



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 313883

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 K 14/705

Patentstyret

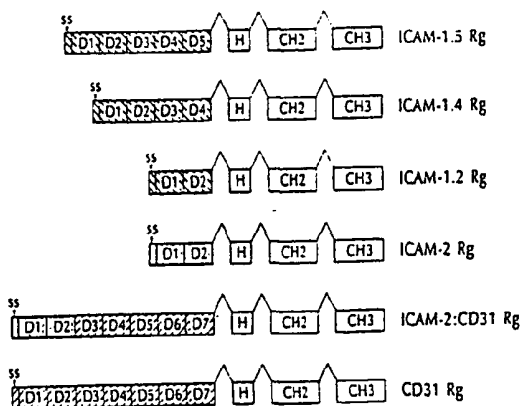
(21) Søknadsnr	19942320	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	1994.06.17	søknadsnummer	1992.12.15, PCT/US92/10964
(24) Løpedag	1992.12.15	(85) Videreføringsdag	1994.06.17
(41) Alm. tilgj.	1994.06.17	(30) Prioritet	1991.12.20, US. 811129
(45) Meddelt dato	2002.12.16		

(71) Patenthaver	Bristol-Myers Squibb Co, 345 Park Avenue, New York, NY 10154, US
(72) Oppfinner	Alejandro Aruffo, Edmonds, WA, US
	Nitin K. Damle, Renton, WA, US
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Løselig fusjonsmolekyl og rekombinant fusjonsmolekyl som har bindingsspesifisitet for CD11a/CD18**

(56) Anførte publikasjoner EP 365837, EP 387668
C.G. Gahmberg et al., Eur. J. biochem. vol. 195, 1991, s. 177-182

(57) Sammendrag Løselige fusjonsmolekyler som inneholdt et CD11a/CD18 spesifikt bindingsområde operativt bundet til et immuno-globulin-konstantområde, ble fremstilt. Disse molekyler omfattet spesielt ekstracellulære deler av adhesjonsmolekyler slik som ICAM-1 og ICAM-2 bundet til IgG-konstantområder. Fusjonsmolekylene beskrevet her benyttes som samtidig stimulerende forbindelser for aktivering av T-celler og i fremgangsmåter for å øke CD4⁺ T-celle-proliferativ reaksjon og IL-2-stimulering.



Foreliggende oppfinnelse vedrører løselige fusjonsmolekyler som har et område med spesifikk bindingsaktivitet overfor CD11a/CD18 og et område som tilsvarer et immunoglobulin-konstantområde, slik som et rekombinant molekul inneholdende et ekstracellulært CD11a/CD18 bindingsområde bestående av
5 ICAM-2 og et konstantområde for et IgG. Molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse kan benyttes i fremgangsmåter for å påvirke T-celle-reaksjoner og aktivitet.

CD3/TCR (T-celle-antigenreseptor)-komplekset på overflaten av T-celler gjenkjenner ikke bare ikke-selv-antigen (Ag) i samband med våre hovedvevs-
10 forlikelighets (MHC)-molekyler som uttrykkes på overflaten av antigenpresenterende celler (APC), men også deltar i signaloverføring for å starte aktiveringen av T-celler (H. Clevers et al., (1988) Ann. Rev. Immuno. 6:629). Reaksjonen mellom CD3/TCR og Ag/MHC på APC er vanligvis ikke tilstrekkelig og krever deltagelse av andre celle-overflatemolekyler som formidler binding og/eller signaloverføring
15 for å uttrykke optimalt ulike funksjoner i aktiverte T-celler, selv om denne reaksjon er uvesentlig for å starte T-celle-aktiveringen (H. Clevers et al., (1988) Ann. Rev. Immuno. 6:629; T.A. Springer (1990) Nature 346:425; G. Moller (1990) Immunol. Rev. 114:1-217).

Leukocyt-adhesjonsmolekylet LFA-1 (CD11a/CD18) som er uttrykt på
20 overflaten til alle modne leukocytter, formidler en lang rekke reaksjoner med andre somatiske celler under immun-svaret og betennelse ved å reagere med sin ligand, det intercellulære adhesjonsmolekyl-1 (ICAM-1/CD54) (T.A. Springer (1990) Nature 346:425; G. Moller (1990) Immunol. Rev. 114:217; T.K. Kishimoto et al., (1989) Adv. Immunol. 46:149; S.D. Marlin et al., (1987) Cell 51:813; M.W.
25 Makgoba et al., (1988) Nature 331:86; D.E. Staunton et al., (1988) Cell 52:925; D. Simmons et al., (1988) Nature 331:624; D.E. Staunton et al., (1990) Cell 61:243; A.W. Boyd et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3095; G. Dougherty et al., (1988) Eur. J. Immunol. 18:35; D.M. Altman et al., (1989) Nature 338:512). ICAM-1 uttrykkes konstant (konstitutivt) på noen vev og stimulerer på andre under
30 betennelse (M. L. Dustin et al., (1986) J. Immunol. 137:245). ICAM-1 gir et viktig ko-stimulerende signal via sin adhesive reaksjon med LFA-1 under CD3/TCR-formidlet aktivering av hvilende T-celler (G.A. Van Seventer et al., (1990) J. Immunol. 144:4579). Nylig har en annen ligand for LFA-1, ICAM-2 blitt identifisert

og denne kan formidle ICAM-1-uavhengig adhesjon av LFA-1⁺-celler (D.E. Staunton et al., (1989) Nature 339:61; M.L. Dustin et al., (1989) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54:753). Produksjon av ICAM-2 er begrenset og reguleres ikke lett opp i nærvær av betennelses-stimulerende signaler (A.R. De Fougères et al., (1991) J. Exp. Med. 174:253; P. Nortamo et al., (1991) J. Immunol. 146:2530).

I foreliggende oppfinnelse har løselige rekombinante ICAM-1 og ICAM-2 immunoglobulin-fusjonsproteiner blitt utviklet for å analysere og sammenligne funksjonene til disse molekyler i cellulære reaksjoner som ligger bak ulike immun-
10 svar. Denne oppfinnelse viser at ICAM-2 kan på samme måte som dets homologe molekyl ICAM-1, gi et viktig samtidig stimulerende signal under TCR-formidlet aktivering av CD4⁺-celler. Det samtidig stimulerende signal under TCR-formidlet aktivering av CD4⁺ T-celler. Det samtidig stimulerende signal skjer under TCR-formidlet aktivering av CD4⁺ T-celler. Den samtidig stimulerende adhesjon
15 formidlet av LFA-1:ICAM-2-reaksjon kan representere en kritisk signalvei for utløsning av T-celle-aktivering med ICAM-1⁻ eller ICAM-1^{low}ICAM-2⁺ APC.

Foreliggende oppfinnelse vedrører løselige fusjonsmolekyler omfattende et første område som har bindingsspesifisitet for CD11a/CD18, funksjonelt (operativt) bundet til et annet område som i det vesentlige tilsvarer et immunoglobulin-
20 konstantområde, hvori det første område i det vesentlige tilsvarer en ekstracellulær del av ICAM-2. Disse fusjonsmolekyler inneholder et område som besitter en spesifikk binding for CD11a/CD18. Området er operativt bundet til, eller koblet til, et annet område som i det vesentlige tilsvarer et immunoglobulin-konstantområde. Flere adhesjonsmolekyler er kjente som har bindingsspesifisitet
25 for CD11a/-CD18. De fleste av disse molekyler er cellemembran-forbundet og således uløselige, og omfatter ICAM-1 og ICAM-2.

I denne oppfinnelse blir den løselige, ekstracellulære del av et slikt adhesjonsmolekyl som besitter bindingsspesifisitet for CD11a/CD18, benyttet. Dette ekstracellulære område er koblet til et Ig-konstantområde slik som IgG eller
30 IgM-konstantområde. Et aspekt ved foreliggende oppfinnelse er et rekombinant fusjonsmolekyl omfattende et første område som har bindingsaffinitet for CD11a/CD18, funksjonelt (operativt) bundet til et annet område som i det

vesentlige tilsvarer et immunoglobulin-konstantområde, hvori det første område i det vesentlige tilsvarer en ekstracellulær del av ICAM-2. Molekylene ifølge denne oppfinnelse kan fremstilles ved hjelp av enten kjemisk syntese eller rekombinant fremstilling.

5 Når et rekombinant fusjonsmolekyl benyttes, kan det fremstilles ved standard fremgangsmåter for genkloning. F.eks., kan et spesifikt rekombinant fusjonsmolekyl med ICAM-2 og IgG-konstantområde fremstilles ved først å subklone et cDNA som koder for den ekstracellulære del av ICAM-2 inn i en IgG-ekspresjonsvektor. Det klonede DNA kan så transskriberes og fusjonsmolekylet
10 uttrykkes. Det uttrykte protein blir så isolert og resulterer i et rekombinant fusjonsmolekyl som inneholder en ekstracellulær del av ICAM-2 som er operativt bundet til et IgG-konstantområde.

Fusjonsmolekylene ifølge foreliggende oppfinnelse kan benyttes som samtidig stimulerende forbindelse for aktivering av T-celler og i fremgangsmåter
15 for å øke den proliferative reaksjon til $CD4^{+}$ T-celler og stimuleringen av T-celler med IL-2. T-cellene kan aktiveres ved hjelp av en fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse ved å la celler reagere med en ligand som er i stand til å binde CD3 på T-celler og en effektiv samtidig stimulerende mengde med et fusjonsmolekyl ifølge oppfinnelsen. T-celle-proliferasjon og IL-2-stimulering blir
20 startet i foreliggende oppfinnelse ved å la følsomme T-celler reagere med et fusjonsmolekyl ifølge oppfinnelsen i en periode som er tilstrekkelig til henholdsvis å stimulere cellevekst og IL-2-produksjon.

Beskrivelse av figurene

25 Fig. 1 illustrerer løselige ICAM Rg fusjonsgener. Antistoff-eksoner (humant IgG1) er vist ved sorte områder og introner ved hjelp av sammenbindende streker. H, CH2 og CH3 betyr henholdsvis IgG1-hengselet, CH2 og CH3 konstantområde-eksoner. ICAM-1 N-terminale signalsekvens (SS) og Ig-lignende områder (D1-D5) er vist som stripete felt. ICAM-2 N-terminale SS og Ig-lignende områder (D1 og
30 D2) er vist i stripete felt. CD31 N-terminale SS og Ig-lignende (D1-D7)-områder er vist som hvite felt.

Fig. 2 illustrerer evnen til CD7, ICAM-1 eller ICAM-2 Rg'er som alle er immobilisert ved hjelp av anti-TCR-1 til å stimulere delingen av $CD4^{+}$ T-celler.

