(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

FI000118792B

(10) **FI 118792 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **31.03.2008**

(51) Kv.lk. - Int.kl.

A61K 35/38 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **964272**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **23.10.1996**

(24) Alkupäivä - Löpdag **25.04.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **19.12.1996**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/US95/04832**

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

25.04.1994 US 234987 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •**Trustees of Dartmouth College,** Hanover, NH 03755, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**University of Massachusetts Medical Center,** 55 Lake avenue North, Worcester, MA 01655, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •**Noelle,Randolph J.,** Rural Route 3, Box 257, Cornish, NH 03745, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Durie,Fiona H.,** 1731 N.W. 58th #101, Seattle, WA 98107, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •**Parker,David C.,** 1953 S.E. 20th avenue, Portland, OR 97214, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •**Appel,Michael C.,** 2204 Foothills Drive South, Golden, CO 80401, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •**Philips,Nancy E.,** 22 Oakland avenue, Shrewsbury, MA 01545, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 •**Mordes,John P.,** 80 Devonshire Road, Newton, MA 02168, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 •**Grenier,Dale L.,** 39 Williamsville Tempelton Road, Hubbardston, MA 01452, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
8 •**Rossini,Aldo A.,** 62 Rambling Road, Sudbury, MA 01776, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Käyttöjä T-solutoleranssin indusoinniksi kudos- tai elinsiirrännäiselle
Användningar av inducering T-cellstorerans med hänsyn till vävnads- eller organtransplantat

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: HB 11712 ATCC HB 11713 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

WO 9506666 A, WO 9506481 (PatL 2 § §mom. 2. ja 4. virke)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnössä kuvataan menetelmiä T-solutoleranssin indusoimiseksi kudos- tai elinsiirrettä kohtaan siirteen vastaanottajassa. Näihin menetelmiin sisältyy se, että potilaalle annetaan: 1) allogeenista tai ksenogeenista solua, joka ilmentää luovuttajanantigeenejä ja

jonka pinnalla on ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla olevan ja solujen kosketuksesta riippuvaisen auttajaefektoritoiminnon välikappaleena toimivan reseptorin kanssa; ja 2) tämän reseptorin antagonistia, joka estää ligandin ja reseptorin välisen vuorovaikutuksen. Edullisessa sovellutusmuodossa allogeeninen tai ksenogeeninen solu on B-solu, ja edullisesti lepovaiheessa oleva B-solu, ja se T-solun pinnalla oleva molekyyli, joka toimii solujen kosketuksesta riippuvaisen auttajaefektoritoiminnon välikappaleena, on gp39. Edullinen gp39:n antagonisti on gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine. Allogeenista tai ksenogeenista solua ja gp39:n antagonistia annetaan tyypillisesti siirteen vastaanottajalle ennen kudoksen tai elimen siirtoa. Tämän keksinnön mukaisia menetelmiä voidaan käyttää T-solutoleranssin aikaansaamiseksi siirteitä, kuten maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoja, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa ja suolta, kohtaan. Keksinnössä on myös kuvattu menetelmä diabeteksen hoitamiseksi, joka menetelmä käsittää sen, että potilaalle annetaan luovuttajan antigeenejä ilmentäviä allogeenisiä tai ksenogeenisiä soluja, gp39:n antagonistia ja haiman solusaarekkeita.

Uppfinningen avser sätt för inducering av T-celltolerans gentemot ett vävnads- eller organtransplantat i mottagaren av tränsplantatet. Dessa sätt omfattar administration åt en patient: 1) en allogen eller xenogen cell, som utgör expressionen av donatorantigener och på sin yta har en ligand, som växelverkar med en receptor på ytan av en mottagande T-cell, som förmedlar en kontaktberoende hjälpareffektorfunktion; och 2) en antagonist av receptorn, som inhiberar växelverkan mellan liganden och receptorn. I en föredragen utföringsform är den allogena eller xenogena cellen en B-cell och företrädesvis en vilande B-cell, och molekylen på ytan av T-cellen, som förmedlar den kontaktberoende hjälpareffektorfunktionen, är gp39. En föredragen antagonist för gp39 är en anti-gp39-antikropp. Den allogena eller xenogena cellen och gp39-antagonisten administreras typiskt åt transplantatmottagaren före transplantationen av vävnaden eller organet. Sätten enligt uppfinningen kan användas för inducering av T-celltolerans gentemot transplantat såsom lever, njurar, hjärta, lungor, hud, muskler, nervvävnad, magsäck och tarmar. Uppfinningen avser även ett sätt för behandling av diabetes, varvid man administrerar åt patienten allogena eller xenogena celler, som utgör expressionen av donatorantigener, en gp39-antagonist och mjältecellöar.

Käyttöjä T-solutoleranssin indusoinniksi kudos- tai elinsiirrännäiselle

Keksinnön tausta

Antigeenispesifisten T-solujen aktivoitumisen ja solukloonien kasvun käynnistämiseksi on kahden antigeeniä esittävän solun (AP-solun) tuottaman signaalin päästävä elimistössä lepotilassa olevien T-lymfosyyttien pinnalle. [Jenkins, M. ja Schwartz, R., J. Exp. Med. 165 (1987) 302 - 319; Mueller, D. L., et al., J. Immunol. 144 (1990) 3701 - 3709; Williams, I. R. ja Unanue, E. R., J. Immunol. 145 (1990) 85 - 93]. Ensimmäinen signaali, joka tekee immuunivasteesta spesifisen, syntyy T-solureseptorin (TCR) välityksellä sen jälkeen kun immunologinen järjestelmä on tunnistanut MHC-kompleksin (Major Histocompatibility Complex) yhteydessä esitetyn vieraan antigeenisen peptidin. Toinen signaali, josta käytetään nimitystä apustimulaatiosignaali, käynnistää T-solujen lisääntymisen ja muuttaa ne toimintakykyisiksi [Schwartz, R. H., Science 248 (1990) 1349 - 1356]. Apustimulaatio ei ole antigeenispesifinen eikä MHC-kompleksin suhteen rajoittuva ja sen arvellaan muodostuvan AP-solujen yhtenä omana erillisenä tai useampina erillisinä molekyyleinä solun pinnalla ilmentämän molekyylin vaikutuksesta [Jenkins, M. K., et al., J. Immunol. 140 (1988) 3324 - 3330; Linsley, P. S., et al., J. Exp. Med. 173 (1991) 721 - 730; Gimmi, C. D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 6575 - 6579; Young, J. W., et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 229 - 237; Koulova, L., et al., J. Exp. Med. 173 (1991) 759 - 762; Reiser, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 271 - 275; van-Seventer, GA., et al., J. Immunol. 144 (1990) 4579 - 4586; LaSalle, J. M., et al., J. Immunol. 147 (1991) 774 - 80; Dustin, M. I., et al., J. Exp. Med. 169 (1989) 503; Armitage, R. J., et al., Nature 357 (1992) 80 - 82; Liu, Y., et al., J. Exp. Med. 175 (1992) 437 - 445]. Yksi apustimulaatioreaktiotie, jonka katsotaan saavan aikaan T-solujen

aktivaation, sisältää T-solujen pinnalla olevan CD28-molekyylin. Tämä molekyyli voi ottaa vastaan B-solujen tai muiden AP-solujen pinnalla olevan ligandin tuottaman apustimulaatiosignaalin. CD28:n ligandeja ovat B-lymfosyytti-aktivaatioantigeenien B7-ryhmän jäsenet (kuten B7-1 ja/tai B7-2 [Freedman, A. S., et al., J. Immunol. 137 (1987) 3260 - 3267; Freeman, G. J., et al., J. Immunol. 143 (1989) 2714 - 2722; Freeman, G. J., et al., J. Exp. Med. 174 (1991) 625 - 631; Freeman, G. J., et al., Science 262 (1993) 909 - 911; Azuma, M., et al., Nature 366 (1993) 76 - 79; Freeman, G. J., et al., J. Exp. Med. 178 (1993) 2185 - 2192]. B7-1 ja B7-2 ovat myös vielä yhden molekyylin, CTLA 4:n, ligandeja, joka molekyyli esiintyy aktivoitujen T-solujen pinnalla, vaikkakin CTLA4:n osuus apustimulaatiossa on epäselvä.

Kun antigeenispesifinen signaali on tullut T-soluun yhdessä apustimulaatiosignaalin kanssa, niin tämä johtaa T-solun aktivaatioon, johon voi sisältyä sekä T-solujen lisääntyminen että sytokiinien erittyminen. Silloin kun antigeenispesifinen signaali on tästä poiketen tullut T-soluun ilman apustimulaatiosignaalia, niin tämän arvellaan indusoivan T-soluun reagoimattomuustilan eli anergian, mikä näin ollen indusoi T-solussa antigeenispesifisen toleranssin.

T-solujen ja B-solujen välisillä vuorovaikutuksilla on keskeinen osuus immuunireaktioissa. Humoraalisen immuniteetin indusoituminen kateenkorvasta riippuvaisia antigeenejä vastaan vaatii "avuksi" auttaja-T-soluja (näistä käytetään tämän jälkeen nimitystä Th-solut). Vaikkakin Th-solujen vapauttamat liukoiset molekyylit (esimerkiksi lymfokiinit, kuten IL-4 ja IL-5) avustavat jossakin määrin B-lymfosyyttejä, niin B-solujen aktivaatio tarvitsee myös B-solujen ja T-solujen välistä solujen kosketuksesta riippuvaista vuorovaikutusta. Hirohata, et al., J. Immunol. 140 (1988) 3736 - 3744; Bartlett, et al., J. Immunol. 143 (1989) 1745 - 1754. Tämä viittaa siihen, että B-solujen ak-

tivaatioon sisältyy pakollinen vuorovaikutus B-solujen ja Th-solujen pinnalla esiintyvien molekyylien kesken. T-solujen molekyyli(t) toimii(vat) tästä syystä T-solun solujen kosketuksesta riippuvaisten auttaja-efektoritoimintojen välikappaleena. Käsitystä solujen kosketuksesta riippuvaisesta vuorovaikutuksesta B-solujen ja T-solujen pinnalla olevien molekyylien kesken tukee lisäksi se havainto, että aktivoituneiden T-solujen eristetyt plasmamembraanit voivat tuottaa B-solujen aktivaatioon tarvittavia auttajatoimintoja. Brian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 564 - 568; Hodgkin, et al., J. Immunol. 145 (1990) 2025 - 2034; Noelle, et al., J. Immunol. 146 (1991) 1118 - 1124.

On tunnistettu molekyyli, CD40, joka esiintyy kypsymättömien ja kypsien B-lymfosyyttien pinnalla ja joka vasta-aineisiin silloitettuna käynnistää B-solujen lisääntymisen. Valle, et al., Eur. J. Immunol. 19 (1989) 1463 - 1467; Gordon, et al., J. Immunol. 140 (1988) 1425 - 1430; Gruber, et al., J. Immunol. 142 (1989) 4144 - 4152. CD40:tä vastaava DNA-molekyyli on kloonattu ja luonnehdittu. Stamenkovic, et al., EMBO J. 8 (1989) 1403 - 1410. CD40:n ligandia, gp39:ää (tästä käytetään myös nimitystä CD40:n ligandi eli CD40L) vastaava DNA-molekyyli on myös kloonattu ja luonnehdittu. Armitage, et al., Nature 357 (1992) 80 - 82; Lederman, et al., J. Exp. Med. 175 (1992) 1091 - 1101; Hollenbaugh, et al., EMBO J. 11 (1992) 4313 - 4319. gp39-proteiini ilmentyy aktivoitujen mutta ei lepovaiheessa olevien $CD4^{+}$Th-solujen pinnalla. Spriggs, et al., J. Exp. Med. 176 (1992) 1543 - 1550; Lane, et al., Eur. J. Immunol. 22 (1992) 2573 - 2578; Roy, et al., J. Immunol. 151 (1993) 1 - 14. Solut, joihin on transfektoitu gp39-geeni ja jotka ilmentävät pinnallaan gp39-proteiinia, voivat laukaista B-solujen lisääntymisen ja yhdessä muiden stimuloivien signaalien kanssa voivat käynnistää vasta-aineiden muodostumisen. Armitage, et al., Nature 357 (1992) 80 - 82; Hollenbaugh, et al., EMBO J. 11 (1992) 4313 - 4319.

Keksinnön yhteenveto

Solun pinnalla esiintyvät molekyylit, jotka toimivat T-solujen solujen kosketuksesta riippuvaisten auttaja-efektoritoimintojen välikappaleina, ovat tärkeitä sellaisten immuunivasteiden indusoimiselle, joissa tarvitaan T-solujen apua. Esimerkiksi T-solujen pinnalla esiintyvän gp39:n vuorovaikutuksella B-solujen pinnalla esiintyvän CD40:n kanssa on keskeinen osuus antigeeniä vastaan suunnattujen B-soluvasteiden aktivoimisessa. Tämä keksintö perustuu ainakin osaksi siihen löytöön, että T-solujen solujen kosketuksesta riippuvaisten auttaja-efektoritoimintojen välikappaleina toimivilla solun pinnan molekyyleillä on myös ratkaiseva osuus T-solujen vasteessa alloantigeenejä vastaan. Erityisesti on tehty se löytö, että kun gp39:n vuorovaikutus sellaisen allogeenisen solun pinnalla olevan ligandin kanssa, joka esittää alloantigeenejä T-solulle, estetään, niin tämä voi sopivissa olosuhteissa saada aikaan toleranssin T-solussa. T-solulle alloantigeenejä esittävältä solulta vaaditaan edullisesti sitä, että solun pinnalla olevan gp39:n ligandin ja T-solun pinnalla olevan gp39:n välinen vuorovaikutus kykenee tuottamaan T-solun aktivaatioon tarvittavia signaaleja. Kun allogeenisen solun pinnalla olevan gp39:n ligandin vuorovaikutus T-solun pinnalla olevan gp39:n kanssa estetään, niin tämä estää T-solun aktivaation ja saa pikemminkin aikaan alloantigeenispesifisen T-solun toleranssin. Tässä keksinnössä kuvatulla tavalla tehtävää T-solun toleranssin indusoimista alloantigeenejä vastaan voidaan käyttää valmistelevana hoito-ohjelmana kudosten tai elinten siirtoa varten.

Tämän mukaisesti keksintö koskee a) allogeenisen tai ksenogeenisen solun, joka ilmentää vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja jonka pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, ja b) gp39:n antagonistin käyttöä valmistettaessa yhdistettyä valmistetta samanaikaista, erillistä tai peräkkäistä käyttöä varten luovutta-

jan kudokseen tai elimeen kohdistuvan T-solutoleranssin indusoimiseksi tämän kudoksen tai elimen vastaanottajassa sillä edellytyksellä, että kun allogeeninen tai ksenogeeninen solu on allogeeninen solu, luovuttajan kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita, maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoa, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa tai suolta. Antagonisti estää T-solun pinnalla esiintyvän molekyylin ja tämän allogeenisen tai ksenogeenisen solun pinnalla sijaitsevan ligandin välisen vuorovaikutuksen.

Tämä keksintö koskee myös a) allogeenisen tai ksenogeenisen solun, joka ilmentää vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja jonka pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, ja b) gp39:n antagonistin, ja c) luovuttajan haiman solusaarekesolujen käyttöä valmistettaessa yhdistettyä valmistetta samanaikaista, erillistä tai peräkkäistä käyttöä varten diabeteksen hoidossa.

Lisäksi keksintö koskee a) luovuttaja-allogeenisen solun, joka ilmentää vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja jonka pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, ja b) gp39:ää vastaan suunnatun vasta-aineen käyttöä valmistettaessa yhdistettyä valmistetta samanaikaista, erillistä tai peräkkäistä käyttöä varten luovuttajan kudokseen tai elimeen kohdistuvan T-solutoleranssin indusoimiseksi tämän kudoksen tai elimen vastaanottajassa, jolloin luovuttaja-allogeeninen solu ja gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine annetaan vastaanottajalle ennen kudoksen tai elimen siirtoa, jolloin luovuttajan kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita, maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoa, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa tai suolta.

Vielä lisäksi tämä keksintö koskee gp39:n antagonistin käyttöä sellaisen valmisteen valmistamiseksi, joka on tarkoitettu luovuttajan kudokseen tai elimeen kohdistuvan T-solutoleranssin indusoimiseksi vastaanottajassa, joka tullaan altistamaan allogeenisille tai ksenogeenisille so-

luille, jotka ilmentävät vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja joiden pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, sillä edellytyksellä, että kun allogeeniset tai ksenogeeniset solut ovat allogeenisia soluja, luovuttajan kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita, maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoa, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa tai suolta.

