



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 33 960 T2 2006.05.24

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 939 652 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 39/395 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 33 960.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/16321

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 943 316.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/011918

(86) PCT-Anmeldetag: 17.09.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 26.03.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 08.09.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 10.08.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.05.2006

(30) Unionspriorität:

715342 18.09.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IE, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:

Research Corp. Technologies, Inc., Tucson, Ariz.,  
US

(72) Erfinder:

LAZAROVITS, I., Andrew, London, CA; POPPEMA,  
Sibrand, NL-9496 PD Bunne, NL

(74) Vertreter:

Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679  
München

(54) Bezeichnung: Verwendung von Antikörpern gegen CD45RO Leukozytenantigen zur Immunmodulation

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****Hintergrund der Erfindung**

**[0001]** Es wird angenommen, dass Organ-, Zell- und Gewebetransplantatabstoßung und die verschiedenen Autoimmunerkrankungen hauptsächlich das Ergebnis einer T-Zell-vermittelten Immunantwort sind. Diese T-Zell-vermittelte Immunantwort wird zunächst durch Helfer-T-Zellen ausgelöst, die imstande sind, spezifische Antigene zu erkennen. Diese Helfer-T-Zellen können von einer vorherigen Immunantwort übrig gebliebene Gedächtniszellen oder naive Zellen sein, die vom Thymus freigesetzt werden und jeden beliebigen aus einer extrem großen Vielfalt von Antigenrezeptoren exprimieren können. Wenn eine dieser Helfer-T-Zellen ein in der Form eines Antigen-MHC-Komplexes auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) oder eines Makrophagen vorliegendes Antigen erkennt, wird die Helfer-T-Zelle durch Signale, die von dem antigenspezifischen T-Rezeptor und Corezeptoren ausgehen, und von der APC oder dem Makrophagen sezerniertes IL-1 dazu angeregt, IL-2 zu produzieren. Die Helfer-T-Zellen proliferieren dann. Proliferation führt zu einer großen Population von T-Zellen, die klonal auf die Erkennung eines bestimmten Antigens selektiert sind. Die T-Zell-Aktivierung kann auch die B-Zell-Aktivierung und unspezifische Makrophagen-Antworten stimulieren.

**[0002]** Einige dieser proliferierenden Zellen differenzieren sich zu cytotoxischen T-Zellen, die Zellen, die das ausgewählte Antigen besitzen, zerstören. Wenn das Antigen nicht länger vorliegt, bleiben die reifen, klonal selektierten Zellen als Gedächtnishelferzellen und Gedächtniscytotoxische T-Zellen übrig, die im Körper zirkulieren und das Antigen erkennen, sollte es erneut auftauchen. Wenn das Antigen, das diese Antwort auslöst, kein Fremdantigen, sondern ein Selbstantigen ist, resultiert eine Autoimmunerkrankung; wenn das Antigen ein Antigen aus einem transplantierten Organ ist, resultiert eine Transplantatabstoßung. Infolgedessen ist eine Möglichkeit erwünscht, diese T-Zell-vermittelte Immunantwort zu regulieren.

**[0003]** Das CD45-Antigen (CD45) wird auf den meisten Leukozyten exprimiert. Tatsächlich wurde früher angenommen, dass ein gemeinsames CD45-Antigen auf allen Leukozyten präsent wäre, weswegen der Rezeptor ursprünglich als das „gemeinsame Leukozytenantigen“ („Leukocyte Common Antigen“, LCA) bekannt war. Monoklonale Antikörper (mAbs) gegen CD45 wurden als Mittel der wirksamen Beseitigung aller Leukozyten, wo erwünscht, vorgeschlagen, z. B. zur Reinigung eines zu transplantierenden Organs von mitgenommenen Leukozyten vor der Transplantation unter Verwendung eines unspezifischen monoklonalen Antikörpers gegen CD45. Siehe z. B. WO 91/05568.