50.000 hvilende $CD4^+$ T-celler ble dyrket ved hjelp av immobilisert CD7 Rg, ICAM-1.5 Rg eller ICAM-2 Rg (100 ng/brønn) og enten anti-CD19 eller anti-TCR-1 mAb (50 ng/brønn) i et endelig volum på 0,2 ml komplett medium pr. mikrotiter. 3H-TdR-innbygging i disse kulturer ble målt på dag 4.

5 Fig. 3 illustrerer kinetikken til den samtidig stimulerende virkning av ICAM-1 og ICAM-2 Rg. 50.000 hvilende

$CD4^+$ T-celler ble dyrket med anti-TCR-1 mAb (50 ng/brønn) ko-immobilisert med 100 ng/brønn med ELAM-1 Rg (som kontroll), ICAM-1 Rg eller ICAM-2 Rg. Celledelingsreaksjoner i disse kulturer ble målt på det angitte tidspunkt.

10 Fig. 4 illustrerer konsentrasjonsavhengigheten til de samtidig stimulerende virkninger av ICAM-1 og ICAM-2 Rg'er. ICAM-1.2, ICAM-1.4 eller ICAM-2 Rg'er ved ulike konsentrasjoner ko-immobilisert med anti-TCR-1 mAb (50 ng/brønn) før tilsetning av 50.000 hvilende $CD4^+$ T-celler/brønn. Celledelingsvirkningene i disse kulturer ble målt på dag 4.

15 Fig. 5 illustrerer sammenligningen mellom samtidig stimulerende virkninger av ulike ICAM Rg'er. Anti-TCR-1 mAb (50 ng/brønn) ble ko-immobilisert med 100 ng/brønn av CD7 Rg, CD31, ELAM-1, ICAM-1.2, ICAM-1.4, ICAM-2 eller ICAM-2:CD31 Rg'er før tilsetningen av 50.000 hvilende $CD4^+$ T-celler/brønn. Celledelingssvarene i disse kulturer ble målt på dag. 4.

20 Fig. 6 illustrerer at ICAM-2 Rg kan også samtidig stimulere delingen av Ag-aktiverede $CD4^+$ T-celler. Anti-TCR-1 mAb i 50 ng/brønn ble ko-immobilisert med eller uten 100 ng/brønn med enten ICAM-1.4 Rg eller ICAM-2 Rg i mikrotiterkulturbrønner. 50.000 hvilende $CD4^+$ T-celler, som enten stammer fra kulturer stimulert med 25 forskjellige stafylokokk-eksotoksiner ble tilsatt i disse kulturbrønner og deres celledelingsvirkninger målt på dag 3.

Fig. 7 illustrerer stimuleringen av $CD25/IL-2R\alpha$ på overflaten til $CD4^+$ T-celler ved samtidig stimulering med ICAM Rg'er. Hvilende $CD25^- CD4^+$ T-celler ble dyrket med anti-TCR-1 (50 ng/brønn) ko-immobilisert med ELAM-1 (benyttet 30 som kontroll), ICAM-1.2, ICAM-1.4 eller ICAM-2 Rg'er

(100 ng/brønn). Etter 60 timer ble T-celler høstet fra disse kulturer og undersøkt med hensyn til deres CD25-ekspresjon ved hjelp av direkte immunofluorescens-analyse.

Fig. 8 illustrerer at den samtidig stimulerende virkningen til ICAM-2 omfatter

5 deltagelse av CD11a/CD18 (LFA-1)-kompleks på T-celler. 50.000 CD4⁺ T-celler ble dyrket med anti-TCR-1 ko-immobilisert med ICAM-1.4 eller ICAM-2 Rg i nærvær av løselig mAb (10 µg/ml) som reagerer med CD11 a, CD11a, CD18, CD19 eller ICAM-1. Celledelingsreaksjoner i disse kulturer ble målt på dag 4.

Aktivering av T-celler krever ofte både signaler via TCR-kobling og de som
10 er et resultat av samtidig stimulerende reaksjoner mellom visse T-celle-overflatemolekyler og deres ligander på APC. LFA-1 på T-celler modulerer aktiveringen av T-celler ved å reagere med sine ligander ICAM-1 og/eller ICAM-2 på overflaten til APC. Den samtidig stimulerende evne til ICAM-1 er blitt vist. Her benyttes et løselig ICAM-2 immunoglobulin-fusjonsprotein (reseptor-globulin, Rg)
15 for å demonstrere den samtidig stimulerende virkning til ICAM-2 under aktiveringen av CD4⁺ T-celler. Når Rg er ko-immobilisert med anti-TCR-1 mAb og ICAM-2, startes sterke celledelingsreaksjoner i CD4⁺ T-celler. Denne samtidig stimulerende virkning til ICAM-2 var avhengig av dets ko-immobilisering med mAb rettet mot CD3/TCR-komplekset men ikke dem som er rettet mot CD2 eller CD28.
20 Både hvilende såvel som antigen-stimulerte CD4⁺ T-celler reagerte på de samtidig stimulerende virkninger til ICAM-2. Tilsetningen av mAb rettet mot CD11a eller CD18-molekyler hemmet nesten fullstendig reaksjonene til ICAM-2 Rg. Disse resultater er forenlig med rollen til LFA-1-komplekset som en reseptor for, og formidler av, ICAM-2 samtidig stimulerende virkninger. Stimulering av T-celler
25 med ko-immobilisert anti-TCR-1 og ICAM-2 resulterte i stimuleringen av IL-2-reseptor (CD25), og anti-Tac (CD25) mAb hemmet dette svaret hvilket antydte et bidrag fra endogent syntetisert IL-2 under denne stimulering. Resultatene viser at ICAM-2, såvel som dets homologe ICAM-1, også utøver en sterk samtidig stimulerende virkning under TCR-formidlet aktivering av T-celler. De samtidig
30 stimulerende virkninger som utløses av LFA-1:ICAM-2-reaksjonen kan være kritiske under igangsetting av T-celle-aktivering ved hjelp av ICAM-1^{low} APC.

For å beskrive klarere foreliggende oppfinnelse og dens utførelsesformer, er følgende definisjoner inkludert.

"Transfeksjon", som benyttet her, er tilegnelsen av nye genetiske markører ved hjelp av innbygging av tilsatt DNA i eukaryote celler.

5 "Transformasjon", som benyttet her, er tilegnelsen av nye genetiske markører ved hjelp av innbygging av tilsatt DNA i prokaryote celler.

"Kloningsvektor", som benyttet her, er ethvert plasmid eller virus hvori man kan innsette og klonе fremmed DNA.

10 "Plasmid", som benyttet her, er et automatisk, selv-delende, ekstra-kromosomalt sirkulært DNA.

"Åpen leseramme" (ORF), som benyttet her, er en DNA-sekvens som kan (potensielt) translateres til et protein.

15 "Gen (cistron)", som benyttet her, er det DNA-segment som koder for sekvensen i en peptidkjede; det kan omfatte områder som ligger foran og følger etter det kodende område (leder og hale) såvel som mellomliggende sekvenser (introner) mellom ulike kodende segmenter (eksoner).

"Ekspresjon", som benyttet her, er fremgangsmåten som et strukturelt gen går gjennom for å fremstille et peptid eller protein. Det er en kombinasjon av transkripsjon og translasjon.

20 Som benyttet her, beskriver betegnelsen "klon" ethvert antall identiske celler eller molekyler som stammer fra en enkel stam-celle eller molekyl.

Som benyttet her, blir betegnelsen "basepar" (bp) en kobling mellom adenin (A) med thymin (T) eller mellom cytosin (C) og guanin (G) i en DNA dobbel heliks.

25 Som benyttet her, er betegnelsen "ekspresjonsvektor" ethvert plasmid eller virus hvori et fremmed-DNA kan bli innsatt og/eller uttrykt. Illustrerende ekspresjonsvektorer omfatter dem som uttrykker CD-8-IgG1-proteinene (Aruffo et al., (1990) Cell 61:1303-1313) og CD4-IgG1- og CD4-IgM-proteinene (Zattlmeissl et al., (1990) DNA Cell Biol. 9:347-353).

30 Som benyttet her, refererer betegnelsen "polymerase-kjedereaksjon" (PCR) til forøkningen av DNA-molekyler ved hjelp av trinnvis bruk av en temperaturstabil DNA-polymerase for å kopiere DNA-kjeden, adskillelse av de komplementære kjeder ved oppvarming, tilsetting av "primere" og gjentakelse av prosessen ca. 30 ganger for å fremstille omtrent 10^9 kopier DNA. Ved bruk av PCR-

fremgangsmåten, kan ørsmå mengder DNA forøkes for å lage tilstrekkelig DNA med anvendelse i ulike fremgangsmåter.

Betegnelsen "syntetisk" som benyttet her, refererer til et peptidmolekyl som er blitt bygget opp ved hjelp av kjemiske hjelpemidler, d.v.s. syntetisert kjemisk, istedenfor å bli fremstilt ved hjelp av biologiske hjelpemidler slik som genetiske ingeniørteknikker.

Som benyttet her, betyr betegnelsen "effektiv mengde" en mengde som er tilstrekkelig til å gi det ønskede resultat.

Betegnelsen "tilsvarer" i sine ulike grammatikalske former, som benyttet her, og i kravene i forhold til peptid- eller protein-sekvenser, betyr sekvensen som er beskrevet pluss eller minus opp til 10 aminosyrerester i den ene eller i begge av amino- eller karboksy-endene og inneholder kun konservative substitusjoner i bestemte aminosyrerester i peptid og/eller proteinsekvensen.

Betegnelsen "konservativ substitusjon" som benyttet ovenfor betyr at én aminosyrerest er blitt erstattet av en annen, biologisk lignende rest. Eksempler på konservative substitusjoner omfatter substitusjonene med én hydrofob rest slik som Ile, Val, Leu eller Met for en annen, eller substitusjonen av én polar rest for en annen, slik som Arg og Lys, mellom Glu og Asp eller mellom Gln og Asn, og lignende.

I noen tilfeller har erstatningen av en ionisk rest med en motsatt ladet ionisk rest slik som Asp for Lys blitt betegnet konservativ i feltet ved at disse ioniske grupper er tenkt kun å være tilknyttet evne til løselighet. Vanligvis blir imidlertid, siden erstatningene som er diskutert her er på et relativt kort syntetisk peptidområde, sammenlignet med et helt protein, erstatningen av en ionisk rest ved hjelp av en annen ionisk rest med motsatt ladning betraktet å være en "radikal erstatning" på samme måte som erstatninger mellom ikke-ioniske og ioniske rester, og store rester slik som Phe, Tyr eller Trp med mindre store rester slik som Gly, Ile og Val.

Betegnelsene "ikke-ioniske" og "ioniske" rester benyttes her på vanlig måte for å beskrive de aminosyrerester som enten har ingen ladning eller som normalt har en ladning ved fysiologisk pH. Eksempler på ikke-ioniske rester omfatter Thr og Gln, mens eksempler på ioniske rester omfatter Arg og Asp.