Keksinnön mukaisesti antagonisti on molekyyli, joka estää T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n vuorovaikutuksen allogeenisen tai ksenogeenisen solun pinnalla esiintyvän gp39:n ligandin kanssa. Erityisen edullinen gp39:n antagonisti on gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine. Toisessa sovellutusmuodossa gp39:n antagonisti on gp39:n ligandin liukoinen muoto, esimerkiksi liukoinen CD40. Vastaanottajalle annettava allogeeninen tai ksenogeeninen solu on edullisesti lymfoidisolu, esimerkiksi B-solu. Vaihtoehtoisesti allogeeninen tai ksenogeeninen solu on pieni lepovaiheessa oleva B-solu. Vastaanottajana olevalle potilaalle annetaan allogeenistä tai ksenogeenistä solua ja antagonistia (esimerkiksi gp39:ää vastaan suunnattua vasta-ainetta) tyypillisesti ennen kudoksen tai elimen siirtoa vastaanottajaan. Esimerkiksi potilaalle annetaan luovuttajan kudoksesta tai elimestä peräisin olevia lymfoidisoluja (esimerkiksi B-soluja) yhdessä antagonistin kanssa ennen kudoksen tai elimen siirtoa vastaanottajaan.

Lyhyt kuvaus piirroksista

Kuvio 1 on graafinen esitys, joka kuvaa siirrettyjen haiman solusaarekeallografтien elinkykyä kemiallisin keinoin diabeettisiksi tehdyissä hiirissä, joita on käsitelty etukäteen pelkällä gp39:ää vastaan suunnatulla vasta-aineella tai joita on esikäsitelty pelkillä fraktioimattomilla tai fraktioiduilla allogeenisillä pernasoluilla.

Kuviot 2A ja 2B ovat graafisia esityksiä, jotka kuvaavat siirrettyjen haiman solusaarekeallografтien elinkykyä määritettynä veriplasman glukoosikonsentraation piene-

nemisenä kemiallisin keinoin diabeettisiksi tehdyissä hiirissä, joita on käsitelty etukäteen yhdellä annoksella fraktioituja allogeenisia pernasoluja yhdessä gp39:ää vastaan suunnatun vasta-aineen (MR1) kanssa käsittelyn ollessa joko kaksi viikkoa (osakuvio A) tai seitsemän viikkoa (osakuvio B). Kukin käyrä edustaa yksittäisestä hiirestä peräisin olevia koetuloksia. Avoimet symbolit merkitsevät vastaanottajia, jotka menettivät saarekeallograftin spontaanisti. Täytetyt symbolit esittävät hiiriä, joiden saarekesiirteet olivat toimintakykyisiä kokeiden päättyessä.

Kuviot 3 A, B ja C ovat virtaussytometrisia profiileja, jotka kuvaavat kuuden tunnin ajan aktivoitujen ihmisen periferaalisen veren lymfosyyttien värjäytymistä joko CD40Ig:llä (osakuvio A), mAb 4D9-8:lla (osakuvio B) tai mAb 4D9-9:lla (osakuvio C).

Kuviot 4 A, B ja C ovat virtaussytometrisiä profiileja, jotka kuvaavat kuuden tunnin ajan aktivoitujen ja syklosporiini A:n läsnä ollessa viljeltyjen ihmisen periferaalisen veren lymfosyyttien värjäytymistä mAb 4D9-8:lla (osakuvio A), mAb 4D9-9:llä (osakuvio B) tai CD40Ig:llä (osakuvio C).

Kuviot 5 A ja B ovat virtaussytometrisiä profiileja, jotka kuvaavat kuuden tunnin ajan aktivoitujen ihmisen periferaalisen veren lymfosyyttien värjäytymistä CD40Ig:lla leimalla varustamattoman mAb4D9-8:n (osakuvio A) tai leimalla varustamattoman mAb 4D9-9:n (osakuvio B) läsnä ollessa.

Kuvio 6 on graafinen esitys, joka esittää liukoisella gp39:llä ja IL4:llä indusoidun humaani-B-solun lisääntymisen inhibitiota viljeltäessä soluja humaani-gp39:ää vastaan suunnattujen mAb-molekyylien 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 tai 89-79 läsnä ollessa.

Kuvio 7 on graafinen esitys, joka esittää allospesifistä sekalymfosyyttiviljelmän (mixed lymphocyte response) inhibitiota viljeltäessä soluja humaani-gp39:ää vas-

taan suunnattujen mAb-molekyylien 24-31 tai 89-79:n läsnä ollessa.

Keksinnön yksityiskohtainen selitys

Tässä keksinnössä on kuvattu luovuttajan kudokseen tai elinsiirteeseen kohdistuvan T-solutoleranssin aikaansaamista siirteen vastaanottajassa in vivo -olosuhteissa. Tähän sisältyy a) allogeenisen tai ksenogeenisen solun, joka ilmentää vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja jonka pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, ja b) gp39:n antagonistin käyttö valmistettaessa yhdistettyä valmistetta samanaikaista, erillistä tai peräkkäistä käyttöä varten luovuttajan kudokseen tai elimeen kohdistuvan T-solutoleranssin indusoimiseksi tämän kudoksen tai elimen vastaanottajassa sillä edellytyksellä, että kun allogeeninen tai ksenogeeninen solu on allogeeninen solu, luovuttajan kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita, maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoa, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa tai suolta.

Tässä keksinnössä termi "vastaanottaja" tarkoittaa potilasta, jolle kudoksen tai elimen siirtoa ollaan parhaillaan suorittamassa tai tämä on jo suoritettu. Tässä keksinnössä "allogeeninen" solu on solu, joka tulee sen saman lajin eri yksilöltä kuin mihin vastaanottaja kuuluu ja joka ilmentää "alloantigeenejä", jotka poikkeavat vastaanottajan solujen ilmentämistä antigeeneistä. "Ksenogeeninen" solu tulee vastaanottajan eläinlajista poikkeavalta lajilta ja tämä ilmentää "ksenoantigeenejä", jotka poikkeavat vastaanottajan solujen ilmentämistä antigeeneistä. "Luovuttajan antigeenit" tarkoittavat tässä keksinnössä vastaanottajaan siirrettäväksi tarkoitetun luovuttajan kudoksen tai elinsiirteen ilmentämiä antigeenejä. Luovuttajan antigeenit voivat siirteen lähtömateriaalin mukaan olla alloantigeenejä tai ksenoantigeenejä. Vastaanottajalle osana siedätyshoito-ohjelmaa annettu alloantigeeninen tai ksenoantigeeninen solu ilmentää luovuttajan antigeenejä, toisin sanoen se

ilmentää joitakin tai kaikkia niitä samoja antigeenejä, joita luovuttajan siirrettävässä kudoksessa tai elimessä esiintyy. Allogeeninen tai ksenogeeninen solu tulee edullisesti kudoksen tai elinsiirteen luovuttajalta mutta tämä voi tulla yhdestä tai useammasta materiaalilähteestä, joilla on yhteisiä antigeenisiä determinantteja luovuttajan kanssa.

Osana siedätyshoito-ohjelmaa vastaanottajalle annetaan allogeenisen tai ksenogeenisen solun lisäksi sen T-solujen pinnalla olevan molekyylin antagonisteja, joka toimii solujen kosketuksesta riippuvaisten auttajaefektoritoimintojen välikappaleena. Tässä keksinnössä määritellyllä tavalla on molekyyli tai reseptori, joka toimii solujen kosketuksesta riippuvaisten auttaja-efektoritoimintojen välikappaleena, molekyyli, joka ilmentyy Th-solun pinnalla ja joka osallistuu itsensä ja efektorisolun (esimerkiksi B-solun) pinnalla olevan ligandin väliseen vuorovaikutukseen, jossa molekyylin vuorovaikutus ligandinsa kanssa on välttämätön efektorisoluvasteen (esimerkiksi B-solujen aktivaation) muodostumiselle. Sen lisäksi, että tällainen molekyyli osallistuu efektorisoluvasteisiin, on sen tai reseptorin havaittu tässä keksinnössä osallistuvan antigeeniä vastaan suunnattuun T-soluvasteeseen. Se T-solun pinnalla oleva molekyyli, joka toimii solujen kosketuksesta riippuvaisen auttaja-efektoritoiminnon välikappaleena, on gp39. Tämän mukaan tämän keksinnön mukaiset käytöt sisältävät edullisissa sovellutusmuodoissa sen, että siirteen vastaanottajalle annetaan allogeenista tai ksenogeenista solua ja gp39:n antagonistia. Allogeenisen tai ksenogeenisen solun aikaansaama vastaanottajan T-solujen aktivaatioon sisältyy vastaanottajan T-solujen pinnalla olevan gp39:n ja allogeenisen tai ksenogeenisen solun pinnalla olevan gp39:n ligandin välinen vuorovaikutus. Kun tämä vuorovaikutus gp39:n antagonistia käyttäen estetään, niin allogeenisen tai ksenogeenisen solun ilmentämät luovuttajan antigeenit eivät aktivoi vastaanottajan T-soluja vaan nämä tulevat pikemmin-

kin toleranteiksi luovuttajan antigeeneille. Kun vastaanottajassa saadaan muodostumaan toleranssi luovuttajan antigeenejä kohtaan, niin tämä tekee mahdolliseksi saavuttaa suotuisat tulokset luovuttajan kudoksen tai elimen siirrossa eikä immuunijärjestelmä hylji luovuttajan siirrettä.

Tämän keksinnön useat eri kohteet on kuvattu seuraavissa alakappaleissa.

I gp39:n antagonistit

Tämän keksinnön mukaisesti annetaan gp39:n antagonistia vastaanottajalle sen vuorovaikutuksen estämiseksi, joka tapahtuu vastaanottajan T-solujen pinnalla olevan gp39:n ja vastaanottajalle annettavan allogeenisen tai ksenogeenisen solun, kuten B-solun, pinnalla olevan gp39:n ligandin välillä. Gp39:n antagonisti määritellään molekyyliksi, joka estää tämän vuorovaikutuksen. gp39:n antagonisti voi olla gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine (esimerkiksi gp39:ää vastaan suunnattu monoklonaalinen vasta-aine), gp39:ää vastaan suunnatun vasta-aineen fragmentti tai johdannainen (esimerkiksi Fab- tai F(ab)'2-fragmentit, kimeeriset vasta-aineet tai humanisoidut vasta-aineet), gp39:n ligandin liukoiset muodot (esimerkiksi liukoinen CD40), gp39:n ligandin fuusioproteiinin liukoiset muodot (esimerkiksi liukoinen CD40Ig) tai farmaseuttiset aineet, jotka keskeyttävät gp39:n ja CD40:n välisen vuorovaikutuksen tai estävät sen.

A. Vasta-aineet

Nisäkäs (esimerkiksi hiiri, hamsteri tai kaniini) voidaan immunisoida gp39-proteiinin tai -proteiinifragmentin (esimerkiksi peptidifragmentin) immunogeenisella muodolla, mikä saa aikaan vasta-ainevasteen syntymisen nisäkkäässä. Immunogeeninä voidaan myös käyttää solua, joka ilmentää pinnallaan gp39:ää. Vaihtoehtoisia immunogeenejä ovat puhdistettu gp39-proteiini tai -proteiinifragmentit. gp39 voidaan puhdistaa gp39:ää ilmentävästä solusta tavallisilla puhdistusmenetelmillä. Lisäksi gp39:n cDNA:ta [Armitage, et al., Nature 357 (1992) 80 - 82; Lederman, et

al., J. Exp. Med. 175 (1992) 1091 - 1101; Hollenbaugh, et al., EMBO J. 11 (1992) 4313 - 4319] voidaan ilmentää isäntäsolussa, esimerkiksi bakteereissa tai nisäkässolulinjassa, ja gp39-proteiini voidaan puhdistaa soluviljelmistä tavanomaisin menetelmin. Vaihtoehtoisesti voidaan gp39-peptidejä syntetoida gp39:n aminohapposekvenssin [tämä on kuvattu julkaisuissa Armitage, et al., Nature 357 (1992) 80 - 82; Lederman, et al., J. Exp. Med. 175 (1992) 1091 - 1101; Hollenbaugh, et al., EMBO J. 11 (1992) 4313 - 4319] perusteella tunnettuja menetelmiä käyttäen (esimerkiksi syntetoimalla kemiallisesti F-moc-menetelmällä tai T-boc-menetelmällä). Menetelmiä proteiinin tekemiseksi immunogeeniseksi ovat menetelmät, joilla proteiineja konjugoidaan kantaja-aineisiin, tai muut tällä alalla tunnetut menetelmät. Proteiinia voidaan esimerkiksi antaa adjuvantin läsnä ollessa. Immunisoitumisen edistymistä voidaan seurata havaitsemalla vasta-ainetiittereitä veriplasmasta tai seerumista. Vasta-ainepitoisuuksien määrittämiseen voidaan käyttää tavallista ELISA-määritystä tai jotakin muuta immunomääritystä, jossa antigeenina käytetään immunogeeniä.

Immunisoinnin jälkeen voidaan saada antiseerumeja, ja seerumista voidaan haluttaessa eristää polyklonaalisia vasta-aineita. Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi voidaan vasta-ainetta tuottavia soluja (lymfosyyttejä) ottaa talteen immunisoidusta eläimestä ja nämä voidaan fuusioida myeloomasoluihin tavanomaisilla somaattisten solujen fuusiointimenetelmillä, mikä siten tekee nämä solut jatkuvasti kasvaviksi ja näistä saadaan hybridoomasoluja. Nämä menetelmät ovat tällä alalla tunnettuja. Esimerkkejä näistä ovat alun perin Kohlerin ja Milsteinin kehittämä hybridoomamenetelmä [Nature 256 (1975) 495 - 497] sekä muut menetelmät, kuten humaani-B-soluhybridoomamenetelmä [Kozbar, et al., Immunol. Today 4 (1983) 72], monoklonaalisten humaani-vasta-aineiden valmistamiseen käytettävä EBV-hybridoomamenetelmä [Cole, et al., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) (Allen R. Bliss, Inc., s. 77 - 96] ja

kombinatoriaalisten vasta-ainekirjastojen seulonta [Huse, et al., Science 246 (1989) 1275]. Hybridoomasoluista voidaan seuloa immunokemiallisesti esiin proteiinin tai peptidin kanssa spesifisesti reagoivia vasta-aineita tuottavat solut ja näistä voidaaan eristää monoklonaalisia vasta-aineita.

Termiin vasta-aine on tässä keksinnössä tarkoitettu sisältyvän tämän fragmentit, jotka reagoivat spesifisesti gp39-proteiinin tai tästä peräisin olevan peptidin kanssa tai gp39-fuusioproteiinin kanssa. Vasta-aineita voidaan fragmentoida tavanomaisin menetelmin ja fragmenteille voidaan suorittaa seulonta samalla tavoin kuin mitä edellä oli kuvattu kokonaisten vasta-aineiden kyseessä ollessa. Esimerkiksi $F(ab')_2$-fragmentteja voidaan valmistaa käsittelemällä vasta-ainetta pepsiinillä. Tulokseksi saatua $F(ab')_2$-fragmenttia voidaan käsitellä niin, että disulfidisillat pelkistyvät, mistä saadaan Fab'-fragmentteja. Tarkoituksena on lisäksi se, että tämän keksinnön mukainen vasta-aine sisältää gp39:ää vastaan suunnatun osan sisältäviä bispesifisiä ja kimeerisiä molekyylejä.

