



(12) **Øversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2302380 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Øversettelse publisert	2013.04.22
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.11.21
(86)	Europeisk søknadsnr	09012276.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.09.28
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.03.30
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	TheraMab GmbH, Friedrich-Bergius-Ring 15, 97076 Würzburg, Tyskland
(72)	Oppfinner	Hünig, Thomas, Am Hohlweg 34, 97286 Winterhausen, Tyskland
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for preklinisk testing av immunmodulerende legemidler.
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1- 1 944 359 US-A1- 2006 286 104 WO-A1-2008/081198 STEBBINGS R ET AL: "Safety of biologics, lessons learnt from TGN1412" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 20, no. 6, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 673-677, XP026778877 ISSN: 0958-1669 [retrieved on 2009-11-04]

Fremgangsmåte for preklinisk testing av immunmodulerende legemidler

Oppfinnelsens område

5 Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte hvor et kjent eller potensielt immunmodulerende legemiddel testes, inneholdende trinnet med å bringe en in-vitro kultur av perifere mononukleære blodceller (PBMC) i kontakt med det immunmodulerende legemiddelet og observere PBMC-kulturen for frisetting av minst ett cytokin fra PBMC-en eller for celleproliferasjon ved kontakt med det
10 immunmodulerende legemiddelet. Oppfinnelsen vedrører videre en fremgangsmåte for å teste cytokinstormdempende legemidler in-vitro. Oppfinnelsen vedrører endelig en fremgangsmåte.

15 Kjent teknikk og bakgrunn for oppfinnelsen

Immunterapeutiske legemidler som modulerer aktiviteten til lymfocytter, evalueres preklinisk i to systemer: dyremodeller, vanligvis gnagere, og, hvis tilgjengelig, primater; og kulturer av humane perifere mononukleære blodceller
20 (PBMC).

PBMC brukes rutinemessig fordi de for det første inneholder alle undergrupper av lymfocytter i tillegg til monocytter, og for det andre er lett tilgjengelige fra veneblod hentet fra friske donorer eller fra pasienter. In vitro-stimulering av
25 disse PBMC-ene regnes som en nyttig indikator på aktivitetene til et immunmodulerende legemiddel som kan forventes in vivo.

Bestemte T-celleaktivatorer, spesielt monoklonale antistoffer (mAb) som virker via T-celleantigenreseptoren (TCR) slik som OKT3, den første mAb brukt i
30 klinikken for immunsuppresjon, induserer den systemiske frisettingen av proinflammatoriske cytokiner (Abramowicz et al., 1989). De farligste av disse er TNF, interferon-gamma (IFN-gamma) og IL-2. Hos pasienter som mottar mAb-terapi, oppnås kontroll over et slikt cytokinfrisettingsyndrom eller "cytokinstorm" rutinemessig ved behandling med høye doser kortikosteroid.

35

TGN1412 er et humanisert monoklonalt antistoff (mAb) av IgG4-underklassen spesifikk for det kostimulerende molekylet CD28 uttrykt ved humane T-celler. Det kalles en "CD28-superagonist" (CD28SA) fordi det i motsetning til det klassiske CD28-spesifikke mAb kan aktivere T-lymfocytter uten simultan
5 involvering av T-celleantigenreseptoren (TCR) (Hunig, 2007). TGN1412 ble utviklet av det nå oppløste TeGenero AG, Würzburg.

Under et første forsøk på menneske (eng: "first-in-man trial") utført av det uavhengige Parexel Clinical Trial Unit ved Northwick Park Hospital i London den
10 13. mars 2006 førte intravenøs tilførsel av 100 µ/kg kroppsvekt av TGN1412 til friske menneskelige frivillige, til et livstruende cytokinfrisettingsyndrom som først kom under kontroll etter overføring av de frivillige til sykehusets intensivavdeling (Suntharalingam et al., 2006).

Det prekliniske arbeidet presentert av sponsoren, TeGenero AG, viste ingen tegn på en slik "cytokinstorm" i en analog rottemodell som brukte en rotte-CD28-spesifikk superagonist, og hos krabbemakaker som mottok TGN1412 selv i opptil 50 ganger høyere doser enn de menneskelige frivillige (Duff, 2006). Videre førte tilsetning av TGN1412 til kulturer av humant PBMC heller ikke til
20 cytokinfrisetting. Alle nøkkelforsøkene på aper og PBMC-kulturer ble gjentatt av British National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) på vegne av regjeringens Expert Scientific Group on Phase One Clinical Trials, og bekreftet den uskadelige atferden til TGN1412 i disse systemene (Duff, 2006). Tre år etter det mislykkede TNG1412-forsøket er det fortsatt ikke brakt på det rene hvorfor
25 denne in vitro-analysen ikke advarte mot cytokinstormen som ble erfart av de menneskelige frivillige.

Det at gnagere og krabbemakaker ikke frisatte toksiske systemiske cytokiner etter injisering av CD28SA skyldes åpenbart forskjeller mellom artene når det
30 gjelder reaktiviteten til det intakte immunforsvaret overfor slike midler, og spesifikke antakelser om slike forskjeller er gjort. (Gogishvili et al., 2009; Nguyen et al., 2006; Schraven og Kalinke, 2008).

Disse funnene antyder at på grunn av artsspesifikke reaksjonsmønstre, er selv
35 ikke primat-dyremodeller alltid sikre prediktorer på human reaktivitet på nye legemidler. Det skal anmerkes at et menneske har omtrent 10^{12} T-lymfocytter,

og at mindre enn én prosent av disse sirkulerer i blodet til enhver tid. Derfor skyldes kultivert PBMCs unnløstelse av å respondere på TGN1412 enten en funksjonsdefekt i disse cellene sammenlignet med de som finnes i lymfatisk vev (som åpenbart responderte med cytokinfrisetting hos de frivillige), eller
5 nødvendigheten av en celletype nærværende i lymfatiske organer, men ikke i blod for TGN1412-mediert aktivering av T-lymfocytter.

Det er derfor et presserende behov for reproduksjon av cytokinstormen observert hos de menneskelige frivillige fra London TGN1412-forsøket i
10 cellekultur for å forstå dens mekanisme og teste dens sensitivitet for farmakologisk suppresjon.

Fra et bredere perspektiv antyder kjente humane PBMC-kulturers unnløstelse av å respondere på oppløselig TGN1412 med cytokinfrisetting at dette systemet ikke
15 responderer på alle lymfocytaktivatorer på samme måte som det intakte humane immunforsvaret inne i kroppen gjør. Korreksjon av denne defekten kan ikke bare muliggjøre en detaljert analyse av virkningene til humane CD28-superagonister (SA) slik som TGN1412, men kan også avsløre reaktiviteten til andre, tilsynelatende ufarlige legemidler under preklinisk utvikling.

20

Oppfinnelsens tekniske problem

Oppfinnelsens tekniske problem er følgelig å tilveiebringe forbedrede midler for
25 in-vitro-testing av immunmodulerende legemidler, spesielt CD28SA, med hensyn til potensielle cytokinstormer. Et ytterligere formål ved oppfinnelsen er å tilveiebringe midler for å teste legemidler egnet for å dempe cytokinstormer.

Oppfinnelsens prinsipper og foretrukne utførelsesformer.

30

For å løse de førstnevnte tekniske problemene fremgår det av oppfinnelsen en fremgangsmåte for å teste et potensielt eller kjent immunmodulerende legemiddel for T-celleaktivering, omfattende trinnet med in vitro å bringe en kultur av perifere mononukleære blodceller (PBMC) i kontakt med en
35 forutbestemt mengde av det potensielle eller kjente immunmodulerende legemiddelet og observere PBMC-kulturen for frisetting av minst én cytokin fra

PBMC-ene ved kontakt med det potensielle eller kjente immunmodulerende legemiddelet, hvori celletettheten til en PBMC-prekultur tilpasses slik at PBMC-ens celle-celle-kontakt muliggjøres og hvori PBMC-prekulturen kultiveres i minst 12 timer. Betegnelsen "prekultiveres" betyr at PBMC-kulturen kultiveres under
5 fravær av immunmodulerende legemidler og før kontakt med slike legemidler som skal testes. Betegnelsen "observere" omfatter kvalitativ, halv-quantitativ og kvantitativ måling av konsentrasjoner av det minst ene cytokinet eller av proliferasjon med kjente teknikker.

10 Oppfinnelsen er basert på det overraskende funnet at en PBMC-kultur, som er preparert ved hjelp av standardmetoder, men ytterligere prekultivert i en forutbestemt tidsperiode før kontakt med det immunmodulerende legemiddelet, plutselig viser sensitivitet med hensyn til cytokinfrisetting utløst av kontakt med immunmodulerende legemidler, som ikke utløser cytokinfrisetting under fravær
15 av prekultiveringsprosessen. Oppfinnelsen er videre basert på funnet at denne prekultiveringseffekten fremmes av PBMC-ens celle-celle-kontakter i en forutbestemt tidsperiode. Med andre ord, PBMC-kulturen bør ikke være nylig preparert når det immunmodulerende legemiddelet tilsettes.

20 Derfor er oppfinnelsen nyttig for å forutsi enkeltpersoners reaktivitet på immunmodulerende legemidler, som TGN1412, og, som det vil bli forklart i mer detalj senere, evnen til immunsupprimerende legemidler slik som kortikosteroider til å kontrollere uønskede reaksjoner. Den er også nyttig for å ytterligere forstå virkemåten til CD28SA. Videre er oppfinnelsen nyttig ved
25 screening av potensielle immunmodulerende legemidler for deres T-celleaktiveringspotensial, inkludert cytokinfrisetting. Fordi PBMC-en som samles inn etter prekultivering med høy tetthet, sannsynligvis gjenspeiler statusen til T-celleaktivitet funnet i de lymfatiske organene, bør de, i kombinasjon med en aktivator, også utnyttes for å teste immunsupprimerende legemidler fordi
30 sirkulerende T-celler enklere kan supprimeres på grunn av deres "inaktive" status, noe som gir misvisende resultater for effektiviteten av slike legemidler.

I en utførelsesform av oppfinnelsen utføres prekultiveringstrinnet ved å lagre PBMC-kulturen i minst 24 timer, foretrukket minst 36 timer, mer foretrukket
35 minst 45 timer, ved 35 til 40 °C, foretrukket ved 36 til 38 °C, under fravær av

immunmodulerende legemidler, og før kontakten med det immunmodulerende legemiddelet som skal testes.

5 I oppfinnelsen er celletettheten til PBMC-kulturen under og/eller etter
prekultiveringstrinnet minst $2 \cdot 10^6$ /ml, foretrukket minst $5 \cdot 10^6$ /ml, mer
foretrukket minst 10^7 /ml. Når det gjelder celletetthet ved overflaten av
vevskulturbeholderen, bør den være minst $4 \cdot 10^5$ /cm², foretrukket minst
10 10^6 /cm², mest foretrukket minst $2 \cdot 10^6$ /cm². De tilveiebrakte verdiene gjelder
direkte for beholdere bestående av flate brønner. I runde brønner eller koniske
brønner vil den totale tettheten variere fordi celletettheten er høy ved bunnen av
brønner og lav i de øvre delene av brønner. Følgelig skal celletetthetene per
volumenhet gitt ovenfor også henvise til partielle volumer i beholdere av alle
typer, dvs. de gitte tetthetene skal tilveiebringes i et partielt volum på f.eks.
minst 10 µl av det totale nærværende prekulturvolumet. I tillegg skal enhver
15 annen fremgangsmåte for å oppnå celletettheter i levedyktige celler, som krevet,
være omfattet av oppfinnelsen. Foretrukket er det minste antallet celler som er i
celle-celle-kontakt, minst 50 000.