Som benyttet her, refererer betegnelsen "cellulært adhesjonsmolekyl" til spesifikke betennelses-celleoverflate-molekyler som gjenkjennes av og binder til vaskulært endotel og/eller granulocytter.

Som benyttet her, refererer betegnelsen "IgG-konstantområde" til områder i
5 γ -kjeden i IgG-molekylet som ligger opp til det variable område som tilsvare de første 107 aminosyrer i γ -kjeden eller fragmenter derav. De fire områder i γ -kjede-konstantområdet betegnes CH₁, H, CH₂ og CH₃. CH₁ er like ved det variable område og omfatter aminosyrerester 114 til og med 223. H (hengsel; restene 224-245) er nær CH₁ og inneholder cysteinrestene som danner de sulfidbindinger som
10 forbinder kovalent de to immunoglobulin-tunge kjeder. CH₂ er like ved hengselet og omfatter aminosyrerestene 246 til og med 361, etterfulgt av CH₃, som inneholder aminosyrerestene 362 til og med 496.

Som benyttet her, refererer betegnelsen "bibliotek" til en stor vilkårlig samling av klonede DNA-fragmenter som oppnås fra det transskripsjonssystem
15 som velges.

Som benyttet her, refererer betegnelsen "operativt bundet" til en binding som ikke påvirker evnen til noen av de bundne grupper til å fungere som beskrevet. Slike koblinger kan dannes ved hjelp av syntetiske og/eller rekombinante fremgangsmåter. I én foretrukken utførelsesform, blir et ICAM-2
20 ekstracellulært område operativt bundet til en konstant del av et immunoglobulinmolekyl slik som et IgG-konstantområde på en måte som tillater ICAM-2-området å binde til en CD11a/CD18.

Som benyttet her, refererer betegnelsen "farmasøytisk akseptabel bærer" til en forbindelse som er forenelig med tilførsel til en pasient og som ikke gir giftige eller uønskede virkninger etter slik tilførsel. Illustrerende eksempler på
25 farmasøytisk akseptable bærere er fosfatbufret saltvann, Ringer-løsning, oljer, geler og mikrokuler, såvel som liposomer. Andre farmasøytisk akseptable bærere er velkjente å det farmasøytiske felt og er omfattet av foreliggende oppfinnelse.

Som benyttet her, refererer "vesentlig" til en høy grad av likhet. Et vesentlig
30 renset peptid ifølge foreliggende oppfinnelse betyr et preparat som har mindre enn ca. 10% andre peptider til stede. En vesentlig lik sekvens i foreliggende oppfinnelse har mindre enn ca. 10% variasjon med hensyn til sekvensen.

Som benyttet her, refererer betegnelsen "kloning" og dets grammatikalske former til innsettingen av DNA-sekvens i genomet til en prokaryot eller eukaryot celle eller organisme hvor den kan dele seg på samme måte. Slike kloningsresultater i fremstilling av rekombinante DNA-molekyler blir laget ved å koble
5 ende til ende ulike DNA'er.

Som benyttet her, betyr betegnelsen "subkloning" og dets ulike grammatikalske former innsetting av en genomisk cDNA-sekvens i en ekspresjonsvektor.

Som benyttet her, vedrører betegnelsen "område" til et molekyl med
10 enhvert konstruert eller beskrevet område i molekylet slik som en ekstracellulær del eller område for et adhesjonsmolekyl slik som ICAM-1, ICAM-2 eller et IgG-konstantområde.

Som benyttet her, omfatter betegnelsen "fusjonsmolekyl" et laget molekyl som inneholder bestemte områder og/eller egenskaper fra to eller flere ulike
15 molekyler. I foreliggende oppfinnelse inneholder fusjonsmolekylene et område i et adhesjonsmolekyl og et område i et immunoglobulin. I foreliggende oppfinnelse resulterer dette i et løselig fusjonsmolekyl som har bindingsspesifisitet til et cellulært adhesjonsmolekyl. Fusjonsmolekyler kan fremstilles ved hjelp av enten syntetiske eller rekombinante fremgangsmåter.

Betegnelsen "bindingsspesifisitet" som benyttet her, henspiller seg på den
20 selektive binding av et molekyl til et annet slik som binding av antistoffer til antigener, reseptorer til ligander og enzymer til substrater. Alle molekyler som binder til en spesiell del blir vurdert å ha bindingsspesifisitet for den delen. Alle antistoffer som binder til et spesielt antigen har således bindingsspesifisitet for det antigenet, og alle ligander som binder til en spesifikk cellulær reseptor har
25 bindingsspesifisitet for den reseptoren.

Foreliggende oppfinnelse vedrører to nye løselige fusjonsmolekyler og fremgangsmåter som, i en foretrukken utførelsesform, viser at ICAM-2, på samme måte som dets homologe ICAM-1, kan fungere som en samtidig stimulerende
30 forbindelse overfor reseptor/lignand under aktivering av T-celler. Denne observasjon tillater ICAM-2 å bli inkludert i en undergruppe av Ig supergenfamilie-medlemmer som er i stand til å fungere som samtidig stimulerende molekyler. Denne subgruppe omfatter B7, ICAM-1, LFA-3 og VCAM-1 (G.A. Van Seventer et al., (1990) J. Immunol. 144:4579; N.K. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 88:6403; B.E. Bierer et al., (J. Exp. Med. 168:1145; P. Moingeon et al., (1989) Nature 339:312; P.S. Linsley et al., (1991) J. Exp. Med. 173:721). Alle disse molekyler og andre som er kjent av fagmannen på området kan benyttes til å lage fusjonsmolekyler ifølge foreliggende oppfinnelse. Samtidig stimulering med ICAM-2 ble vist å være absolutt avhengig av samtidig stimulering av T-cellene ved hjelp av CD3/TCR-komplekset og krevet at både anti-TCR-1 og ICAM-2 var ko-immobilisert på samme overflate. Den ko-stimulerende virkning til ICAM-2 var slående lik den til ICAM-1, kanskje på grunn av det faktum at både ICAM-1 og ICAM-2 deler den samme overflatereseptor, LFA-1 (CD11a/CD18-molekylet (S.D. Marlin et al., (1987) Cell 51:813; M.W. Mkgoba et al., (1988) Nature 331:86; D.E. Staunton et al., (1989) Nature 339:61; M.L. Dustin et al., (1989) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54:753).

Til tross for anvendelse av den samme reseptor (LFA-1), var reaksjonene som ble indusert av ICAM-1 og ICAM-2, kvantitativt forskjellige, selv om de var kinetisk like. De proliferative reaksjoner som ble indusert med ICAM-2 ble også gjenspeilet i deres henholdsvis evne til å stimulere produksjonen av overflate IL-2R og syntetisere IL-2. De observerte sterkere ko-stimulerende virkninger til ICAM-1, sammenlignet med dem til ICAM-2, kan skyldes ulikheter i relativ binding når det gjelder reaksjon mellom disse to molekyler med LFA-1; ICAM-1 har sterkere bindingsevne til LFA-1 enn ICAM-2 (D.E. Staunton et al., (1989) Nature 339:61; M.L. Dustin et al., (1989) Cold Spring Harbor Symp. Quant. 54:753; A.R. De Fougerolles et al., (1991) J. Exp. Med. 174:253). Det ekstracellulære område til ICAM-1 består av fem Ig-lignende områder mens det ekstracellulære område til ICAM-2 har kun to slike områder (D.E. Staunton et al., (1988) Cell 52:925, D. Simmons et al., (1988) Nature 331:624, D.E. Staunton et al., (1989) Nature 339:61). Hemningsstudier med ulike anti-ICAM-1 mAb har kartlagt LFA-1-reaksjonssetet på ICAM-1 til det første område i ICAM-1-molekylet (D1 i fig. 1) med et visst bidrag fra område 2 (D.E. Staunton et al., (1990) Cell 61:243). Selv om de to mest N-terminale områder i ICAM-1 og ICAM-2 som bidrar til deres reaksjoner med LFA-1 viser 34% identitet (D.E. Staunton et al., (1989) Nature 339:61), kan tilstedeværelsen av 3 ytterligere områder i ICAM-1-molekylet gi ytterligere fleksibilitet med hensyn til bindingsområdene i ICAM-1 (D1 og D2) og således forklare den sterkere binding til LFA-1.

Muligheten for at tilstedeværelsen av ytterligere områder i strukturen til ICAM-1 gjør dette til et sterkere ko-stimulerende molekyl enn ICAM-2, ble undersøkt eksperimentelt ved hjelp av genteknologi der et ICAM-1 Rg-molekyl ble laget og hadde kun de to mest N-terminale områder ICAM-1, ICAM-1.2 Rg. Ved direkte sammenligning, var ICAM-1.2 Rg fremdeles sterkere i sin ko-stimulerende virkning enn ICAM-2 Rg (fig. 4). Disse resultater er forenelige med, og underbygger videre, konklusjonen at de to lengst N-terminale Ig-lignende områder til ICAM-1 er kritiske i sin reaksjon med LFA-1 (D.E. Staunton et al., (1988) Cell 52:925; D.E. Staunton et al., (1990) Cell 61:243).

Størrelsen på ICAM-2-molekylet ble øket ved å gi det fem ytterligere Ig-lignende områder fra CD13-molekylet. ICAM-2:CD31 Rg-hybridet, som inneholder det ekstracellulære område til ICAM-2 og som erstattet de lengst N-terminale av de syv Ig-lignende områdene til CD31 (P.J. Newman et al., (1990) Science 247:1219; D.L. Simmons et al., (1990) J. Exp. Med. 171:2147), var hverken mer eller mindre effektivt når det gjaldt å ko-stimulere T-celler enn ICAM-2 Rg-molekylet selv. Samlet viser disse resultater at *in vitro*-forskjellene når det gjelder de ko-stimulerende virkninger til ICAM-1 og ICAM-2 kan stamme fra forskjeller i de primære strukturer til de to lengst N-terminale Ig-lignende områder i de ulike molekyler og ikke fra forskjeller i lengde og/eller fleksibilitet i de to molekyler. Selv om de rensede ICAM-1 Rg'er med ulike områder ble funnet å være like stimulerende (resultater ikke vist), kan tilstedeværelsen av ytterligere områder i det native ICAM-1-molekylet tilpasse det videre i det ekstracellulære rommet og derved redusere innblandingen av den cellulære "glycocalyx" (D.E. Staunton (1989) Nature 339:61; A.R. De Fougères et al., (1991) J. Exp. Med. 174:253). ICAM-2-molekylet i sin naturlige form kan kanskje ikke ha denne fordel, og kanskje av den grunn blir i en fysiologisk sammenheng, ICAM-2-formidlet binding svakere enn ICAM-1-formidlet binding (adhesjon), (D.E. Staunton (1989) Nature 339:61; A.R. De Fougères et al., (1991) J. Exp. Med. 174:253).