Kun ihmisissä käytetään terapeuttisiin tarkoituksiin vasta-aineita, joita on valmistettu sellaisten eläinlajien yksilöissä, jotka eivät kuulu ihmislajiin, niin ihmisen elimistö tunnistaa ne vaihtelevassa määrin vieraiksi ja potilaassa voi syntyä immuunivaste. Yksi yleistä immuunisupressiota edullisempi lähestymistapa tämän ongelman vähentämiseksi tai poistamiseksi on valmistaa kimeerisiä vasta-ainejohdannaisia, toisin sanoen vasta-ainemolekyylejä, jossa eläimestä peräisin oleva ei-humaani vaihteleva alue on yhdistetty ihmisen muuttumattomaan alueeseen. Kimeeriset vasta-ainemolekyylit voivat sisältää esimerkiksi hiiren, rotan tai jonkin muun lajin vasta-aineesta peräisin olevan antigeenia sitovan domeenin ja ihmisen muuttumattomat alueet. Kimeeristen vasta-aineiden valmistamiseksi on kuvattu useita erilaisia lähestymistapoja, joita voidaan käyttää sellaisten kimeeristen vasta-aineiden valmistami-

seen, jotka sisältävät gp39:n tunnistavan immunoglobuliinin vaihtelevan alueen. Tätä kysymystä on käsitelty esimerkiksi julkaisuissa Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1985) 6851; Takeda, et al., Nature 314 (1985) 452; Cabilly, et al., US-patenttijulkaisu nro 4 816 567; Boss, et al., US-patenttijulkaisu nro 4 816 397; Tanaguchi, et al., EP-patenttijulkaisu 171 496; EP-patenttijulkaisu 173 494, GB-patenttijulkaisu 2 177 096B. Tällaisten kimeeristen vasta-aineiden odotetaan olevan potilaassa vähemmän immunogeenisiä kuin vastaavan ei-kimeerisen vasta-aineen.

gp39-proteiinin tai peptidin kanssa spesifisesti reagoivat monoklonaaliset tai kimeeriset vasta-aineet voidaan terapeuttisiin tarkoituksiin ihmisille vielä lisäksi humanisoida valmistamalla ihmisen vaihtelevan alueen sisältäviä kimeeroita, joissa osia vaihtelevista alueista, erityisesti vasta-ainetta sitovan domeenin kehys (framework) -alueet, ovat peräisin ihmiseltä ja ainoastaan runsaasti vaihtelevat alueet ovat peräisin muista eläinlajeista kuin ihmislajista. Tällaisia muunnettuja immunoglobuliinimolekyylejä voidaan valmistaa millä tahansa tällä alalla tunnetuista useista menetelmistä [esimerkiksi Teng, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 (1983) 7308 - 7312; Kozbor, et al., Immunology Today 4 (1983) 7279; Olsson, et al., Meth. Enzymol. 92 (1982) 3 - 16], ja niitä valmistetaan edullisesti PCT-julkaisuissa W092/06 193 tai EP 0 239 401 kuvattujen ohjeiden mukaisesti. Humanisoidut vasta-aineet voivat olla kaupallisesti valmistettuja ja näitä tuottavat esimerkiksi yhtiö Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Iso-Britannia.

Vielä yksi menetelmä gp39-proteiinia tai -peptidiä vastaan reagointikykyisten spesifisten vasta-aineiden tai vasta-ainefragmenttien valmistamiseksi on seuloa gp39-proteiinilla tai -peptidillä immunoglobuliinigeenejä tai näiden osia koodaavia bakteereissa ilmennettyjä ilmentämiskirjastoja. Esimerkiksi täydellisiä Fab-fragmentteja, VH-alueita ja FV-alueita voidaan ilmentää bakteereissa käyttä-

en faagi-ilmentämiskirjastoja. Näitä kysymyksiä on käsitelty esimerkiksi julkaisuissa Ward, et al., Nature 341 (1989) 544 - 546; Huse, et al., Science 246 (1989) 1275 - 1281 ja McCafferty, et al., Nature 348 (1990) 552 - 554. Kun tällaisia kirjastoja seulotaan esimerkiksi gp39-peptidillä, voidaan tunnistaa gp39:n kanssa reagoivia immunoglobuliinifragmentteja. Vaihtoehtoisesti voidaan vasta-aineiden tai näiden fragmenttien valmistamiseen käyttää SCID-hu-hiirtä (tämä on saatavilla yhtiöstä Genpharm).

Esimerkissä 2 kuvataan yksityiskohtaisesti menetelmiä sellaisten gp39:ää, mukaan lukien humaani-gp39:ää ja muriini-gp39:ää, vastaan suunnattujen monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi, joita on tarkoitus käyttää tämän keksinnön mukaisesti.

Tämän keksinnön mukaiset monoklonaaliset humaani-gp39:ää vastaan suunnatut vasta-aineet ovat edullisia käytettäväksi antigeenispesifisen T-solutoleranssin aikaansaamiseen. Edullisia vasta-aineita ovat esimerkissä 2 kuvatut monoklonaaliset vasta-aineet 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 ja 89-79. Erityisen edullisia vasta-aineita ovat monoklonaaliset vasta-aineet 89-76 ja 24-31. 89-76- ja 24-31-vasta-aineita tuottavat 89-76- ja 24-31-hybridoomat talletettiin 2.9.1994 kumpikin erikseen Budapestin sopimuksen ehtojen mukaisesti talletuslaitokseen American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, MD. 89-76-hybridoomalle annettiin ATCC:n hakunumero HB11713 ja 24-31-hybridoomalle annettiin ATCC:n hakunumero HB11712. 24-31- ja 89-76-vasta-aineet ovat IgG1-isotyyppiä.

Vielä yhdessä sovellutusmuodossa tämän keksinnön mukaisiin käyttöihin tarkoitettu humaani-gp39:ää vastaan suunnattu mAb sitoo monoklonaalisten vasta-aineiden 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 tai 89-79 tunnistamaa epitooppia. Humaani-gp39:ää vastaan suunnattu mAb sitoo edullisemmin monoklonaalisen vasta-aineen 24-31 tai monoklonaalisen vasta-aineen 89-76 tunnistamia epitooppeja. mAb:n kyky sitoa minkä tahansa edellä mainituista vasta-

aineista tunnistamaa epitooppia voidaan määrittää tavanomaisin ristikkäisin kompetitiomäärityksin. Esimerkiksi vasta-aine, joka sitoo samaa epitooppia kuin minkä mAb 24-31 tunnistaa, kilpailee leimalla varustetun 24-31:n kanssa sitoutumisesta aktivoituihin T-soluihin, kun taas vasta-aine, joka sitoutuu eri epitooppiin kuin minkä mAb 24-31 tunnistaa, ei kilpaile leimalla varustetun 24-31:n sitoutumisesta aktivoituihin T-soluihin.

B. gp39:n liukoiset ligandit

Muita gp39:n antagonisteja, joita voidaan antaa T-solutoleranssin aikaansaamiseksi, ovat gp39:n ligandin liukoiset muodot. gp39:n monovalenttinen liukoinen ligandi, kuten liukoinen CD40, voi sitoutua gp39:ään, mikä tämän vaikutuksesta estää gp39:n vuorovaikutuksen CD40:n kanssa. Termi "liukoinen" viittaa siihen, että ligandi ei assosioidu pysyvästi solumembraaniin. gp39:n liukoista ligandia voidaan valmistaa syntetoimalla se kemiallisesti tai edullisesti käyttäen yhdistelmä-DNA-menetelmiä esimerkiksi ilmentämällä ainoastaan solunulkoista domeenia (tästä puuttuvat transmembraanidomeeni ja sytoplasminen domeeni). Edullinen gp39:n liukoinen ligandi on liukoinen CD40. Vaihtoehtoisesti voi gp39:n liukoinen ligandi olla fuusioproteiinin muodossa. Tällainen fuusioproteiini sisältää vähintään osan gp39:n ligandista toiseen molekyyliin kiinnittyneenä. CD40:ää voidaan esimerkiksi ilmentää fuusioproteiinina immunoglobuliinin kanssa (toisin sanoen CD40Ig-fuusioproteiinina). Edullisessa sovellutusmuodossa valmistetaan fuusioproteiini, joka sisältää CD40:n solunulkoisen domeeniosan aminohapporyhmät liitettynä immunoglobuliinin raskaan ketjun, esimerkiksi Cγ1:n, sarana-, CH2- ja CH3-alueita vastaavan sekvenssin aminohapporyhmiin CD40Ig-fuusioproteiinin muodostamiseksi [tätä kysymystä on käsitelty esimerkiksi julkaisuissa Linsley, et al., J. Exp. Med. 1783 (1991) 721 - 730; Capon, et al., Nature 337 (1989) 525 - 531; ja Capon, julkaisu US 5 116 964]. Fuusioproteiinia voidaan valmistaa syntetoimalla sitä kemiallisesti tai

edullisesti CD40:n cDNA:han perustuvilla yhdistelmä-DNA-menetelmillä [Stamenkovic, et al., EMBO J. 8 (1989) 1403 - 1410].

II Antigeenispesifisen toleranssin indusoimiseen soveltuvat solut

Tämä keksintö perustuu ainakin osaksi siihen havaintoon, että kun allogeeniset solut esittävät alloantigeenejä T-soluille gp39:n antagonistin läsnä ollessa, niin tuloksena on alloantigeenejä vastaan suunnattu T-solutoleranssi. Soluja, jotka kykenevät saamaan aikaan toleranssin tällä mekanismilla ovat solut, jotka esittävät antigeeniä ja aktivoivat T-soluja gp39:n kanssa tapahtuvan vuorovaikutuksen perusteella (toisin sanoen T-solujen pinnalla olevan gp39:n ja antigeeniä esittävän solun pinnalla olevan gp39:n ligandin välinen vuorovaikutus on välttämätön asiaankuuluvien T-soluaktivaatiosignaalien saattamiseksi T-soluun). Kun allogeenisen tai ksenogeenisen solun pinnalla olevan ligandin vuorovaikutus vastaanottajan T-solujen pinnalla olevan gp39:n kanssa estetään, niin tämä estää allo- tai ksenoantigeenien aiheuttaman T-solujen aktivaation ja pikemminkin indusoi T-solutoleranssin näitä antigeenejä kohtaan. Kun gp39:n välityksellä tapahtuva T-solun aktivaatio estetään, niin tämä voi estää apustimulaatiomolekyylien (esimerkiksi B-solun pinnalla oleva B7-ryhmän molekyylien) muodostumisen käynnistymisen allogeenisen tai ksenogeenisen solun pinnalla, niin että solu lähettää T-solulle antigeenisen signaalin ilman apustimulaatiosignaalia, mikä siten saa aikaan toleranssin.

Tämän mukaan tämän keksinnön mukaisissa käytöissä vastaanottajalle annetaan allogeenistä tai ksenogeenistä solua. Allogeeninen tai ksenogeeninen solu kykenee esittämään antigeenin vastaanottajan T-soluille ja se on esimerkiksi B-lymfosyytti, "ammattimainen" antigeeniä esittävä solu (esimerkiksi monosyytti, dendriittisolu, Langerhansin solu) tai jokin muu sellainen solu, joka esittää antigeenin immuunijärjestelmän soluille (näitä ovat esimerkiksi kera-

tinosyytti, endoteelisolu, astrosyytti, fibroblasti, oligodendrosyytti). Lisäksi on edullista, että allogeenisen tai ksenogeenisen solun kyky stimuloida apustimulaatiosignaalin muodostumista vastaanottajan T-soluissa on normaalia pienempi. Esimerkiksi allogeenisesta tai ksenogeenisesta solusta voi puuttua kyky ilmentää apustimulaatiomolekyylejä, kuten B7-proteiiniryhmää (esimerkiksi B7-1 ja B7-2), tai näiden ilmentyminen voi olla hyvin vähäistä. Apustimulaatiomolekyylien ilmentyminen niiden potentiaalisten allogeenisten tai ksenogeenisten solujen pinnalla, joita on määrä käyttää tämän keksinnön mukaisesti, voidaan määrittää vakiomenetelmin, kuten esimerkiksi virtaussytometrian avulla apustimulaatiomolekyylejä vastaan suunnattuja vasta-aineita käyttäen.

Edullisia allogeenisia tai ksenogeenisia soluja T-solutoleranssin aikaansaamiseksi ovat lymfoidisolut, esimerkiksi periferaalisen veren lymfosyytit tai pernan solut. Edullisia T-solutoleranssin aikaansaamiseen soveltuvia lymfoidisoluja ovat B-solut. B-soluja voidaan puhdistaa solujen sekapopulaatiosta (esimerkiksi periferaalisessa veressä tai pernassa esiintyvistä muista solutyypeistä) käyttämällä normaaleja solujen erotusmenetelmiä. Esimerkiksi kiinnittyvät solut voidaan poistaa viljelemällä pernasoluja muovimaljoilla ja ottamalla talteen maljoihin kiinnittymättä jäävä solupopulaatio. T-solut voidaan poistaa solujen sekapopulaatioista käsittelemällä niitä tätä T-solua vastaan suunnatulla vasta-aineella (esimerkiksi anti-Thy1.1:llä ja/tai anti-Thy1.2:lla) ja komplementilla. Yhdessä sovellutusmuodossa antigeeniä esittävinä soluina käytetään lepovaiheessa olevia lymfoidisoluja, esimerkiksi lepovaiheessa olevia B-soluja. Lepovaiheessa olevia lymfoidisoluja, kuten lepovaiheessa olevia B-soluja, voidaan eristää tällä alalla tunnetuin menetelmin esimerkiksi niiden pienen koon ja tiheyden perusteella. Lepovaiheessa olevia lymfoidisoluja voidaan eristää esimerkiksi vastavirtasentrifugointiin perustuvalla elutriaatiolla esimerkissä 1 kuvatulla tavalla.

Vastavirtasentrifugointiin perustuvaa elutriaatiota käyttäen voidaan saada talteen lepovaiheessa olevien pienien lymfoidisolujen populaatio, josta T-soluvasteita aktivoivat solut on on poistettu, ottamalla talteen virtausnopeuden 4 - 19 ml/min kohdalla ja edullisesti 19 ml/min kohdalla (nopeudella 3200 kierrosta minuutissa) oleva(t) fraktio(t). Vaihtoehtoisesti voidaan pieniä lepovaiheessa olevia lymfosyyttejä (esimerkiksi B-soluja) eristää askeltiheysgradienttisentrifugoinnilla, esimerkiksi käyttäen Ficoll- tai Percoll-gradienttia, ja lepovaiheessa olevia pieniä lymfosyyttejä sisältävä kerros voidaan ottaa talteen sentrifugoinnin jälkeen. Pienet lepovaiheessa olevat B-solut voidaan myös erottaa aktivoiduista B-soluista määrittämällä aktivoitujen B-solujen pinnalla esiintyvien apustimulaatiomolekyylien, kuten B7-1:n ja/tai B7-2:n, ilmentyminen tavallisia menetelmiä (esimerkiksi immunofluoresenssia) käyttäen.

Vastaanottajalle annetut allogeeniset tai ksenogeeniset solut toimivat ainakin osaksi siten, että ne esittävät luovuttajan antigeenejä T-soluille. Nämä solut ilmentävät siten antigeenejä, joita myös luovuttajan kudos tai elin ilmentää. Tämä voidaan saada aikaan tyypillisesti käyttämällä luovuttajan kudoksesta tai elinsiirteestä saatuja allogeenisia tai ksenogeenisia soluja. Voidaan esimerkiksi eristää luovutettavasta kudoksesta tai elimestä peräisin olevia periferaalisen veren lymfoidisoluja, B-soluja tai pernasoluja, joita voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisissa käytöissä. Allogeenisiä tai ksenogeenisiä soluja voidaan vaihtoehtoisesti hankkia käyttöön jostakin muusta materiaalilähteestä kuin kudoksen tai elimen luovuttajalta sikäli kuin näissä soluissa on kudoksen tai elimen luovuttajan kanssa yhteisiä antigeenisiä determinantteja. Voidaan esimerkiksi käyttää sellaisia allogeenisia tai ksenogeenisia soluja, jotka ilmentävät niitä (useimpia tai kaikkia) samoja MHC-kompleksin antigeenejä kuin mitä luovuttajan kudos tai elin ilmentää. Siten voidaan käyttää sellaisista

materiaalilähteistä peräisin olevia allogeenisia tai ksenogeenisia soluja, joiden MHC-haplotyyppi on määritetty yhteensopivaksi kudoksen tai elimen luovuttajan (tämä on esimerkiksi siirteen luovuttajan läheinen sukulainen) suhteen.