I en foretrukket utførelsesform er det immunmodulerende legemidlet et
20 immunstimulerende legemiddel, slik som et antistoff, fortrinnsvis et monoklonalt
antistoff. Spesifikt kan det monoklonale antistoffet være et humant CD28-
spesifikt superagonistisk monoklonalt antistoff.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen er det observerte cytokinet valgt fra
25 gruppen bestående av TNF, IFN-gamma, IL-1-beta, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5,
IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-21,
IL-35, LT og kombinasjoner derav. Alternativt kan cellens proliferasjon
observeres, hvori proliferasjon forekommer når antall celler stiger med en
forutbestemt mengde innenfor en tidsenhet. Denne mengden kan velges av
30 eksperten ved de vanlige hensyn.

I en ytterligere utførelsesform som har spesiell relevans med hensyn til det
andre nevnte formålet, bringes den prekultiverte PBMC-kulturen i tillegg i
kontakt med et potensielt legemiddel for å dempe frisettingen av minst ett
35 cytokin (immunsupprimerende legemiddel), samtidig som PBMC-kulturen bringes
i kontakt med det kjente immunmodulerende, særlig stimulerende, legemiddelet,

eller senere etter en forutbestemt tidsperiode, eller en forutbestemt tidsperiode før dette, hvori cytokinfrisettingen observeres ytterligere. Den forutbestemte tidsperioden kan være i området fra 10 s til 12 h, fortrinnsvis i området fra 10 s til 1 h.

5

Det potensielle legemidlet for å dempe frisettingen av cytokin er fortrinnsvis (men ikke utelukkende) valgt fra gruppen bestående av kortikosteroider, inkludert, men ikke begrenset til, deksametason eller metylprednisolon.

10

I denne utførelsesformen blir det mulig å teste in-vitro hvorvidt et bestemt legemiddel tenkt for demping av en cytokinstorm (immunsupprimerende legemiddel) er egnet, i tilfelle en slik cytokinstorm opptrer i in vivo-forsøk til tross for administrering av det immunmodulerende legemidlet i en konsentrasjon med hvilken en cytokinstorm ikke forventes. Særlig muliggjør denne varianten av oppfinnelsen å skape et matchende par av immunmodulerende legemiddel og dempende legemiddel og tilveiebringer trygge midler for å håndtere uventede cytokinstormer i in vivo-forsøk, spesielt i kliniske studier med mennesker.

15

Nedenfor forklares oppfinnelsen i detalj ved hjelp av eksempler og figurer. Figurene viser:

20

Figur 1: Indusering av cytokinfrisetting ved den CD3-spesifikke mAb OKT3 og CD28-superagonisten TGN1412 fra human PBMC.

Figur 2: Konsekvent konversjon fra en ikke-TGN1412-reaktiv til en TGN1412-reaktiv tilstand ved 2 dagers prekultivering.

25

Figur 3: Erverv av TGN1412-reaktivitet krever høy celletetthet under prekultivering.

Figur 4: Erverv av TGN1412-reaktivitet i prekulturer med høy tetthet krever to dager med inkubering.

30

Figur 5: Erverv av TGN1412-reaktivitet i kulturer med høy tetthet krever celle-celle-kontakt.

Figur 6: Prekultivert, men ikke fersk PBMC responderer på TGN1412 med proliferasjon.

Figur 7: CD45RO (hukommelse) CD4-T-celler er hovedkilden for proinflammatoriske cytokiner frisatt ved både OKT3 og TGN1412.

35

Figur 8: Sammenlignbar kinetikk av TNF-frisetting fra prekultivert PBMC med høy tetthet, induisert ved OKT3 og TGN1412.

Figur 9: Erverv av TGN1412-reaktivitet blokkeres av mAb mot HLA-antigener.

Figur 10: Sammenlignbar sensitivitet av cytokinfrisetting induisert ved OKT3 og TGN1412 overfor kortikosteroidformidlet suppresjon.

5

Eksempel 1: Sammenligningseksempel

10 For indusering av cytokinfrisetting anvender både den foreliggende oppfinnelsen og dette sammenligningseksempellet standardssystemet med PBMC-stimulering slik som det anvendes av forskere verden over for å studere responsen til human PBMC på immunmodulerende midler. I dette systemet anvendes fersk preparert PBMC, isolert fra heparinisert veneblod ved sentrifugering over en

15 tetthetsgradient (Lymphocyte Separation Medium LSM 1077, PAA Laboratories, Pasching, Tyskland) ved å følge produsentens anvisninger. Alternativt anvendes det et ferskt leukocyttkonsentrat, oppnådd fra leukocyttreduksjonssystemkamre (Caridian, Gambro BCT, Lakewood, CO, USA) som biprodukt ved fremstilling av blodplatekonsentrater (Dietz et al., 2006), som startmateriale for Ficoll-rensing, med identiske resultater. PBMC-er kultiveres i 96-brønners vevskulturplater (Greiner bio-one, Frickenhausen, Tyskland), hvor 2×10^5 celler stimuleres i 0,2 ml anrikt RPMI 1640-kulturmedium (GIBCO/Invitrogen, Long Island, NY, USA) supplert med 10 % autologt serum eller "pooled" AB-serum tilgjengelig i

20 handelen (PAA Laboratories), med identiske resultater.

25

I dette vevskultursystemet ble fersk isolert PBMC stimulert med løselig TGN1412 tilveiebrakt av TheraMab GmbH, Würzburg. Dette stammet fra samme GPM-kvalitetsbatch som ble anvendt under London-forsøket (Suntharalingam et al., 2006). Som positiv kontroll for indusering av cytokinfrisetting ble OKT3 av klinisk

30 kvalitet brukt ("Muromonomab", Janssen-Cilag, Neuss, Germany) som er velkjent for å utløse cytokinfrisetting både in-vitro og hos pasienter (Abramowicz et al., 1989). Etter 24 timer ble et cytokinpanel som inneholdt de viktigste pro- og antiinflammatoriske faktorene og som ble detektert i plasmaet hos de frivillige deltakerne i TGN1412-forsøket (Suntharalingam et al., 2006), analysert

35 ved hjelp av CBA-teknologien (CBA = cytokine-bead-array) (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), ved å følge produsentens anvisninger.

Konsentrasjonen av både OKT3 og TGN1412 som ble anvendt, var på 1 µg/ml, som ligger innenfor området av den estimerte konsentrasjonen som ble oppnådd i sirkulasjonen hos de frivillige under TGN1412-forsøket i London (Duff, 2006).
5 Utstrakt titrering av begge antistoffene ikke vist her, viste at denne konsentrasjonen er innenfor det optimale området for biologiske reaksjoner.

Figur 1A viser at løselig TGN1412 ikke klarer å inducere cytokinfrisetting i fersk PBMC. Derimot er OKT3 svært effektivt i å inducere TNF, IFN-gamma og IL-2, som alle er kjent for å bidra til de patologiske utslagene av cytokinfrisettingssyndromet, i tillegg til det antiinflammatoriske cytokinet IL-10. PBMC-er fra en frisk donor ble isolert ved hjelp av Ficoll-tetthetsentrifugering og kultivert i 0,2 ml RPMI1640-medium, supplert med 10 % AB-serum, i 24 timer ved 10^6 /ml i flatbunnede 96 brønners kulturplater. Cytokiner i supernatantene ble analysert etter 24 timer med inkubering ved cytokine-bead-array. Monoklonale antistoffer ble anvendt med 1µg/ml sluttkonsentrasjon. Middelverdier og standardavvik av triplikater er vist.
10
15

Det at TGN1412 ikke er i stand til, og at OKT3 er i stand til, å inducere frisetting av disse og andre cytokiner (ikke vist) i slike standard-PBMC-kulturer ble reproduisert med over 10 ulike donorer og stemmer overens med dataene som ble levert av TeGeneroAG og reproduisert i rapporten fra Scientific Expert Group on the safety of Phase I clinical trials (Duff, 2006).
20

25

Eksempel 2: Respons på TGN1412 etter prekultivering

For forsøket i fig. 1B ble PBMC fra en frisk donor kultivert i 1,5 ml medium i 2 dager ved 10^7 /ml i flatbunnede 24-brønners vevskulturplater før de ble vasket og innstilt på nytt på 10^6 /ml. Med disse cellene ble det samme forsøket utført som beskrevet i eksempel 1.
30

Fig. 1B viser overraskende at evnen til å respondere på TGN1412 er gjenopprettet ved ganske enkelt å prekultivere PBMC i to dager uten åpenbar stimulasjon. Da cellene ble preparert 4. desember 2008, overskred antallet oppnådde PBMC-er det nødvendige antallet for det aktuelle forsøket, så
35

overflødige celler ble lagret i kulturmedium i to dager ved 37 °C. Da disse cellene ble anvendt til det nøyaktig samme forsøket som det som ble utført tidligere med ferske celler (fig. 1A), skjedde noe helt uventet: TGN1412 induiserte nå en cytokinfrisetting i sammenlignbar størrelse som OKT3. Fig. 1B

5 tilveiebringer et eksempel på et slikt forsøk.

Reproduserbarheten og det mekanistiske grunnlaget ble derfor undersøkt ytterligere.

10

Eksempel 3: Reproduserbarhet av nøkkelobservasjonen

Fig. 2 sammenfatter effekten av prekultivering på reaktiviteten på TGN1412 for 7 ulike donorer. Data fra 7 ulike friske donorer er vist, hver representert av et symbol. Betingelsene for antistoffstimulering og for prekultivering var som i fig. 1. Selv om det foreligger donorspesifikke variasjoner for både OKT3- og TGN1412-responsene, er det tydelig at i alle tilfeller uteble en respons på TGN1412-stimulering med cytokinfrisetting fra ferske donorceller, og at denne upåvirkelige tilstanden var tapt etter 2 dagers prekultivering. Donorspesifikke variasjoner er forventet, noe som illustreres av den store forskjellen i cytokinstormens størrelse som ble erfart av de frivillige ved TGN1412-forsøket i London (Suntharalingam et al., 2006).

15

20

25

Eksempel 4: Optimering av den nye fremgangsmåten.

Fig. 3 til 5 beskriver parameterne som bestemmer ervervet av sensitiviteten overfor TGN1412 hos T-celler fra perifert blod.

30

For forsøket i fig. 3 ble PBMC kultivert ved 10^6 /ml eller ved 10^7 /ml i 2 dager før de ble stimulert med TGN1412 ved 10^6 /ml som beskrevet i fig. 1.

35

For forsøket i fig. 4, ble ferske PBMC-er (triplettenes venstre søyler) og PBMC-er prekultivert ved 10^7 /ml i 24 (triplettenes midterste søyler) eller 48 timer (triplettenes høyre søyler) stimulert med TGN1412 i 24 timer under betingelsene gitt under fig. 1.