Den ko-stimulerende virkning når det gjelder reaksjon mellom ICAM-1 og LFA-1 på T-celler er blitt observert i Ag-stimulerte såvel som anti-CD3 stimulerte systemer (D.M. Altmann et al., (1989) Nature 338:512; G.A. Van Seventer et al., (1990) J. Immunol. 144:4579). Foreliggende oppfinnelse viser at de samtidig stimulerende virkninger til ICAM-2, skjønt avhengig av reaksjonen mellom ICAM-2 og LFA-1, er også CD3/TRC-avhengige. LFA-1 på hvilende T-celler binder ikke til

immobilisert ICAM-1 (G.A. Van Seventer et al., (1990) J. Immunol. 144:457; M.L. Dustin et al., (1989) Nature 341:619) eller ICAM-2. Agonister av PKC slik som PMA, som øker bindingen mellom LFA-1 og ICAM-1 (G.A. Van Seventer et al., (1990) J. Immunol. 144:457; M.L. Dustin et al., (1989) Nature 341:619) stimulerer ikke ICAM-1 eller ICAM-2-avhengige T-celledeling. Imidlertid vil binding av CD3/TCR-komplekset på T-celler som forårsaker både aktivering av PKC såvel som mobilisering av intracellulært fritt Ca^{2+} (A. Weiss et al., (1986) Annu. Rev. Immunol. 4:593) ikke bare øke bindingen av LFA-1 for ICAM'er (G.A. Van Seventer et al., (1990) J. Immunol. 144:457; M.L. Dustin et al., (1989) Nature 341:616), men også sette T-cellene i stand til å motta samtidig stimulerende signaler formidlet ved ICAM'er (G.A. Van Seventer et al., (1990) J. Immunol. 144:457). Selv om de molekylære mekanismer gjennom hvilke ligander av LFA-1 avgir sine aktiveringssignaler er fremdeles dårlig forstått, stimulerer kryss-binding mellom mAb rettet mot CD3/TCR og LFA-1 meget mer enn forlenget mobilisering av intracellulært fritt Ca^{2+} og hydrolyse av fosfatidylinositol enn det anti-CD3 mAb gjør alene (M.C. Wacholtz et al., (1989) J. Exp. Med. 170:431; R. Pardi et al., (1989) J. Immunol. 143:3157). Selv om det ikke er undersøkt her, kan ICAM'er når de er immobiliserte med anti-TCR-1 stimulere lignende forlenget utvikling av "sekundære budbringere" hvilke er essensielt for T-celle-aktivering. Ved aktivering, blir CD18 (LFA-1 β) hurtig fosforylert på serin mens vedvarende serin-fosforylering av CD11a forblir uforandret (T.A. Catila et al., (1988) J. Immunol. 140:4308). Det er viktigere at ved aktivering av T-celler med Ag-stimulert APC lokaliserer LFA-1-komplekset sammen med CD3/TCR på et bestemt kontaktsted mellom T-celler og APC etterfulgt av reorganisering av cytoskjelett kanskje ved hjelp av bidrag fra cytoskjelett-komponenten talin (A. Kupfer et al., (1989) Annu. Rev. Immunol. 7:309). Hvis dette er tilfelle vil det være av interesse å undersøke hvorvidt forskjellen i de ko-stimulerende virkninger til ICAM-1 og ICAM-2 virkelig skyldes ulik virkning av ICAM'er via LFA-1 på cytoskjelett-elementer (A. Kupfer et al., (1989) Annu. Rev. Immunol. 7:309) for å om dirigere aktiveringsprosessene (C. Van Noesel et al., (1988) Nature 333:850).

Til forskjell fra ICAM-1, synes uttrykket av ICAM-2 å være meget mer begrenset og ikke modulert av betennelses-cytokiner (D.E. Staunton et al., (1989) Nature 339:61; P. Nortamo et al., (1991) J. Immunol. 146:2530). ICAM-2 er til

stede hovedsakelig på vaskulære endotelceller og på visse interstitielle celler som omfatter dendritiske celler (D.E. Staunton (1989) et al., Nature 339:61; A.R. De Fougerolles et al., (1991) J. Exp. Med. 174:253; P. Nortamo et al., (1991) J. Immunol. 146:2530). I lys av dets ko-stimulerende virkning, kan ICAM-2

- 5 understøtte aktiveringen av T-celler via ICAM-1 eller ^{lav}APC før ekspresjon av ICAM-1 kan bli oppregulert. Gitt en sterkere ekspresjon av ICAM-2 på vaskulære endotelceller kan den ko-stimulerende oppførsel til ICAM-2 være av betydning under sykdomsutviklingen av visse betennelsesreaksjoner. F.eks., kan ICAM-2 som uttrykkes på vaskulære endotelceller understøtte adhesjon/aktivering av
- 10 intravaskulært aktiverte T-celler for å starte og deretter forverre den intravaskulære betennelsesreaksjon forbundet med toksisk sjokksyndromet utløst av stafylokokk-eksotoksiner (Super Ag) eller vaskulært sjokksyndrom forbundet med tilførsel av høye doser IL-2 under kreftbehandling (S.D. Resnick (1990) J. Pediatr. 116:321; N.K. Damle et al., (1989) J. Immunol. 142:2660). Således kan
- 15 enhver terapeutisk anvendelse som er rettet mot å hemme ICAM-2-avhengige reaksjoner vise seg å være klinisk fordelaktige for behandlinger av intravaskulære betennessykdommer.

Eksempel 1

20 *Konstruksjon og fremstilling av ICAM Rg*

- ICAM-1 cDNA-sekvenser som koder for de mest N-terminale 2 eller 4 Ig-lignende områder eller komplekset som representerer det ekstracellulære område ICAM-1, ble forøket ved polymerase-kjedereaksjon (PCR) med syntetiske oligo-
- 25 nukleotider som var komplementære til sekvenser som flankerer dette område fra 1 ng i et cDNA som koder for ICAM-1-molekylet (D. Simmons et al., (1988) Nature 331:624) som templat med bruk av 25 perioder PCR. Hver periode består av 30 sek. ved 92°C, 2 min. ved 55°C, ved bruk av reaksjonsbufferen anbefalt av enzym-leverandøren (United States Biochemical). Oligonukleotider ble laget for å tillate
- 30 dannelsen av restriksjonsenzym-spaltningsseter ved 5' og 3'-endene i de forøkede cDNA-segmenter for å lette etterfølgende innsetting i IgG1-ekspresjonsvektoren (N.K. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Sci. USA 88:6403). For disse tre konstruksjoner, ble en forover "primer" som koder for sekvenser lokalisert i

ekspresjonsvektoren som inneholder en full-lengde cDNA kodende for ICAM-1-proteinet, syntetisert med følgende sekvenser:

5'GTA CGG GCC AGA TAT ACG CGT TGA CAT TGA TTA-3'.

Revers "primere" som koder for sekvenser lokalisert på overgangen mellom det andre og tredje Ig-lignende område, de fjerde og femte Ig-lignende områder, og ved enden av det femte Ig-lignende område som inneholder et BAMHI med de følgende sekvenser ble så syntetiserte:

5'CCT AGG ATC CGG GGG AGT AGC TGG CAG GAC AAA GGT-3'

5-CCT AGG ATC CGG GCC ATA CAG GAC ACG AAG CTC CCG-3'; og

5-CCT AGG ATC CCC CTC ATA CCG GGG GGA GAG CAC ATT CAC-3'.

ICAM-1 PCR-produktene ble spaltet med restriksjonsenzymene Mlu I og BamHI og ligert inn i Mlu I- BamHI-kuttet CD8-IgG1-vektor (N.K. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6403) hvilket resulterte i fremstillingen av ICAM-1.2 Rg, og ICAM-1.5 Rg-fusjonsproteinene.

ICAM-2 cDNA-sekvenser (D.E. Staunton et al., (1989) Nature 339:61) som kodet for det ekstracellulære område til ICAM-2 ble forøket ved hjelp av PCR fra 100 ng av et Mlu I-linearisert humant plasenta cDNA bibliotek fremstilt ved ekspresjonsvektoren CDM8 (B. Seed (1987) Nature 329:840). Én forover "primer" som var komplementær til sekvenser lokalisert like oppstrøms for sekvensen som koder for den N-terminale signalsekvensen til ICAM-2-proteinet med sekvensen 5'CGC GAA GCT TCT AGA GAG ATG TCC TCT TTC GGT-3' ble benyttet sammen med to ulike revers "primere" som var komplementære til sekvenser lokalisert ved overgangen til det ekstracellulære og transmembrane område i ICAM-2. De to reverse "primere" hadde de følgende sekvenser:

5'-CCG CGG ATC CGC TGT CCG ACA AGG CTC ATA-3' og

5'-CGC TCG AGG ATC CTG GCT GTC CGA CAC AGG CTC-3'.

PCR-produkter fremstilt ved hjelp av disse oligonukleotider ble subklonet inn i enten CD8-IgG1-ekspresjonsvektoren (N.K. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6403) for å fremstille ICAM-2 Rg eller i stedet for de to mest N-terminale Ig-lignende områder i CD31 (P.J. Newman et al., (1990) Science 247:1219; D.L. Simmons et al., (1990) J. Exp. Med. 171:2147) i en CD31 Rg-konstruksjon for å lage ICAM-2:CD31 Rg-fusjonsproteinene. Konstruksjonene av CD7 Rg og ELAM-1 Rg er tidligere beskrevet (N.E. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:6403; G. Walz et al., (1990) Science 250:1132.

De resulterende konstruksjoner ble transfektert hver for seg inn i COS-celler og de ønskelige fusjonsproteinene gjenvunnet og rensset fra supernatanten til de transfektete celler som beskrevet (N.E. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:6403).