III Solujen ja gp39:n antagonistien antaminen

T-solutoleranssi elintä tai kudossiirrettä kohtaan voidaan saada aikaan tämän keksinnön mukaisesti antamalla siirteen vastaanottajalle gp39:n antagonistia sekä sellaista allogeenistä tai ksenogeenistä solua, joka ilmentää luovuttajan antigeenejä ja osallistuu gp39:n välityksellä vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solujen kanssa. Edullisessa sovellutusmuodossa vastaanottajalle annetaan samalla kertaa tai yhtäaikaisesti allogeenistä tai ksenogeenistä solua ja gp39:n antagonistia. Vaihtoehtoisesti voidaan gp39:n antagonistia antaa ennen allogeenisten tai ksenogeenisten solujen antamista, esimerkiksi silloin kun antagonisti on vasta-aine, jonka puoliintumisaika on pitkä. Antagonistia ja allogeenisiä tai ksenogeenisiä soluja annetaan edullisessa sovellutusmuodossa vastaanottajalle ennen elimen tai kudoksen siirtoa vastaanottajaan (toisin sanoen vastaanottajalle suoritetaan esikäsittely antagonistilla ja soluilla). Esimerkiksi allogeenisiä tai ksenogeenisiä soluja ja antagonistia voidaan antaa useita päiviä (esimerkiksi viidestä kahdeksaan päivää) ennen kudoksen tai elimen siirtoa.

Yhden allogeenisten solujen annoksen antamisen (antagonistiin yhdistettynä) on havaittu riittävän luovuttajan kudokseen tai elimeen kohdistuvan T-solutoleranssin aikaansaamiselle (ks. esimerkki 1). Annettu solumäärä voi olla eri suuruinen käytetyn solutyypin, kudos- tai elinsiirretyypin, vastaanottajan painon, vastaanottajan yleisen terveydentilan ja muiden alan ammattikokemuksen perusteella tunnettujen muuttujien mukaan. Tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi soveltuva sopiva solujen lukumäärä voidaan määrittää alan ammattikokemuksen perusteella millä tahansa tavanomaisella menetelmällä (esimerkiksi esimerkissä 1 kuvatulla tavalla). Solut annetaan sellaisessa muodossa ja

käyttäen sellaista antotietä, joka soveltuu T-solutoleranssin aikaansaamiseen vastaanottajassa. Solut voidaan antaa fysiologisesti hyväksyttävässä liuoksessa, kuten puskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa tai tätä vastaavassa kantaja-aineessa. Solut annetaan edullisesti suonensisäisesti.

Tämän keksinnön mukaisesti antagonistia annetaan T-solutoleranssin aikaansaamiseksi potilaalle in vivo -olosuhteissa tapahtuvaan farmaseuttisen aineen annosteluun soveltuvassa biologisesti yhteensopivassa muodossa. Termi "in vivo -olosuhteissa tapahtuvaan annosteluun soveltuva biologisesti yhteensopiva muoto" tarkoittaa annettavan antagonistin muotoa, jossa yhdisteen terapeuttiset vaikutukset ovat mahdollisia toksisia vaikutuksia suuremmat. Termin potilas piiriin on tarkoituksena kuulua elävät organismit, esimerkiksi nisäkkäät, joissa immuunivaste voidaan saada syntymään. Esimerkkejä potilaista ovat ihmiset, koirat, kissat, hiiret, rotat ja näiden transgeeniset muodot. gp39:n antagonistia voidaan annostella missä tahansa farmakologisessa muodossa mahdollisesti farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen kanssa. Annettavan antagonistin terapeuttisesti aktiiviseksi määräksi määritellään halutun tuloksen (esimerkiksi T-solutoleranssin) tuottava määrä tähän tarvittavia annostuksia ja antamisen kestoa käyttäen. Terapeuttisesti aktiivinen määrä gp39:n antagonistia voi esimerkiksi olla eri suuruinen sellaisten tekijöiden mukaan, joita ovat sairauden vaihe, potilaan ikä, sukupuoli ja paino ja antagonistin kyky saada aikaan haluttu vaste potilaassa. Annostuksessa käytettäviä hoito-ohjelmia voidaan tarkentaa optimaalisen terapeuttisen vasteen aikaansaamiseksi. Voidaan esimerkiksi antaa päivittäin useita osa-annoksia tai annosta voidaan pienentää vastaavassa suhteessa hoitotilanteen vaatimusten osoittamalla tavalla. Kuten esimerkissä 1 anti-gp39-vasta-aineella suoritettavan käsittelyn kyseessä ollessa on kuvattu, voi tehokas hoito-ohjelma sisältää sen, että vasta-ainetta ryhdytään antamaan

ennen kudoksen tai elimen siirtoa (esimerkiksi viidestä kahdeksaan päivää ennen siirtoa), minkä jälkeen vasta-ainetta annetaan uudelleen (esimerkiksi joka toinen päivä) useiden viikkojen ajan (esimerkiksi kahdesta seitsemään viikkoon) siirron suorittamisesta.

Aktiivista yhdistettä (esimerkiksi antagonistia, kuten vasta-ainetta) voidaan antaa sopivalla tavalla, kuten käyttämällä injektiota (ihonalaista injektiota, suonensisäistä injektiota ja muita näitä vastaavia injektioita), antamalla yhdistettä oraalisesti, inhalaation muodossa, levittämällä transdermaalisesti tai antamalla sitä rektaalisesti. Aktiivinen yhdiste voidaan annostelutien mukaan päällystää jollakin materiaalilla yhdisteen suojaamiseksi entsyymien, happojen ja muiden luonnollisten olosuhteiden vaikutukselta, jotka voivat inaktivoida yhdisteen. Edullinen annostelutie on käyttää suonensisäistä injektiota.

gp39:n antagonistin annostelemiseksi käyttämällä jotakin muuta annostelutietä kuin parenteraalista antamista voi olla tarpeellista päällystää antagonisti sen inaktivoitumisen estävällä materiaalilla tai antaa antagonistia yhtä aikaa sen inaktivoitumisen estävän materiaalin kanssa. Antagonistia voidaan esimerkiksi antaa potilaalle sopivassa kantaja-aineessa tai laimentimessa, minkä yhteydessä annetaan samalla entsyymi-inhibiittoreita, tai se voi olla valmistettuna sopivaan kantaja-aineeseen, kuten liposomeihin. Farmaseuttisesti hyväksyttäviä laimentimia ovat fysiologinen suolaliuos ja vesipitoiset puskuriliuokset. Entsyymi-inhibiittoreja ovat haiman trypsiini-inhibiittori, di-isopropyylifluorifosfaatti (DEP) ja trasyloli. Liposomeja ovat vesi-öljy-vesi-emulsiot sekä tavanomaiset liposomit [Strejan, et al., J. Neuroimmunol. 7, 27).

Aktiivista yhdistettä voidaan myös antaa parenteraalisesti tai intraperitoneaalisesti. Dispersioita voidaan myös valmistaa glyseroliin, nestemäisiin polyetyleeniglykoleihin ja näiden seoksiin ja öljyihin. Tavallisissa varastointi- ja käyttöolosuhteissa nämä valmisteet voivat sisäl-

tää mikro-organismien kasvun ehkäisemiseen tarkoitettua säilyteainetta.

Injektiokäyttöön soveltuvia farmaseuttisia koostumuksia ovat steriilit vesipitoiset liuokset (materiaalien ollessa vesiliukoisia) tai dispersioita ja steriilejä jauheita steriilien injektioliuosten tai dispersion valmistamiseksi ex tempore -menetelmällä. Kaikissa tapauksissa koostumuksen on oltava steriili ja sen täytyy olla siinä määrin juoksevaa, että sen käsittely ruiskun avulla on vaivatonta. Sen on oltava valmistus- ja varastointiolosuhteissa stabiili ja siinä on käytettävä säilyteaineita mikro-organismien, kuten bakteerien ja sienten, kontaminoivaa vaikutusta vastaan. Kantaja-aine voi olla liuotin tai dispergointimedium, joka sisältää esimerkiksi vettä, etanolia, polyolia (esimerkiksi glyserolia, propyleeniglykolia ja nestemäistä polyetyleeniglykolia tai jotakin muuta näitä vastaavaa materiaalia) ja näiden sopivia seoksia. Juoksevuus voidaan pitää sopivana esimerkiksi käyttämällä päällystettä, kuten lesitiiniä, säilyttämällä vaadittu partikkelikoko dispersion kyseessä ollessa ja käyttämällä pinta-aktiivisia aineita. Mikro-organismien vaikutuksen ehkäisemiseen voidaan käyttää useita erilaisia antibakteriaalisia ja antifungaalisia aineita, esimerkiksi parabeneja, kloributanolia, fenolia, askorbiinihappoa, timerosaalia ja muita näitä vastaavia materiaaleja. Monissa tapauksissa on edullista lisätä koostumuksiin isotonisia aineita, esimerkiksi sokereita, polyalkoholeja, kuten mannitolia, sorbitolia ja natriumkloridia. Injektiokoostumukset voidaan saada absorboitumaan pitkän ajan kuluessa käyttämällä absorptiota viivästävää ainetta, esimerkiksi aluminiummonostearaattia ja gelatiinia.

Steriilejä injektioliuoksia voidaan valmistaa lisäämällä tarvittava määrä aktiivista yhdistettä (esimerkiksi gp39:n antagonistia) sopivaan liuottimeen yhdessä edellä luetellun ainesosan tai ainesosien yhdistelmän kanssa sen mukaan, millaista on tarpeellista käyttää, minkä jälkeen

materiaali steriilisuodatetaan. Dispersiot valmistetaan tavallisesti lisäämällä aktiivinen yhdiste steriiliin kantaja-aineeseen, joka sisältää perusdipergointimediumia ja edellä esitetystä luettelosta peräisin olevia muita haluttuja ainesosia. Sellaisten steriilien jauheiden kyseessä ollessa, jotka on tarkoitettu steriilien injektioliuosten valmistamiseen, ovat edullisia menetelmiä vakuumikuivaus ja ilmakuivaus, joista saadaan jauhetta, joka sisältää aktiivista ainesosaa (esimerkiksi antagonistia) sekä mitä tahansa muuta haluttua ainesosaa, joka on tehty tämän etukäteen steriilisuodatetusta liuoksesta.

Kun aktiivinen yhdiste on suojattu sopivalla tavalla edellä olevan kuvauksen mukaisesti, niin proteiinia voidaan antaa oraalisesti, esimerkiksi käyttäen inerttiä laimenninta tai elimistössä sulavaa syötäväksi kelpaavaa kantaja-ainetta. Tässä keksinnössä "farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja-aine" sisältää kaikenlaiset liuottimet, dispergointiaineet, päällysteet, antibakteriaaliset ja antifungaaliset aineet, isotoniset ja absorptiota pitkittävät aineet ja muut näitä vastaavat aineet. Tällaisten mediumien ja aineiden käyttö farmaseuttisesti aktiivisten aineiden valmistamiseen on tällä alalla tunnettua. Lukuun ottamatta sitä tilannetta, että jokin tavanomainen medium tai aine ei ole yhteensopiva aktiivisen yhdisteen kanssa, niin näitä ajatellaan käytettäväksi terapeuttisissa koostumuksissa. Koostumuksiin voidaan myös lisätä vaikutukseltaan täydentäviä aktiivisia yhdisteitä.

On erityisen edullista formuloida parenteraalisesti käytettävät koostumukset kerta-annoksen muotoon, jotta ne ovat vaikeuksitta annettavissa ja jotta niiden annoksesta saadaan yhdenmukainen. Tässä keksinnössä tarkoittaa kerta-annoslääkemuoto fysikaalisesti erillisiä annoksia, jotka soveltuvat kerta-annoksiksi hoidettaville nisäkkäisiin kuuluville potilaille; kukin kerta-annos sisältää ennakolta määrätyn määrän aktiivista yhdistettä, jonka on laskettu tuottavan halutun terapeuttisen vaikutuksen vaadittuun far-

maseuttiseen kantaja-aineeseen yhdistettynä. Tämän keksinnön mukaisten kerta-annoslääkemuotojen koostumus määräytyy ja on suoraan riippuvainen (a) aktiivisen yhdisteen ainutlaatuisista ominaisuuksista ja aikaansaatavasta tietystä nimenomaisesta terapeuttisesta vaikutuksesta, ja (b) yhdisteiden valmistamisen alalla luontaisista rajoituksista tällaisen potilaiden herkkyyden hoitamiseen tarkoitetun aktiivisen yhdisteen yhdistämisessä muihin materiaaleihin.

Tässä keksinnössä kuvatun siedätyshoito-ohjelman jälkeen tai tämän ohjelman kuluessa siirretään luovuttajan kudos tai elin tavanomaisin menetelmin siirteen vastaanottajaan.

IV Tämän keksinnön käyttömuodot

Tämän keksinnön mukaiset käytöt ovat sovellettavissa suureen määrään useita erilaisia kudossiirto- ja elinsiirtotilanteita. Keksintöä voidaan käyttää T-solutoleranssin aikaansaamiseen tai kudos- tai elinsiirteen, kuten haiman solusaarekkeiden, maksan, munuaisen, sydämen, keuhkojen, ihon, lihaksen, hermokudoksen, mahan ja suolen, vastaanottajassa. Tätä keksintöä voidaan siten käyttää sellaisten sairauksien tai tilojen hoidoissa, joihin liittyy kudoksen tai elimen siirto (esimerkiksi maksan siirto hyperkolesterolemian hoitamiseksi, lihassolujen siirto lihasdystrofian hoitamiseksi, hermokudoksen siirto Huntingtonin taudin tai Parkinsonin taudin hoitamiseksi, ja muiden näitä vastaavien tautien hoitamiseksi). Edullisessa sovellutusmuodossa siirrettävä kudos sisältää haiman solusaarekkeita. Tämän mukaisesti tämä keksintö kattaa haiman solusaarekkeiden käyttöön perustuvan yhdistetyn valmisteen valmistamisen diabeteksen hoitoon. Tämä käyttö sisältää sen, että 1) allogeenisiä tai ksenogeenisiä soluja, jotka ilmentävät luovuttajan antigeenejä, 2) vastaanottajan T-solujen pinnalla ilmentyvän sellaisen molekyylin antagonistia, kuten gp39:n antagonistia (esimerkiksi gp39:ää vastaan suunnattua vasta-ainetta), joka toimii solujen kosketuksesta riippuvaisen auttaja-efektoritoiminnon välikappaleena, ja 3) luovuttajan

haiman solusaarekkeita käytetään valmistettaessa sellaista yhdistettyä valmistetta, joka on tarkoitettu diabeteksen hoitoon. Allogeenisia tai ksenogeenisia soluja ja antagonisteja sisältävää valmistetta on edullista antaa vastaanottajalle ennen haiman solusaarekkeen antamista.

Tätä keksintöä kuvataan lisäksi seuraavan esimerkin avulla, jonka ei ole katsottava rajoittavan tätä keksintöä. Kaikkien tässä patenttihakemusjulkaisussa siteerattujen kirjallisuusviitteiden, patenttijulkaisujen ja patenttihakemusjulkaisujen sisältö on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

Esimerkki 1

Haiman solusaarekeallografteja vastaan suunnatun toleranssin indusointi käsittelemällä vastaanottajaa allogeenisilla soluilla ja anti-gp39:llä

Nykyiset allotrasplantaatiotutkimukset perustuvat yleiseen immunosupressioon, joka heikentää immuuniefektoritoimintoja epäspesifisesti. Immunosupressiiviset farmaseuttiset aineet voivat kuitenkin saada aikaan merkittäviä sivuvaikutuksia. On lisäksi osoitettu, ettei tällä ratkaisutavalla saada tuloksia suoritettaessa Langerhansin saarekkeiden allotransplantaatio diabeteksen hoitamiseksi [tätä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Robertson, R. P., N. Engl. Med. 327 (1992) 1861]. Jyrsijöillä voivat hoidot, joissa käytetään T-soluja vastaan suunnattuja vasta-aineita, antaa mahdollisuuden saavuttaa myönteisiä tuloksia solusaarekeallograftien siirrossa mutta tämäkin lähestymistapa tuottaa yhtenäisen yleisen immunosupression [Carpenter, C. B., N. Engl. J. Med. 322 (1990) 1224, Roark, J. H., et al., Trasplantation 54 (1992) 1098; Kahan, B. D., Curr. Opin. Immunol. 4 (1992) 553]. Tässä esimerkissä saatiin solusaarekeallografteihin kohdistuva toleranssi aikaan siirteen vastaanottajassa manipuloimalla alloantigeenin esittämistä T-soluille siten, että näiden aktivaatio estyi. Solusaarekeallograftien elinkykyä kemiallisin keinoin dia-

beettisiksi tehdyissä C57BL/6 (H-2^b) -hiirissä tutkittiin käyttäen menetelmiä, jotka olivat:

Diabeteksen aiheuttaminen

Koiraspuoliset C57Bl/6J (H-2^b) -hiiret tehtiin diabeettisiksi ruiskuttamalla niihin suonensisäisesti streptotsootosiinia (140 mg/kg). Pysyvä diabetes varmistettiin osoittamalla veriplasman glukoosikonsentraation olevan $\geq$ 400 mg/dl kolmena kertana yhden viikon aikana.