**[0004]** Vor kurzem wurde gezeigt, dass durch alternatives Spleißen eines einzelnen Primärtranskripts des CD45-Gens verschiedene CD45-Isoformen erzeugt werden. Diese CD45-Isoformen umfassen CD45RA, CD45RB, CD45RC und CD45R0. CD45RA enthält das Expressionsprodukt des Exons 4 (manchmal als R<sub>A</sub> bezeichnet) des CD45-Gens; CD45RC enthält das Expressionsprodukt des Exons 6; CD45RB enthält das Expressionsprodukt des Exons 5; CD45R0 enthält keines der Expressionsprodukte eines der Exons 4, 5 oder 6. Siehe Hall et al, „Complete Exon-Intron Organization of the Human Leukocyte Common Antigen (CD45) Gene“, J. Immunol, 141, 2781 (1988) und Streuli et al, "Characterization of CD45 and CD45R Monoclonal Antibodies Using Transfected Mouse Cell Lines that Express Individual Human Leukocyte Common Antigens“, J. Immunol, 141, 3910 (1988). Die Bedeutung dieser unterschiedlichen Expression war bislang unklar. A. I. Lazarovits et al (1996), Nature 380, 717-720 beschreiben Prävention und Umkehrung der Abstoßung von Nieren-Allotransplantaten durch Antikörper gegen CD45RB.

**[0005]** Der Anstiegs des Erfolgs klinischer Organtransplantationen verlief parallel zur Verbesserung der Techniken zur Immunsuppression. Jedoch rufen zunehmend wirksame Immunsuppressiva aufgrund ihres Mangels an Spezifität oftmals Komplikationen hervor. Z. B. können die Empfänger sehr empfindlich gegenüber Infektionen werden. Eine hochspezifische Immunsuppression ist daher wünschenswert.

**[0006]** Das ideale spezifische Verfahren zur Immunsuppression wäre eine Behandlung, die die Aktivität der für die Abstoßung des individuellen Transplantats, das der Patient erhält, verantwortlichen Lymphozyten unterdrückt, ohne das Immunsystem auf andere Weise zu beeinflussen.

**[0007]** Daher existiert ein Bedürfnis nach der dauerhaften und selektiven Unterdrückung oder anderweitigen Modulation der Immunantwort bei Menschen, insbesondere Transplantatempfängern oder von Autoimmunerkrankung Betroffenen.

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0008]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an ein CD45R0-Epitop des CD45R0-Isotyps des Leukozytenantigens bindet, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prävention von Organ-, Zell- und Gewebetransplantatabstoßung durch Hemmung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort des Empfängers. Die Behandlungen umfassen in vivo-Behandlungen zur Prävention der Abstoßung transplantiertener Zellen, Gewebe und Organe und in vivo-Behandlungen nach der Transplantation zur Umkehr einer pathologischen Immunantwort. Vorzugsweise kann das vorliegende Verfahren dem Empfänger dauerhafte Toleranz vermitteln, nicht nur Verzögerung der Abstoßung. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an ein CD45R0-Epitop des CD45R0-Isotyps des Leukozytenantigens bindet, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prävention einer Zell-, Gewebe- oder Organtransplantatabstoßung über die Hemmung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort im Empfänger. Beispielsweise kann der in den Ansprüchen definierte Antikörper verwendet werden, um ein Medikament zur Behandlung eines Patienten, der Transplantatabstoßung einschließlich „graft versus host disease“ erleidet oder von einer Autoimmunerkrankung betroffen ist, herzustellen.

**[0009]** Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Antikörper, der an ein CD45R0-Epitop des CD45R0-Isotyps des Leukozytenantigens spezifisch bindet, in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Vehikel. Der Begriff „Substanz“ bezeichnet hier einen Antikörper, wie hier definiert, und auch Moleküle mit antikörperähnlichen Funktionen wie synthetische Antikörperanaloga, z. B. „single-chain antigenbinding molecules“, kleine bindende Peptide oder Gemische davon.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung ist nützlich zur Behandlung von Transplantatabstoßungen. Insbesondere kann sie zur Behandlung eines Patienten, der sich einer entweder allogenen oder xenogenen Zell-, Gewebe- oder Organtransplantation unterzogen hat, verwendet werden. Weiterhin kann die vorliegende Erfindung vor dem, nach dem oder während des Transplantationsverfahrens, oder in jeder beliebigen Kombination davon, angewandt werden.

**[0011]** In einer Vielzahl von Transplantationssituationen, sogar Situationen, in denen ein Empfänger aufeinander folgende Transplantate der gleichen oder verschiedener Zellen, Gewebe oder Organe erhält, wird die vorliegende Erfindung als vorteilhaft angesehen. Z. B. kann das Verfahren der vorliegenden Erfindung während einer Herz-, Leber-, Knochenmarks- oder Nierentransplantation oder während der Transplantation von Pankreasinseln oder Gefäßgewebe, z. B. dem Legen eines koronaren Bypasses, angewandt werden.

