml) (toimittaja tri Edward A. Clark, University of Washington), CD40 mAb M2:llä (12,5 µg/ml) tai CD40 mAb M3:llä (12,5 µg/ml). Sitoutunut biotiinileimattu CD40.Fc detektoitiin virtaussytometrisellä analyysillä käyttämällä streptavidini-fykoerytriiniä. Kuten kuviossa 2 osoitetaan, sekä CD40 mAb M2 että M3 estivät näinä pitoisuuksina CD40.Fc:n sitoutumisen yli 95-%:isesti verrattuna irrelevanttiin ms IgG:hen tai ms IgG1 mAb G28.5:een.

Esimerkki 3

CD40:n biologisen aktiivisuuden inhibointi käyttämällä CD40 mAb:tä

Tämä esimerkki osoittaa, että CD40mAb estää CD40:n biologisen aktiivisuuden inhiboimalla CD40L-välitteistä TNF- α -tuotantoa. Perustettiin monosyyttiviljelmiä puhdistamalla ensin monosyyttejä normaalin luovuttajan PBMC:stä vastavirtaelutriaatiolla Aldersonin et al. kuvaamalla tavalla [J. Exp. Med. 173 (1991) 923]; niiden puhtausaste oli vähintään 95 % Giemsa-värjättyjen sytosentrifugipreparaattien mikroskooppitutkimuksen mukaan. Soluja viljeltiin RPMI1640-alustassa, joka sisälsi 10 % vähän endotoksiinia sisältävää FBS:a, 50 ky/ml pensilliiniä, 50 mg/µl streptomysiiniä ja $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l 2-merkaptotoetanolia.

Valmistettiin seuraavat reagenssit. CD40L:ää ilmentävät CV-1/EBNA-solut kiinnitettiin paraformaldehydillä 2 päivän kuluttua transfektioinnista Armitagen et al. [Nature (Lond.) 357 (1992) 80] ja Spriggsin et al. [J. Exp. Med. 176 (1992) 1543] kuvaamalla tavalla. Yhdistelmä-IL-3, -IL-4 ja -GM-CSF puhdistettiin Aldersonin et al. kuvaamalla tavalla [J. Immunol. 149 (1992) 1252] ja niiden ominaisaktiivisuudet olivat $9 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^4$ ja $5 \cdot 10^4$ ky/µg. Käytetty CD40-molekyyli oli liukoinen CD40-fuusioproteiini, joka koostui CD40:n ekstrasellulaarisesta alueesta kytkettynä

ihmisen IgG1:n Fc-alueeseen ja konstruoitiin ja puhdistettiin edellä esimerkissä 1 kuvatulla tavalla.

Perustettiin monosyyttiviljelmiä 24-syvennyksisiin maljoihin (Costar, Cambridge, MA), yhdessä kasvavien määrien kanssa CV-1/EBNA-soluja, jota ilmentävät tilapäisesti CD40L:ää, joko yksinään tai GM-CSF:n, IL-3:n tai IFN- γ :n (10 ng/ml) läsnä ollessa. TNF- α -pitoisuudet detektoitiin 24 tunnin kuluttua ELISA:lla. Kuvio 3 osoittaa annoksesta riippuvan riippuvuuden CD40-induktion ja TNF- α -tuotannon välillä. Jopa niin pieni määrä kuin 10^3 CD40:tä ilmentävää CV-1/EBNA-solua riitti indusoimaan TNF- α -tuotannon GM-CSF:n, IL-3:n tai IFN- γ :n läsnä ollessa, mutta suuretkaan määrät näitä soluja yksinään eivät pystyneet indusoimaan merkittävää TNF- α -tuotantoa.