Allogeenisten pernasolujen fraktiointi

Siirteen vastaanottajien esikäsittelyyn tarkoitetut luovuttajan allogeeniset solut otettiin käänteishyljinnän ehkäisemiseksi käyttöön (C57 x BALB/c) (H-$2^{b/d}$) F_1-hybridieläimistä. Pienten lymfosyyttisolujen eristämiseksi poistettiin punasolut pernasolususpensiosta, joka oli peräisin 8 viikon ikäisistä naaraspuolisista (C57 x BALB/c) F_1-hiiristä, ja solut fraktioitiin koon mukaan elutriaatiolla julkaisuissa Tony, H. P., et al., J. Exp Med. 161 (1985) 223; ja Gosselin, E.J., et al., J. Immuol. 140 (1988) 1408 kuvatulla tavalla. Lyhyesti mainittuna pieniä lymfosyyttejä eristetään vastavirtasentrifugointiin perustuvalla elutriaatiolla esimerkiksi käyttäen mallin J-6B-sentrifugia (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Noin 1 - 5 x 10^8 solua 8 ml:ssa viljelymediumia tai tasapainotettua suolaliuosta, joka sisältää 1,5 % fetaalista naudanseerumia, käsitellään deoksiribonukleaasilla, pipetoidaan elutriaatiokammioon käyttämällä alkuun vastavirtavirtausnopeutena 13,5 ml minuutissa ja käyttämällä sentrifugia 4 °C:ssa vakionopeudella, jonka suuruus on 3 200 kierrosta minuutissa. Piensolufraktio, joka sisältää vain muutamia kontaminoivia suuria soluja, eluoituu tyypillisesti kohdalla 14 - 19 ml minuutissa, vaikkakin täsmällinen virtausnopeus voi olla riippuvainen solujen suspendointiin käytetystä mediumista. Tässä keksinnössä kuvatuissa kokeissa koottiin piensolufraktio talteen virtausnopeuden 19 ml/min kohdalla (kierrosnopeudella 3 200 kierrosta minuutissa). Tähän fraktioon ei ollut jäänyt lainkaan säteilytystä (3000 radia) kestävää

apusolutoimintaa sellaisella määrityksellä määritettynä, jossa käytettiin T-solulinjoja, jotka olivat spesifisiä joko kaniinin IgG:n ja $H2^d$:n (CDC35:n) suhteen tai alloreagoivia $H2^b$:n (D10.G4:n) suhteen. Pienet solut ja fraktioimattomat solut pestiin kaksi kertaa seerumittomassa mediumissa ja ne injektoitiin allograftin vastaanottajien häntälaskimoon. Kokeessa käytettiin noin 40 - 100 x 10^6 fraktioimatonta (C57 x BALB/c)F_1(H-$2^{b/d}$) -eläimistä peräisin olevaa pernasolua tai 40 - 100 x 10^6 elutrioitua pientä (C57 x BALB/c)F_1(H-$2^{b/d}$) -eläimistä peräisin olevaa pernasolua.

Siirteen vastaanottajien esikäsittely

Siirteen vastaanottajia esikäsiteltiin joko fraktioimattomilla allogeenisillä (C57 x BALB/c)F_1(H-$2^{b/d}$)-pernasoluilla, elutrioiduilla pieniläpimittaisilla "fraktion 19" pernasoluilla, joista APC-aktiivisuus oli poistettu (nämä oli eristetty edellä kuvatulla tavalla), gp39:ää vastaan suunnatulla monoklonaalisella vasta-aineella (MR1, ks. esimerkki 2, koe 3) tai allogeenisten solujen ja gp39:ää vastaan suunnatun vasta-aineen yhdistelmällä. Fraktion 19 solut tutkittiin kahdella eri annosalueella, pienellä annoksella, jonka suuruus oli 40 - 44 x 10^6 solua, tai suurella annoksella, jonka suuruus oli 77 - 88 x 10^6 solua. Kontrollieläimiin ei annettu allogeenisiä soluja eikä niitä käsitelty vasta-aineella. Allogeenisiä soluja annettiin siirteen vastaanottajiin injektoimalla niitä häntälaskimoon 5 - 8 päivää ennen solusaarekeallograftin siirtoa. Käsittely MR1-vasta-aineella suoritettiin käyttäen annoksena 250 µg hiirtä kohti kaksi kertaa viikossa alkaen 7 päivää ennen solusaarekkeiden siirtoa ja jatkaen näin 2 - 7 viikon ajan tai siihen asti, kunnes siirre menetettiin. Ensimmäinen vasta-aineinjektio annettiin tyypillisesti samana päivänä kuin ensimmäinen allogeenisten pernasolujen injektio.

Solusaarekeallograftin siirto

Allogeenisiä BALB/c ($H-2^d$) -solusaarekkeita eristettiin modifioidulla kollagenaasikäsittelymenetelmällä

[Gottlieb, P. A., et al., Diabetes 39 (1990) 643]. Solusaarekkeita, joiden annoksena käytettiin 30 saareketta ruumiinpainogrammaa kohti, siirrettiin välittömästi niiden eristämisen jälkeen vastaanottajana toimivien C57Bl/6J ($H\text{-}2^b$) -hiirten munuaiskapselin alle. Siirteen elinkyky määriteltiin kykynä säilyttää veriplasman glukoosikonsentraatio tasolla $\leq$ 200 mg/dl.

Tulokset

Ensimmäisessä koesarjassa solusaarekeallograftin vastaanottajia käsiteltiin joko pelkillä allogeenisilla pernasoluilla tai pelkällä gp39:ää vastaan suunnatulla vasta-aineella. Kuten kuviossa 1 on esitetty, niin pernasoluesikäsittelyn puuttuessa tapahtui kaikille solusaarekeallografteille hyljintä 13 päivän kuluessa siirrosta (9 ± 2 päivää; vaihteluväli 5 - 13 päivää; N = 23). Solusaarekkeiden havaittiin myös olevan heikosti elinkykyisiä eläimissä, joita oli käsitelty ainoastaan sellaisilla fraktioimattomilla pernasoluilla, jotka sisälsivät normaalia APC-aktiivisuutta (6 ± 3 päivää; vaihteluväli 4 - 12 päivää; N = 7) tai pienillä annoksilla (40 - 44 x 10^6 solua) fraktion 19 pernasoluja, joista AP-solut oli poistettu (7 ± 3 päivää; vaihteluväli 3 - 14 päivää, N = 16). Kun suurempi annos fraktion 19 pieniä splenosyyttejä, joista AP-solut oli poistettu (75 - 88 x 10^6 solua), oli injektoitu eläimeen, niin allograftin elossapysymisaika piteni (19 ± 10 päivää; vaihteluväli 7 - 40 päivää; N = 16). Tämä vaikutus siirteen elossapysymisen kestoon oli tilastollisesti merkittävä ($F_{3,58}$ = 17,3 $p < 0,001$, verrattuna ryhmiin, joita ei oltu suoritettu mitään käsittelyä, koko pernan käsittävillä verensiirroilla tai pienemmällä annoksella fraktion 19 pernasoluja), mutta tämä ei ollut pysyvää. Se, että allogeenisten solusaarekkeiden elossapysyminen piteni mutta oli rajallista niissä diabeettisissa vastaanottajissa, joille annettiin fraktion 19 pieniä soluja, joista AP-solut oli poistettu, viittaa siihen, että nämä solut eivät yksinään kykene pitämään allograftia elossa. Vielä yhtä siir-

teen vastaanottajien kohorttia käsiteltiin fraktion 20 soluilla, joiden määrä oli 77 - 88 x 10^6. Tämä fraktio koostui suurimmaksi osaksi pienistä lymfosyyteistä, mutta se eroaa fraktion 19 populaatiosta siinä mielessä, että se sisältää määritettävissä olevan APC-toiminnon. Näiden solujen vastaanottajat (n = 6) hylkivät kaikki siirteitään nopeasti (keskiarvo = 8,5 päivää, vaihteluväli 6 - 12). Toista siirteen vastaanottajaryhmää käsiteltiin yksinomaan gp39:ää vastaan suunnatulla monoklonaalisella vasta-aineella, MR1:llä. Kuvio 1 kuvaa sitä, että solusaarekeallograftit menetettiin 15 päivän kuluessa 7:ssä niistä 11 hiirestä, joita oli käsitelty pelkästään gp39:ää vastaan suunnatulla mAb:lla. Jäljellä olevilla neljällä hiirellä olivat siirteet toimintakykyisiä kokeen päättyessä päivänä 48. Nämä tulokset osoittavat, että pelkän gp39:ää vastaan suunnatun MR1-vasta-aineen antaminen vastaanottajalle voi pidentää solusaarekeallograftin elinkykyä (keskiarvo = 20,19 päivää; vaihteluväli 9:stä määrittelemättömän suureksi; N = 5. Keston pidentymisaste oli tilastollisesti samanlainen kuin mitä oli saatu aikaan käyttäen suurempaa pelkkien fraktion 19 pernasolujen annosta ja merkittävästi pidempi kuin mitä saatiin aikaan kolmessa muussa ryhmässä ($p < 0,05$).

Edellä kuvattu koesarja osoitti, että käsittely pelkillä fraktion 19 pernasoluilla, joista AP-solut oli poistettu, tai pelkällä gp39:ää vastaan suunnatulla mAb:lla voi parantaa haiman solusaarekeallograftin elossa pysymistä verrattuna tällaisen käsittelyn poisjättöön. Kumpikaan käsittely ei kuitenkaan itsessään ollut tehokas indusoimaan solusaarekeallografteihin kohdistuvaa pitkäkestoista toleranssia vastaanottajissa. Seuraavissa koesarjoissa yhdistettiin käsittely allogeenisilla pernasoluilla vastaanottajan käsittelyyn anti-gp39:llä. Kun allogeenisia pernasoluja ja anti-gp39:ää annettiin yhdistettynä, niin tämän havaittiin olevan tehokkaampaa kuin kumpikaan reagenssi yksinään. Tulokset on esitetty kuviossa 2, jossa kukin käyrä edustaa koetuloksia yksittäisestä hiirestä. Avoimet symbolit tar-

koittavat vastaanottajia, joissa solusaarekeallografti menetettiin spontaanisti. Täytetyt symbolit tarkoittavat hiiriä, joissa solusaarekesiirteet olivat toimintakykyisiä kokeen lopetushetkellä. Kuvio 2 (osakuvio B) esittää, että siirre saatiin pysymään toimintakykyisenä määräämättömän ajan kaikissa niissä eläimissä, joita oli käsitelty 7 viikon ajan gp39:ää vastaan suunnatulla MAB:lla ja yhdellä injektiolla sellaisia fraktion 19 pernasoluja, joista AP-solut oli poistettu (n = 6). Kun tätä menettelyä muutettiin vähentämällä anti-gp39-käsittelyn kestoa, niin suotuisa vaikutus siirteen elinkykyyn heikkeni mutta ei hävinnyt. Siirre saatiin pysymään toimintakykyisenä määräämättömän ajan kuudella kahdeksasta vastaanottajasta silloin, kun gp39:ää vastaan suunnattua mAb:ta annettiin vain kahden viikon ajan fraktion 19 pernasoluihin yhdistettynä (kuvio 2, osakuvio A). Siirteen havaittiin myös pysyvän toimintakykyisenä määräämättömän ajan vastaanottajilla, joita oli käsitelty 2 tai 7 viikon ajan anti-gp39:lla yhdistettynä yhteen injektioon fraktioimattomia allogeenisiä pernasoluja.

Solusaarekesiirteen toiminnan varmistamiseksi ja sen varmistamiseksi, etteivät jäljellä olevat solusaarekkeet, joita streptotsootosiinikäsittely ei ollut tuhonnut, eivät erittäneet insuliinia, poistettiin ne munuaiset, jotka sisälsivät kapselin alle siirrettyjä siirteitä. Kaikissa tapauksissa yksipuolinen munuaisten poisto sai kolmen päivän kuluessa aikaan hyperglykemian uusiutumisen (> 300 mg/dl).

Solusaarekesiirteet ja natiivi haima tutkittiin histologisesti kaikista eläimistä joko siirteen menettämisen yhteydessä tai kokeen päättyessä. Niiden vastaanottajien munuaisten solusaarekeallografttien histologisissa leikkeessä, joille oli annettu fraktioituja allogeenisiä pieniä lymfosyyttejä ja joita oli käsitelty jatkuvasti (7 viikkoa) MR1-mAb:lla, esiintyi runsaasti kokonaisia solusaarekkeita, jotka olivat havaittavissa munuaiskapselin pinnan alla ja

joissa ei esiintynyt mononukleaarisolujen kudokseen tunkeutumista ja jotka sisälsivät selvästi jyväsekkäitä insuliini- ja glukagonipositiivisia soluja. Tästä poiketen esiintyi sellaisten vastaanottajien munuaisissa olevien solusaarekeallografti en histologisissa leikkeissä, joita oli käsitelty pelkällä gp39:ää vastaan suunnatulla mAb:lla, luonteenomainen voimakas mononukleaarisolutulehdus ja tähän liittyvä solusaarekesolujen tuhoutuminen. Solusaarekkeiden morfologia oli kaikissa isäntien haimoissa yhtenäisellä tavalla yhdenmukainen sen käsityksen suhteen, että näillä esiintyi streptotsootosiinidiabetes.

Esimerkki 2: gp39:ää vastaan suunnattujen vasta-aineiden valmistaminen ja luonnehtiminen

Koe 1 - Humaani-gp39:ää vastaan suunnatut vasta-aineet

Antigeenispesifisen T-solutoleranssin indusoimiseksi potilaaseen on edullista antaa humaani-gp39:ää vastaan suunnattua vasta-ainetta. Humaani-gp39:ää vastaan suunnattujen hiiressä tehtyjen monoklonaalisten vasta-aineiden aikaansaamiseen käytettiin seuraavaa menetelmää. Balb/c-hiiriä immunisoitiin täydelliseen Freundin adjuvanttiin (CFA) valmistetulla liukoisella gp39-fuusioproteiinilla, gp39-CD8:lla. Hiiriä käsiteltiin sitten 6 viikkoa myöhemmin liukoisella gp39-CD8:lla, joka oli valmistettu epätäydelliseen Freundin adjuvanttiin (IFA). Liukoista gp39-CD8:aa annettiin liukoisessa muodossa 4 viikkoa sekundaarisen immunisoinnin jälkeen. Hiirille annettiin tästä 2 viikon kuluttua tehosteannos aktivoituja periferaalisen veren humaanilymfosyyttejä, minkä jälkeen tästä kahden viikon kuluttua annettiin vielä viimeinen tehosteannos, jossa käytettiin liukoista gp39-CD8:aa. Splenosyytit fuusioitiin vakiomenetelmiin kuuluvana toimenpiteenä NS-1-fuusio-osapuoleen 4. päivänä viimeisen immunisoinnin jälkeen.

Kloonit, jotka tuottivat humaani-gp39:ää vastaan suunnattuja vasta-aineita, valittiin monilähtökohtaisen seulontamenetelmän perusteella. Kloonit seulottiin aluksi

käyttäen sitoutumismääritystä maljoilla, joissa käytettiin gp39-CD8:aa. Tämän jälkeen positiiviset kloonit seulottiin CD8-kontrollifuusioproteiinia (CD72-CD8) vastaan. Kloonit, jotka tuottivat positiivisen tuloksen maljoilla suoritetussa CD8-CD72-sitoutumismäärityksessä, hylättiin. Jäljelle jääneet kloonit seulottiin tämän jälkeen lepovaiheessa olevien ja 6 tunnin ajan aktivoitujen periferaalisen veren humaanilymfosyyttien (PBL) päällä käyttäen virtaussytometrianalyysiä. Hybridoomat, jotka värjäsivät aktivoituja mutta eivät lepovaiheessa olevia PBL-soluja, katsottiin positiivisiksi. Jäljellä olevista klooneista tutkittiin lopuksi niiden kyky estää CD40Ig:n sitoutuminen maljaan sidottuun gp39:ään.