5 For forsøket i fig. 5 ble PBMC kultivert i to dager ved høy tetthet (10^7 /ml, triplettenes høyre søyler) eller ved lav tetthet (10^6 /ml, triplettenes venstre og midterste søyler) i 1,5 ml transwell-kulturer inneholdende en innsats med semipermeabel membran på hvilken PBMC ble kultivert ved høy tetthet (10^6 /ml under membran, 10^7 /ml over membran, triplettenes midterste søyler). Celler ble stimulert på nytt og analysert som angitt i fig. 1.

10 Som vist ovenfor erverver PBMC sensitivitet overfor TGN1412 gjennom prekultivering i medium med 10 % autologt AB-serum eller AB-serum tilgjengelig i handelen. Vi har testet rollen de følgende parameterne spiller i ervervet av TGN1412-sensitivitet.

15 Celletetthet. I motsetning til standard-PBMC-stimuleringsanalyser ble cellene kultivert ved 10^6 /ml eller 2×10^5 /cm² av kulturbrønnen, "parkering" i 2 dager ble utført ved 10 ganger høyere tetthet. Fig. 3 viser at PBMC-prekultivering ved høy (10^7 /ml eller 2×10^6 /cm²), men ikke ved lav (10^6 /ml eller 2×10^5 /cm²) tetthet, induserer reaktivitet på TGN1412 i den sekundære kulturen.

20 Tid. Fig. 4 viser at full reaktivitet på TGN1412 (sammenlignbar med reaktivitet på OKT3) er oppnådd etter 2 dagers prekultivering. 1 dags prekultivering fører kun til en moderat reaktivitetsøkning.

25 Nødvendighet av celle-celle-kontakt. Nødvendigheten av høy celletetthet under PBMC-prekultivering for å erverve reaktivitet på TGN1412 kan være på grunn av behovet for celle-celle-kontakt og/eller på grunn av virkningen av løselige faktorer som må oppnå en viss konsentrasjon for å fremme modningen til den reaktive tilstanden. Ved å anvende et transwell-system (Corning incorporated, Lowell, MA, USA) der celler kultivert ved høy tetthet er adskilt fra cellene kultivert ved lav tetthet ved hjelp av en membran med 8 µm porer som tillater diffusjon av løselige faktorer, er det vist i fig. 5 at celle-celle-kontakt er nødvendig.

35

Eksempel 5: Ytterligere karakteristikk ved den nye fremgangsmåten

Fig. 6 viser at prekultivert, men ikke fersk isolert PBCM proliferer som respons på TGN1412. Fersk og prekultivert PBMC ble fremstilt og kultivert slik som beskrevet for hhv. fig. 1A og B. På dag 3 ble 1 μ Ci av 3 H-tymidin tilsatt, kulturer ble høstet 16 timer senere og bearbeidet for flytende scintillasjonstilling. Ved siden av cytokinfrisetting fører polyklonal T-celleaktivering til proliferasjon som kan måles som radioaktivitet inkorporert som tritiummerket tymidin. Som kan ses i fig. 2 stimulerte OKT3 proliferasjonen av både fersk og prekultivert PBMC, mens TGN1412 kun var i stand til å indusere proliferasjon i prekultivert PBMC. Proliferasjon kan følgelig også anvendes som avlesning.

Fig. 7 viser at TGN1412 frisetter proinflammatoriske cytokiner fra CD4-hukommelsesceller i prekultivert PBMC. Fersk PBMC og PCMB prekultivert i 2 dager ved høy tetthet ble stimulert i 16 timer med 1 μ g/ml OKT3 eller TGN1412. I løpet av de siste fire timer med kultivering ble 5 μ g/ml brefeldin A tilsatt for å blokkere cellulær eksport av cytokiner. Etter farging av celleoverflaten med fluorkromkonjugert mAb mot CD4 og CD45RO (hukommelsesmarkør) ble cellene fiksert, permeabilisert og farget med mAb mot TNF (alt fra BD Pharmingen, Mountain View, CA, USA). 15.000 "live-gated" hendelser ble innsamlet på et BD Calibur flowcytometer og data ble analysert ved bruk av FlowJo-programvare (Three Star Inc., Ashland, OR, USA). Data som er vist, er "gated" på CD4-T-celler. Cytokinstormen fremkalt av OKT3 hos pasienter er et godt kjent fenomen, og informasjon som er stilt til rådighet sammen med dette legemidlet (Muromonomab, Janssen-CILAG) advarer eksplisitt mot dette syndromet. For å sammenligne den cellulære kilden til de to proinflammatoriske nøkkelcytokinene TNF og IFN-gamma ved respons på OKT3 og TGN1412, ble de holdt inne i cellen ved å blokkere deres transport gjennom golgiapparatet ved å anvende legemidlet brefeldin A (Sigma Aldrich, Steinheim, Tyskland), og avslørt ved intracellulær farging av fikserte og permeabiliserte celler med fluorescerende TNF-spesifikk mAb (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Parallelt ble celleoverflatefenotypen til den stimulerede PBMC-en bestemt. Den viktigste cytokinproduserende undergruppen av T-celler, CD4-T-cellene, ble derved identifisert og inndelt videre i naive (CD45RO-) and hukommelses- (CD45RO+) undergrupper. Fig. 7 viser at både i fersk og prekultivert PBMC utløser OKT3 cytokinproduksjon hovedsakelig i undergruppen CD4-hukommelsesceller.

Dessuten er TGN1412, som ikke er i stand til å utløse TNF-produksjon i fersk PBMC, i stand til å gjøre dette effektivt in den samme populasjonen CD4-hukommelsesceller etter prekultivering ved høy tetthet.

5 Fig. 8 viser at TNF-frisetting fra prekultivert PBMC følger den samme kinetikken ved induksjon med enten OKT3 eller TGN1412. PBMC prekultivert med høy tetthet ble preparert som i fig. 1B og stimulert med 1 µg/ml OKT3 eller TGN1412. Supernatanter ble høstet på de angitte tidene, og TNF-innhold ble analysert som i fig. 1.

10

In vivo følger frisetting av TNF, det viktigste proinflammatoriske cytokinet i "cytokinstormen", den samme kinetikken ved induksjon med enten OKT3 eller TGN1412 (Abramowicz et al., 1989; Suntharalingam et al., 2006). Derfor ble TNF-frisettingens kinetikk i prekultivert PBMC mellom de to mAb-er sammenlignet og funnet å være praktisk talt identisk.

15

Eksempel 6: Mekanistisk grunnlag for indusering av reaktivitet på TGN142 under prekultivering med høy tetthet: Selv-MHC-gjenkjenning

20

25 Dette eksemplet tilveiebringer funksjonell informasjon om oppfinnelsen uten å binde seg til en teori. Det ble foreslått ut fra tidligere arbeid med mus at gjenkjenning av molekyler til hovedhistokompatibilitetskomplekset (MHC = major histocompatibility complex; HLA hos mennesker) ved antigenreseptorene (TCR) til T-celler i de lymfoide organene (lymfeknuter, milt osv.) forbereder TCR-ene for forbedret signalisering under senere antigenmøter (Stefanova et al., 2002). Siden laboratoriet til oppfinneren tidligere har vist at CD28-superagonistsignalisering virker gjennom forsterkningen av svake TCR-signaler (Dennehy et al., 2007), ble hypotesen frembrakt at det er tapet av dette forberedessignalet som gjør sirkulerende T-celler (som ikke har celle-cellekontakt, i motsetning til situasjonen i de lymfoide organene) upåvirkelige overfor TGN1412-stimulering. Dette ble testet ved å inkludere blokkerende mAb-er som reagerer med alle humane HLA-molekyler av klasse I og klasse II i løpet av de to dagene med prekultivering (mAb-er 646-2.6 og Tü39, Becton-Dickinson) ved 30 35 10 µg/ml.

Fig. 9 viser at mAb-er spesifikke for HLA klasse I, og i mindre grad de spesifikke for HLA klasse II, er i stand til å blokkere erverv av TGN1412-reaktivitet, noe som illustrerer behovet for HLA-gjenkjenning ved TCR-en til cellene som erverver denne reaktiviteten. Prekultivering av PBMC ved høy tetthet ble utført som angitt i fig. 1B. Til noen av prekulturene med høy tetthet ble mAb-er mot HLA klasse I eller HLA klasse II tilsatt med 10µg/ml.

10 Dette funnet antyder sterkt at interaksjon mellom TCR og HLA-molekyler i de tettpakkede lymfoide organene er en forutsetning for den sterke reaktiviteten på TGN1412 slik den ble erfart av de frivillige i London-forsøket, og at denne situasjonen er etterlignet med in vitro-kultur med høy tetthet, hvorved reaktiviteten til sirkulerende T-celler som har mistet celle-celle-kontakt, gjenopprettes til å nå den hos T-cellene i lymfoide organer. Det forklarer også hvorfor responsen på OKT3 observeres ikke bare i prekultivert, men også i fersk PBMC: Siden OKT3 i motsetning til TGN1412 virker via selveste TCR-en, er det ikke noe behov for å "forberede" denne reseptoren ved interaksjoner med HLA-molekyler. Den ulike evnen til mAb spesifikk for HLA klasse I og klasse II til å blokkere erverv av reaktivitet på TGN1412, forklares ved at mer enn 90 % av tilgjengelige HLA-molekyler i PBMC-kulturer er av klasse I.

20

Eksempel 7: Testing av kortikosteroiders evne til å kontrollere TGN1412-formidlet cytokinfrisetting

25 Den OKT3-induserte cytokinstormen håndteres vanligvis ved forebygging eller ved intervensjon med høydose kortikosteroider (Goldman et al., 1989). Inntil nå var det umulig å teste sensitiviteten av TGN1412-indusert cytokinfrisetting overfor kortikosteroider fordi det ikke fantes noe analysesystem. Derfor brukte vi den nye fremgangsmåten for å sammenligne sensitiviteten av cytokinfrisetting i fersk og prekultivert PBMC overfor deksametason ("Dex", Sigma-Aldrich).

30

Fig. 10 viser at TGN1412-indusert cytokinfrisetting er sensitiv overfor kortikosteroider. Celler prekultivert ved høy tetthet ble preparert og stimulert med mAb som beskrevet i fig. 1B. Der hvor det er angitt, ble deksametason inkludert med de angitte sluttkonsentrasjonene, og cytokiner ble målt etter 24 timer med kultivering.

35

5 Cytokinfrisetting induert ved både OKT3 og TGN1412 er fullstendig supprimert med den høyeste anvendte dosen (1 μ M), og er fortsatt nesten fullstendig supprimert med en ti ganger lavere dose (100 nM). Dette antyder sterkt at TGN1412-indusert cytokinfrisetting kan kontrolleres med passende kortikosteroidbehandling, slik som anvendt klinisk for pasienter behandlet med OKT3.