**[0012]** Die vorliegende Erfindung kann auch zur Behandlung oder Prävention von Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Zuständen und arthritischen oder rheumatoïden Erkrankungen nützlich sein. Z. B. kann die vorliegende Erfindung zur Behandlung von autoimmunhämatologischen Störungen, systemischem Lupus erythematoses, entzündlicher Darmerkrankung, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Multipler Sklerose, Diabetes mellitus vom Typ 1 und dergleichen verwendet werden.

**[0013]** Ein entzündungshemmender oder immunsuppressiver Wirkstoff kann vor, nach oder gleichzeitig mit dem Antikörper verabreicht werden, wie in den Ansprüchen beschrieben. Z. B. gehören Cyclosporin, FK-506, Rapamycin, Cortikosteroide, Cyclophosphamid, Mycophenolat, Mofetil, Leflunomid, Antilymphozyten-Globulin, Desoxyspergualin OKT-3 und dergleichen zu für diesen Zweck geeigneten Wirkstoffen, ohne darauf beschränkt zu sein.

**[0014]** Das Medikament gemäß der vorliegenden Erfindung kann mit einer Menge der Lymphozyten des Patienten diesem verabreicht werden, d. h., in Kombination mit an das CD45-Leukozytenantigen bindenden Substanzen.

**[0015]** Weitere Ausführungen sind in den Ansprüchen definiert.

**[0016]** Die Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass Leukozyten, wie verschiedene Typen von T-Lymphozyten oder „T-Zellen“, hauptsächlich die eine oder andere CD45-Isoform exprimieren können. Naive Helfer-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen exprimieren hauptsächlich CD45RA bzw. CD45R0. Die Expression von CD45R $\beta$  ist ebenfalls unterschiedlich; auf naiven Helfer-T-Zellen ( $T_H0$ ) und auf T-Zellen, die hauptsächlich Interleukin 2 produzieren und inflammatorische und cytotoxische Antworten auslösen können ( $T_H1$ ), ist es hoch exprimiert (hell). T-Zellen, die hauptsächlich Interleukin-4 produzieren und humorale Immunantworten auslösen ( $T_H2$ ), haben niedrige CD45RB-Expression (dunkel).

**[0017]** Es wurde jetzt gezeigt, dass einige Antikörper, die mit CD45RB reagieren (MB23G2 bei Mäusen, 6G3 bei Primaten), imstande sind, selektiv die entzündliche und cytotoxische T-Zell-vermittelte Immunantwort zu inhibieren, ohne die Gesamtheit der Gedächtnis-T-Zellen zu zerstören. Infolgedessen haben CD45RB-Suppressoren einen großen Vorteil gegenüber gängigen Immunsuppressiva, da sie (i) auf eine bestimmte T-Zell-population wirken, anstelle einen allgemeinen immunsupprimierenden Effekt zu haben, wodurch das Risiko von mit Übersuppression des Immunsystems verbundenen Nebenwirkungen vermieden wird; und (ii) imstande sind, andauernde Toleranz gegenüber einem bestimmten Antigen zu erzeugen, wenn sie gleichzeitig zum Kontakt mit dem Antigen verabreicht werden, d. h. unmittelbar vor und nach einer Organtransplantation oder während einer akuten Phase einer Autoimmunerkrankung.

**[0018]** Hier bezieht sich der Ausdruck „Immuntoleranz“ oder einfach „Toleranz“ auf den dauerhaft unempfänglichen Aktivitätszustand lymphoider Zellen gegenüber einem vorausgewählten oder spezifischen Antigen oder Antagensatz. Die Immunantwort auf andere Immunogene ist somit unbeeinträchtigt, während die Notwendigkeit für anhaltende exogene Immuntherapien verringert oder beseitigt wird. Außerdem ermöglicht Toleranz nachfolgende Transplantation von Material, da es das gleiche Antigen oder den gleichen Antagensatz umfasst, ohne die Erfordernis für exogene Immuntherapie zu erhöhen.