Ensimmäisessä vaiheessa seulottiin gp39-CD8:aa ja CD72-CD8:aa vastaan maljoilla suoritettavissa sitoutumismäärityksissä noin 300 kloonia. Näistä klooneista havaittiin 30:n havaitsevan maljaan sitoutuneen gp39:n eikä CD8:aa. Näistä klooneista seulottiin tämän jälkeen niiden kyky havaita aktivoitujen humaani-PBL-solujen pinnalla esiintyvä gp39. Noin 15 kloonia havaitsi molekyylin aktivoitujen PBL-solujen mutta ei lepovaiheessa olevien solujen pinnalla. Spesifisyys varmistettiin lisäksi määrittämällä näiden kloonien kyky estää maljaan sidotun gp39:n havaitseminen CD40Ig:n avulla. Kolme tutkitusta 10:stä kloonista estävät CD40Ig:n sitoutumisen tässä määrityksessä. Nämä kloonit olivat 3E4, 2H5 ja 2H8. Nämä kloonit ovat edullisia käytettäväksi tämän keksinnön mukaisesti. Klooneista, jotka tutkimusten tulosten mukaan olivat positiivisia aktivoitujen mutta ei lepovaiheessa olevien PBL-solujen suhteen, seulottiin myös niiden reagoivuus aktivoidun rotan T-solukloonin, POMC8:n, kanssa. Kloonissa 2H8 ilmentyi ristireagoivuutta tämän rotan T-solulinjan kanssa.

Koe 2 - Humaani-gp39:ää vastaan suunnatut vasta-aineet

Samanlaista immunisaatiomenetelmää kuin mikä oli kuvattu kokeessa 1 käytettiin muiden humaani-gp39:ää vas-

taan suunnattujen vasta-aineiden valmistamiseen. Yksi Balb/c-hiiri immunisoitiin CFA:han valmistetulla liukoisella gp39-CD8:lla ja sitä käsiteltiin 4 viikkon kuluttua tästä aktivoiduilla periferaalisen veren humaanilymfosyyteillä 6 tunnin ajan. Hiirelle annettiin sitten tehosteannos käyttäen liukoista gp39-CD8:aa, mikä tapahtui 4 päivää ennen splenosyyttien fuusiointia NS-1-fuusio-osapuoleen vakiomenetelmiä käyttäen. Hybridoomakloonien seulonta suoritettiin värjäämällä ne virtaussytometrissa kuuden tunnin ajan aktivoiduilla humaani-PBL-soluilla. Valikoitiin kloonit, jotka saivat aikaan aktivoitujen mutta eivät lepovaiheessa olevien humaani-PBL-solujen värjäytymisen. Jatkotutkimukseen valittiin kuusi kloonia, kloonit 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 ja 89-79.

Valittujen vasta-aineiden spesifisyys varmistettiin useilla määrityksillä. Ensimmäiseksi virtaussytometrinen analyysi osoitti, että kaikki kuusi mAb-molekyyliä värjäävät aktivoituja mutta eivät lepovaiheessa olevia periferaalisen veren T-soluja (ks. kuvio 3B ja 3C, jotka toimivat edustavana esimerkkinä ja jotka kuvaavat aktivoitujen T-solujen värjäytymistä 4D9-8:lla ja 4D9-9:lla, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna). Kunkin kuuden vasta-aineen tunnistaman molekyylin ilmentyminen on havaittavissa neljän tunnin kuluessa aktivaatiosta, se on huipussaan 6 - 8 tunnin välillä aktivaation jälkeen eikä se ole havaittavissa 24 tuntia aktivaation jälkeen. Kaikki kuusi mAb-molekyyliä tunnistavat aktivoitujen $CD3^+$-PBL-solujen pinnalla ilmentyvän molekyylin, jotka solut ovat pääasiassa $CD4^+$-fenotyyppiä mutta osa $CD8^+$-T-soluista ilmentää myös tätä molekyyliä. Kaikkien näiden kuuden mAb-molekyylin tunnistaman molekyylin ilmentyminen inhiboituu silloin, kun viljelymediumissa käytetään syklosporiini A:ta, samoin kuin on asianlaita gp39:n ilmentymisen suhteen (ks. kuvio 4A ja 4B, jotka toimivat edustavana esimerkkinä ja joissa kuvataan syklosporiinilla käsiteltyjen T-solujen värjäytymistä 4D9-8:lla ja 4D9-9:lla, mainitussa järjestyksessä ilmoitettu-

na). Näiden mAb-molekyylien tunnistaman molekyylin ilmentymiskinetiikka ja ilmentymisen jakaantuminen ovat identtisiä gp39:n vastaavien ominaisuuksien suhteen havaittuna käyttämällä humaani CD40Ig-fuusioproteiinia. Lisäksi kaikki kuusi mAb-molekyyliä estävät gp39:n värjäytymisen CD40Ig:lla (ks. kuvio 5A ja 5B, jotka toimivat edustavina esimerkkeinä ja joissa kuvataan sitä, miten gp39:n värjäytyminen CD40Ig:lla inhiboituu 4D9-8:n ja 4D9-9:n läsnä ollessa, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna). Kaikki kuusi mAb-molekyyliä tunnistavat ELISA-määrityksissä gp39-CD8:n, joka on gp39-molekyylin liukoinen fuusiomuoto. Lisäksi kaikki kuusi mAb-molekyyliä saavat aikaan sellaisen molekyylin immunosaostumisen, jonka koko on noin 36 kd ja joka on peräisin ^{35}S-leimalla varustetuista aktivoidusta humaani-PBL-soluista. Immunosaostunut molekyyli on identtinen humaani-CD40Ig-fuusioproteiinin saostaman molekyylin suhteen.

Kuuden valitun mAb:n (4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 ja 89-79) toiminnallinen aktiivisuus määritettiin seuraavasti. Ensimmäiseksi määritettiin mAb-molekyylien kyky inhiboida IL-4:n ja liukoisen gp39:n kanssa viljeltyjen puhdistettujen humaani-B-solujen lisääntymistä. Puhdistettuja humaani-B-soluja viljeltiin gp39:n ja IL-4:n kanssa käyttäen puhdistettuja monoklonaalisia vasta-aineita tai CD40Ig:tä annoksina, jotka olivat alueella 0 - 12,5 µg/ml. B-solujen lisääntyminen määritettiin kolmen päivän viljelyn jälkeen käyttämällä tymidiinin kerääntymistä soluihin. Tulokset (nämä on esitetty kuviossa 6) osoittavat, että kaikki kuusi mAb-molekyyliä voivat inhiboida gp39:n ja IL-4:n aikaansaamaa B-solujen lisääntymistä. mAb-molekyylit 89-76 ja 24-31 olivat tehokkaimpia indusoidun B-solujen lisääntymisen inhiboimisessa.

Seuraavaksi tutkittiin näiden mAb-molekyylien kyky inhiboida B-solujen erilaistumista määritettynä anti-CD3:lla aktivoitujen T-solujen ja IL-2:n aikaansaamana Ig-molekyylien muodostumisena. Puhdistettuja IgD^+-humaani-B-soluja valmistettiin käyttämällä positiivista selektiota

FACS:n avulla ja niitä viljeltiin tämän jälkeen CD3:a vastaan suunnattujen aktivoitujen (mitomysiini C:llä käsiteltyjen) humaani-T-solujen ja IL-2:n kanssa kuuden päivän ajan käyttäen viljelymediumissa gp39:ää vastaan suunnattuja puhdistettuja monoklonaalisia vasta-aineita annoksina 0 - 10 µg/ml tai jättämällä nämä molekyylit pois viljelymediumista. IgM:n, IgG:n ja IgA:n muodostuminen 6. päivänä määritettiin ELISA:lla. Tulokset (nämä on esitetty edempänä taulukossa 1) osoittavat, että kaikki kuusi vasta-ainetta voivat inhiboida T-soluista riippuvaista B-solujen erilaistumista IgM:n, IgG:n ja IgA:n muodostumisen avulla määritettynä.

Taulukko 1

Immunoglobuliinin muodostuminen

mAb	**µg/ml**	**IgM**	**IgG**	**IgA**
ei mitään	-	17 500	6 710	4 471
4D9-8	0,1	4 813	2 130	2 819
	1,0	4 394	2 558	1 519
	10,0	1 081	389	396
4D9-9	0,1	3 594	919	1 731
	1,0	2 659	1 233	1 606
	10,0	374	448	266
24-31	0,1	3 863	981	344
	1,0	1 287	314	165
	10,0	1 120	596	23
24-43	0,1	6 217	4 132	432
	1,0	3 193	2 130	192
	10,0	7 021	1 252	1 081
89-76	0,1	3 783	1 069	344
	1,0	2 180	352	171
	10,0	818	551	19
89-79	0,1	9 763	1 924	3 021
	1,0	2 314	460	156
	10,0	183	135	434

Sen vaikutuksen tutkimiseksi, joka gp39:ää vastaan suunnatuilla mAb-molekyyleillä on T-soluvasteisiin, lisät-

tiin mAb-molekyylejä tavallisiin sekalymfosyyttiviljelmiin (MLR). 300 000 periferaalisen veren humaanilymfosyyttiä (reagoivat solut = R) viljeltiin yhdessä 100 000 säteilytetyn allogeenisen periferaalisen veren lymfosyytin (stimulaattorit = S) kanssa viljelymediumissa, joka sisälsi gp39:ää vastaan suunnattuja mAb-molekyylejä (10 µg/ml) tai josta nämä oli jätetty pois. Viljelmille annettiin 3H-tymidiinipulssi 4., 5. ja 6. päivänä ja ne koottiin talteen 18 tuntia tämän jälkeen. Kaikki kuusi humaani-gp39:ää vastaan suunnattua mAb-molekyyliä inhiboivat allospesifisiä vasteita määritettynä MLR:n avulla (ks. kuvio 7, joka toimii edustavana esimerkkinä ja jossa on kuvattu allospesifisten vasteiden inhiboituminen *silloin*, kun R-soluja ja S-soluja inkuboidaan 24-31:n tai 89-76:n länsä ollessa; positiivisina kontrolleina käytettiin CTLA4-immunoglobuliinifuusioproteiinia ja CD28:aa vastaan suunnattua mAb:ta).

Sen määrittämiseksi, tunnistavatko nämä kuusi mAb-molekyyliä humaani-gp39-molekyylin pinnalla esiintyviä erillisiä epitooppeja, suoritettiin silloituskokeita. Aktivoidut humaani-PBL-solut tehtiin ensin toimintakyvyttömiksi kullakin näistä kuudesta mAb-molekyylistä (25 µg/ml konjugoimatonta vasta-ainetta). Solut pestiin ja ne värjättiin sitten käyttäen 10 µg/ml biotiiniin konjugoitua vasta-ainetta, minkä jälkeen nämä saatettiin reagoimaan fykoerytriiniin konjugoidun avidiinin (PE-Av) kanssa. Solujen värjäytyminen PE-Av:lla analysoitiin FACS:lla. Tulokset on esitetty alla taulukossa 2.

Taulukko 2

Estävä vasta-aine	**Värjäykseen käytetty vasta-aine**					
	4D9-9	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
ei mitään	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	EM	-	++++	++++	+++	+++
4D9-9	+++	EM	+++	++++	+++	+++
24-31	+	+	EM	+++	++	++
24-43	+	+	+++	EM	++	+
89-76	+	+	+++	+++	EM	+++
89-79	+	++	+++	+++	+++	EM

Symboli + esittää värjäytymisen voimakkuutta ja positiivisten solujen prosenttimäärää (++++ = MI > 200; +++ = MI > 125; ++ = MI > 50; + = MI > 25; - = ei mitään taustan ylittävää värjäytymistä). EM = ei määritetty.

Kaikki vasta-aineet estivät CD40Ig:n sitoutumisen aktivoituihin humaani-PBL-soluihin. Taulukossa 2 esitetyt tulokset osoittavat kuitenkin selvästi, että jotkin vasta-aineet eivät kykene estämään muiden vasta-aineiden sitoutumista aktivoituihin humaani-PBL-soluihin, mikä viittaa siihen, että ne tunnistavat erillisiä epitooppeja humaani-gp39-molekyylien pinnalla.

89-76- ja 24-31-hybridoomat, jotka tuottivat 89-76- ja 24-31-vasta-aineita, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna, talletettiin Budapestin sopimuksen ehtojen mukaisesti 2.9.1994 talletuslaitokseen American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, Md. 89-76-hybridoomalle an-

nettiin ATCC:n hakunumero HB11713 ja 24-31-hybridoomalle annettiin ATCC:n hakunumero HB11712.

Koe 3 - Hiiren gp39:ää vastaan suunnatut vasta-aineet

Tämän keksinnön yhdessä sovellutusmuodossa gp39:n antagonisti on hiiren gp39:ää vastaan suunnattu monoklonaalinen vasta-aine, MR1. Monoklonaalisen MR1-vasta-aineen valmistamiseen käytettiin seuraavaa menetelmää ja tätä voidaan käyttää muiden gp39:ää vastaan suunnattujen vasta-aineiden valmistamiseen.

Hamstereita immunisoitiin intraperitoneaalisesti viikon välein kuuden viikon ajan aktivoiduilla T_h1-soluilla (d1.6), joiden määrä oli 5 - 10^6. Kun hiiren T_h1-soluja vastaan suunnatun seerumin tiitteri oli suurempi kuin noin 1:10 000, niin suoritettiin solufuusioita polyetyleeniglykolin avulla käyttäen hamsterissa tehtyjä immunosplenosyyttejä ja NS-1:tä. Kasvavia hybridoomia sisältävistä kuopista peräsin olevat supernatantit seulottiin virtaussytometriaa käyttäen lepovaiheessa olevien ja aktivoitujen T_h1-solujen päällä. Yksi nimenomainen hybridooma, joka tuotti sellaista mAb-molekyyliä, joka tunnisti selektiivisesti aktivoidun T_h:n, otettiin jatkotutkimuksiin ja tämä jatkokloonattiin MR1:n aikaansaamiseksi. MR1:tä valmistettiin askitesnesteessä ja se puhdistettiin ioninvaihto-HPLC:n avulla. MR1-hybridooma on talletettu talletuslaitokseen American Type Culture Collection ja sille on annettu hakunumero HB11048.

Vastaavat sovellutusmuodot

Alan ammattikokemuksen perusteella on selvää tai sen perusteella kyetään pelkin rutiinikokein havaitsemaan monia tämän keksinnön spesifisiä sovellutusmuotoja vastaavia sovellutusmuotoja, jotka on kuvattu tässä julkaisussa. Nämä vastaavat sovellutusmuodot on tarkoitettu kuulumaan seuraavien patenttivaatimusten piiriin. Kaikkien tässä patenttihakemusjulkaisussa siteerattujen kirjallisuusviitteiden ja patenttihakemusjulkaisujen sisältö on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

Patenttivaatimukset

1. a) Allogeenisen tai ksenogeenisen solun, joka ilmentää vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja jonka pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, ja

b) gp39:n antagonistin

käyttö valmistettaessa yhdistettyä valmistetta samanaikaista, erillistä tai peräkkäistä käyttöä varten luovuttajan kudokseen tai elimeen kohdistuvan T-solutoleranssin indusoimiseksi tämän kudoksen tai elimen vastaanottajassa sillä edellytyksellä, että kun allogeeninen tai ksenogeeninen solu on allogeeninen solu, luovuttajan kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita, maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoa, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa tai suolta.

2. a) Allogeenisen tai ksenogeenisen solun, joka ilmentää vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja jonka pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, ja

b) gp39:n antagonistin, ja

c) luovuttajan haiman solusaarekesolujen

käyttö valmistettaessa yhdistettyä valmistetta samanaikaista, erillistä tai peräkkäistä käyttöä varten diabeteksen hoidossa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että antagonisti on gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine.

4. a) Luovuttaja-allogeenisen solun, joka ilmentää vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja jonka pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, ja

b) gp39:ää vastaan suunnatun vasta-aineen

käyttö valmistettaessa yhdistettyä valmistetta samanaikaista, erillistä tai peräkkäistä käyttöä varten luovuttajan kudokseen tai elimeen kohdistuvan T-solutoleranssin indusoimiseksi tämän kudoksen tai elimen vastaanottajassa, jolloin luovuttaja-allogeeninen solu ja gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine annetaan vastaanottajalle ennen kudoksen tai elimen siirtoa, jolloin luovuttajan kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita, maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoa, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa tai suolta.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että allogeeninen tai ksenogeeninen solu on lymfoidisolu.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että lymfoidisolu on B-solu.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että B-solu on lepovaiheessa oleva B-solu.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 tai 5 - 7 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että allogeenista tai ksenogeenista solua ja antagonistia annetaan vastaanottajalle ennen kudoksen tai elimen siirtoa.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 tai 4 - 8 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 tai 4 - 8 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että kudos tai elin on valittu joukosta maksa, munuainen, sydän, keuhkot, iho, lihas, hermokudos, maha ja suoli.