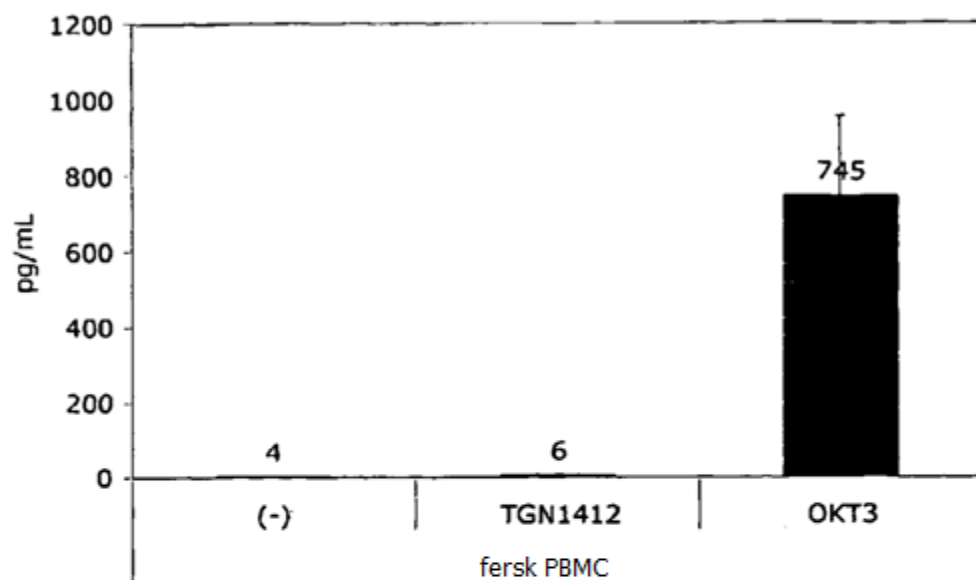
- 10 Abramowicz, D. et al., *Transplantation* 47, 606-608 (1989).
Dennehy, K. M. et al., *J Immunol* 178, 1363-1371 (2007).
Dietz, A. B. et al., *Transfusion* 46, 2083-2089 (2006).
Duff, G. W. C.. Expert Scientific Group on Phase One Clinical Trials Final Report (Norwich, UK, Stationary Office 2006).
Gogishvili, T. et al., *PLoS ONE* 4, e4643 (2009).
15 Goldman, M. et al., *Lancet* 2, 802-803 (1989).
Hunig, T., *Adv Immunol* 95, 111-148 (2007).
Nguyen, D. H. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7765-7770 (2006).
Schraven, B. et al., *Immunity* 28, 591-595 (2008).
Stefanova, I. et al., *Nature* 420, 429-434 (2002).
20 Suntharalingam, G. et al., *N Engl J Med* 355, 1018-1028 (2006).

Patentkrav

- 5 **1.** Fremgangsmåte for å teste et potensielt eller kjent immunmodulerende legemiddel for T-celleaktivering, omfattende trinnet med in vitro å bringe en kultur med perifere mononukleære celler (PBMC) i kontakt med en forutbestemt mengde av det potensielle eller kjente immunmodulerende legemiddelet og observere PBMC-kulturen for frisetting av minst ett cytokin fra PBMC-ene eller for celleproliferasjon ved kontakt med det potensielle eller kjente
- 10 immunmodulerende legemiddelet, hvori celletettheten i en PBMC-prekultur under og/eller etter prekultiveringstrinnet er minst $2 \cdot 10^6$ /ml eller minst $4 \cdot 10^5$ /cm² slik at PBMC-enes celle-celle-kontakt muliggjøres, og hvori PBMC-prekulturen kultiveres i minst 12 timer.
- 15 **2.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor prekultiveringstrinnet utføres ved å lagre PBMC-kulturen i minst 24 timer, foretrukket minst 36 timer, mer foretrukket minst 45 timer, ved 35 til 40 °C under fravær av immunmodulerende legemidler før kontakten med det immunmodulerende legemiddelet som skal testes.
- 20 **3.** Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori det immunmodulerende legemiddelet er et immunstimulerende legemiddel.
- 4.** Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori det immunstimulerende legemiddelet er et antistoff.
- 25 **5.** Fremgangsmåten ifølge krav 4, hvori antistoffet er et monoklonalt antistoff.
- 6.** Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvori det monoklonale antistoffet er et humant CD28-spesifikt superagonistisk monoklonalt antistoff.
- 30 **7.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvori det observerte cytokinet er valgt fra gruppen bestående av TNF, IFN-gamma, IL-1-beta, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-21, IL-35, LT og kombinasjoner derav.
- 35

- 5 **8.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvori den prekultiverte PBMC-kulturen i tillegg bringes i kontakt med et potensielt legemiddel for å dempe frisettingen av minst ett cytokin, samtidig som PBMC-kulturen bringes i kontakt med det kjente immunmodulerende, særlig stimulerende, legemiddelet, eller senere etter en forutbestemt tidsperiode, eller en forutbestemt tidsperiode før dette, hvori cytokinfrisettingen observeres ytterligere.
- 10 **9.** Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvori den forutbestemte tidsperioden kan være i området fra 10 sekunder til 12 timer, foretrukket i området fra 10 sekunder til 1 time.
- 10.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 8 eller 9, hvori det potensielle legemiddelet for å dempe cytokinfrisettingen er et kortikosteroid.

Fig. 1A

IFN γ 

IL-2

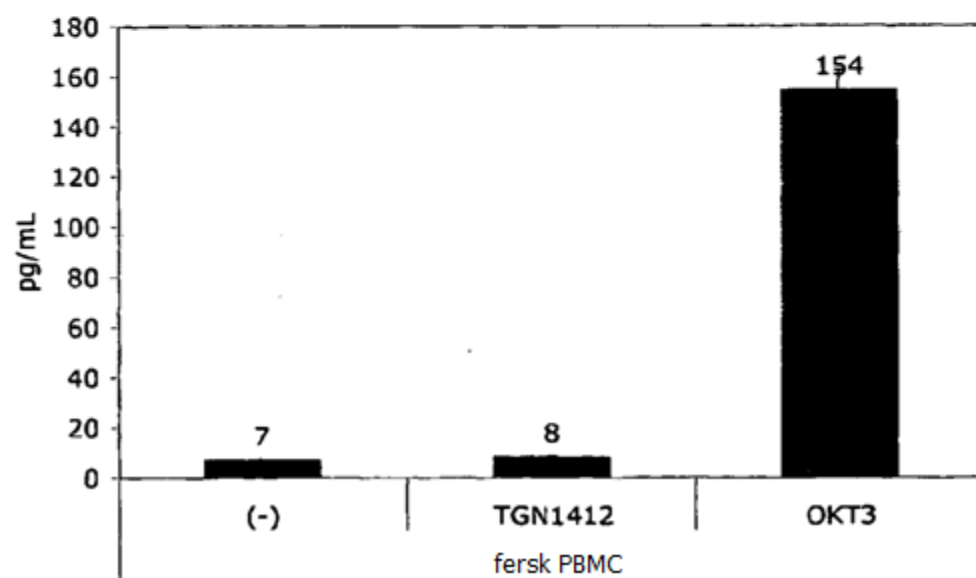
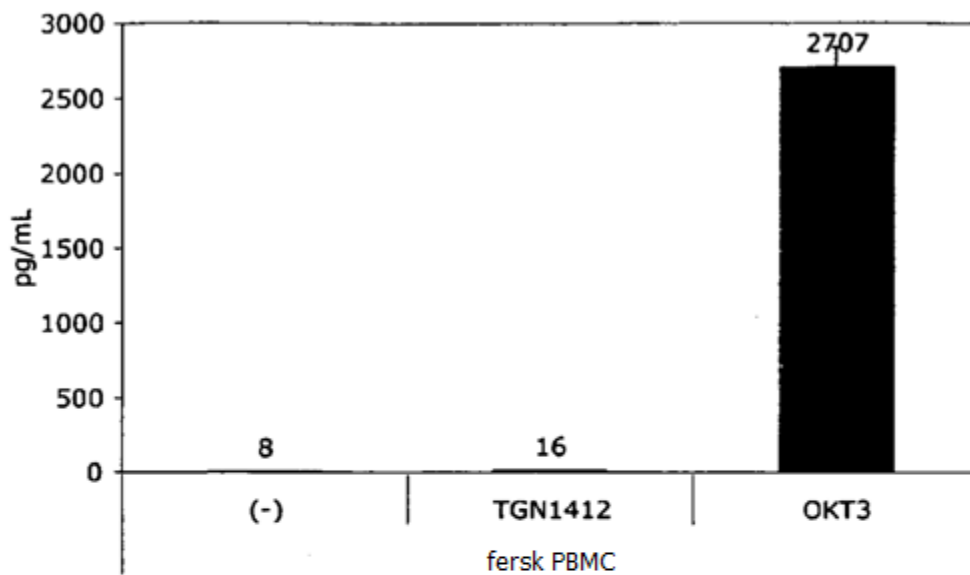


Fig. 1A forsettelse

TNF



IL-10

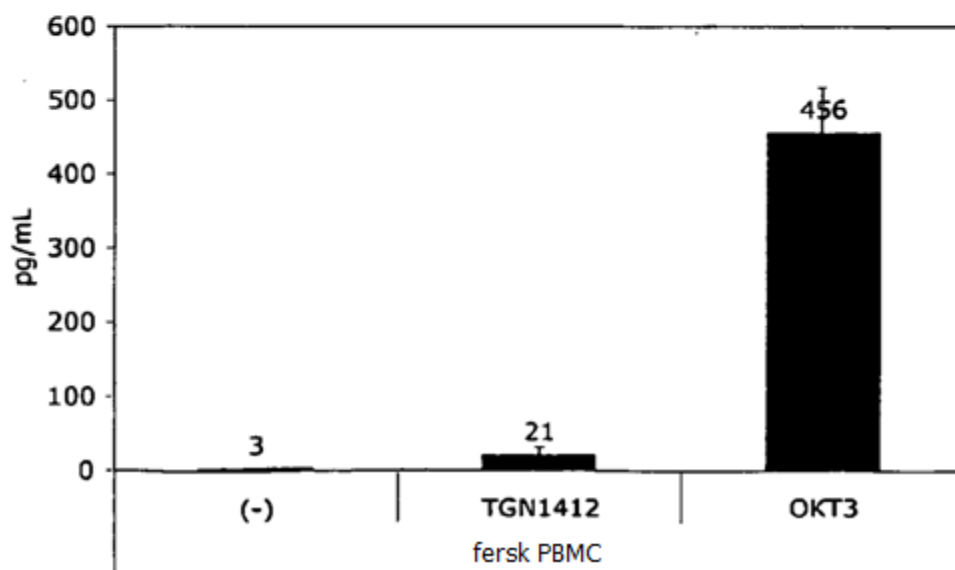
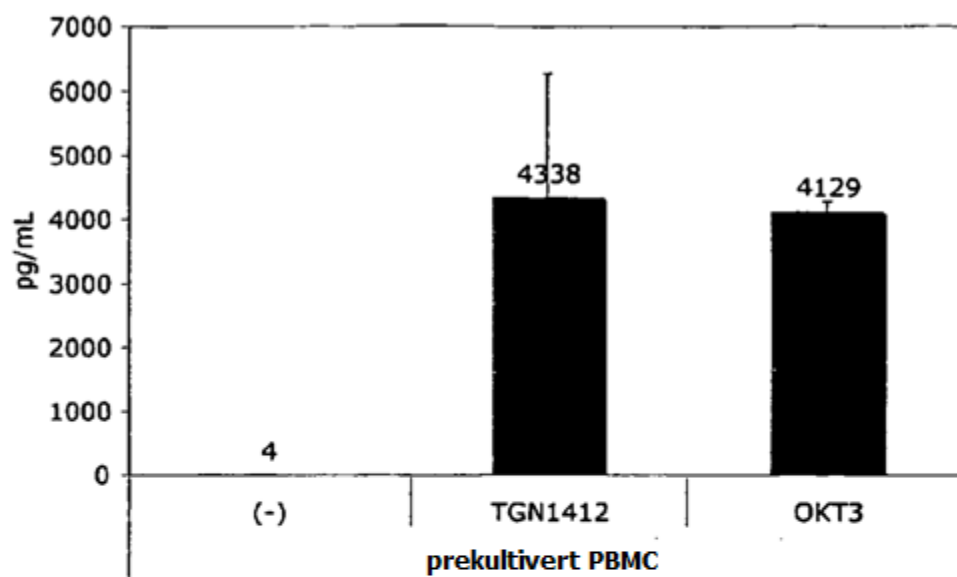


