



F 1000105452B



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 105452 B

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

31.08.2000

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

A61K 39/395, C12N 5/08

(21) Patentihakemus - Patentansökning

924082

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

11.09.1992

(24) Alkupaiva - Löpdag

13.03.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

11.09.1992

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US91/01683

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

14.03.1990 US 493511 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •The Immune Response Corporation, 5935 Darwin Court, Carlsbad, CA 92008, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Bohlen,Heribert, Laarbeeklaan 103, 1090 Bruxelles, BELGIA, (BE)

2 •Urbain,Jacques, Tienne du Peuthy 1, 1338 Lasne, BELGIA, (BE)

3 •Van Camp,Benjamin, Laarbeeklaan 103, 1090 Bruxelles, BELGIA, (BE)

4 •Thielemans,Kristiaan, Laarbeeklaan 103, 1090 Bruxelles, BELGIA, (BE)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Idiotyyppirokotuksen valmistus B-solulymfoomaa vastaan
Framställning av idiotypvaccination mot B-cellymfoma**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö esittää menetelmän, jolla indusoidaan tehokas immuuniresponssi patogeenisiä lymfosyyttejä vastaan antamalla sellaisia dendriittisoluja, jotka on aiemmin altistettu halutulle idiotyyppi-proteiinille. Yhdessä suoritustavassa on esitetty menetelmä nisäkkään aktiiviseksi immuni-soimiseksi lymfoomaa vastaan. Tämä suoritustapa sisältää vaiheet, joissa altistetaan dendriittisolut idiotyyppi-immunoglobuliinille niin, että saadaan idiotyypille altistetut dendriittisolut, ja injektoidaan idiotyypille altistetut dendriittisolut takaisin nisäkkääseen, jossa indusoituu immunitetti lymfoomasoluja vastaan. Toisessa suoritustavassa keksintö koskee sekä idiotyyppisten solujen että altistettujen dendriittisolujen antoa.

Uppfinningen avser ett förfarande för inducering av ett effektivt immungensvar mot patogeniska lymfocyter genom administrering av dendritiska celler, vilka tidigare exciterats med idiotypproteiniet av intresse. I ett utförande tillhandahålls ett förfarande för aktiv immunisering av ett däggdjur mot lymfoma. Detta utförande omfattar utsättande av dendritiska celler för idiotypen Ig för framställning av idiotypexciterade, dendritiska celler och injicering av de idiotypexciterade, dendritiska cellerna ånyo i däggjuret, varvid immunitet mot lymfomaceller induceras. I ett annat utförande avser uppfinningen administrering av både idiotypceller och exciterade dendritiska celler.

Idiotyyppirotekokuksen valmistus B-solulymfoomia vastaan

Tämä keksintö liittyy yleisesti aktiivisen immuni-
saation alueeseen ja erikoisemmin sellaisten rokotteiden
5 valmistukseen, jotka ovat käyttökelpoisia immunisoitaessa
lymfoomia vastaan, ja sellaisiin adjuvantteihin, jotka
ovat käyttökelpoisia muutettaessa immuuniresponssin suu-
ruutta ja ominaisuuksia. Tarkemmin tämä keksintö koskee
menetelmää idiotyypille altistettujen terapeuttisesti
10 käyttökelpoisten dendriittisolujen valmistamiseksi.

Keksinnön tausta

Selkärankaisen immuunisysteemi toimii tunnistuen ja
eliminoiden materiaaleja, kuten patogeeneja, bakteereita
ja viruksia, jotka isäntä tunnistaa vieraiksi aineiksi.
15 Lisäksi immuunisysteemi toimii myös valvontasysteeminä
eliminoiden pahanlaatuisia syöpäsoluja, joita, johtuen
siitä, että ne ekspressoivat muuttuneita proteiineja solun
pinnalle, pidetään vieraina aineina. Immuuniresponssit
vieraita aineita, joita nimitetään antigeneiksi, vastaan
20 sisältävät humoraalisen responssin ja soluvälitteisen
responssin. Humoraalinen responssi sisältää spesifisten
vasta-aineiden, tai immunoglobuliinien, tuoton, jotka tun-
nistavat antigenin ja sitoutuvat siihen. Soluvälitteinen
responssi sisältää sellaisten solujen lisääntymisen, jotka
25 auttavat antigenien eliminoimisessa.

Immuuniresponssi voidaan usein indusoida tai sitä
voidaan lisätä aktiivisella immunisaatiolla käyttäen roko-
tetta (tai immunogeenia), joka sisältää antigenin tai
antigenia muistuttavan molekyylin. Usein on tarpeen käyt-
30 tää immunogeenin lisäksi immuunitehostajia, joita kutsu-
taan adjuvanteiksi.

Suurimmalle osalle B-imusolukasvaimista on ominais-
ta immunoglobuliinin (Ig) ekspressoituminen solumembraa-
nilla. Pinnan immunoglobuliinin idiotyyppiä (id) voidaan
35 pitää kasvainspesifisenä antigenina tai merkkiaineena ja

sitä on käytetty immunoterapian kohteena. Monoklonaalisia anti-id-vasta-aineita on käytetty tutkittaessa näiden kasvainten immunobiologiaa ja niitä on käytetty myös terapeuttisiin kokeisiin. Erikoisesti hiirialkuperää olevien monoklonaalisten anti-id-vasta-aineiden (Mab:t) passiivista antoa on kuitenkin vaikeuttaneet useat ongelmat, jotka ovat alentaneet niiden soveltuvuutta kliiniseen käyttöön. Eräät näistä ongelmista ovat (i) verenkierrossa oleva vapaa antigeeni, (ii) hiiren immunoglobuliinia vastaan herännyt immuuniresponsi ja (iii) kasvainsolujen heterogeenia. Useissa tutkimuksissa on julkaistu, että immunisaatio idiotyyppiproteiinilla tai sen pienemmällä fragmenteilla voi suojata eläintä plasmasytooman kasvulta tai sellaisen lymfooman kasvulta, jossa on immunoglobuliinia solun pinnalla. Indusoitu immuuniresponsi sisältää anti-idiotyyppiset vasta-aineet yhtä hyvin kuin T-soluvälitteisen immuniteetin. Kun on muodostettu sellaisia vasta-aineita ja herätetty sellainen immuniteetti altistamalla kasvainsoluille, on toistuvasti osoitettu, että on tarpeen liittää idiotyyppiproteiini vahvaan immunogeeniseen kantajaan ja antaa tämä konjugaatti vahvan adjuvantin läsnä ollessa.