CD40.Fc:n tai CD40 mAb M2:n osoitettiin molempien kykenevän inhiboimaan CD40L:n indusoimaa TNF- α -tuotantoa. Monosyyttejä stimuloitiin CD40L:llä GM-CSF:n läsnä ollessa. CD40.Fc:tä ja CD40 mAb M2:ta käytettiin loppupitoisuutena 10 μ g/ml. TNF- α :aa ei ollut detektoitavissa (< 5 pg/ml) vertailuviljelmissä, joissa oli alustaa yksinään, GM-CSF:ää yksinään, CD40:tä yksinään, CD40.Fc:tä yksinään tai CD40-vasta-ainetta yksinään. Kuvio 4 osoittaa, että joko CD40.Fc:n tai CD40 mAb M2:n poissa ollessa CD40L stimuloi TNF- α -tuotantoa GM-CSF:n läsnä ollessa. Sekä CD40.Fc että CD40:tä salpaava mAb M2 inhiboivat sen sijaan CD40L:n indusoimaa TNF- α -tuotantoa GM-CSF:n läsnä ollessa. Isotyyppivertailunäyte-mAb ja ihmisen IgG1 eivät pystyneet estämään TNF- α -tuotantoa tässä määrityksessä (tuloksia ei esitetä). Nämä tulokset osoittavat, että CD40 mAb M2 sitoutuu spesifisesti ihmis-CD40-molekyyliin ja pystyy estämään CD40-molekyylin sitoutumisen CD40-ligandiin. Nämä tulokset viittaavat lisäksi siihen, että CD40 mAb M2 voi olla käyttökelpoinen TNF- α -välitteisen tulehduksen estämisessä käytettynä yhdessä muiden sytokiinien kanssa.

Esimerkki 4**Vasta-aineiden tuotanto ja puhdistus**

- BALB/c-hiiret esikäsiteltiin ensin 0,5 ml:lla pristana (2,4,6,10-tetrametyylipentadekaani, Aldrich, Milwaukee, Wis.). Kahden viikon kuluttua hiireen injektoitiin intraperitoneaalisesti $1 \cdot 10^6$ hiiren hynridoomaa PBS:ssä. Vesivatsanestettä poistettiin hiirestä noin 2 - 5 viikon kuluttua ja sentrifugoitiin se solujen ja hiukkasmaisen materiaalin poistamiseksi.
- Laitettiin 5 ml vesivatsanestettä 3 ml:n proteiini A -sefaroosikolonneihin (Pharmacia, Piscataway, N. J.) laimennettuna suhteessa 1:4 ammoniumsulfaattiliuoksella (0,1 mol/l), pH 9. Kolonnei huuhdottiin 10 - 20-kertaisella tilavuudella ammoniumsulfaattiliuosta, pH 9. Puhdistettu vasta-aine eluoitiin sitten sitraattiliuoksella (0,05 mol/l, pH 3,0) ja neutraloitiin NaOH-liuoksella (1 mol/l).

Esimerkki 5

- Monoklonaalisten vasta-aineiden vaikutus CD40-ligandin indusoimaan B-solujen proliferaatioon**
- Eristettiin ihmisen ääreisveren yksitumaisia soluja (PBMC) normaaliin vapaaehtoisten luovuttajien ääreisverestä tekemällä tiheysgradienttisentrifugointi Histopaquen® (Sigma, St. Louis, MO) läpi. Soluvalmisteita, joista oli poistettu T-solut (E^-) saatiin poistamalla T-solut 2-aminoetyyli-isotiouroniumbromidilla käsitellyillä SRBC:illä (lampaan punasoluilla) ja tekemällä lisäksi tiheysgradienttisentrifugointi Histopaque®:n läpi. B-solujen proliferaatiomääritykset tehtiin käyttämällä E^- -valmisteita RPMI-alustassa, johon oli lisätty 10 % lämmöllä inaktivoitua naudan sikiöseerumia (FBS), lämpötilassa 37 °C 10 % CO_2 :a sisältävässä atmosfäärissä. Kasvatettiin $1 \cdot 10^5$ E^- -solua syvennystä kohden kolmena rinnakkaisviljelmänä tasapohjaisissa 96-syvennyksisissä mikromaljoissa (Corning) kolme päivää joko pelkän liukoisen trimeerisen CD40-ligandin

(suhteessa 1:40 laimennetun supernatanttinesteen sisältämiä soluja, jotka oli transfektoitu liukoista trimeeristä CD40-L:ää koodittavalla ilmentymisvektorilla olennaisilta osiltaan hakemuksessa PCT/US92/08990 kuvatulla tavalla),