Fig. 1B

IFN γ 

IL-2

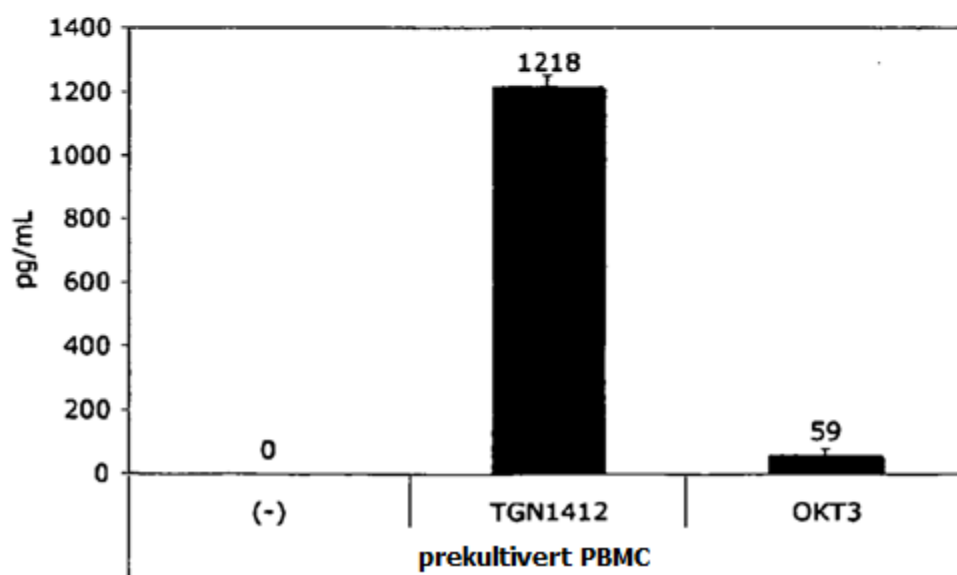
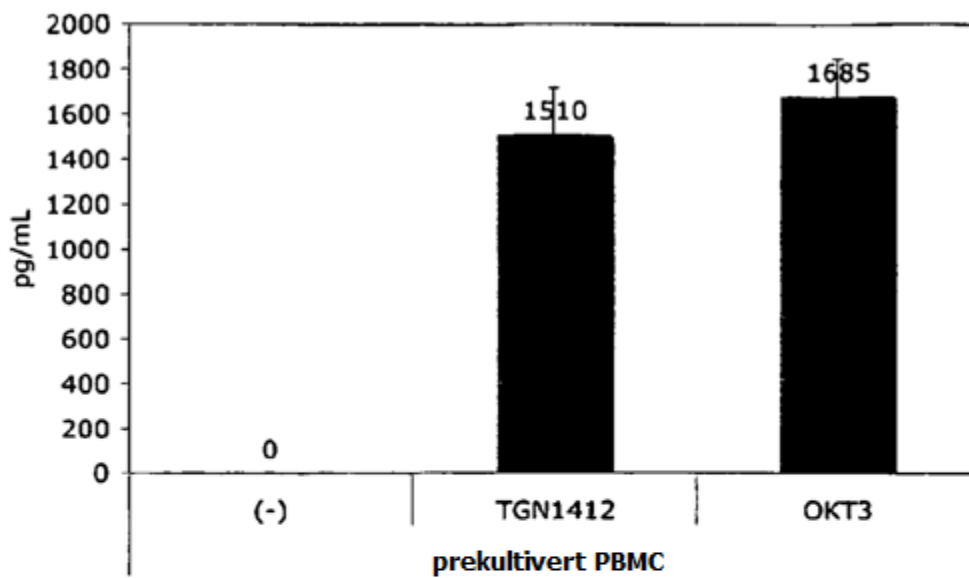