11. Jonkin patenttivaatimuksen 3 - 10 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine on monoklonaalinen vasta-aine.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on saatavissa hybridoomasolulinjasta MR1, joka on tallennettu numerolla ATCC HB11048.

13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on kimeerinen monoklonaalinen vasta-aine.

14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on humanisoitu monoklonaalinen vasta-aine.

15. Jonkin patenttivaatimuksen 3 - 14 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine on humaani-gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine.

16. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että gp39:n antagonisti on gp39:n ligandin liukoinen muoto.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että gp39:n ligandin liukoinen muoto on CD40:n fuusioproteiini.

18. Gp39:n antagonistin käyttö sellaisen valmisteen valmistamiseksi, joka on tarkoitettu luovuttajan kudokseen tai elimeen kohdistuvan T-solutoleranssin indusoimiseksi vastaanottajassa, joka tullaan altistamaan allogeenisille tai ksenogeenisille soluille, jotka ilmentävät vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja joiden pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa, sillä edellytyksellä, että kun allogeeniset tai ksenogeeniset solut ovat allogeenisia soluja, luovuttajan kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita, maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoa, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa tai suolta.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että allogeeniset tai ksenogeeniset solut, jotka ilmentävät vähintään yhtä luovuttajan antigeenia, käsittävät lymfoidisoluja tai antigeenin esittäviä soluja.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että lymfoidisolu on B-lymfosyytti.

21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että antigeenin esittävä solu on valittu monosyyteistä, dendriittisoluista, Langerhansin soluista, keratinosyyteistä, endoteelisoluista, astrosyyteistä, fibroblasteista ja oligodendrosyyteistä.

22. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että antigeenin esittävä solu on B-solu.

23. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että luovuttajan kudos tai elin käsittää haiman solusaarekkeita, maksaa, munuaista, sydäntä, keuhkoa, ihoa, lihasta, hermokudosta, mahaa tai suolta.

24. Gp39:n antagonistin käyttö sellaisen lääkeaineen valmistamiseksi, joka on tarkoitettu diabeteksen hoitoon potilaalla, joka tullaan altistamaan luovuttajan haiman solusaarekkesoluille ja allogeenisille tai ksenogeenisille soluille, jotka ilmentävät vähintään yhtä luovuttajan antigeenia ja joiden pinnalla esiintyy ligandi, joka osallistuu vuorovaikutukseen vastaanottajan T-solun pinnalla esiintyvän gp39:n kanssa.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että allogeenisiin tai ksenogeenisiin soluihin, jotka ilmentävät vähintään yhtä luovuttajan antigeenia, lukeutuu dendriittisoluja, monosyyttejä, Langerhansin soluja sekä lymfoidisoluja kuten B-lymfosyyttejä.

26. Jonkin patenttivaatimuksen 18 - 25 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että gp39:n antagonisti on gp39:ää vastaan suunnattu vasta-aine tai liukoinen CD40:n fuusioproteiini.

27. Patenttivaatimuksen 26 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että vasta-aine on gp39:ää vastaan suunnattu monoklonaalinen vasta-aine.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on on kimeerinen vasta-aine tai humanisoitu monoklonaalinen vasta-aine.

Patentkrav

1. Användning av a) en allogen eller xenogen cell, som uttrycker minst en donators antigen och på vars yta förekommer en ligand, som deltar i växelverkan med gp39, som förekommer på ytan av en mottagares T-cell och

b) en antagonist till gp39

för framställning av ett kombinerat preparat för samtidig, separat eller på varandra följande användning för inducering av T-celltolerans som riktar sig mot en donators vävnad eller organ hos mottagaren av denna vävnad eller detta organ under förutsättning att då den allogena eller xenogena cellen är en allogen cell, omfattar donatorns vävnad eller organ bukspottkörtelns cellöar, lever, njurar, hjärta, lunga, hud, muskel, nervvävnad, magsäck eller tarm.

2. Användning av a) en allogen eller xenogen cell, som uttrycker minst en donators antigen och på vars yta förekommer en ligand, som deltar i växelverkan med gp39, som förekommer på ytan av en mottagares T-cell och

b) en antagonist till gp39, och

c) cellöar från en donators bukspottkörtel

för framställning av ett kombinerat preparat för samtidig, separat eller på varandra följande användning för behandling av diabetes.

3. Användning enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknad av att antagonisten är en mot gp39 riktad antikropp.

4. Användning av a) en allogen donatorcell, som uttrycker minst en donators antigen och på vars yta förekommer en ligand, som deltar i växelverkan med gp39, som förekommer på ytan av en mottagares T-cell och

b) en mot gp39 riktad antikropp

vid framställning av ett kombinerat preparat för samtidig, separat eller på varandra följande användning för inducering av T-celltolerans som riktar sig mot en do-

nators vävnad eller organ hos mottagaren av denna vävnad eller detta organ, varvid den allogena donatorcellen och den mot gp39 riktade antikroppen ges till mottagaren före transplantation av vävnad eller organ, varvid donatorns vävnad eller organ omfattar bukspottkörtelns cellöar, lever, njurar, hjärta, lunga, hud, muskel, nervvävnad, magsäck eller tarm.

5. Användning enligt något av patentkraven 1 - 4, kännetecknad av att den allogena eller xenogena cellen är en lymfoidcell.

6. Användning enligt patentkrav 5, kännetecknad av att lymfoidcellen är en B-cell.

7. Användning enligt patentkrav 6, kännetecknad av att B-cellen är en B-cell i vilofas.

8. Användning enligt något av patentkraven 1 eller 5 - 7, kännetecknad av att den allogena eller xenogena cellen och antagonisten ges till mottagaren före transplantation av vävnad eller organ.

9. Användning enligt något av patentkraven 1 eller 4 - 8, kännetecknad av att vävnaden eller organet omfattar bukspottkörtelns cellöar.

10. Användning enligt något av patentkraven 1 eller 4 - 8, kännetecknad av att vävnaden eller organet har valts bland lever, njurar, hjärta, lunga, hud, muskel, nervvävnad, magsäck och tarm.

11. Användning enligt något av patentkraven 3 - 10, kännetecknad av att den mot gp39 riktade antikroppen är en monoklonal antikropp.

12. Användning enligt patentkrav 11, kännetecknad av att den monoklonala antikroppen kan erhållas från hybridomcellinjen MR1, som är deponerad med deponeringsnummer ATCC HB11048.

13. Användning enligt patentkrav 11, kännetecknad av att den monoklonala antikroppen är en chimär monoklonal antikropp.

14. Användning enligt patentkrav 11, kännetecknad av att den monoklonala antikroppen är en humaniserad monoklonal antikropp.

15. Användning enligt något av patentkraven 3 - 14, kännetecknad av att den mot gp39 riktade antikroppen är en mot humant gp39 riktad antikropp.

16. Användning enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknad av att antagonisten till gp39 är en löslig form av en gp39 ligand.

17. Användning enligt patentkrav 16, kännetecknad av att den lösliga formen av gp39 liganden är ett CD40 fusionsprotein.

18. Användning av en antagonist till gp39 för framställning av ett sådant preparat som är avsett för inducering av T-celltolerans som riktar sig mot en donators vävnad eller organ hos mottagaren, som kommer att utsättas för allogena eller xenogena celler som uttrycker minst en donators antigen och på vars yta förekommer en ligand, som deltar i växelverkan med gp39, som förekommer på ytan av mottagarens T-cell under förutsättning att då de allogena eller xenogena cellerna är allogena celler, omfattar donatorns vävnad eller organ bukspottkörtelns cellöar, lever, njurar, hjärta, lunga, hud, muskel, nervvävnad, magsäck eller tarm.

19. Användning enligt patentkrav 18, kännetecknad av att de allogena eller xenogena cellerna som uttrycker minst en donators antigen omfattar lymfoidceller eller celler som representerar antigenen.

20. Användning enligt patentkrav 19, kännetecknad av att lymfoidcellen är en B-lymfocyt.

21. Användning enligt patentkrav 19, kännetecknad av att cellen som representerar antigenen har valts bland monocyter, dendritceller, Langerhans celler, keratinocyter, endotelceller, astrocyter, fibroblaster och oligodendrocyter.

22. Användning enligt patentkrav 19, kännetecknad av att cellen som representerar antigenen är en B-cell.

23. Användning enligt patentkrav 18, kännetecknad av att donatorns vävnad eller organ omfattar bukspottkörtelns cellöar, lever, njurar, hjärta, lunga, hud, muskel, nervvävnad, magsäck eller tarm.

24. Användning av en antagonist till gp39 för framställning av ett sådant läkemedel som är avsett för behandling av diabetes hos en patient, som kommer att utsättas för celler av bukspottkörtelns cellöar från en donator och allogena och xenogena celler som uttrycker minst en donators antigen och på vars yta förekommer en ligand, som deltar i växelverkan med gp39, som förekommer på ytan av mottagarens T-cell.

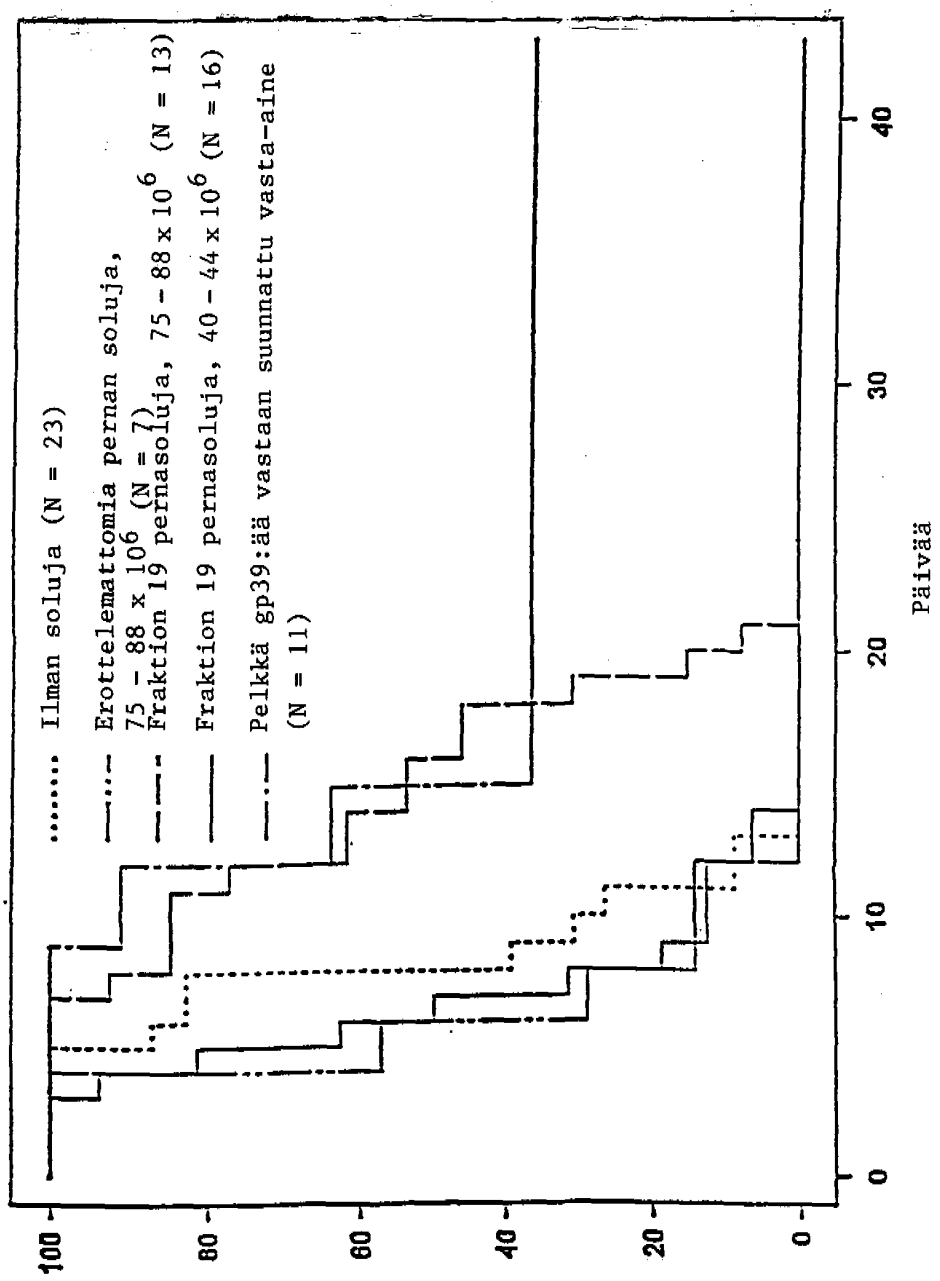
25. Användning enligt patentkrav 24, kännetecknad av att till allogena och xenogena celler som uttrycker minst en donators antigen hör dendritceller, monocyter, Langerhans celler samt lymfoidceller såsom B-lymfocyter.

26. Användning enligt något av patentkraven 18-25, kännetecknad av att antagonisten till gp39 är en mot gp39 riktad antikropp eller ett lösligt CD40 fusionsprotein.

27. Användning enligt patentkrav 26, kännetecknad av att antikroppen är en mot gp39 riktad monoklonal antikropp.

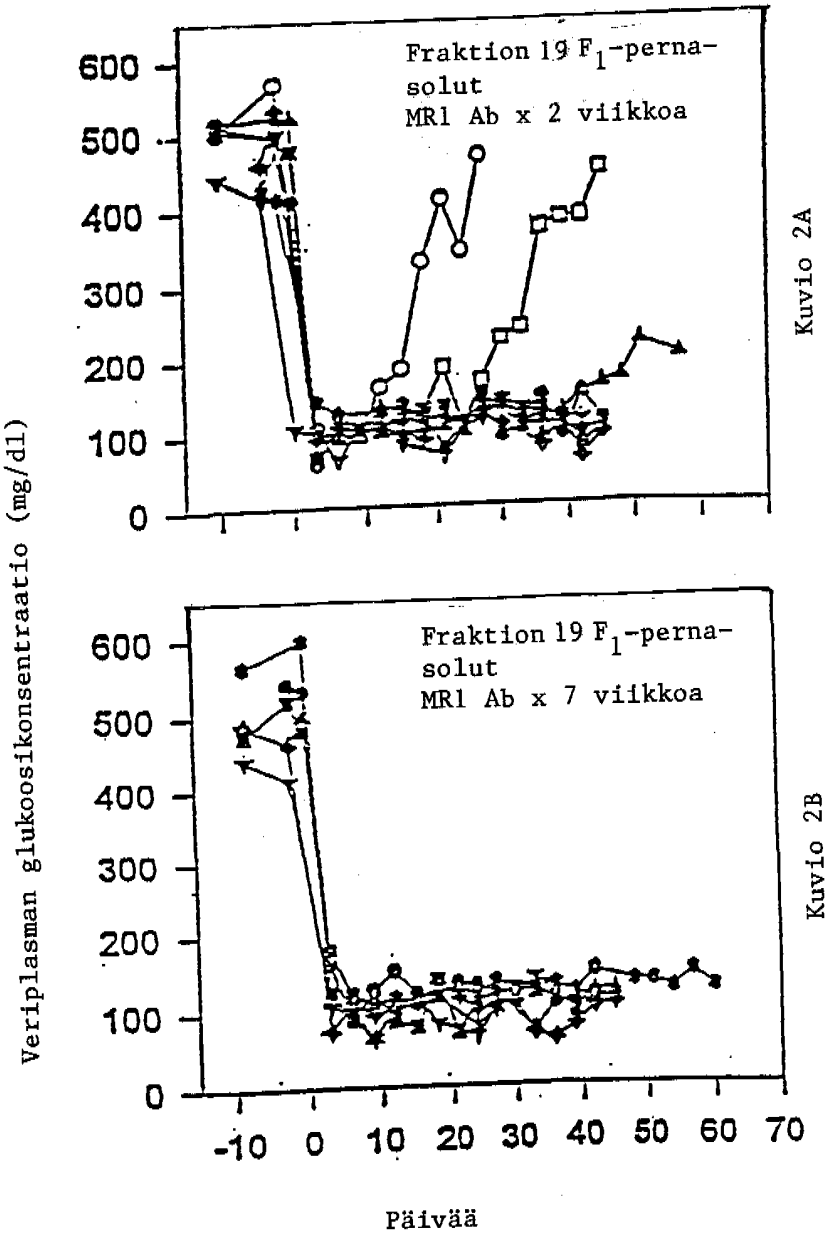
28. Användning enligt patentkrav 27, kännetecknad av att den monoklonala antikroppen är en chimär antikropp eller humaniserad monoklonal antikropp.