Idiotyyppiheterogeenia on kuvattu kliinisen kokeen aikana käytettäessä anti-idiotyyppisiä vasta-aineita. Monoklonaalisen vasta-aineen indusoiman alussa olevan osittaisen responssin jälkeen alkuperäiseen kasvaimen kohtaan ilmaantui idiotyyppiltään toisenlaisia kasvainsoluja. On todennäköistä, että sellaiset idiotyyppiltään toisenlaiset kasvainsolut olivat läsnä jo ennen hoitoa monoklonaalisella vasta-aineella, mutta niiden lisääntyminen sallittiin, kun idiotyyppisesti positiiviset kasvainsolut poistettiin selektiivisesti.

Eläinten aktiivinen immunisointi syngeneisellä kasvaimesta peräisin olevalla immunoglobuliinilla tai sen pienemmällä fragmenteilla aiheuttaa anti-id-vasta-aineiden muodostuksen ja indusoi suojauksen syntymisen sen jälkeen

tapahtuvalle kasvainsolualtistukselle. Useimmissa tapauksissa kuitenkin kasvain aiheuttaa responssin, joka on liian heikko tai joka ilmaantuu liian myöhään, jotta sillä olisi kestäväää terapeutista arvoa. Sen vuoksi tarvitaan joko modifioituja id-immunoglobuliineja tai vahvoja ei-fysiologisia adjuvantteja. Ei-fysiologisten immunogeenien tai epäspesifisten aktivaattorien käyttö on erittäin epätoivottavaa ihmispotilaille käytettäväksi johtuen sivuvaikutuksista, jotka sisältävät mahdollisuuden indusoida polyklonaalinen β -soluresponssi, joka voi johtaa autoimmuunitaudin kehittymiseen.

Sen vuoksi on ollut olemassa jo pitkään tarve menetelmästä, jolla tehostetaan rokotteiden immunogeenisuutta. Suositeltavasti kaikkien sellaisen immunisaation yhteydessä käytettävien adjuvanttien täytyy muodostaa immuuniresponssi, joka on riittävän vahva ollakseen terapeuttisesti käyttökelpoinen. Erikoisesti on tarve kasvaimen omaavan isännän tehokkaasta aktiivisesta immunisaatiomenetelmästä käyttäen syngeenistä immunoglobuliinia niin, että aiheutetaan tehokas polyklonaalinen responssi. Esillä oleva keksintö tyydyttää tämän tarpeen ja esittää myös siihen liittyviä parannuksia.

Keksinnön yhteenveto

Tässä kuvataan menetelmä tehokkaan immuuniresponssin indusoimiseksi patogeenisiä lymfosyyttejä vastaan, jossa menetelmässä annetaan dendriittisoluja, jotka on aiemmin altistettu halutulle idiotyyppiproteiinille. Yhdessä suoritustavassa esitetään menetelmä, jolla nisäkäs immunisoidaan aktiivisesti lymfoomaa vastaan. Tämä suoritustapa sisältää vaiheet, joissa altistetaan dendriittisolut idiotyyppiselle immunoglobuliinille idiotyypille altistettujen dendriittisolujen muodostamiseksi ja näiden idiotyypille altistettujen dendriittisolujen injektioimisen takaisin nisäkkääseen, jossa indusoituu immuni-

teetti lymfoomasoluja vastaan. Toisessa suoritustavassa

annetaan sekä idiotyyppisiä soluja että idiotyypille altistettuja dendriittisoluja. Keksinnön mukaiselle menetelmälle idiotyypille altistettujen terapeuttisesti käyttökelpoisten dendriittisolujen valmistamiseksi, on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään.

5 Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuvio 1. Idiotyyppi-KLH-konjugaateilla tehdyn immunisaation indusoima kasvainimmunitetti. C₃H/He-hiiret immunisoitiin viikon välein 38C13 IgM:n KLH-konjugaateilla (_ . _ . _ kaksi injeksiota: ryhmä II, -O-O- kolme injeksiota: ryhmä I, -O-O- yksi injektio: ryhmä III) tai kontrolli-IgM:lla (-O-O- kaksi injeksiota: ryhmä IV). Yksi viikko viimeisen immunisaation jälkeen hiiret ympätettiin 10² 38C13-kasvainsolulla. Numerot vastaavat taulukon I koeryhmiä.

10

Kuvio 2. Idiotyyppi-IgM:lle altistetuilla dendriittisolulla (DC) tehdyn immunisaation vaikutus hiirten eloonjääntiin kasvaimen ympäyksen jälkeen. C3H/He-hiiret immunisoitiin 38C13 IgM-DC:llä (-O-O-: ryhmä V) tai kontrolli IgM-DC:llä (_ . _ . _ : ryhmä VI) tai liukoisella idiotyyppi-proteiinilla (-♦-♦-: ryhmä VII) 28 vuorokautta ennen altistusta kasvainsoluille (10²). Hiiret saivat yhden tehosteen liukoisella IgM:lla vuorokautena -7. Numerot vastaavat taulukon I koeryhmiä.

15

20

Kuvio 3. Syngeenisten anti-idiotyyppivasta-aineiden, jotka indusoitiin immunisoimalla Freundin adjuvantissa olevalla 38C13-KLH:lla, ja 38C13:lle altistettujen dendriittisolujen vertailu. Seerumit hiiristä, jotka oli immunisoitu kolme (-O-O-: ryhmä I) tai kaksi (_ . _ . _ : ryhmä II) kertaa Freundin adjuvanttiin emulsifioiduilla 38C13 KLH-konjugaateilla tai 38C13:lle altistetuilla dendriittisolulla (-♦-♦-: ryhmä V) lisättiin kuoppiin, jotka oli esipäälyllystetty 38C13-IgM:lla. Seerumit laimennettiin kahdeksan kuopan sarjalla. Sitoutunut vasta-aine tunnistettiin lisäämällä entsyymillä leimattua vuohen anti-hiiri-IgG:ia.

25

30

35

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Esillä oleva keksintö mahdollistaa menetelmän immunisaation tehostamiseksi. Sellainen menetelmä on erikoisen käyttökelpoinen sellaisissa immunisointitapauksissa, joissa tehokas immuuniresponssi on vaikea saada aikaan, kuten monien kasvainmerkkiaineiden tapauksissa. Menetelmä on kuitenkin sovellettavissa myös eri patogeeneja vastaan suoritettujen immunisaatioiden yhteyteen.