Fig. 1B fortsettelse

TNF



IL-10

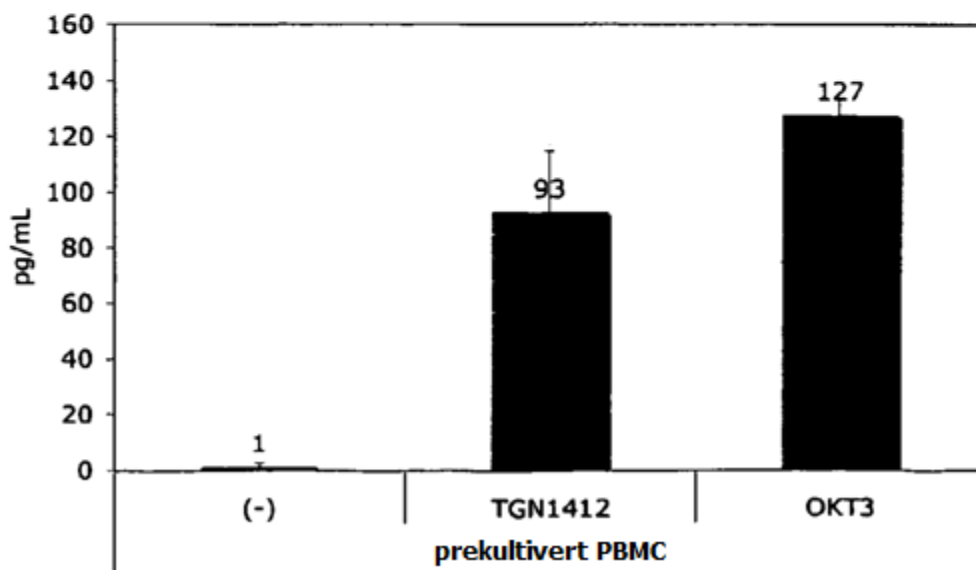


Fig. 2

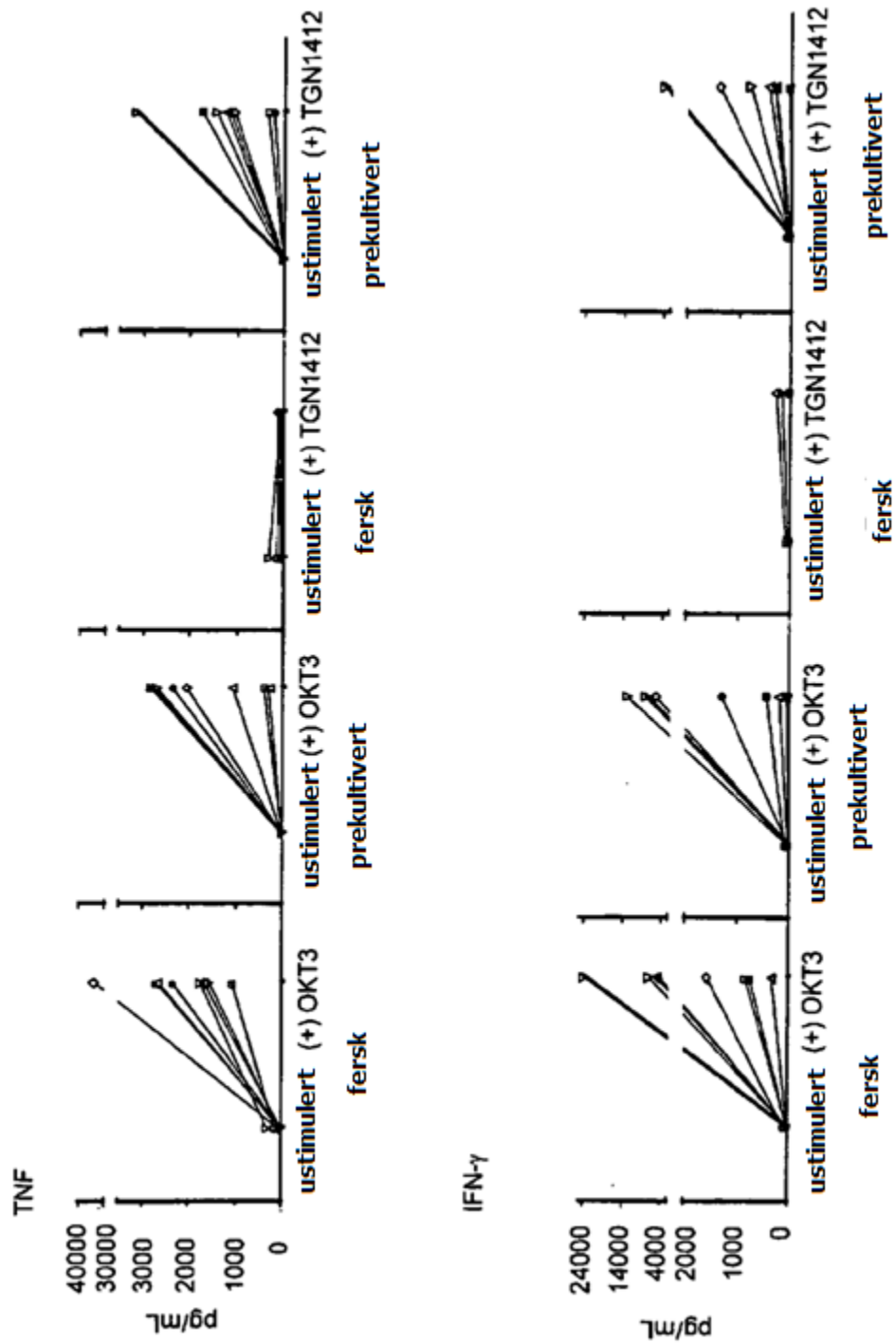


Fig. 2 fortsettelse

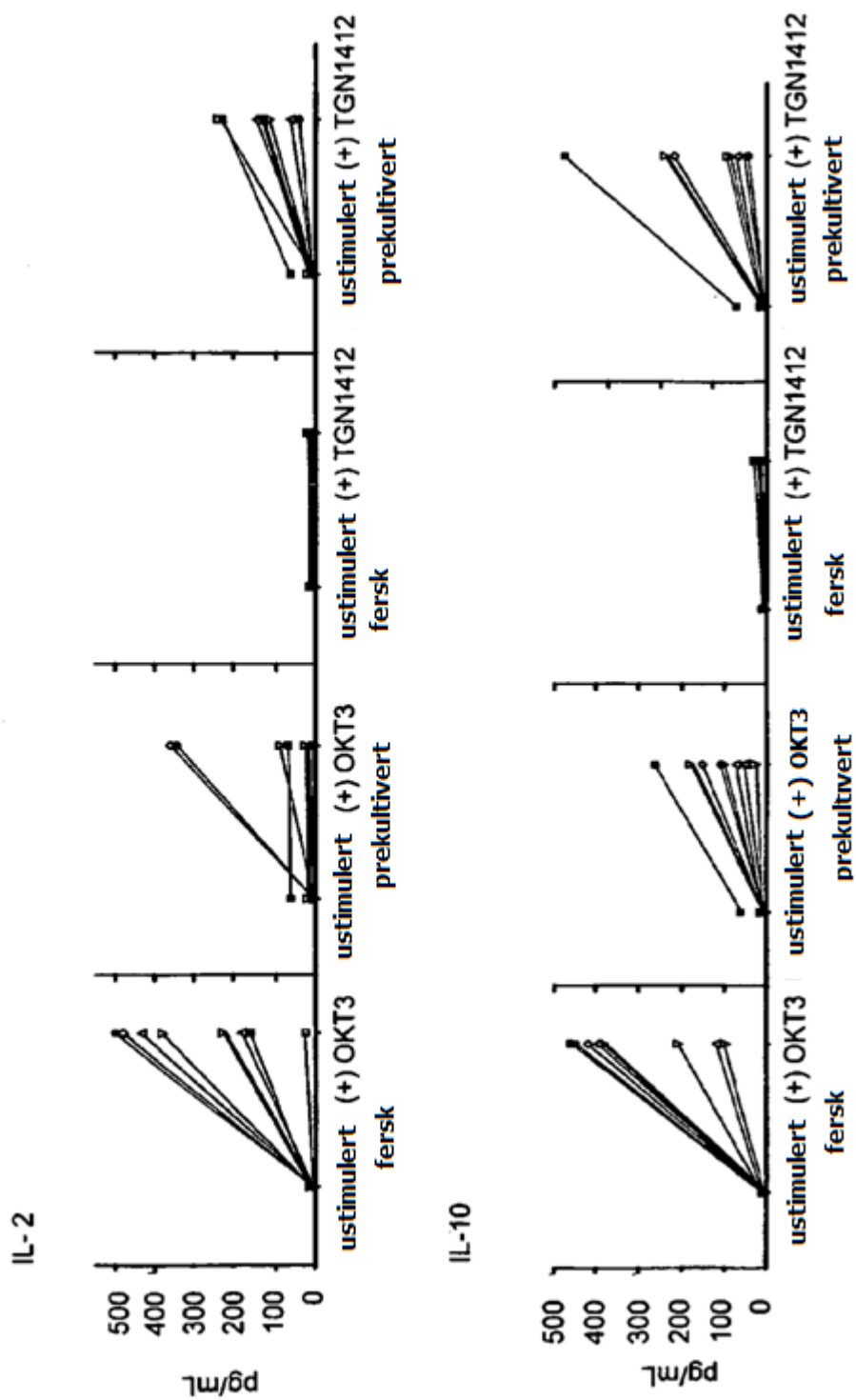


Fig. 3

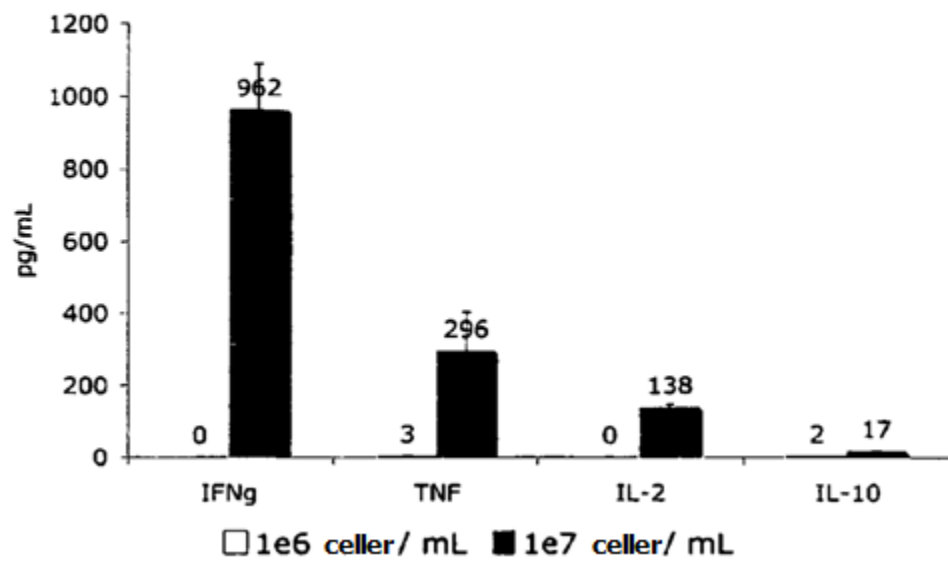
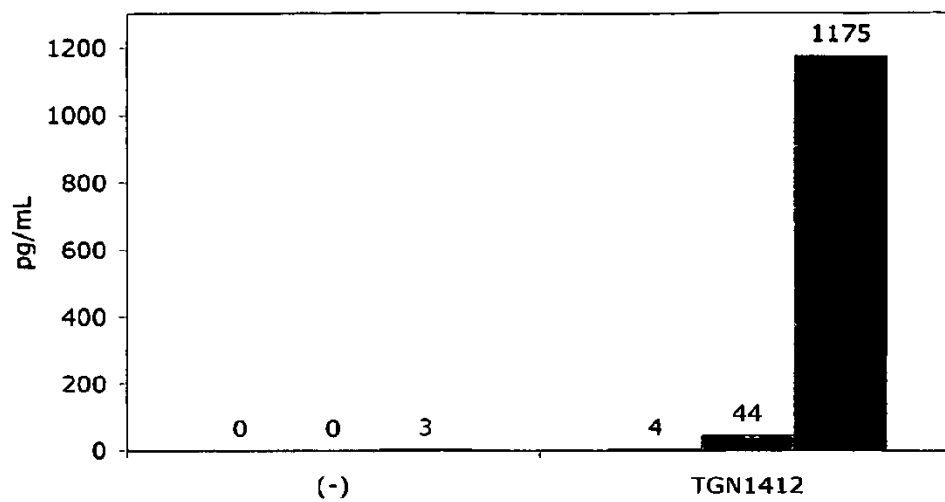