5

Eksempel 2

Monoklonale antistoffer

Hybridomer OKT3 (anti-CD3), OKT4 (anti-CD4), OKT8 (anti-CD8), OKM1
 10 (anti-CD11b), 7G7/B6 (anti-CD25), L243 (anti-HLA-DR) og 63D3 (anti-monocytt)
 ble oppnådd fra American Type Culture Collection, Rockville, MD. Hybridom-
 utskillende anti-ICAM-1 mAb 84H10 ble oppnådd fra Dr. P. Mannoni, Istitut Paoli
 Calmettes, Marseille, Frankrike. Bukhulevæsker som inneholdt det respektive
 monoklonale antistoff (mAb) fra disse hybridomer ble laget i pristan-stimulerte
 15 BALB/c-mus. Mab 9.6 (anti-CD2), 10.2 (anti-CD5), G10-1 (anti-CD8), 60.1 (anti-
 CD11b), FC2 (anti-CD16), 60.3 (anti-CD18), 1F5 (anti-CD20), 9.3 (anti-CD28), og
 HB10a (anti-HLA-DR) ble gitt av Dr. J.A. Ledbetter (Bristol-Myers Squibb). Mab
 MHM23 (anti-CD18) og MHM24 (anti-CD11a) ble gitt av Dr. A. McMichael, Nuffield
 Foundation, Osford UK. Mab 4G7 (anti-CD19) ble gitt av Dr. E.G. Engleman,
 20 Stanford University School of Medicine, Stanford, CA. Mab WT-31 (anti-TCR-1)
 ble oppnådd fra Dr. W. Tax, University of Nijmegen, Nijmegen, Nederland, som
 også ble oppnådd fra Becton Tickings Monoclonal Center, Mountain View, CA.
 Anti-Tac (CD25/IL-2R α) mAb ble oppnådd fra Dr. T.A. Waldmann, NIH, Bethesda,
 MD. Anti-CD11a mAb 2503, anti-CD11c mAb BU15 og anti-CD18 mAb BL5 ble
 25 stammet fra Amac, Inc., Westbrook, ME. Hver av de ovenfor nevnte mAb er et
 IgG-antistoff. FITC-merket eller PE-merket mAb rettet mot ulike lymfoide
 overflatemolekyler ble oppnådd fra Amac, eller Coulter Immunology, Hialeah, FL.

Isolering av CD4⁺ T-celler

30

Perifere blodmononukleære celler fra friske givere ble adskilt ved hjelp av
 Ficoll-Hypaque tetthetsgradient-sentrifugering. Hvilende CD4⁺ T-celler ble isolert
 ved hjelp av omhyggelig immunomagnetisk negativ seleksjon ved bruk av

Dynabeads M-450 (Dynal Inc., Great Neck, NY) som beskrevet i (N.E. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:6403; K. Horgan et al., (1991) In Current Protocols in Immunology. J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach og W. Strober. Editors, s. 7.4.1-7.4.6). Negativ seleksjon ble utført ved bruk av en cocktail av mAb mot HLA-DR (L243 eller HB10a) på B-celler, monocyttar og aktiverte T-celler, 63D3 (monocyttar), CD19 (4G7) eller CD20 (1F5) på B-celler, CD11b (OKM1 eller 60.1) på monocyttar og NK-celler, CD16 (FC2) på NK-celler og CD8 (OKT8 eller G10-1) på CD4⁺ T-celler. Renheten av de isolerte CD4⁺ populasjoner var >95% som vurdert ved direkte eller indirekte immunofluorescensanalyse ved bruk av en fluorescens-aktivert cellederter (EPICS V, Coulter, Hialeah, FL). Isolerte CD4⁺ T-celler ble resuspendert med 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamin, og 10% føtalt bovinserum. Disse CD4⁺ T-celler var ikke i stand til å dele seg som svar på mitogene konsentrasjoner av PHA (10 µg/ml) eller løselig anti-CD3/TCR (100 ng/ml) i fravær av hjelpeceller.

Eksempel 3

Fremstilling av Ag-stimulerte CD4⁺ T-celler

Friskt isolerte hvilende mononukleære celler ble stimulert ved hjelp av stafylokokk-eksotoksiner (SEA, SEB, SEE eller TSST-1 (Toxin Technology, Inc., Sarasota, FL) (1 µg/ml) i 7 dager etterfulgt av CD4⁺ T-celle-isolering og dyrkning i nærvær av bestrålte klasse II MHC⁺ B-celler, individuell eksotoksin (1 µg/ml) og IL-2 (50 U/ml). DRw6-stimulerte CD4⁺ T-celler ble fremstilt fra denne blandede lymfocyttkulturen (MLC) stimulert ved bestrålte DRw6⁺ B-cellelinje ARENT og videreført ved bruk av ARENT B-celler og IL-2 som beskrevet i (N.K. Damle et al., 1990) Eur. J. Immunol. 20:1995). Før deres reaksjoner ble studert, ble levedyktige CD4⁺ T-celler isolert fra deres vekst/vedlikeholdte kulturer ved hjelp av Ficoll-Hypaque tetthetsgradiententrifugering, vedlikeholdt i 12-16 timer i fullstendig medium (CM) i fravær av ethvert stimulus.

*Eksempel 4**Proliferasjonstester*

Rund-bundet mikrotiterskåler (Corning) ble på forhånd dekket i 12-16 timer ved 4°C med en blanding (10 µg/ml hver) av affinitets-renset geit, anti-mus og anti-menneske IgG Fc-antistoffer (Tago, Burlingame, CA) (40 µl/brønn i natrium-bikarbonatpuffer, pH 9,6) og deretter ble ytterligere protein-bindende seter blokkert i 12-16 timer med 2% bovint serumalbumin i RPMI 1640. ICAM-1 Rg eller ICAM-2 Rg (human IgG Fc) og anti-TCR (mouse IgG) mAb ble immobilisert i de ovenfor nevnte mikrotiterbrønner i 1 time og skålene ble vasket to ganger med CM som beskrevet (N.K. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6403). Disse skåler som var "ladet" med ICAM Rg og/eller anti-TCR-1 ble benyttet for å stimulere CD4⁺ T-celler. 50.000 CD4⁺ i 0,2 ml CM ble dyrket i de ovenfor nevnte "ladede" mikrotiterskåler i 96 timer ved 37°C i 5% CO₂ og 95% luft.

Celledelingsreaksjoner i kulturene ble målt vanligvis på dag 4 ved å tilsette i kort tid triplikate kulturer med 1 µCi/brønn med ³H-TdR (6,7 Ci/mM, New England Nuclear, Boston, MA) 16 timer før høsting av celler for måling av radioaktivt merket nylig syntetisert DNA. Resultatene blir uttrykt som cpm ± SEM.

20 *Eksempel 5**Fremstilling av interleukin-2 og analyse av interleukin-2 reseptorekspresjon*

50.000 hvilende CD4⁺ T-celler ble dyrket i 96-brønn mikroskåler på forhånd "ladet" med ICAM-1 eller ICAM-2 Rg (50 ng/brønn), anti-TCR-1 (50 ng/ml) eller begge som beskrevet ovenfor. Celle-frie supernatanter fra disse kulturer ble samlet etter 48 timer og målt med tanke på interleukin 2 (IL-2)-aktivitet ved bruk av IL-2-avhengig T-cellelinje CTL-L2 som beskrevet (S. Gillis et al., (1978) J. Immunol. 120:2027). IL-2-konsentrasjonen i hver prøve ble beregnet ved å referere til rekombinant IL-2 (Cetus Corporation, Emeryville, CA) og uttrykt i internasjonale U/ml. For analyse av CD25 (IL-2Rα⁺ CD4⁺ T-celler, ble kulturene høstet etter 48-60 timer, farvet med fluorescein-konjugert anti-CD25 mAb (Amac)

og analysert på et flow cytometer (EPICS, Coulter) som beskrevet (N.K. Damle (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6403).

Eksempel 6

5 *Fremstilling av ICAM-1 og ICAM-2 immunoglobulin-fusjonsproteiner*

ICAM-1 og ICAM-2 Ig-fusjonsproteiner (reseptorglobuliner, Rg) ble fremstilt ved fusjon av et cDNA-fragment som koder for enten en del av, eller hele det ekstracellulære område i disse molekyler til et genomisk DNA-fragment som koder
10 for det konstante område i human IgG1. Tre ICAM-1 Rg-hybrider ble benyttet i dette studiet: ICAM-1.2 Rg, ICAM-1.4 Rg, ICAM-1.5 Rg. Disse stammer fra cDNA-fragmenter som koder for enten 2 eller 4 av de mest N-terminal Ig-lignende ekstracellulære områdene i ICAM-1, eller det komplette ekstracellulære område ICAM-1, (fig. 1). To ICAM-2-fusjonsproteiner ble fremstilt med tanke på dette
15 studiet: 1) ICAM-2 Rg som inneholder et cDNA-fragment som koder for det komplette ekstracellulære område ICAM-2 koblet til det genomiske DNA-fragment som koder for det humane IgG1-konstante område, og 2) ICAM-2:CD31 Rg hvor cDNA-fragmentet koder for de 2 mest N-terminale Ig-lignende områder i CD31 (PECAM) Rg fusjonsgenet ble erstattet med et CDNA-fragment som koder for de
20 to Ig-lignende områder i ICAM-2 for å lage ICAM-2:CD31-hybridet (fig. 1). På samme måte ble CD7 Rg og ELAM-1 Rg (N.E. Damle et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:6403; G. Walz et al., (1990) Science 250:1132) fremstilt og benyttet som kontroller i dette studium.

Evnen til ICAM-1 til å ko-stimulere T-celledeling er blitt vist (14). I
25 innledende undersøkelser, bekreftet vi de samtidig stimulerende virkninger til ICAM-1 Rg'er og sammenlignet videre de relative styrker til ICAM-1 Rg'ene som hadde ulike N-terminale Ig-lignende områder. Både ICAM-1.4 Rg og ICAM-1.5 Rg ble funnet å være like og ko-stimulerende i T-celle-aktiveringsundersøkelser. Derfor ble i alle etterfølgende eksperimenter med mindre det er uttrykt annerledes,
30 benyttet ICAM-1.4 Rg for ICAM-1.

*Eksempel 7**Ko-stimulerende virkninger av ICAM-2*

Evnen til ICAM-2 Rg til å tilveiebringe ko-stimulerende signaler til CD4⁺ T-celler aktivert via TCR-komplekset ble undersøkt og sammenlignet med evnen til ICAM-1 Rg. ICAM-1 Rg eller ICAM-2 Rg ble ko-immobilisert (100 ng/brønn) med anti-TCR-1 mAb (50 ng/brønn) i mikrotiterbrønner og nylig isolerte CD4⁺ T-celler ble tilsatt disse brønner. Celledelingsreaksjoner fra T-celler ble undersøkt på dag 4 som beskrevet i eksempel 4. Figur 2 viser at både ICAM-1 Rg og ICAM-2 Rg, når de ble individuelt ko-immobilisert med anti-TCR mAb, stimulerte delingen av CD4⁺ T-celler. I motsetning må ko-immobilisering av anti-TCR-1 mAb og begge ICAM Rg'ene bli ko-immobiliserte for å støtte T-celle-aktivering siden hverken ICAM-1 Rg eller ICAM-2 Rg i løsning understøttet T-celledeling sammen med immobilisert anti-TCR-1 mAb. I tillegg greide ikke mAb rettet mot T-celle-overflatemolekylene CD2, CD5 eller CD28 å stimulere T-celler når de ble ko-immobiliserte med noen av ICAM Rg.