Äskettäin Francotte ja Urbain, PNAS 82: 8149 (1985), raportoivat dramaattisen viruksen vastaisen immuuniresponssin tehostumisen käytettäessä hiiren dendriittisoluja, jotka oli altistettu in vitro viruksella tai polyklonaalisilla anti-idiotyyppivasta-aineilla (Ab_2). Dendriittisolujen (DC) on osoitettu olevan vahvoja immuuniresponssien stimulaattoreita sellaisille antigeneille, jotka ovat kiinnittyneet niiden solupintaan. Antigeneille altistetut dendriittisolut esikäsittelevät lepäävät T-lymfosyytit, jotka sitten antavat tarpeellisen avun antigeenispesifisille B-lymfosyyteille.

Keksinnön yhteydessä on yllättäen havaittu, että hiiren dendriittisolut, jotka on altistettu in vitro patogeenisistä lymfosyyteistä peräisin olevalle idiotyyppiproteiinille, voivat korvata immunogeenisen kantajan ja ei-fysiologisen adjuvantin, joiden aiemmin ajateltiin olevan tarpeen tehokkaan immuuniresponssin muodostamiseksi patogeenisiä lymfosyyttejä vastaan. Tässä käytettynä termi "patogeeniset lymfosyytit" viittaa joko säätelemättömiin pahanlaatuisiin lymfosyytteihin tai lymfosyytteihin, jotka aiheuttavat autoimmuuniresponssin. Termi patogeenisestä lymfosyytistä peräisin oleva idiotyyppiproteiini viittaa immunoglobuliiniin tai immunoglobuliinifragmenttiin (FAB), jossa on idiotyyppinen epitooppi.

Suojaus myöhempää kasvainsoluannosta vastaan voidaan saada aikaan esi-immunisoimalla syngeneisellä idiotyyppillä, joka on konjugoitu immunogeeniseen kantajaan ja

emulsifioitu Freundin adjuvanttiin, tai idiotyypille in vitro altistetuilla dendriittisolulla. Kontrolliryhmät, joita käsiteltiin samoilla määrillä dendriittisoluja, jotka oli altistettu asiaan kuulumattomalle IgM:lle, tai jotka oli immunisoitu samalla annoksella liukoista syngeneistä 38C13 IgM:ää, eivät osoittaneet pidentynyttä eloonjäämisaikaa. Nämä tulokset osoittavat selvästi dendriittisolujen tehostajavaikutuksen ja kasvaimen kasvun idiotyyppispesifisen suppression.

10 C_3H/He -hiiret immunisoitiin idiotyyppisellä immunoglobuliini-M:llä (IgM), joka oli peräisin syngeneisestä 38C13-lymfoomasta. Vaadittiin konjugointi immunogeeniseen kantajaproteiiniin (keyhole limpet -kotilon hemosyaniini; KLH) ja vahvaan ei-fysiologiseen immunostimulaattoriin
15 (täydellinen Freundin adjuvantti; CFA), jotta saatiin aikaan idiotyyppispesifinen humoraalinen ja soluvälitteinen immunitetti ja suojaus tappavaa kasvainsolualtistusta vastaan. Kuitenkin, kun dendriittisoluja käytettiin idiotyyppin kanssa, ei tarvittu immunogeenista kantajaa eikä
20 adjuvanttia. Dendriittisolut, jotka oli altistettu in vitro modifioimattomalle idiotyyppiproteiinille ja jotka oli injektoitu takaisin eläimiin, kykenivät indusoimaan merkittävän resistenssin myöhempää kasvaimen ymppäystä vastaan. Ymppäykseen voidaan käyttää vaihtoehtoisesti FAB-
25 fragmentteja tai synteettisiä peptidejä, joissa on idiotyyppiepitooppi. Molemmissa ryhmissä havaittiin idiotyyppispesifisiä T-lymfosyyttejä, jotka lisääntyivät responsina luonnolliselle 38C13-idiotyypille (id), kuin myös sytotoksisia T-lymfosyyttejä. Soluvälitteinen immuuniresponssi oli vahvempi dendriittisolulla käsitellyissä eläimissä kuin niissä, joita käsiteltiin 38C13-KLH:lla ja täydellisellä Freundin adjuvantilla. Molemmat immunisaatiomenetelmät johtivat pitkiin eloonjääntiaikoihin ilman,
30 että kasvainsolut pääsivät karkuun toisenlaisten idiotyyppien ilmestymisestä tai kasvainsolujen lepotilasta joh-

tuen. Huomattavaa on, että yhden vuoden kuluttua 80 % hii-
ristä oli edelleen elossa.

5 Immunisoitujen eläinten seerumianalyysi osoitti,
että suojausvaikutus ei vastannut suoraan seerumin anti-
idiotyypitiitteriä. Freundin adjuvantilla tehdyn hyper-
immunisaation indusoimien anti-idiotyypivasta-aineiden
korkeat tasot ovat voineet moduloida kasvainsolujen pinnan
immunoglobuliineja, jotka solut sitten voivat välttää id-
spesifisten T-solujen aiheuttamaa tuhoa.

10 T-soluja, jotka lisääntyivät idiotyyppi-proteiinien
läsnä ollessa, voitiin havaita jopa kauemmin kuin kolme
kuukautta immunisaation jälkeen. Näillä soluilla, vaikka
niiden fenotyyppiä ei tunneta, oli sytotoksinen vaikutus
syngeenisiin kasvainsoluihin.

15 Seuraavien esimerkkien on ajateltu olevan kuvaavia,
mutta ei keksintöä rajoittavia.

Esimerkki I

Dendriittisolujen valmistus

20 Dendriittisolut (DC) eristettiin käyttäen menetel-
mää, jonka ovat kuvanneet Steiman ja Cohen, J. Exp. Med.
139: 380 - 397 (1974). Lyhyesti, pernasolujen suspensio,
joka oli vapaa aggregaateista tai solurypäleistä, suspen-
doitiin liuokseen, jossa oli naudan seerumialbumiinia
(BSA) ($p = 1,082 \text{ g/cm}^3$); fraktio V (Sigma Chemical Co., St.
25 Louis, MO), konsentraatioksi 1×10^8 solua/ml. Päälle li-
sättiin matalan tiheyden sisältävää BSA-liuosta ($p = 1,060$
 g/cm^3). Putket sentrifugoitiin tasapainoon 10 000 g:lla 30
minuutin ajan $4 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa. Kelluvat solut kerättiin ja pes-
tiin kahdesti RPMI 1640 -alustassa. Solut suspendoitiin
30 uudelleen täydelliseen alustaan (RPMI 1640, 5 % FCS, $5 \times$
 10^{-5} M 2-merkaptoetanolii, penisilliini, streptomysiini,
tarvittavat elintärkeät vähimmäisaminohapot ja natriumpy-
ruvaatti) ja siirrettiin muovisille petrimaljoille kon-
sentraatioksi 1×10^5 solua/ml 3 tunniksi $37 \text{ }^\circ\text{C}$:seen 5 %
35 CO_2 -ilmakehässä. Kiinnittymättömät solut poistettiin pipe-