118792

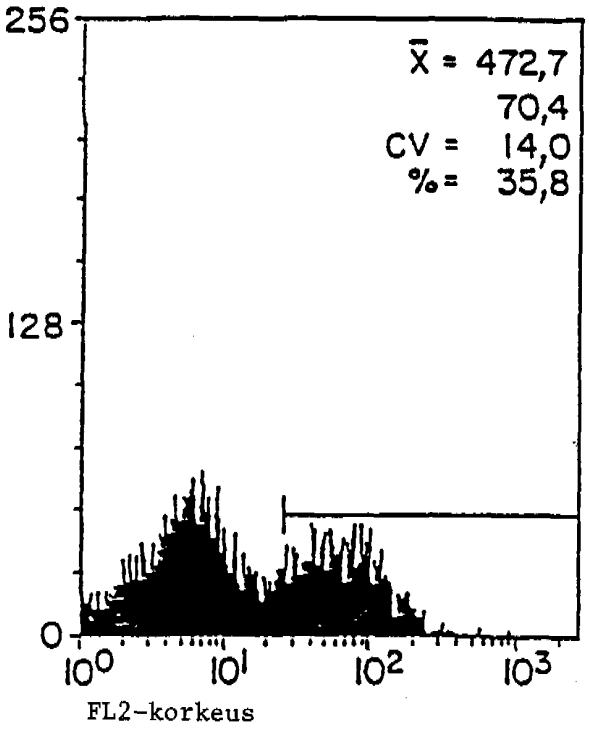


Siirteen kumulatiivinen elinkyky (%)

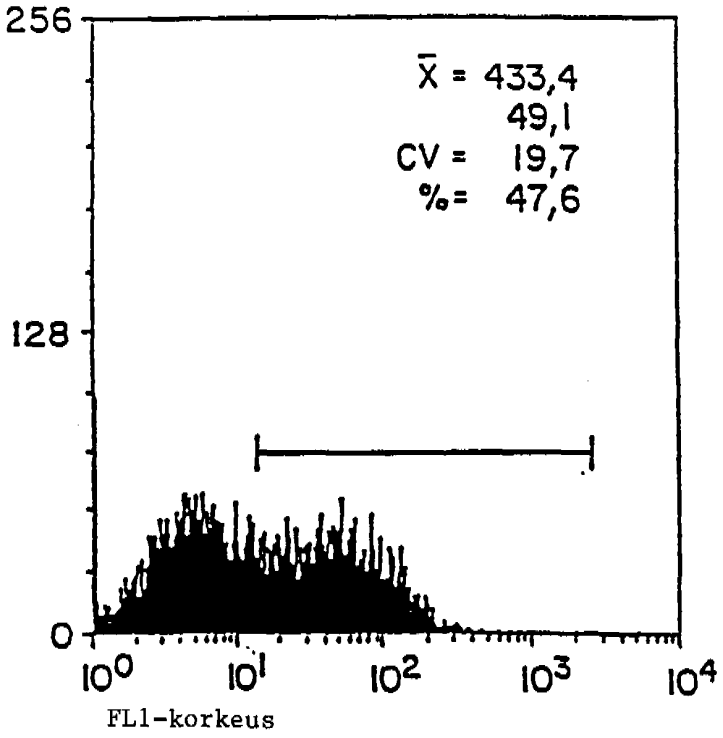
Kuvio 1


Fraktion 19 F_1-perna-solut
MR1 Ab x 2 viikkoa
600
500
400
300
200
100
0
Kuvio 2A
Fraktion 19 F_1-perna-solut
MR1 Ab x 7 viikkoa
600
500
400
300
200
100
0
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
Kuvio 2B
Veriplasman glukoosikonsentraatio (mg/dl)
Päivää

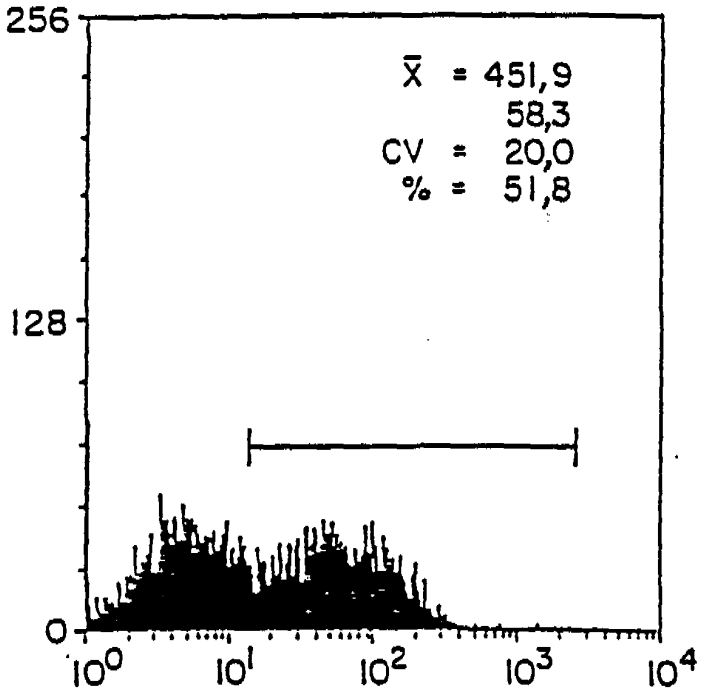
Kuvio 3A



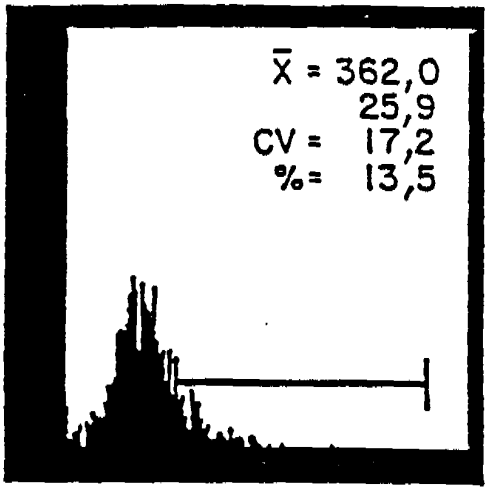
Kuvio 3B



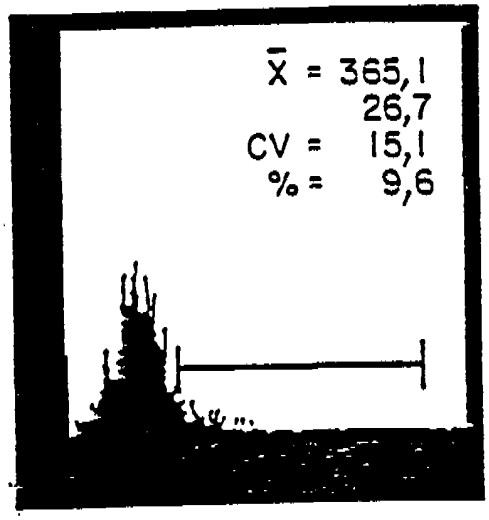
Kuvio 3C



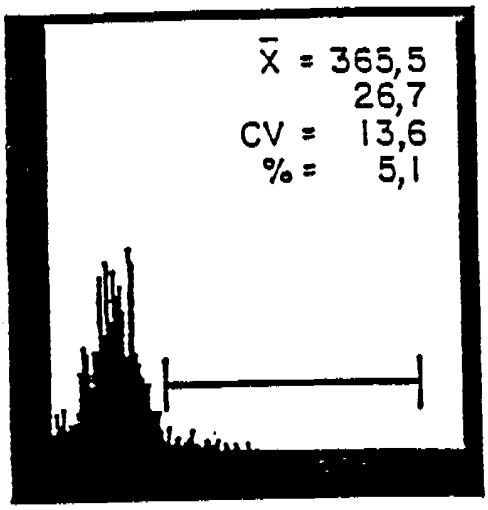
Kuvio 4a



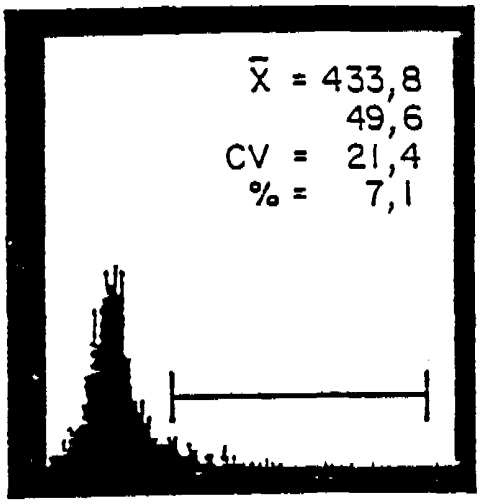
Kuvio 4B



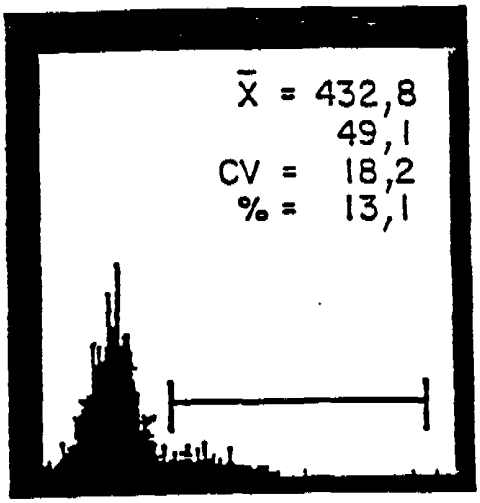
Kuvio 4C



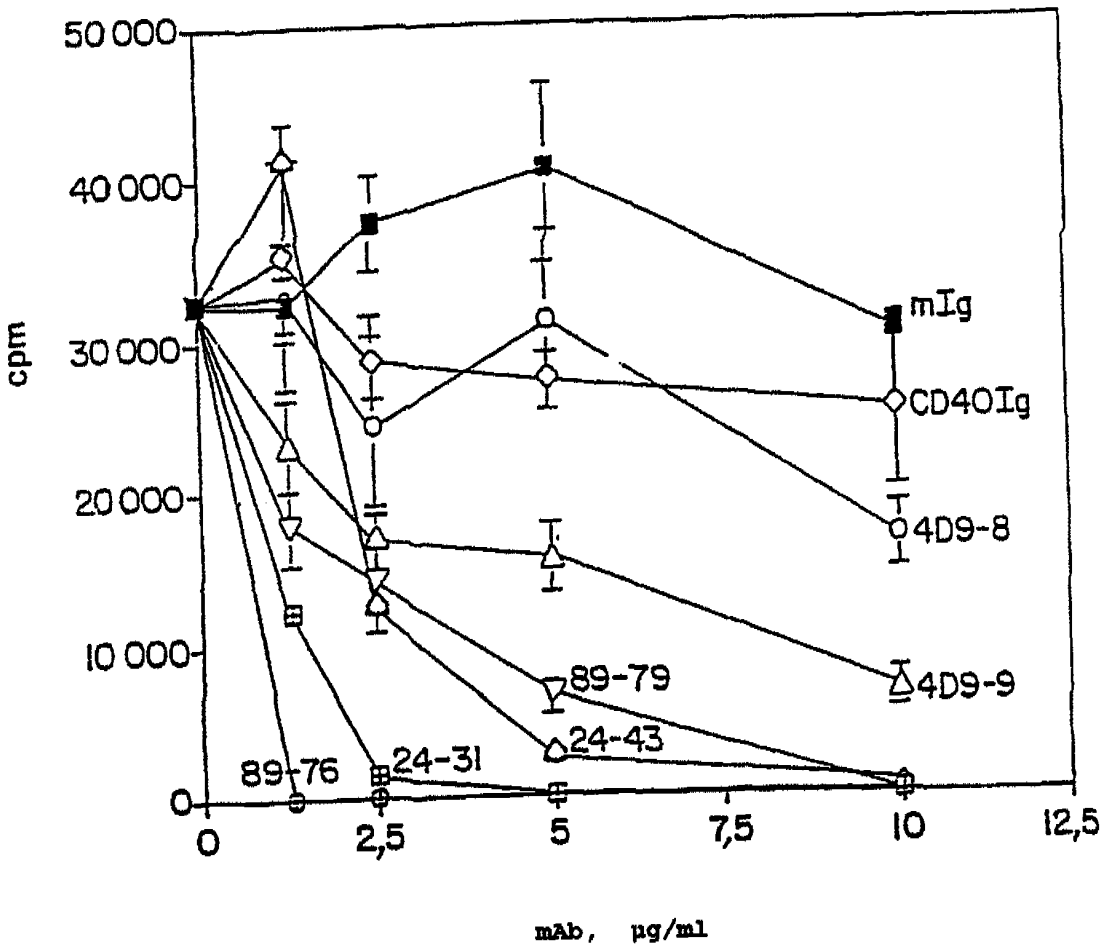
Kuvio 5A



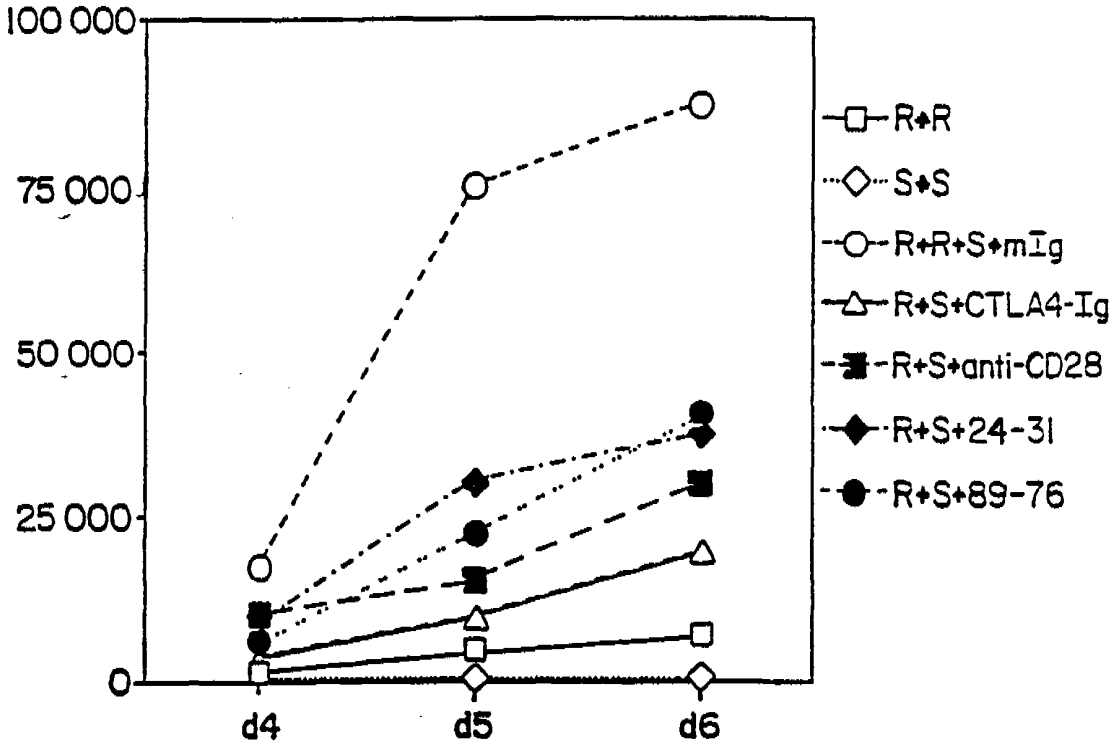
Kuvio 5B



Kuvio 6


50 000
40 000
30 000
20 000
10 000
0
cpm
0
2,5
5
7,5
10
12,5
mAb, µg/ml
mIg
CD40Ig
4D9-8
4D9-9
89-79
24-43
24-31
89-76

Kuvio 7


100 000
75 000
50 000
25 000
0
d4
d5
d6
R+R
S+S
R+R+S+mIg
R+S+CTLA4-Ig
R+S+anti-CD28
R+S+24-31
R+S+89-76