5 liukoisen trimeerisen CD40-ligandin ja immobilisoidun anti-IgM:n (5 µg/ml; BioRad, Richmond, VA) tai liukoisen trimeerisen CD40-ligandin ja interleukiini-4:n (5 ng/ml) läsnä ollessa. Lisäksi tehtiin määritykset käyttämällä monoklonaalista vasta-ainetta M2 (kuvattu tässä), G28-5:tä

10 (Ledbetter et al., US-patenttijulkaisu 5 247 069), EA5:ä ja BE1:tä (molempia kuvaavat Dörken et al., Leukocyte Typing IV, 1989), toista anti-CD40-vasta-ainetta, S2C6:ta tai vertailuhiiri-IgG:tä havaintojen tekemiseksi erilais-

15 ten vasta-aineiden vaikutuksesta B-solujen proliferaatioon. Soluja käsiteltiin tritoidulla tymidiinillä (1 µCi/syvennys; 25 Ci/nmol, Amersham, Arlington Heights, IL) viimeisten 8 viljelytunnin aikana. Solut otettiin tal-

teen lasikuitukiekoille automaattisella solukeräimellä ja sisällytetyksi tullut radioaktiivisuus (min^{-1}) mitattiin

20 nestesointillaatiospektrometrillä. Tulokset esitetään kuvioissa 5 - 7. Monoklonaalinen vasta-aine M2 esti CD40-ligandin indusoiman B-solujen proliferaation, kun taas vasta-aineella G28-5 ja toisella monoklonaalisella anti-CD40-vasta-aineella, S2C6:lla, ei ollut vaikutusta proli-

25 feraatioon. Vasta-aineet EA5 ja BE1 itse asiassa tehostivat proliferaatiota. Vastaavat kokeet osoittivat, että monoklonaalinen vasta-aine M3 toimi samalla tavalla kuin monoklonaalinen vasta-aine M2.

Edellä esitetyn peusteella ymmärrettäneen, että

30 vaikka tässä on kuvattu keksinnön erityissuoritusmuotoja asian valaisemiseksi, voidaan tehdä erilaisia muunnoksia poikkeamatta keksinnön hengestä ja suoja-alasta. Niinpä vain oheiset patenttivaatimukset rajoittavat keksintöä.

Patenttivaatimukset

1. Monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u
siitä, että se sitoutuu spesifisesti ihmisen CD40-molekyy-
5 liin ja inhiboi CD40-molekyylin sitoutumista CD40-ligan-
diin määritettynä havaitsemalla vähintään noin 90-%:inen
inhibitio liukoisen CD40:n sitoutumisessa CD40-ligandia
ilmentäviin soluihin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen monoklonaalinen
10 vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että se valitaan hii-
ren ja ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden joukosta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hiiren monoklo-
naalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että se va-
litaan HuCD40-M2:n (ATCC HB 11459) ja sellaisten monoklo-
15 naalisten vasta-aineiden joukosta, joilla on HuCD40M2:n
CD40-ligandia inhiboivat ominaisuudet määritettynä havait-
semalla vähintään noin 90-%:inen inhibitio liukoisen
CD40:n sitoutumisessa CD40-ligandia ilmentäviin soluihin.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen hiiren monoklo-
20 naalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että vasta-
ainetta tuottaa hiiden hybridooma HuCD40-M2 (ATCC HB
11459).

5. Sitoutuva proteiini, t u n n e t t u siitä,
että se sitoutuu spesifisesti CD40:een ja käsittää
25 CD40:een sitoutuvan alueen, jota koodittaa minkä tahansa
patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaista vasta-ainetta tai sen
CD40:een spesifisesti sitoutuvaa osaa koodittava DNA-sek-
venssi.