toimalla varovasti ja kiinnittyneet solut pidettiin toiset 16 tuntia täydellisessä alustassa. Supernatanttia, joka sisälsi kiinnittymättömät matalan tiheyden omaavat solut, käytettiin dendriittisolujen lähteenä. Kontaminoivat makrofaagit poistettiin antigeenialtistuksen aikana, koska makrofaageilla oli taipumus kiinnittyä uudelleen muovipintaan, kun taas dendriittisolut eivät kiinnittyneet. Lopullisen soluvalmisteen puhtaus tutkittiin pyyhkäisyelektronimikroskopiolla, transmissioelektronimikroskopiolla, immunofluoresenssilla ja akridiinioranssivärjäyksellä. Vuohen anti-hiiri-immunoglobuliinia, joka oli leimattu FITC:lla, ja biotiinilla leimattua anti-Thy-1.2-vasta-ainetta (Becton Dickinson) käytettiin B- ja T-solujen tunnistamiseksi, vastaavassa järjestyksessä.

Dendriittisolut suspendoitiin täydelliseen alustaan konsentraatioksi 5×10^5 solua/ml 24-kuoppaisille tasapohjaisille levyille (1 ml/kuoppa). Lisättiin 50 μ g puhdistettua 38C13 IgM (kappa) -idiotyypiproteiinia tai asiaan kuulumatonta hiiren IgM:ää (kappa) (ABPC - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Levyjä pidettiin 37 °C:ssa 5 % CO₂-ilmakehässä 4 - 5 tuntia. Solut pestiin useita kertoja steriilillä PBS:lla ja suspendoitiin uudelleen konsentraatioksi $2,5 \times 10^5$ solua/ml.

Esimerkki II

25 Syngeeninen immunisaatio idiotyyppisellä immunoglobuliinilla

C₃H/He-hiiret hankittiin Laboratory Animal Center of the Catholic University of Leuven -laboratoriosta. Balb/c- ja F1 (C₃H/He x Balb/c)-hiiret kasvatettiin Laboratory Animal Facility at the Free University of Brussels -laboratoriossa (VUB). 38C13 on karsinogeenin (DMBA) indusoima C₃H-alkuperää oleva B-solukasvain. Nämä kasvainsolut ja in vitro adaptoitu solulinja, joita käytettiin tässä tutkimuksessa, ekspressoivat IgM:ia (kappa) solumembraanille, mutta eivät eritä suuria määriä immunoglobuliinia.

Idiotyyppi-IgM:ää (kappa) erittävä solulinja on saatu fuusioimalla kasvainsolut ei-erittävän myeloomasolulinjan (P3 x 63 Ag 8.653) kanssa.

5 Neljä ryhmää, joissa oli 10 hiirtä kussakin, immu-
nisoitiin 50 µg:lla idiotyyppistä 38C13-IgM:ää tai yhteen
kuulumattomalla ABPC-IgM:lla, joka oli ristiliitetty
KLH:hon, jotka oli emulsifioitu Freundin täydelliseen ad-
juvanttiin (CFA), epätäydelliseen adjuvanttiin (ICFA) tai
10 PBS:ään, seuraten taulukossa 1 esitettyä aikataulua. Viik-
ko viimeisen injektion jälkeen injektointiin 38C13-kasvain-
soluja (10^2 solua/hiiri) intraperitoneaalisesti. Tämä annos
on tappava 100 %:lle käsittelemättömistä eläimistä vuoro-
kauteen 30 mennessä. Kasvaimen läsnäolo ja kuolinvuorokau-
si laitettiin muistiin.

15 Kuvio 1 esittää immunisaation suojaavan vaikutuksen
eloonjääntiin tyypillisessä kokeessa. Tehokkain immunisaa-
tioaikataulu sisälsi kaksi annosta idiotyyppistä IgM:ää,
kerran CFA:ssa ja kerran ICFA:ssa (ryhmä II). Nämä havain-
not olivat toistettavia. Yhtään pitkän eloonjääntiajan
20 omaavia eläimiä ei ollut, kun käytettiin joko asiaan kuu-
lumatonta IgM-KLH-konjugaattia (ryhmä IV) tai konjugoima-
tonta idiotyyppistä IgM:ää (ryhmä VII).

Taulukko I

25	Immunisaatioaikataulu				
	Aika	I	II	III	IV
	Vuorokausi 28	-	-	-	-
	Vuorokausi 21	38C-KLH/ CFA i.p.			
30	Vuorokausi 14	38C-KLH/ ICFA i.p.	38C-KLH/ CFA i.p.	-	ABPC-KLH/ CFA i.p.
	Vuorokausi 7	38C-KLH/ PBS i.v.	38C-KLH/ ICFA i.p.	38C-KLH/ CFA i.p.	ABPC-KLH/ ICFA i.p.

35 *Koeryhmä sisälsi 10 hiirtä.

*Vuorokausi ennen kasvainsolujen (10^2) i.p. injektiota vuoro-
rokautena 0.

Esimerkki III**Immunisaatio idiotyyppiselle IgM:lle altistetuilla dendriittisolulla**

5 Nämä ryhmät, joihin kuului kuhunkin 10 C₃H/He-hiirtä, injektoitiin intraperitoneaalisesti 5 x 10⁴:llä IgM:lle altistetulla dendriittisolulla, jotka oli valmistettu esimerkin I mukaisesti, taulukon II immunisaatioaikataulun mukaisesti.

10

Taulukko II

Aika	V	VI	VII
Vuorokausi 28	DC-38C13 i.v.	DC-ABPC i.v.	38C13 i.v.
Vuorokausi 21	-	-	-
Vuorokausi 14	-	-	-
15 Vuorokausi 7	38C13 i.v.	ABPC i.v.	38C13 i.v.

Koeryhmä sisälsi 10 hiirtä.

*Vuorokausi ennen kasvainsolujen (10²) i.p. injektiota vuorokautena 0.

20

100 38C13-solua injektoitiin intraperitoneaalisesti viikko viimeisen antigeeni-injektion jälkeen. Kasvainsolujen läsnäolo ja kuolinvuorokausi laitettiin muistiin.