Celledelingsvirkningen stimulert av ICAM-1 Rg var alltid sterkere enn den som ble stimulert av ICAM-2 Rg når ko-immobilisering med anti-TCR-1 mAb skjedde. Den kvantitative forskjell mellom CD4⁺ T-celledeling stimulert med ICAM-1 Rg og ICAM-2 Rg kan skyldes ulikheter i reaksjonskinetikene. Kinetikken når det gjelder ko-stimulering av immobiliserte ICAM-1 Rg og ICAM-2 Rg ble derfor undersøkt. Som vist i fig. 3, ble det maksimale svar med begge ICAM alltid oppnådd på kulturdag 6, selv om både ICAM-1-stimulerte og ICAM-2-stimulerte celledelingseffekter i CD4⁺ T-celler ble lett oppdaget 4 dager etter kulturstart. Ved å utvide kulturtiden lengre enn 6 dager ga dette vanligvis som resultat en redusert T-celledeling.

Den konsentrasjonsmessige avhengighet av de ko-stimulerende virkninger til ICAM-2 Rg og ICAM-1 Rg med enten 4 (ICAM-1.4 Rg) eller 2 (ICAM-1.2 Rg) N-terminale Ig-lignende områder ble så undersøkt. Som vist i fig. 4, stimulerte økede konsentrasjoner av hver ICAM Rg (5-500 ng/brønn) proporsjonale CD4⁺ T-celledelingssvar når de var ko-immobiliserte med anti-TCR-1 mAb (50 ng/brønn). Den observerte forskjell mellom de relative ko-stimulerende virkninger til ICAM-1

Rg'ene og ICAM-2 Rg var synlig for hver konsentrasjon som ble undersøkt. Både ICAM-1.2 Rg og ICAM-1.4 Rg hadde kvantitativt lignende T-celledelingsvirkninger. I motsetning ga ICAM-2 Rg alltid en svakere CD4⁺ T-celledelingseffekt enn ICAM-1.

5 De relative effekter av ICAM-2 Rg og ICAM-2:CD31 Rg til å ko-stimulere CD4⁺ T-celler ble undersøkt. ICAM-2:CD31-hybrider med 7 Ig-lignende områder ble laget ved å erstatte to av de syv mest N-terminale områder i CD31 Rg med de to områdene i ICAM-2 som vist i fig. 1. Både ICAM-2 Rg og ICAM-2:CD31 Rg stimulerte kvantitativt lignende celledelingssvar i CD4⁺ T-celler som vist i fig. 5. 10 Økningen i størrelsen av ICAM-2-molekylet med CD31-avledede områder øket ikke den ko-stimulerende evnen til ICAM-2. Både ICAM-1.2 Rg og ICAM-1.4 Rg var fremdeles mer effektive enn både ICAM-2 Rg eller ICAM-2:CD31 Rg når det gjelder å stimulere CD4⁺ T-celledeling. Både CD31 Rg eller ELAM-1 Rg (begge benyttet som negative kontroller) manglet evnen til å samtidig stimulere CD4⁺ T- 15 celler sammen med anti-TCR mAb.

Eksempel 8

Ko-stimulerende virkning av ICAM-2 Rg i antigen-stimulerte T-celler

20 Evnen til ICAM-2 Rg til å ko-stimulere CD4⁺ T-celler som hadde vært aktivert med antigen ble så undersøkt. CD4⁺ T-celler isolert fra kulturer stimulert med stafylokokk-eksotoksiner (super Ag) ble dyrket i 12-16 timer i komplett medium og så undersøkt med tanke på celledelingssvar overfor anti-TCR-1 mAb samtidig immobilisert med ICAM-1 eller ICAM-2 Rg. Som vist i fig. 6, induserte 25 immobiliserte anti-TCR-1 alene proliferasjon av Ag-stimulerte CD4⁺ T-celler. Imidlertid øket ko-immobilisering med anti-TCR-1 med begge ICAM Rg videre denne celledeling. Den overlegne ko-stimulerende virkning til ICAM-1 Rg var også tydelig med Ag-stimulerte T-celler. Lignende resultater ble oppnådd ved å bruke DRw6-stimulerte CD4⁺ T-cellelinjer.

Eksempel 9

Ko-stimulerende virkning av ICAM-1 Rg og ICAM-2 Rg omfatter IL2/IL-2-reseptorsystemet

5 Evnen til de ko-immobiliserte ICAM-2 Rg og anti-TCR-1 mAb til å stimulere ekspresjon av IL-2-reseptorer på CD4⁺ T-celler ble undersøkt. T-cellene ble dyrket i nærvær av immobilisert ICAM-2 Rg eller anti-TCR-1 mAb eller begge og 60 timer senere ble graden av celleoverflate-ekspresjon av CD25 (IL-2Ra) undersøkt ved hjelp av flow cytometri. Som vist i fig. 7 induserte binding av CD4⁺ 10 T-celler til ko-immobiliserte ICAM-1 Rg eller ICAM-2 Rg og anti-TCR-1 mAb ekspresjonen av IL-2R på en betydelig høyere prosent av CD4⁺ T-celler enn de som ble dyrket med immobiliserte anti-TCR-1 mAb og ICAM-1 Rg (>5% CD25⁺) og var alltid større enn stimuleringen med ko-immobilisert ICAM-2 Rg (ca. 25% CD25⁺). I tillegg, fremstilte CD4⁺ T-celler som var stimulerte med anti-TCR-1 mAb og 15 enten ICAM-1 Rg eller ICAM-2 Rg betydelig mer IL-2 (2,5-6 U/ml med ICAM-1 Rg og 1 U/ml med ICAM-2 Rg) enn dem som hadde vært inkubert i brønner med immobilisert anti-TCR-1 mAb alene eller med en av de immobiliserte ICAM Rg'ene (>0,1 U/ml). Således var forskjellen i de relative ko-stimulerende effekter av ICAM-1 og ICAM-2 Rg'ene også tydelig i deres evne til å stimulere IL-2R. Th mAb 20 anti-Tac (anti-CD25) hemmet betydelig CD4⁺ T-celledelingssvaret utløst av ko-immobilisering av anti-TCR-1 mAb og enten ICAM-1 Rg eller ICAM-2 Rg. Sammen viser disse resultater at celledelingssvarene til CD4⁺ T-celler stimulert ved ko-immobilisering av anti-TCR-1 mAb og ett av ICAM Rg'ene er i det minste delvis formidlet via det IL-2/IL-2R autokrine system.

25

Eksempel 10

Rollen til CD11A/CD18 (LFA-1) under ko-stimulering med ICAM Rg

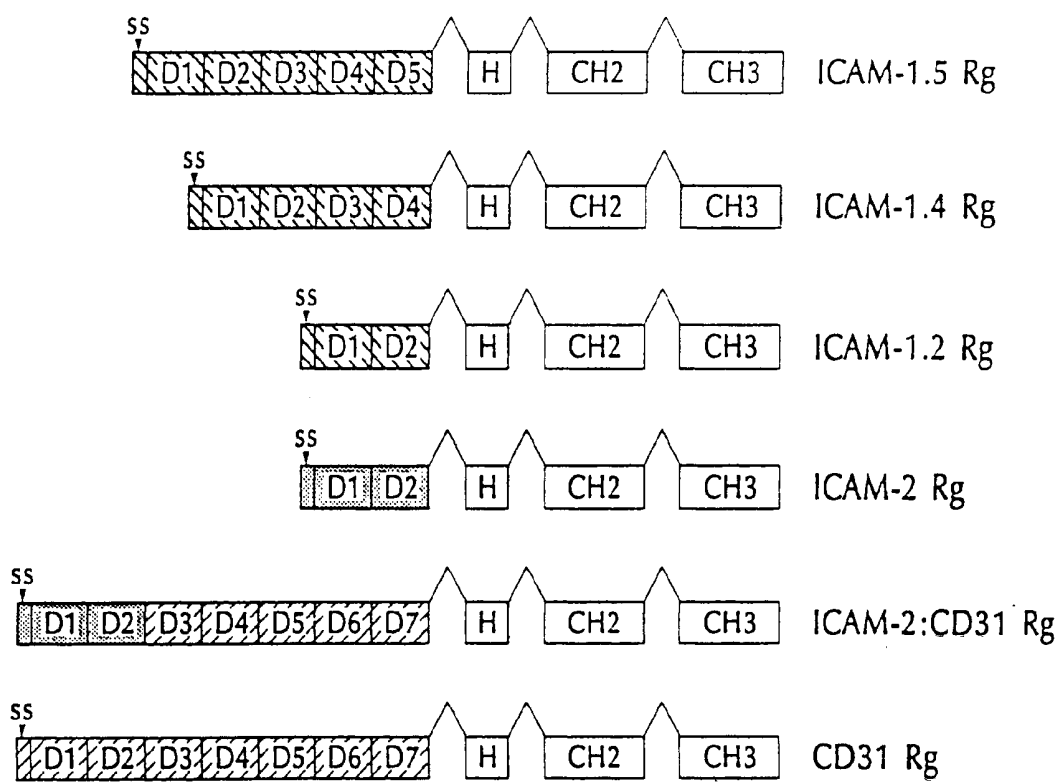
Både ICAM-1 og ICAM-2 har blitt vist å binde CD11a/CD18 (LFA-1) på 30 overflaten av alle leukocyter (.). Rollen til LFA-1 på overflaten til T-cellene under de ko-stimulerende virkninger til ICAM-1 og ICAM-2 ble undersøkt. Både ICAM-1 og ICAM-2 var uavhengige ko-immobiliserte med anti-TCR-1 mAb i

mikrotiterkulturbrønner. $CD4^{+}$ T-celler ble dyrket i disse brønner i nærvær av løselig mAb ($10 \mu\text{g/ml}$) rettet mot CD11a, CD11c, CD18, CD19 eller ICAM-1. Mab rettet mot enten CD11a eller CD18 hemmet nesten fullstendig T-celledelingen med begge ICAM i disse kulturer (fig. 8). I motsetning, hemmet anti-ICAM-1 mAb 84H10 T-cellesvarene overfor immobilisert ICAM-1 Rg men ikke ICAM-2 Rg. Anti-CD19 mAb 4G7 benyttet som kontroll hemmet ikke de ko-stimulerende virkninger til noen av ICAM Rg. Disse resultater viser at reaksjonene mellom ICAM'er med CD11a/CD18 (LFA-1)-komplekset på overflaten til T-celler er viktige når det gjelder å formidle de ovenfor nevnte kostimulerende virkninger.