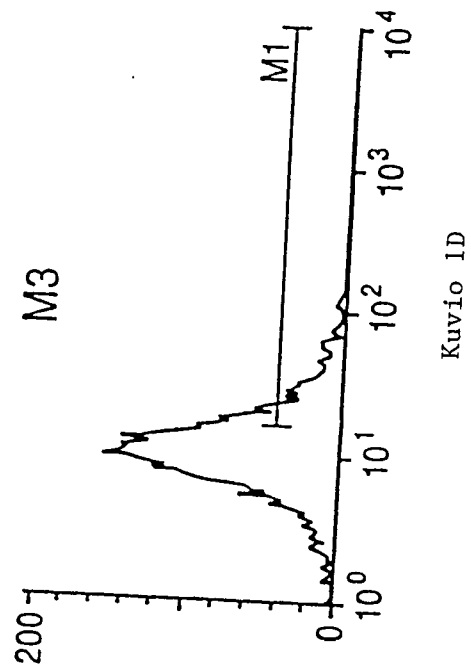
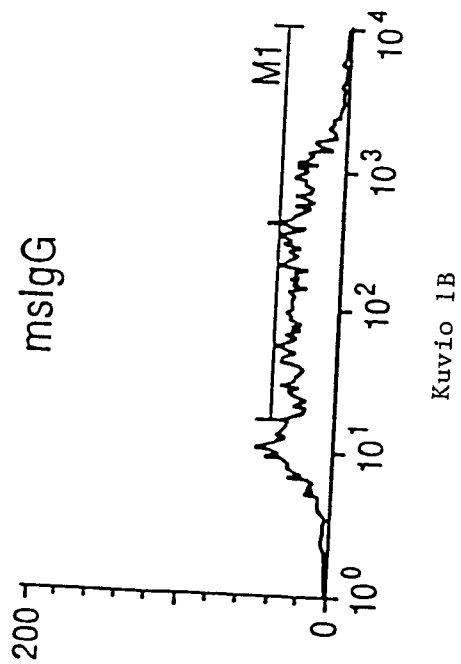
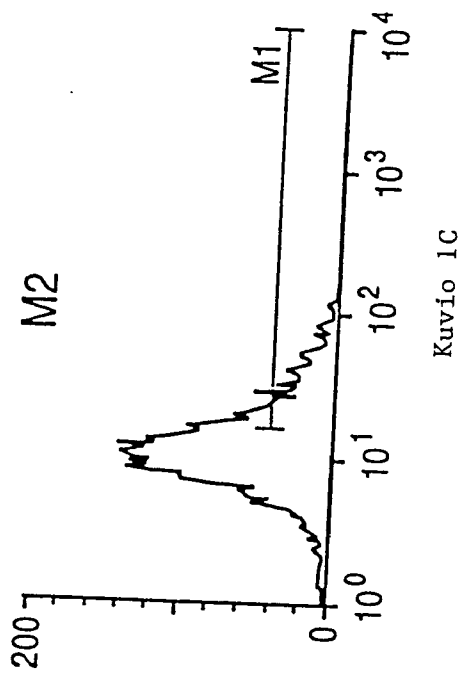
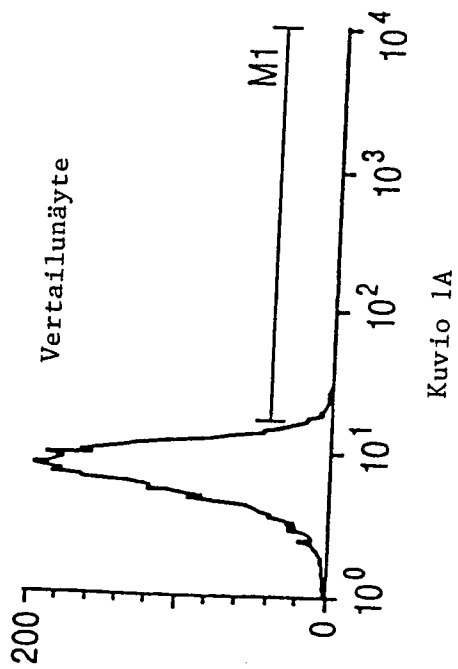
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen sitoutuva prote-
30 iini, t u n n e t t u siitä, että se valitaan humanisoi-
dun monoklonaalisen vasta-aineen, yksiketjuisen Fv-frag-
mentin ja bivalenttisen Fv-fragmentin joukosta.