25 Idiotyyppiselle IgM:lle altistetuilla dendriittisolulla tehdyn immunisaation suojaava vaikutus on esitetty kuviossa 2. Idiotyyppille altistettujen dendriittisolujen yksi injektio, jota seurasi tehoste liukoosilla idiotyyppiproteiinilla, johti samaan eloonjääntiin kasvaimen siirron jälkeen kuin niissä kokeissa, joissa käytettiin 30 38C13-KLH-konjugaatteja ja CFA:ta. Kontrollilla immunisoidut eläimet (asiaan kuulumattomalle IgM:lle tai idiotyyppiproteiinille yksinään altistetut dendriittisolut) eivät osoittaneet minkäänlaista suojausta.

Esimerkki IV**Humoraalisen ja soluvälitteisen immunitetin vahvistus**

Humoraalisen immunitetin roolin vahvistamiseksi
5 syngeenisten anti-idiotyyppisten vasta-aineiden tasot mitattiin IgG-spesifisellä ELISA-testillä, joka suoritettiin seuraavasti.

Balb/c-hiiret immunisoitiin puhdistetulla idiotyyppiproteiinilla, joka oli ristisidottu keyhole limpet -koston hemosyaniinin (KLH) kanssa (Calbiochem-Behring, Hoechst) glutaraldehydillä sen menetelmän mukaisesti, jonka ovat kuvanneet Maloney et al., Hybridoma 4: 191 - 209 (1985), joka julkaisu liitetään tähän viitteeksi. Pernasolut hybridisoitiin P3 x 63 Ag 8.653-myeloomasolulinjaan.
10 Monoklonaaliset vasta-aineet E4 ja 8E3 reagoivat vahvasti 38C13 IgM:n (kappa) kanssa, eivät olleet inhiboitavissa normaalilla C₃H-seerumilla eivätkä sitoutuneet normaaleihin pernasoluihin tai puhdistettuihin IgM-myeloomaproteiineihin. C₃H-alkuperää oleva monoklonaalinen anti-idiotyyppi-
15 vasta-aine S5A8 ja rotan monoklonaalinen vasta-aine R7D7 puhdistettiin askitesnesteestä kaksoissaostamalla käyttäen ammoniumsulfaattia (40 %). Vasta-aineiden leimaus biotinilla suoritettiin alalla hyvin tunnettujen menetelmien mukaisesti.

25 Ennen kasvainsoluiinjektiota hiiristä otettiin verta silmäkuopan takapunoksen läpi. Saman koeryhmän yksittäisten hiirten seerumit yhdistettiin. Syngeeniset anti-idiotyyppiset vasta-aineet tunnistettiin ELISA-testillä, kuten on kuvattu.

30 Kuvion 3 tulokset osoittavat anti-id-vasta-aineiden korkeat tasot niissä hiirissä, jotka immunisoitiin 38C13-KLH:lla ja CFA:lla. Paljon matalammat tasot tunnistettiin sellaisten eläinten seerumeissa, jotka oli immunisoitu dendriittisolulla, joka osoittaa, että vasta-ainetasojen
35 ja eloonjäännin välillä ei ollut mitään suoraa suhdetta.

CFA:ssa olevan IgM-KLH:n kolme injektiota johti korkeampaan anti-id-vasta-aineiden seerumitasoon, mutta matalampiin eloonjäätitasoihin (kuvio 1).

5 Soluvälitteinen immunitetti määritettiin tunnistamalla pitkän eloonjäätiajan omaavien eläinten pernassa olevat idiotyyppispesifiset T-lymfosyytit molemmissa immunisaatiotavoissa. T-solujen suhteen rikastuneita pernasoluja viljeltiin liukoisen idiotyyppiproteiinin tai idiotyyppisen IgM:n, joka oli liitetty sepharoosipartikkeleihin, läsnä ollessa kolme vuorokautta. Kontrollikuopat sisälsivät splenosyyttejä IL2-proteiinia sisältävässä alustassa, jossa oli 10 % (v/v) rotan pernasoluviljelmän alustan supernatanttia, joka sisälsi 4 µg konkanavaliini A:ta/ml, 24 tunnin ajan, tai asiaan kuulumatonta IgM-proteiinia. Eloonjääneiden eläinten pernasolujen suspensio siirrettiin muovisille petrimaljoille (80 mm), jotka oli esipäällystetty 0,2 % BSA:lla, konsentraatioksi 10^7 solua/ml 3 ml:aan täydellistä alustaa 37 °C:seen yhdeksi tunniksi (27). Kiinnittymättömät solut siirrettiin maljoille, jotka oli esipäällystetty kanin anti-hiiri-vastaaineella (kappa)(10 µg/ml) ja sijoitettiin 4 °C:seen yhdeksi tunniksi. Toinen huuhdonta suoritettiin maljoilla, jotka oli esipäällystetty vuohen hiiri-Ig:lla (Tago, Burlingame, CA). Tämän kaksoishuuhdon jälkeen solujen saanto oli yleensä 25 - 30 % tumallisia soluja. Myöhemmissä kokeissa T-solut rikastettiin sitomalla nailonvillaan alalla hyvin tunnetuilla menetelmillä. B-solukontaminaatio tutkittiin immunofluoresenssilla käyttäen vuohen anti-hiiri-Ig-vasta-aineita (Tago). B-solufraktion määrä oli yleensä 5 - 7 %. Solususpensio, joka oli rikastunut T-solujen suhteen, sijoitettiin pyöreäpohjaisiin kuoppiin (200 µl/kuoppa, 5×10^5 solua/ml). Kuoppiin lisättiin 20 µl (50 µg/ml) stimuloivaa ainetta. Kolmen vuorokauden viljelyn jälkeen kuhunkin kuoppaan lisättiin 1,5 µCi [metyyli- ^3H]-tymidiiniä. Tämän 18 tunnin leimauksen jälkeen solut ke-

10
15
20
25
30
35

rättiin lasikuitusuodatinkiekoille ja inkorporoitunut radioaktiivisuus mitattiin nestetuikelaskijalla. Kaikki mitaukset suoritettiin neljänä rinnakkaisena ja tulokset on ilmoitettu cpm:ien keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe.

5 In vitro stimulaation tulokset on esitetty taulukossa II. Sellaisten hiirten, joita käsiteltiin DC-38C13:lla, T-solut respondoivat paremmin idiotyyppiproteiinille kuin sellaisten hiirten T-solut, joita hiiriä käsiteltiin CFA:ssa olevilla idiotyyppi-KLH-konjugaateilla, tai kontrollihiirten T-solut.