Fig. 4

IFN γ 

IL-2

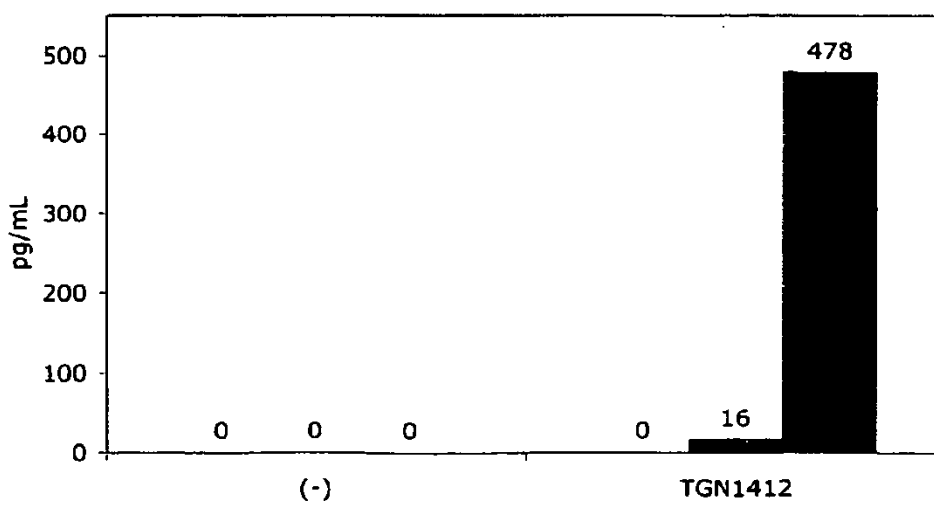


Fig. 4 fortsettelse

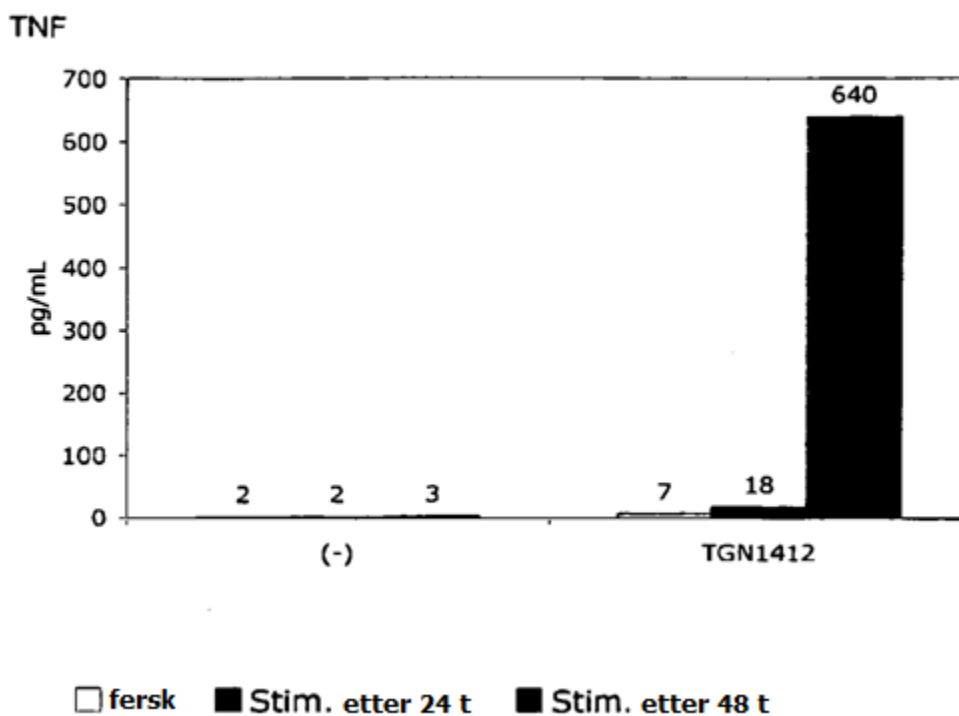


Fig. 5

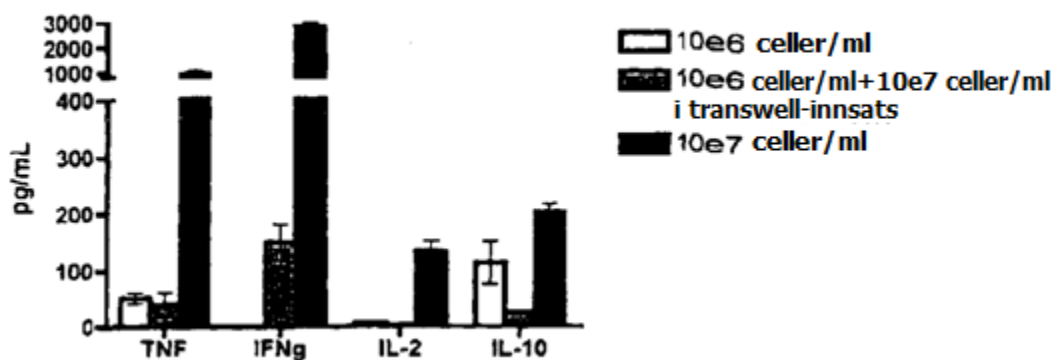


Fig. 6

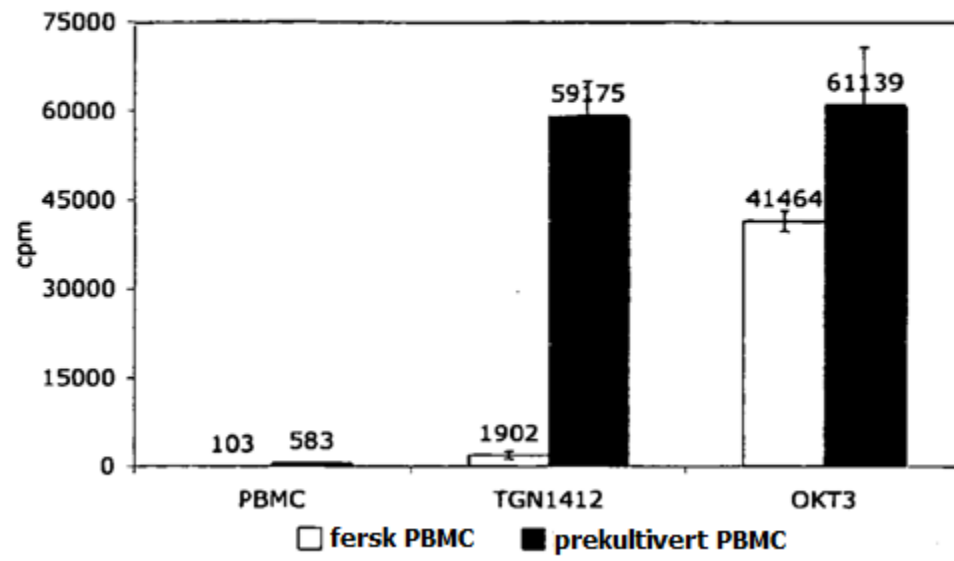
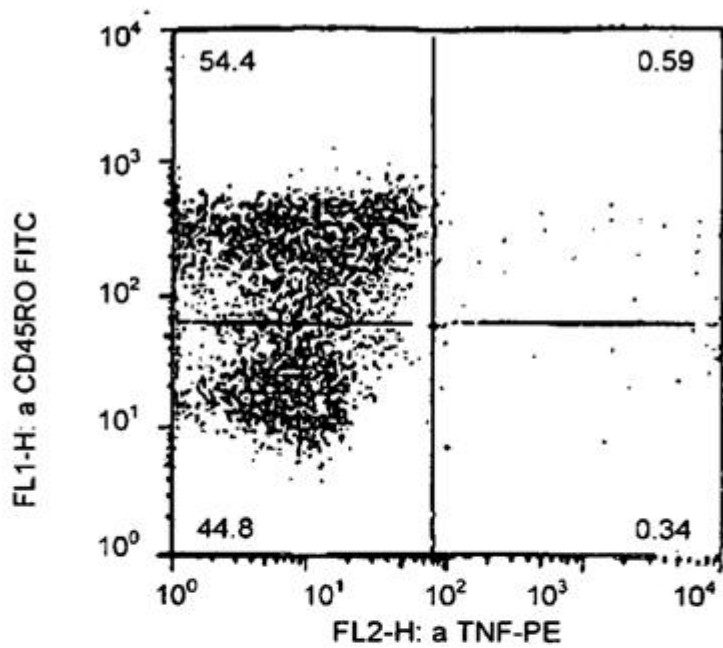
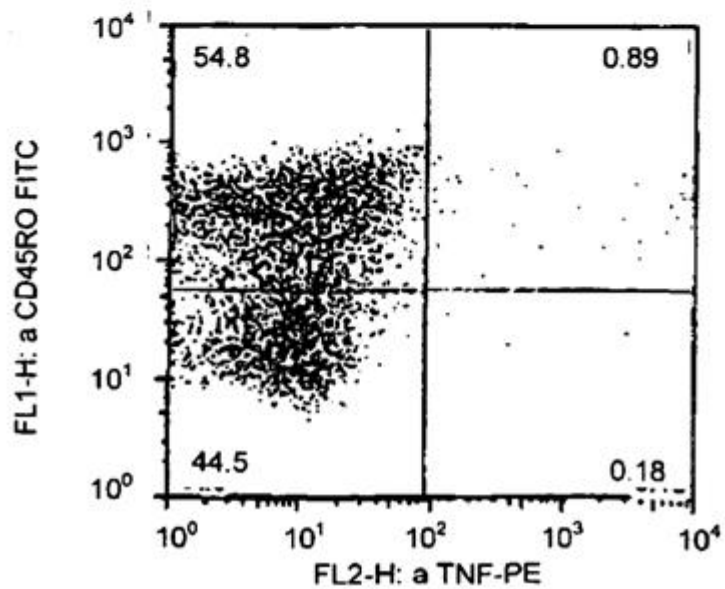