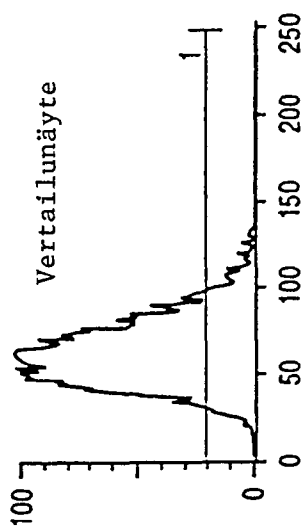
7. Terapeuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä,
että se käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4
35 mukaista CD40:n vastaista monoklonaalista vasta-ainetta ja

fysiologisesti hyväksyttävää kantaja- tai laimennusainetta.

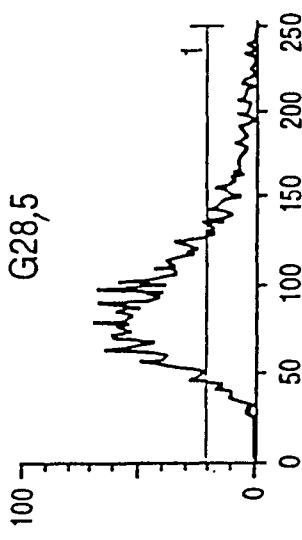
5 8. Terapeuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää kumman tahansa patenttivaatimuksista 5 ja 6 mukaista CD40:n vastaista monoklonaalista vasta-ainetta ja fysiologisesti hyväksyttävää kantaja- tai laimennusainetta.

10 9. Menetelmä CD40-ligandivälitteisen immuuni- tai tulehdusvasteen inhiboimiseksi, t u n n e t t u siitä, että annetaan vaikuttava määrä kumman tahansa patenttivaatimuksista 7 ja 8 mukaista terapeuttista koostumusta.