Lisääntymisresponsit pitkäaikaisen eloonjäännin omaavissa eläimissä*

[³H]-tymidiinin inkorporaatio (cpm \pm keskiarvon keskivirhe)

	38C13-IgM	38C13-sepharoosi	IL2	Yhteen kuulumaton IgM
15	DC-38C13 23,451 \pm 1286 ^s	6,787 \pm 376 ^s	10,071 \pm 563 ^s	1,414 \pm 160
20	CFA:ssa oleva id. KLH 1,084 \pm 127	11,271 \pm 89 ^s	2,166 \pm 527 [#]	4,805 \pm 363 ["]
25	- ¹ 1,453 \pm 661	2,996 \pm 243	850 \pm 302	2,195 \pm 395

Taulukko

30 *Rikastettuja pernan T-soluja viljeltiin in vitro kolmen vuorokauden ajan 38C13-IgM:n, sepharoosipartikkeleihin liitettyjen 38C13-IgM:ien, IL2-proteiinia sisältävän alustan tai liukoisen vieraan IgM:n läsnä ollessa. Stimulaatio mitattiin ³H-tymidiinin inkorporaatiotasona, joka inkorporaatio tapahtui viljelyn viimeisen 18 tunnin aikana. ¹Normaaleja C₃H/He-hiiriä käytettiin esikäsittelemättömien T-solujen puhdistukseen. *Merkittävä arvolla p < 0,001 vieraan IgM:n t-testin mukaan. ^sMerkittävä arvolla p < 0,001

t-testin mukaan verrattuna esikäsittelemättömiin T-soluihin. $p > 0,05$ t-testin mukaan verrattuna esikäsittelemättömiin T-soluihin. "Merkittävä arvolla $p < 0,002$ t-testin mukaan verrattuna esikäsittelemättömiin T-soluihin.

5

T-solujen suhteen rikastettuja pernasoluja käytettiin myös tavanomaisessa soluvälitteisessä sytotoksisuus-testissä seuraavasti:

Kasvainsolut leimattiin L-[4,5-³H]-leusiinilla (Amersham) ja sijoitettiin U-pohjaisiin mikrotiitterilevykuoppiin määräksi 1×10^4 kohdesolua (100 μ l). Vaikuttajasolut (rikastuneet pernan T-solut eloonjääneistä eläimistä) lisättiin suhteina 100/1, 50/1, 25/1, 6,25/1, 3/1 ja 1,5/1 kolmena rinnakkaisena lopullisen tilavuuden ollessa 200 μ l. Solut ajettiin pohjaan varovaisella sentrifugaatiolla ja maljoja inkuboitiin 16 tuntia 37 °C:ssa kosteassa ilmakehässä, joka sisälsi 5 % CO₂:ta. 50 μ l supernatanttia käytettiin laskettaessa vapautuneen radioaktiivisuuden määrä. Spontaani ja maksimivapautuminen määritettiin lisäämällä 100 μ l täydellistä alustaa tai 100 μ l 0,1 % NP40:ää T-solujen sijasta. Spesifinen sytotoksisuus laskettiin seuraavan kaavan mukaisesti:

25

$$\text{Spesifinen vapautumis-\%} = \frac{\text{vapautuminen kokeessa} - \text{spontaani vapautuminen}}{\text{maksimivapautuminen} - \text{spontaanivapautuminen}} \times 100$$

Immuunilymfosyyttien sytotoksisuus mitattiin T-solujen eristyspäivänä ja kolme vuorokautta sepharoosipartikkeleihin kiinnitetyllä 38C13:lla tapahtuneen in vitro stimulaation jälkeen. Stimuloimattomat T-solut eivät kyenneet hajottamaan 38C13-kohdesoluja. Kuitenkin in vitro stimulaation jälkeen 38C13-kasvainsolujen spesifinen hajoaminen DC-38C13:lla käsiteltyjen T-solujen toimesta oli 21 % verrattuna 38C13-KLH:lla stimuloitujen solujen 11 %:iin (vaikuttajakohdesolujen suhteella 100/1 16 tunnin inkubaatiokokeessa).

35

Esimerkki V**Jäljelle jääneet kasvainsolut**

Pitkän eloonjääntiajan omaavien eläinten pernassa olevien jäljelle jääneiden kasvainsolujen läsnäolo hahmo-
 5 telttiin immunohistologialla ja in vitro viljelyllä. Kryos-
 taattileikkeet kiinnitettiin asetonissa ja värjättiin mo-
 noklonaalisilla vasta-aineilla, jonka jälkeen käsiteltiin
 streptavidini-piparjuuriperoksidaasilla ja diaminobentsi-
 diinitetrahydrokloridilla. Pitkän eloonjääntiajan omaavien
 10 eläinten pernojen jäädytetyt leikkeet värjättiin biotiny-
 loiduilla monoklonaalisilla anti-idiotyyppivasta-aineilla.
 Nämä vasta-aineet oli aiemmin testattu kasvaimen sisältä-
 villä pernaleikkeillä, jossa ne värjäisivät sekä pinnan
 että sytoplasman idiotyyppisen IgM:n. Mitään jäljelle jää-
 15 neitä kasvainsoluja ei voitu tunnistaa pitkän eloonjään-
 tiajan omaavien eläinten pernojen sarjaleikkeissä. Pernas-
 ta eristettyjä B-lymfosyyttejä viljeltiin in vitro rikas-
 tetussa ja sopeutetussa alustassa. Vaikka 38C13-kasvain-
 solut, joita käytettiin tässä tutkimuksessa, ovat adap-
 20 toituneet in vitro viljelyyn, yksikään viljelmistä ei
 osoittanut kasvainsolujen uudelleen kasvua. Lopuksi B-so-
 lut siirrettiin säteilytettyihin syngeenisiin luonnol-
 lisiin eläimiin. Mitään kasvaimen kasvua ei havaittu kuu-
 den kuukauden havaintoajan aikana. Nämä tulokset osoit-
 25 tavat, että pitkän eloonjääntiajan omaavien eläinten per-
 noissa ei ollut yhtään jäljelle jääneitä kasvainsoluja.

Esimerkki VI**Dendriittisolujen vaihtoehtoinen valmistus**

Pernat perfusoiitiin liuoksella, jossa oli 100 yk-
 30 sikköä kollagenaasia/ml (CLS III, Worthington, luettelonu-
 mero 4182, 1 g/pullo) 10 x Hanksin tasapainotetussa suo-
 laliuoksessa (HBSS)(laimennettu 10 x HBSS-liuoksesta,
 Gibco, luettelonumero 310-4065A/J)(pH säädettiin 7,2:een
 steriilillä GIBCO:n 7,5 % bikarbonaatilla). Solut kerät-
 35 tiin putkeen, joka sisälsi RPMI-alustaa, jossa oli 10 %

FCS:ia. Jäljelle jäänyttä solujätettä inkuboitiin inkubaattorissa 15 minuuttia liuoksessa, jossa oli 400 yksikköä kollagenaasia/ml. Liuos pipetoitiin noin 50 kertaa, jotta saatiin kerätyksi suurin osa soluista. Kaikki solut yhdistettiin ja pelletoitettiin.