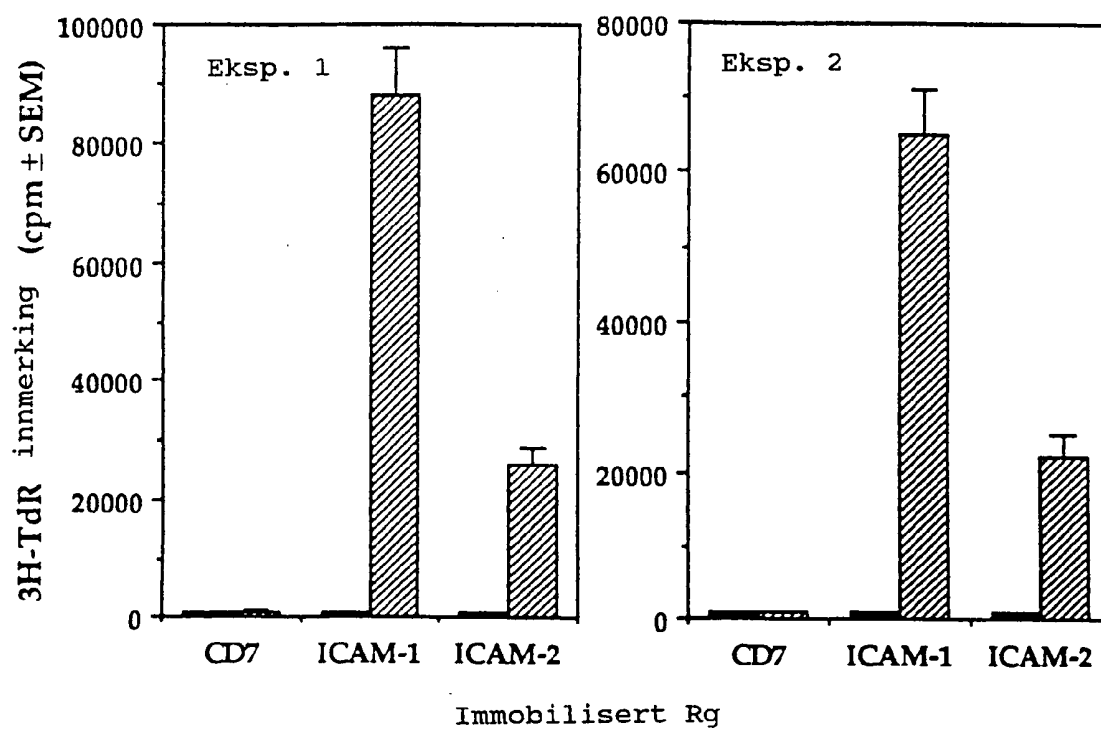
Foregående beskrivelse og eksemplene er ment som illustrasjon av foreliggende oppfinnelse.

PATENTKRAV

1. Løselig fusjonsmolekyl omfattende et første område, som har
5 bindingsspesifisitet for CD11a/CD18, funksjonelt (operativt) bundet til et annet område som i det vesentlige tilsvarer et immunoglobulin-konstantområde, hvori det første område i det vesentlige tilsvarer en ekstracellulær del av ICAM-2.
2. Fusjonsmolekyl ifølge krav 1, hvori det andre område i det vesentlige
10 tilsvarer et IgG-konstantområde.
3. Fusjonsmolekyl ifølge krav 1, fremstilt ved rekombinant ekspresjon.
4. Rekombinant fusjonsmolekyl omfattende et første område, som har
15 bindingsaffinitet for CD11a/CD18, funksjonelt (operativt) bundet til et annet område som i det vesentlige tilsvarer et immunoglobulin-konstantområde, hvori det første område i det vesentlige tilsvarer en ekstracellulær del av ICAM-2.
5. Rekombinant fusjonsmolekyl ifølge krav 4, hvori det andre område i det
20 vesentlige tilsvarer et IgG-konstantområde.
6. Rekombinant fusjonsmolekyl ifølge krav 5, hvori fusjonsmolekylet er fremstilt ved:
 - (a) subkloning av cDNA som koder for en ekstracellulær del av ICAM-2 i en
25 IgG-ekspresjonsvektor, og
 - (b) ekspresjon og isolering av rekombinant fusjonsmolekyl som inneholder en ekstracellulær del av ICAM-2 funksjonelt koblet til et IgG-konstantområde.