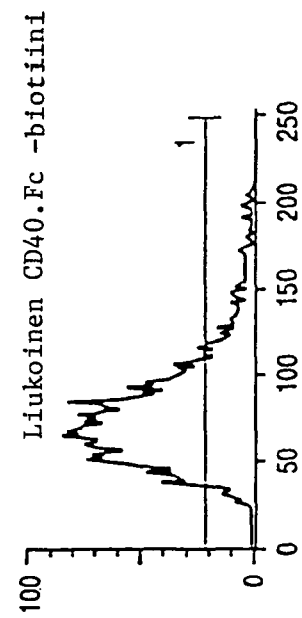




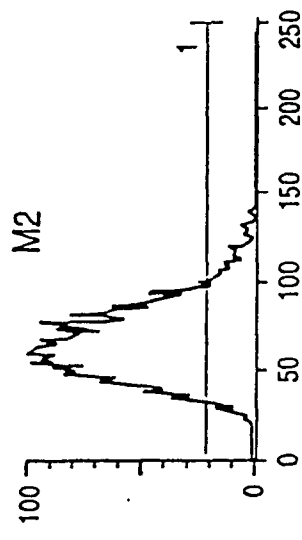
Kuvio 2A



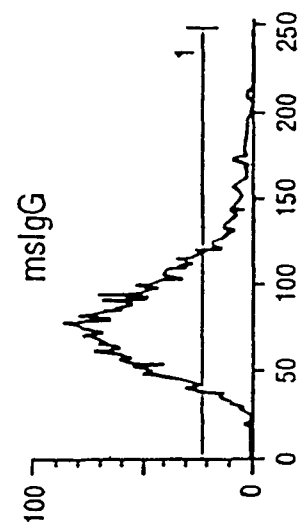
Kuvio 2D