Naudan seerumialbumiini valmistettiin seuraavasti: BOVUMINAR COHN FRACTION V -jauhetta (Armour Pharmaceutical Company, Kankakee, Illinois) pidettiin 4 °C:ssa eksikaattorissa. Lasisäiliössä (suljettu alumiinifoliolla) yhdistettiin 65 ml tislattua vettä, 186 ml PBS:ää, 29 ml 1 M NaOH:ia ja 107 g BSA:ta ja pidettiin 4 °C:ssa 24 tuntia ilman sekoitusta. Tiheys tarkistettiin refraktometrillä ja pidettiin välillä 1,3855 - 1,3865. Jos liuos oli liian tiheä, sitä sekoitettiin hyvin hitaasti ja lisättiin kylmää PBS:ää. Se suodatettiin ja pidettiin 4 °C:ssa. Pelletti suspendoitiin uudelleen liuokseen, jossa oli kylmää BSA:ta, ja sentrifugoitiin 10 000 x g; noin 2 ml seerumivapaata alustaa lisättiin gradientin päälle. Matalan tiheyden omaavat solut kerättiin ja ne edustivat noin 10 % pernasoluista.

Soluja viljeltiin alustassa, joka sisälsi 10 % FCS:ää, 2 tuntia 100 mm viljelymaljoilla. Kiinnittymättömät solut pestiin pois pipetoimalla voimakkaasti (15 minuuttia per malja). Soluja inkuboitiin jälleen yksi tunti seerumivapaassa alustassa ja kiinnittymättömät solut poistettiin pipetoimalla varovasti. Jäljelle jääneitä kiinnittyneitä soluja viljeltiin yli yön RPMI-alustassa, joka sisälsi 10 % FCS:ää. Seuraavana päivänä kiinnittymättömät solut kerättiin pipetoimalla varovasti. Yhdestä pernasta saatiin 2×10^5 - 5×10^5 dendriittisolua.

Vaikka keksintö on kuvattu viitaten tässä suositeltuun suoritustapaan on ymmärrettävä, että eri modifikaatioita voidaan tehdä ilman, että poistutaan keksinnön piiristä. Sen mukaisesti keksintöä rajoittavat ainoastaan seuraavat patenttivaatimukset.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä idiotyypille altistettujen terapeut-
tisesti käyttökelpoisten dendriittisolujen valmistamiseksi,
5 si, t u n n e t t u siitä, että dendriittisoluja altiste-
taan idiotyyppi-proteiinille in vitro ja idiotyypille al-
tistetut dendriittisolut otetaan talteen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheet, joissa
10 a) altistetaan in vitro dendriittisolut solun
pinnalla idiotyyppi-proteiinia ekspressoivan patogeenisen
lymfosyytin idiotyyppi-proteiinille in vitro niin, että
saadaan idiotyypillä altistetut dendriittisolut; ja
b) otetaan talteen mainitut idiotyypillä altiste-
15 tut dendriittisolut.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että patogeeniset lymfositit ovat
kasvainsoluja.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että kasvainsolut ovat lymfooma-
soluja.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että lymfoomasolut ovat B-imu-
soluja.

25 6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että idiotyyppi-proteiini on immu-
noglobuliini.

7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että idiotyyppi-proteiini on sel-
30 lainen immunoglobuliinifragmentti, joka sisältää idiotyypin.

8. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että dendriittisolut ovat ihmisen
soluja.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara dendritceller, vilka exponerats för idiotyp, 5 kännetecknat av att dendritceller exponeras för idiotypprotein in vitro och de för idiotyp exponerade dendritcellerna tillvaratas.

2. Förfarande enligt patentkrav, kännetecknat av att det innehåller steg, vari

10 a) däggdjurs dendritceller exponeras in vitro för idiotypprotein av en patogen lymfocyt som uttrycker idiotypprotein på cellens yta, så att man erhåller dendritceller exponerade för idiotyp; och

b) nämnda för idiotyp exponerade dendritceller 15 tillvaratas.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, kännetecknat av att de patogena lymfocyterna är tumörceller.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, kännetecknat av att tumörcellerna är lymfoceller.

20 5. Förfarande enligt patentkrav 3, kännetecknat av att lymfocellerna är B-lymfocyter.

6. Förfarande enligt patentkrav 2, kännetecknat av att idiotypproteinets är immunoglobulin.

25 7. Förfarande enligt patentkrav 2, kännetecknat av att idiotypproteinets är ett sådant immunoglobulinfragment som innehåller idiotyp.