Fig. 7. Intracellulær TNF

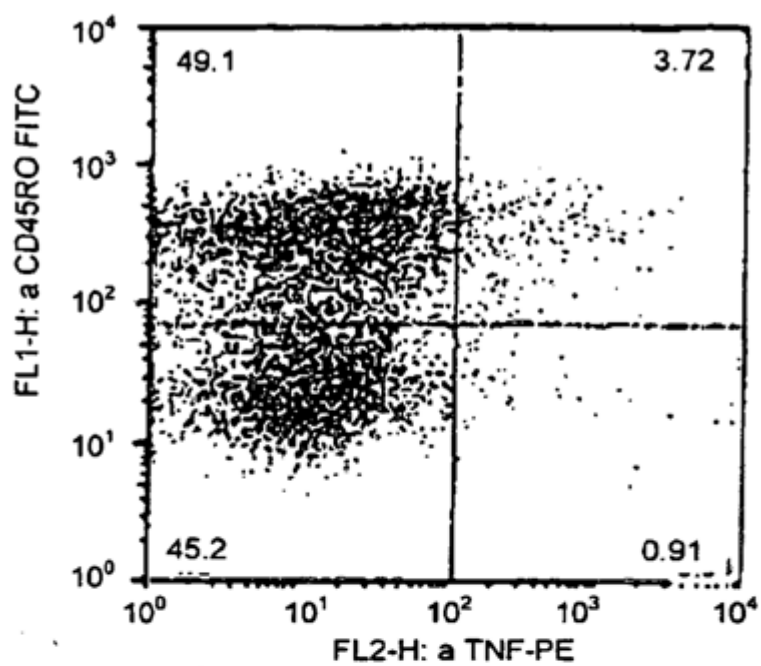
fersk PBMC



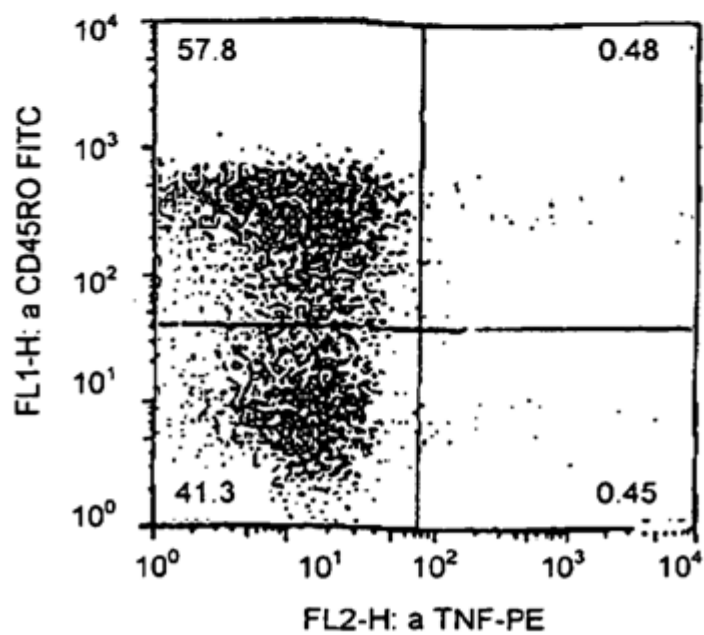
fersk PBMC: + TGN1412



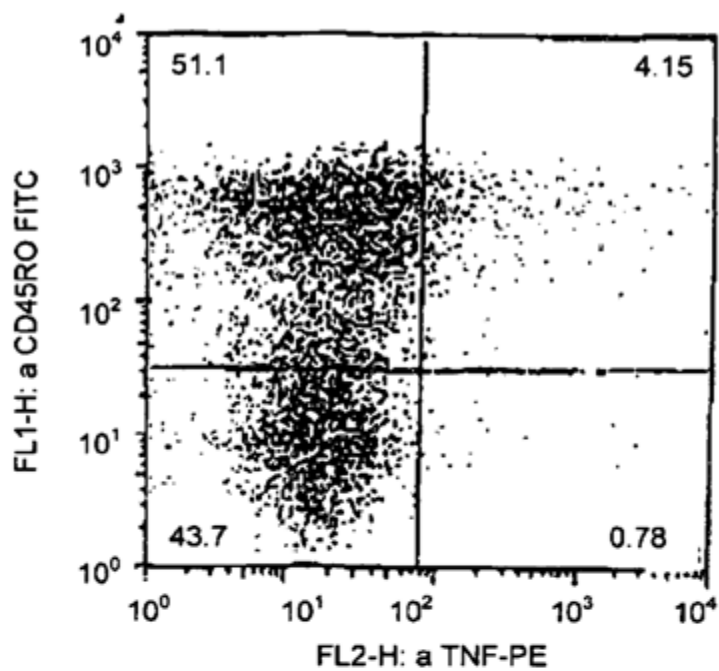
fersk PBMC + OKT3



prekultivert PBMC



prekultivert PBMC + TGN1412



prekultivert PBMC + OKT3

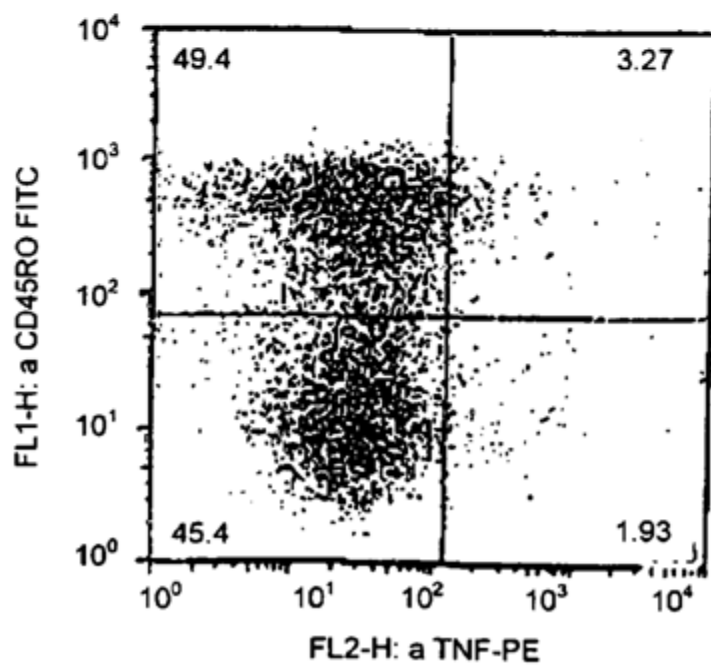


Fig. 8

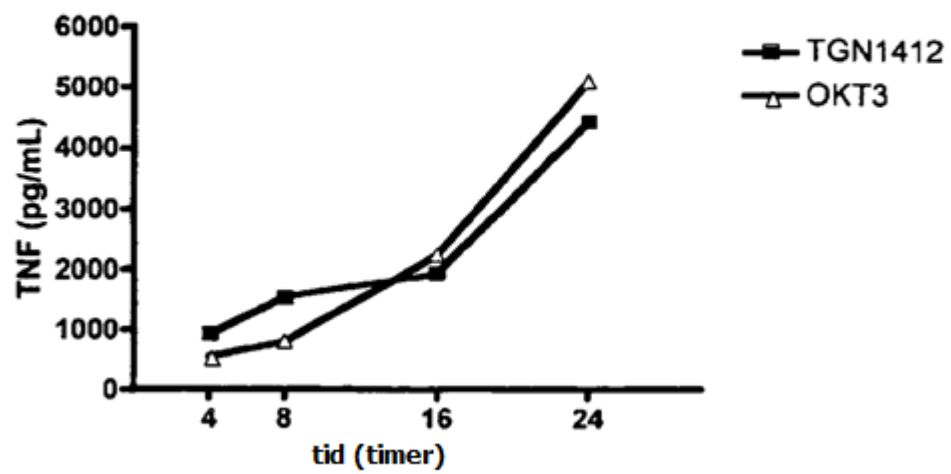
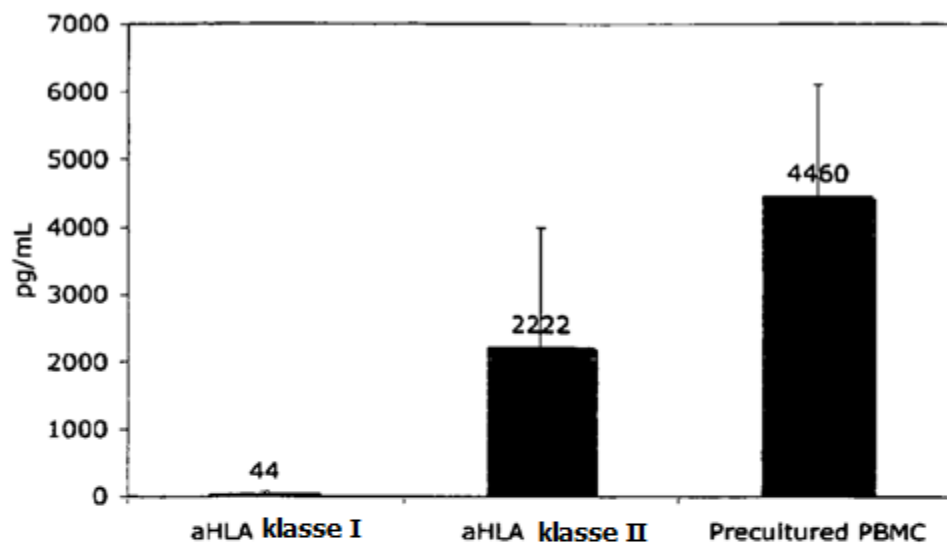


Fig. 9.

IFN γ 

IL-2

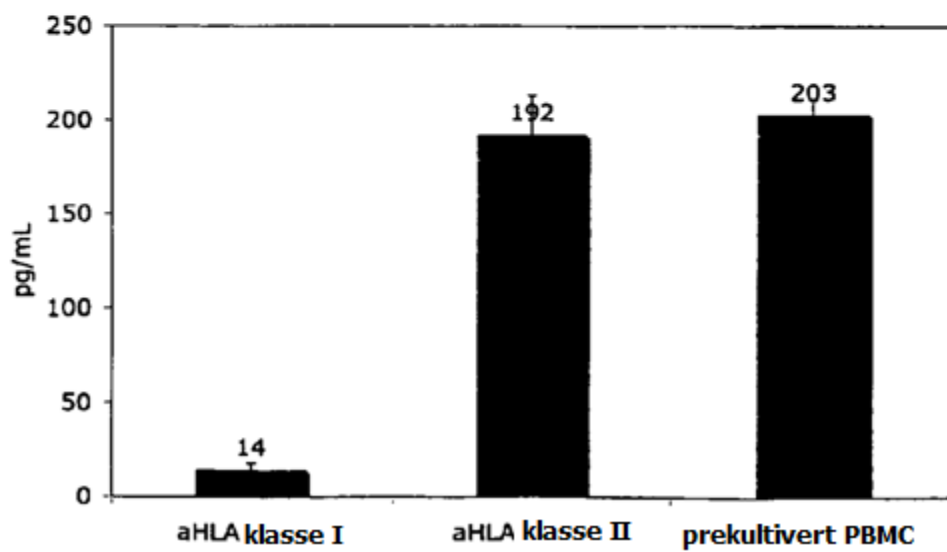
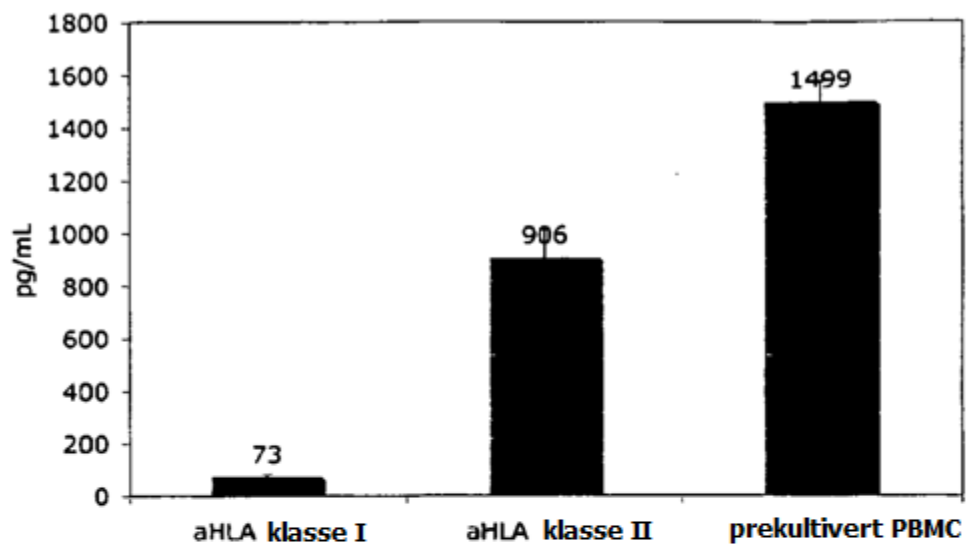


Fig. 9 fortsettelse

TNF



IL-10

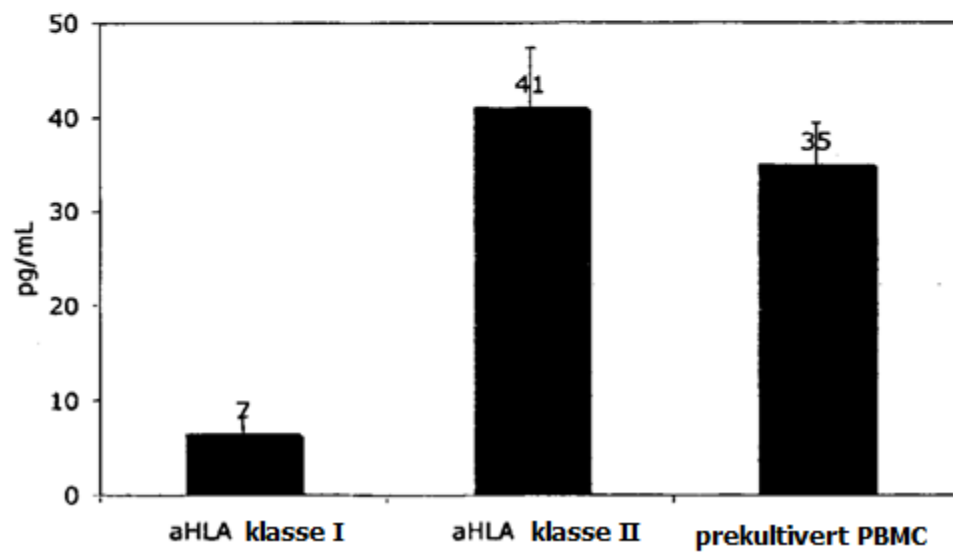
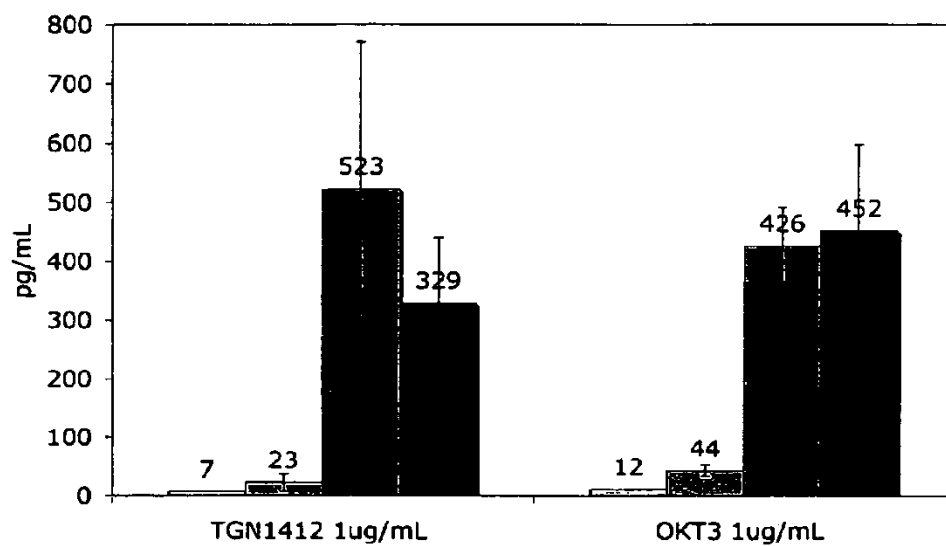


Fig. 10.

IFN γ 

IL-2

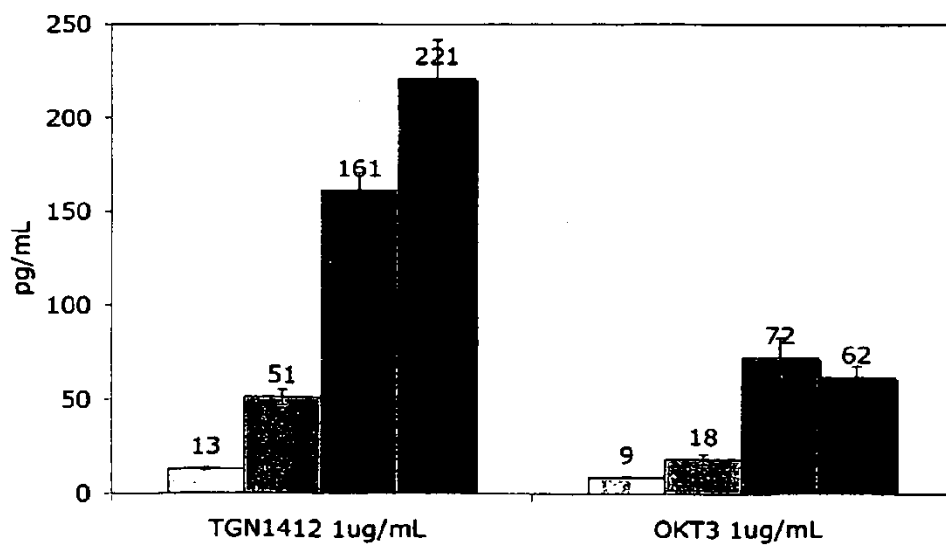


Fig. 10 fortsettelse