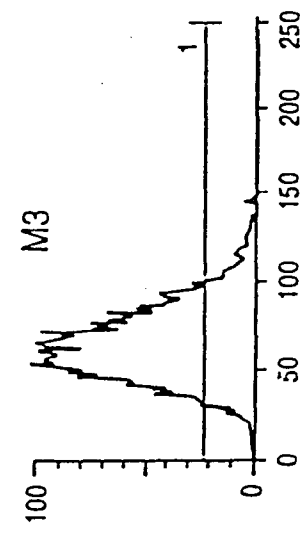
Kuvio 2B



Kuvio 2E

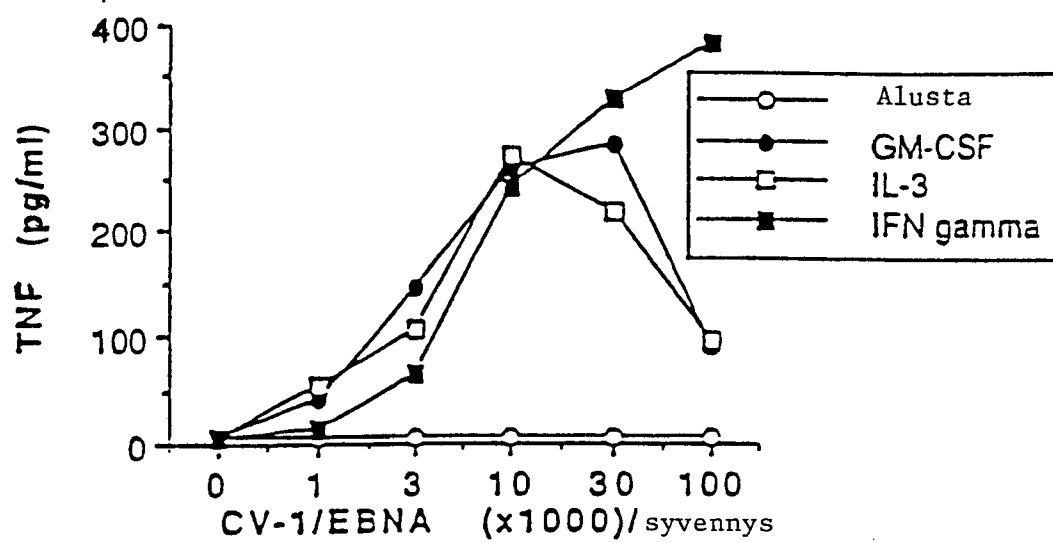


Kuvio 2C

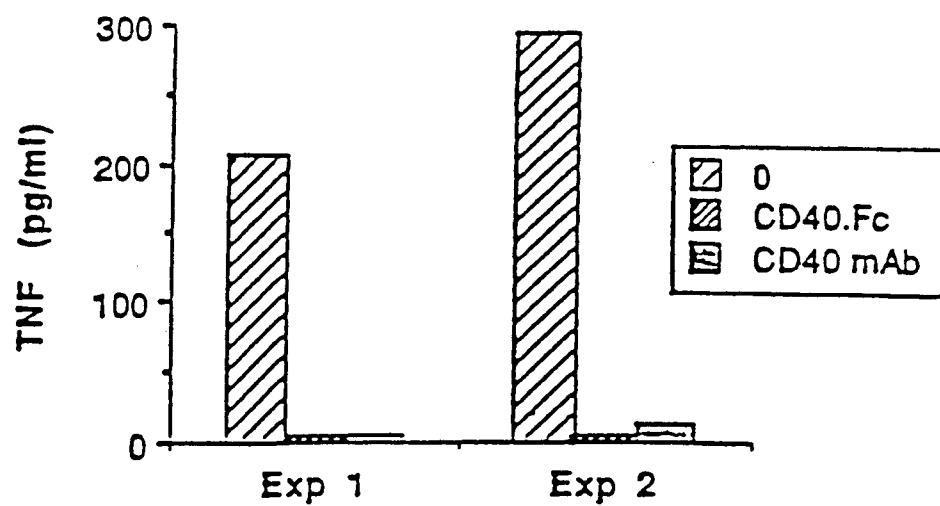


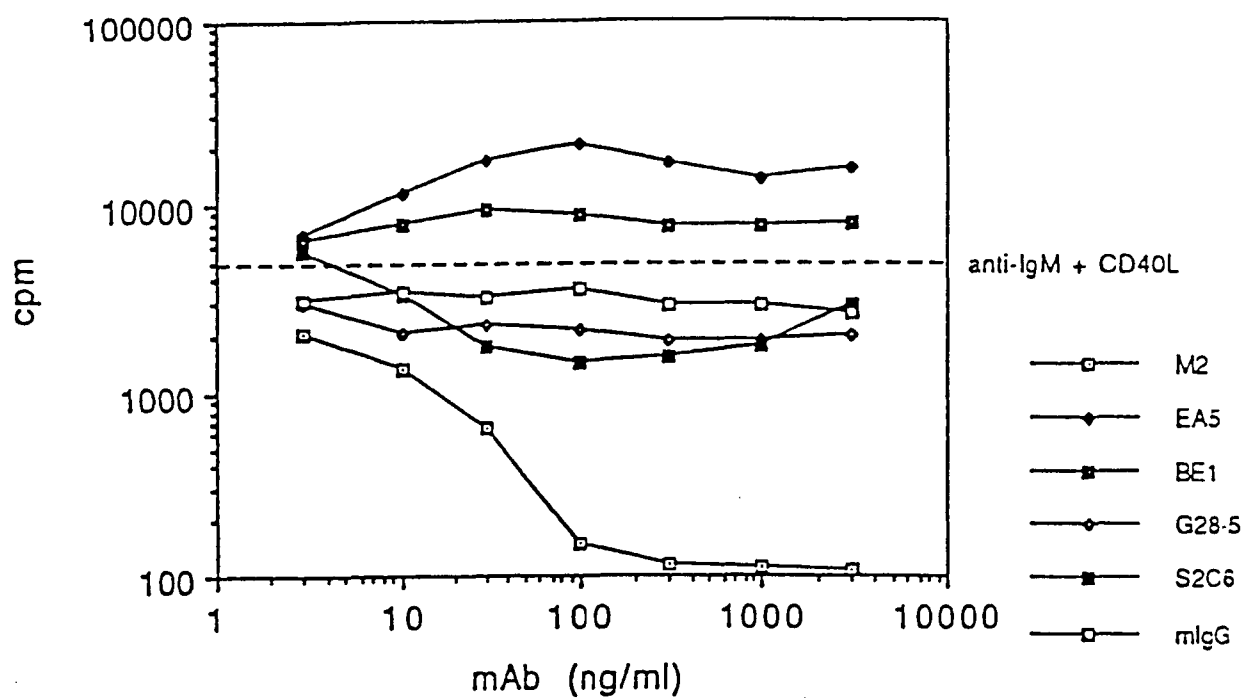