8. Förfarande enligt patentkrav 2, kännetecknat av att dendritcellerna är människoceller.

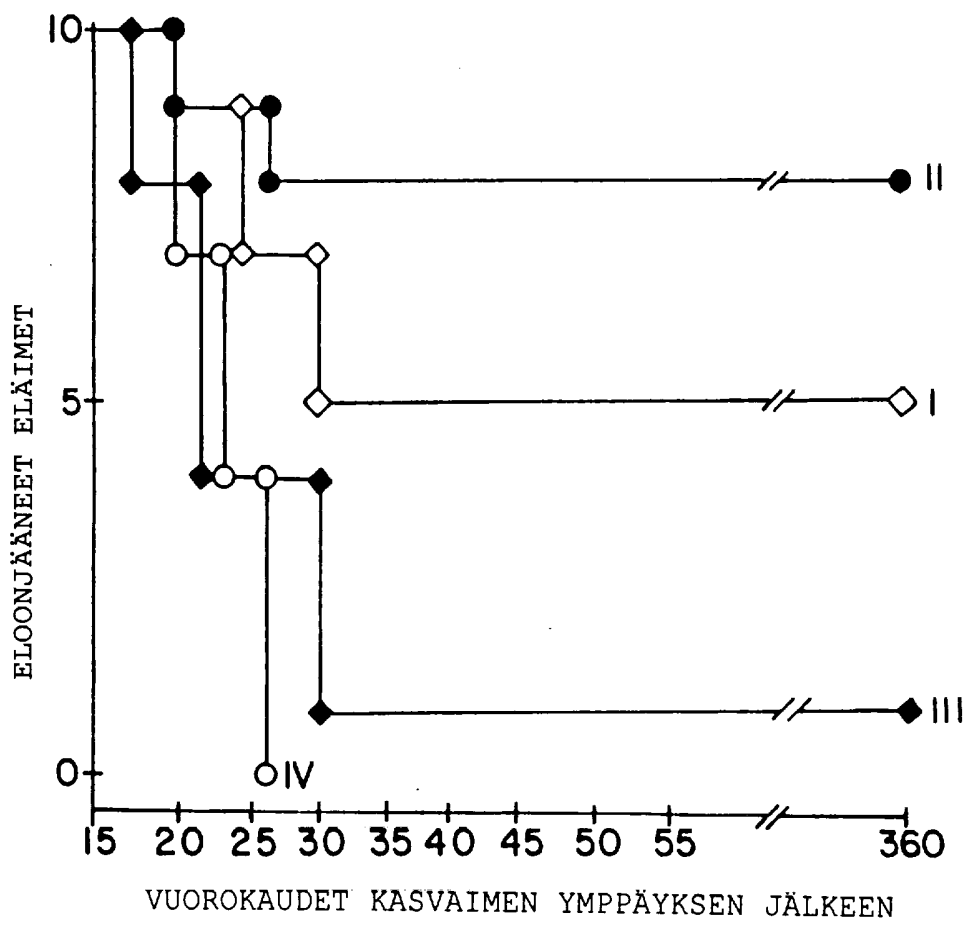


FIG. I

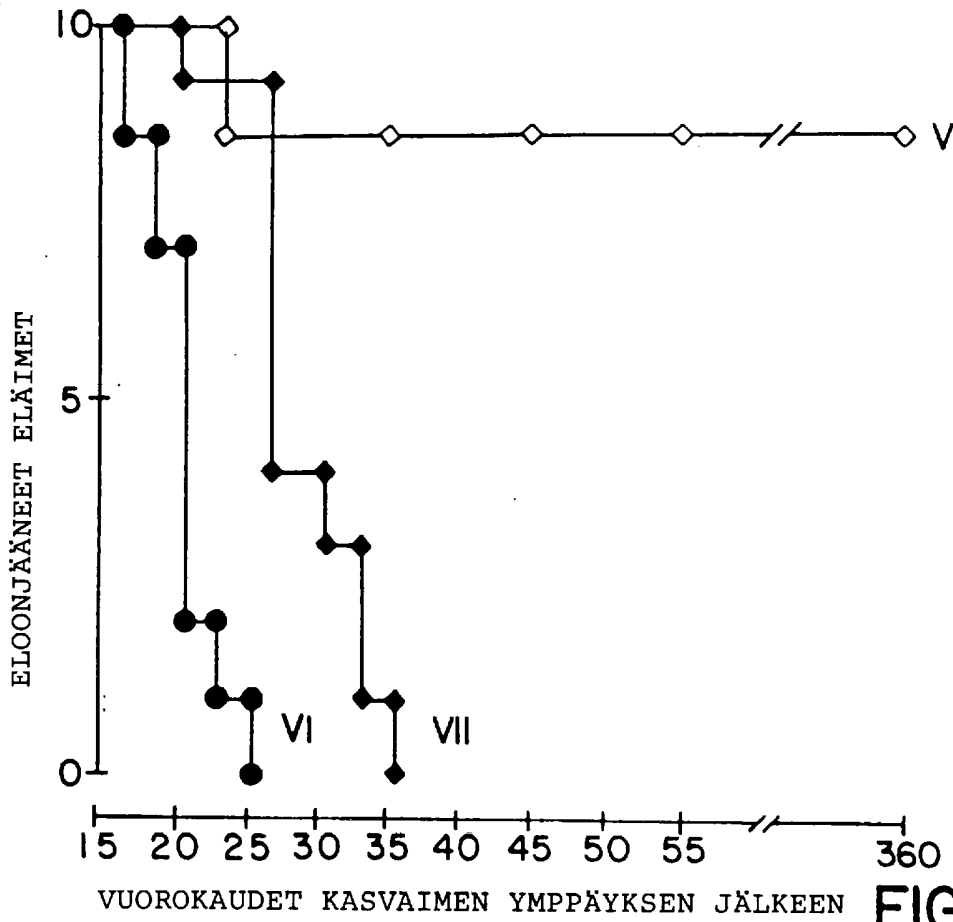


FIG. 2

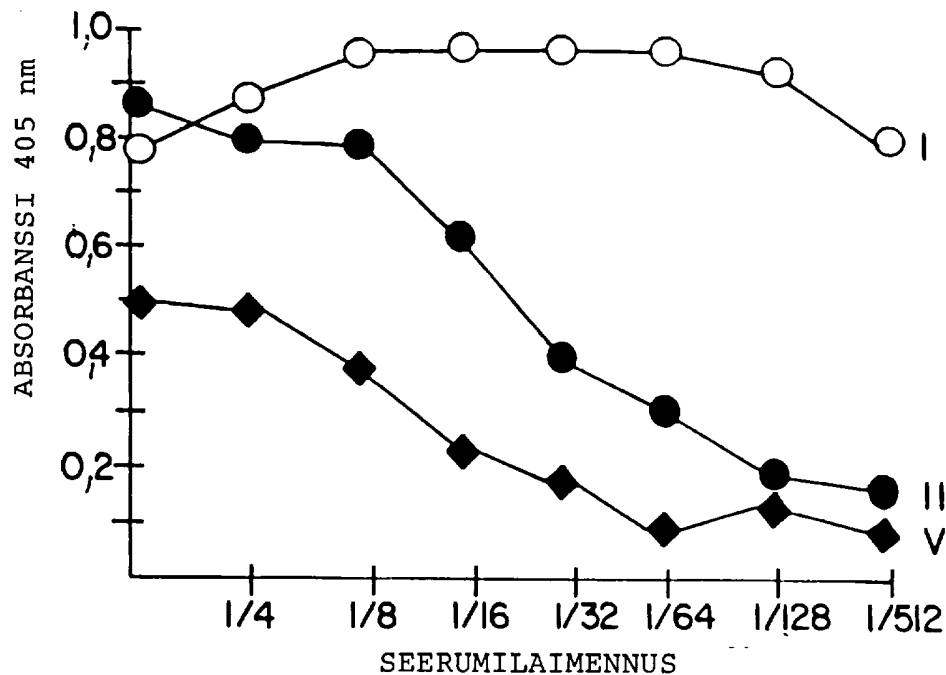


FIG. 3