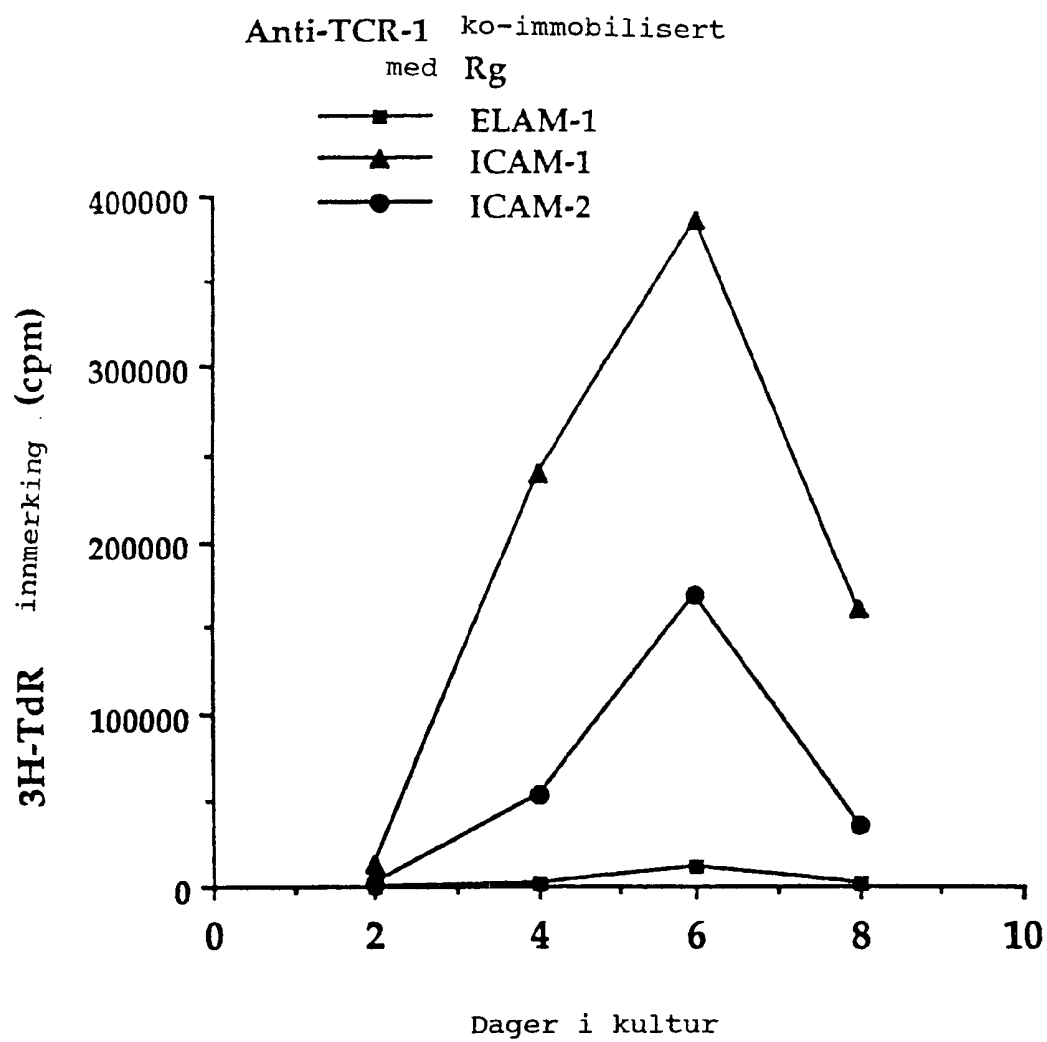
FIGUR 1



Immobilisert

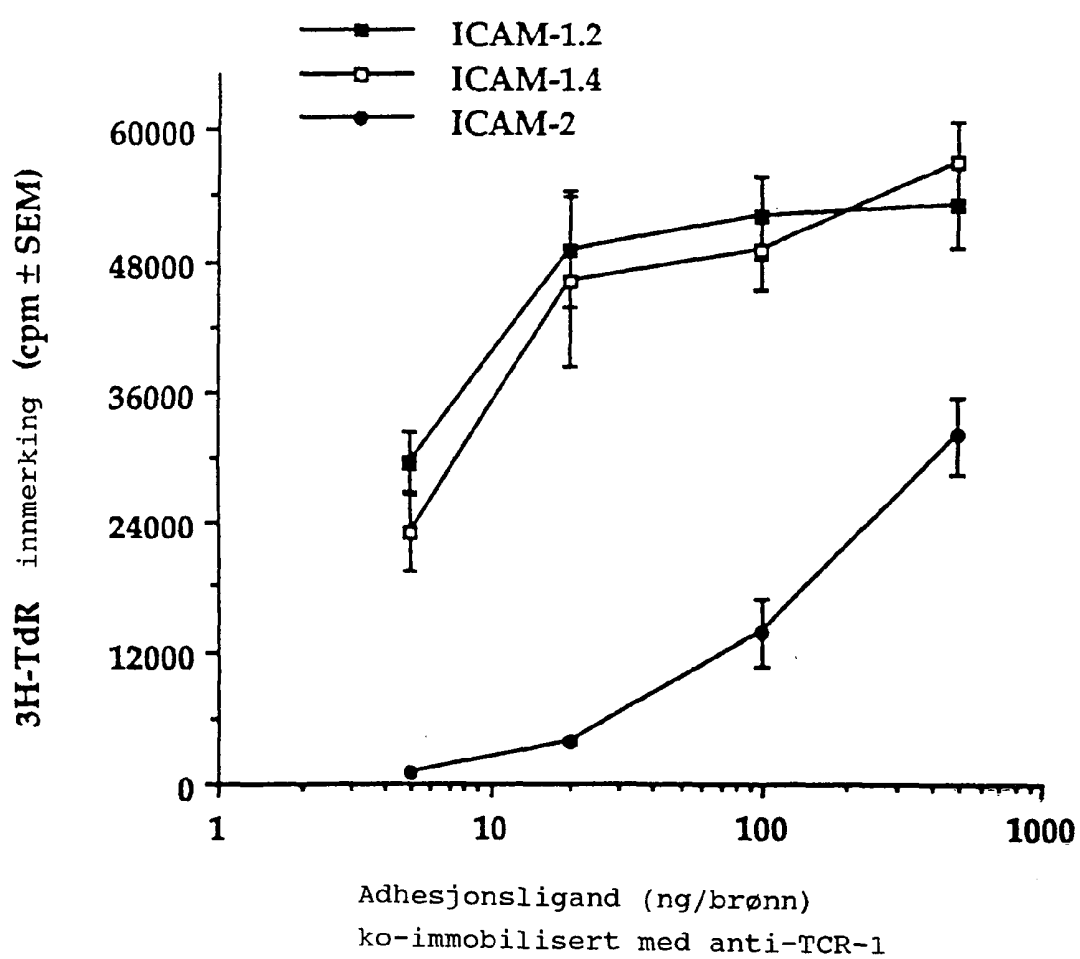
- Anti-CD19
- ▨ Anti-TCR-1

FIGUR 2

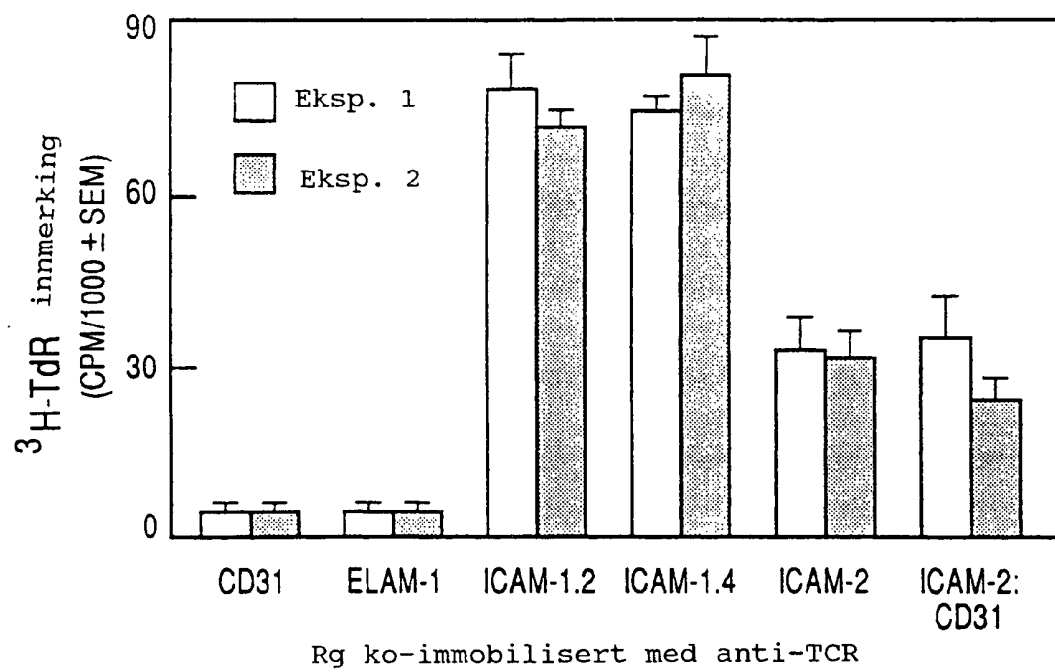


FIGUR 3

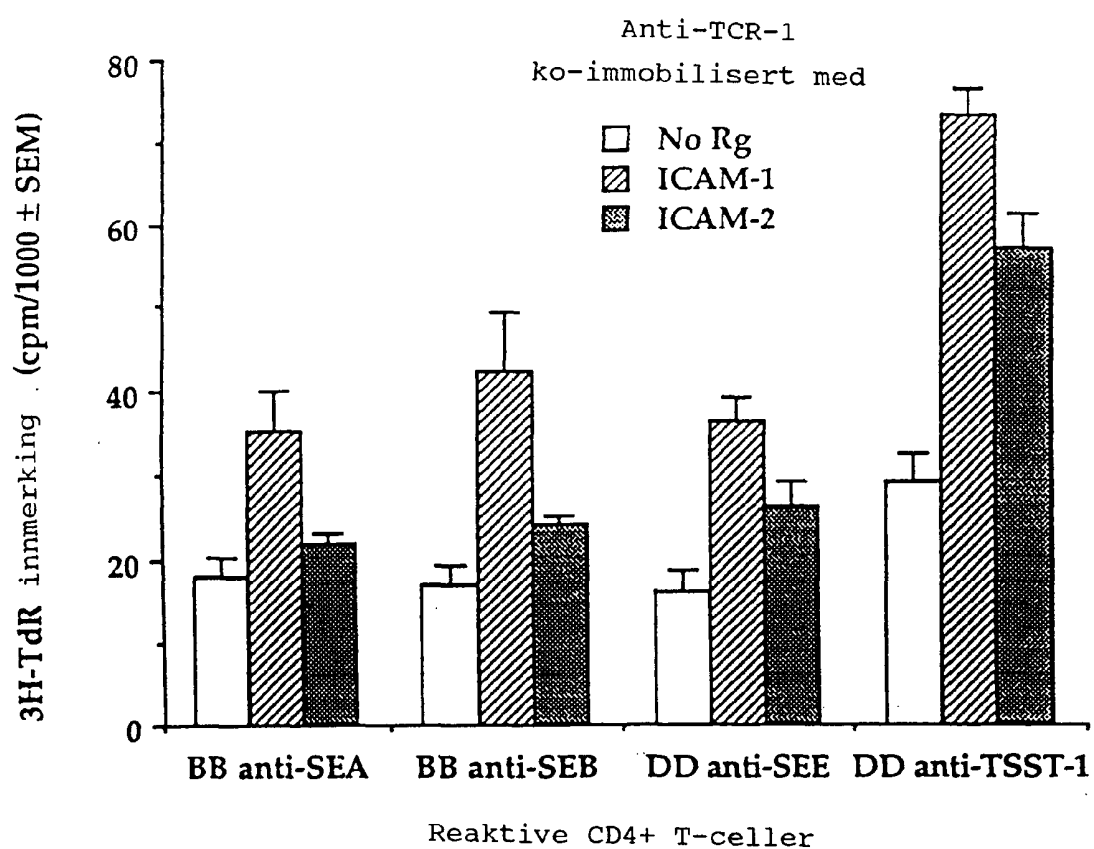
Ko-stimulerende virkninger av intercellulære adhesjonsmolekyler



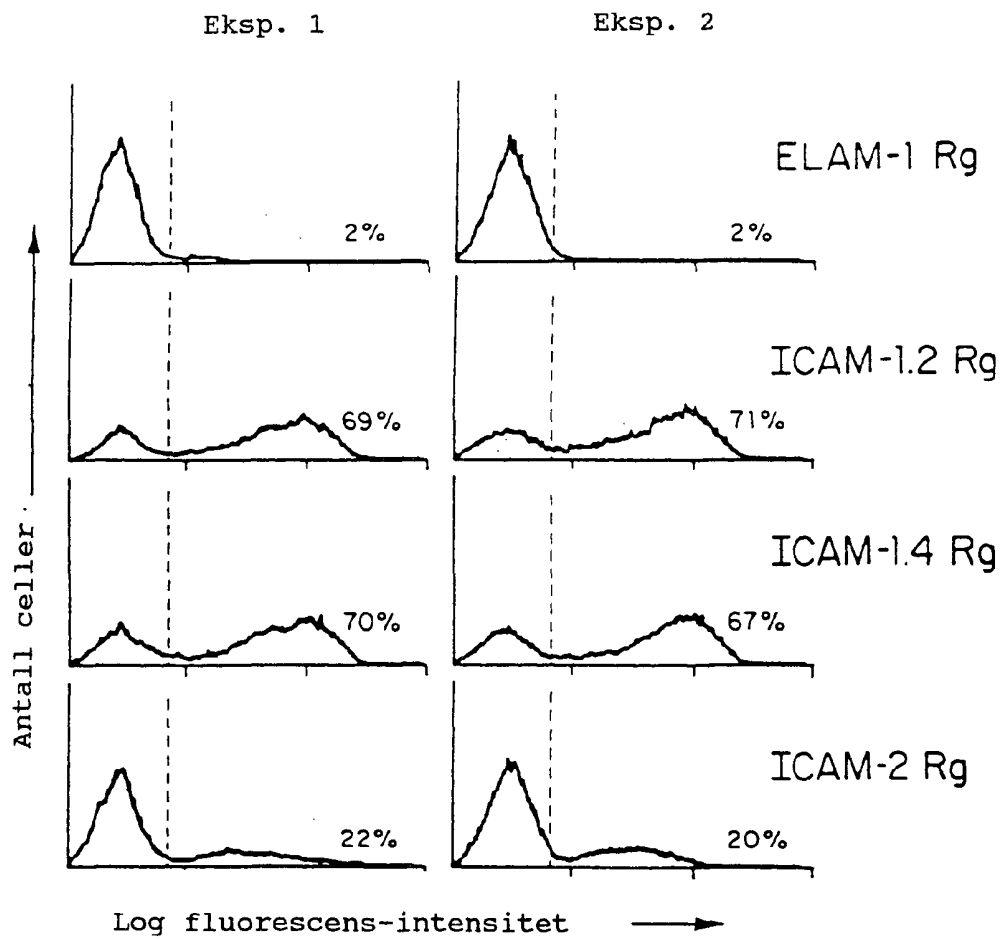
FIGUR 4



FIGUR 5

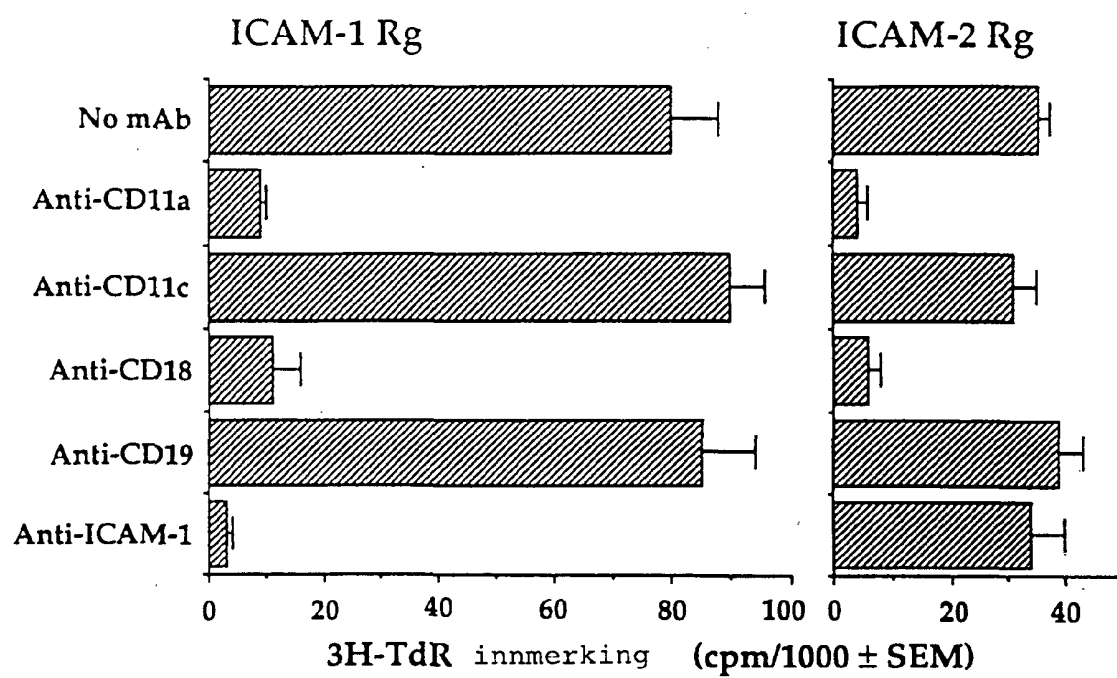


FIGUR 6



FIGUR 7

Anti-TCR-1 ko-immobilisert med



FIGUR 8