Kuvio 2F

Kuvio 3

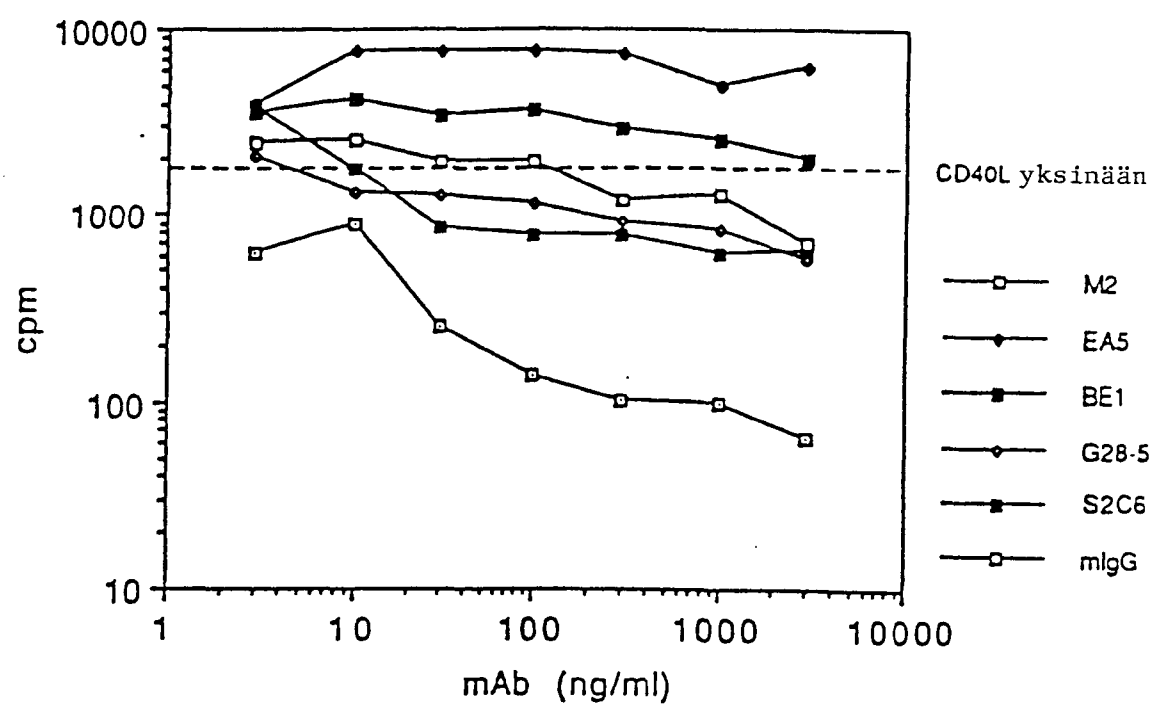


Kuvio 4

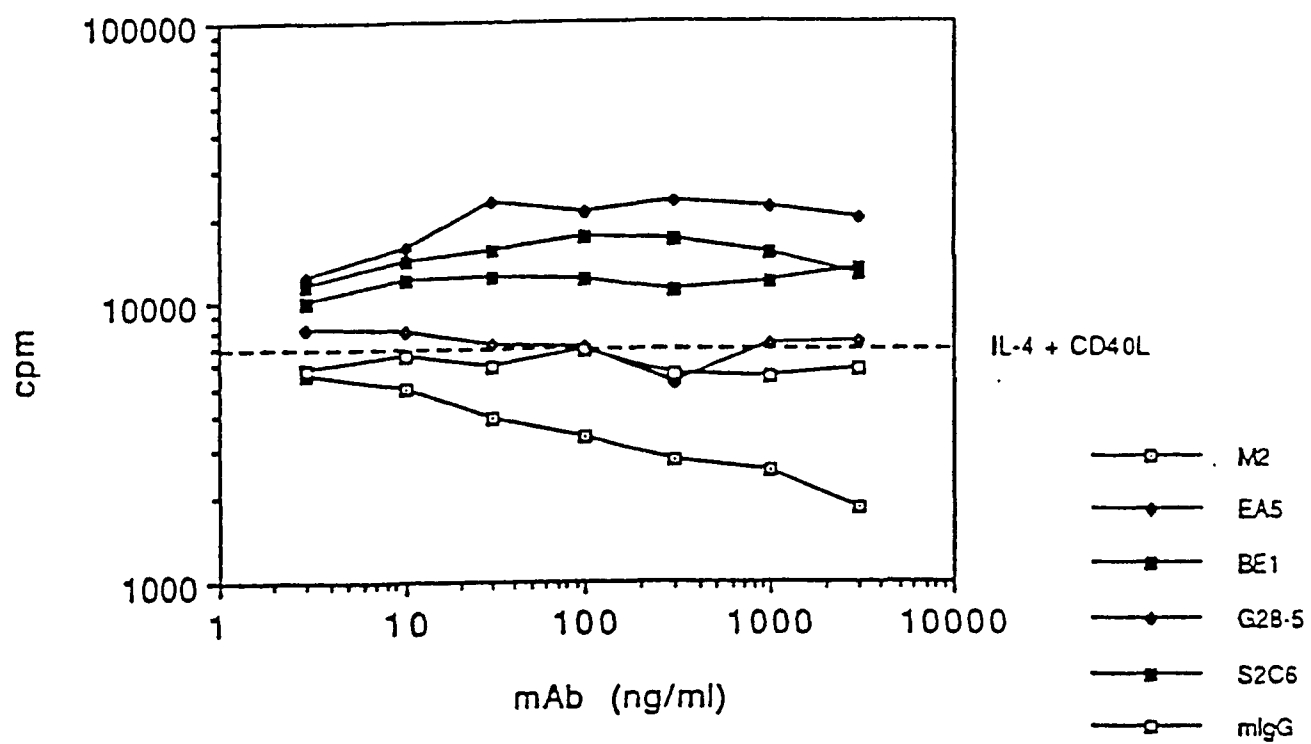




Kuvio 5



Kuvio 6



Kuvio 7