**[0019]** Allgemein wird angenommen, dass die vorliegenden Methoden zur Anergisierung von T-Zellen mit einem Rezeptor für das Antigen führen, so dass diese T-Zellklone funktional oder sogar physisch ausgelöscht werden. Zu einer vollständig funktionalen Aktivierung von T-Zellen sind zwei Signale erforderlich. Das erste Signal erfordert die Erkennung eines Antigens über den T-Zellrezeptor. Das zweite Signal erfordert Interaktion zwischen kostimulatorischen Molekülen wie B7 auf Antigen präsentierenden Zellen und Rezeptoren wie CD28 auf den T-Zellen. Es ist allgemein akzeptiert, dass ein Mangel an diesem zweiten Signal durch CD28 zu Anergie führt. Jedoch wird CD45 für die Aktivierung durch den T-Zellrezeptor benötigt, und eine Störung dieses Prozesses durch CD45RB unterbricht das erste Signal und kann ebenfalls zu Anergie führen. Dies ist in der Tat ein grundlegender Ansatz als eine Blockade der B7-CD28-Interaktion, da es eine Anzahl verschiedener kostimulatorischer Signalwege gibt, während es nur den einen T-Zellrezeptorkomplex gibt. Da CD45 differenziell exprimiert wird, ist es ebenfalls möglich, selektiv bestimmte Untergruppen von T-Zellen zu beeinflussen. Daher sind die beobachteten Wirkungen nicht einfach eine Folge der Depletion einer Untergruppe von T-Zellen oder der gesamten T-Zellpopulation, sondern umfassen eher eine Kombination vorübergehender Depletion und eines dauerhaften Effekts, der zu Toleranzentwicklung bei den Empfängern führt. Z. B. bleibt in einem murinen Nierentransplantationsmodell Toleranz gegenüber dem Allotransplantat nach anfänglicher Behandlung mit monoklonalen anti-CD45RB-Antikörpern unbegrenzt bestehen, wobei die Überlebenszeit weit über 100 Tage beträgt. Bei Mäusen, die nach einer Nieren-Allotransplantation mehr als 100 Tage überleben, ermöglicht es die vorliegende Methode, zur Spenderniere syngene Hauttransplantate zu tolerieren, während Hauttransplantate, die sowohl mit dem Spender als auch dem Empfänger allogen waren, abgestoßen wurden.

**[0020]** Der Begriff „Antikörper“ umfasst menschliche und tierische mAbs und Präparate polyklonaler Antikörper ebenso wie Antikörperfragmente, synthetische Antikörper einschließlich von rekombinanten Antikörpern, chimären Antikörpern einschließlich von humanisierten Antikörpern, antiidiotypischen Antikörpern und ihren Derivaten.

**[0021]** Der Ausdruck „Behandlung“ bezeichnet hier im Bezug auf eine Autoimmunerkrankung oder -störung die Verhinderung der Entwicklung oder des Auflammens der Krankheit oder Störung wie auch die Verringerung oder Beseitigung von einem oder mehreren Symptomen der Krankheit oder Störung.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

**[0022]** [Fig. 1](#) zeigt das verlängerte Überleben MB23G2-behandelter Tiere verglichen mit einer unbehandelten Gruppe;

**[0023]** [Fig. 2](#) zeigt die Serumkreatinininspiegel jeder Gruppe zum Zeitpunkt der Tötung;

**[0024]** [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) zeigen, dass MB23G2 eine Depletion der zirkulierenden Lymphozyten auslöst und an die übrig bleibenden T- und B-Lymphozyten bindet;

**[0025]** [Fig. 4](#) zeigt das Überleben von Cynomolgusaffen (Langschwanzmakaken) unter Behandlung mit monoklonalen anti-CD45RB-Antikörper 6G3 nach Erhalten von Allotransplantaten;

**[0026]** [Fig. 5](#) zeigt die Ergebnisse der Co-Inkubation der CD45R-Antikörper mit OKT3-stimulierten peripheren

mononuklearen Blutzellen;

**[0027]** [Fig. 6](#) zeigt, dass das anti-CD45RB-Reagenz 663 gegenüber CD8-Zellen eine stärkere inhibierende Wirkung hat als gegenüber CD4-Zellen;

**[0028]** [Fig. 7](#) zeigt die inhibierenden Wirkungen von CD45-, CD45RB- und CD45R0-Antikörpern auf eine OKT3-induzierte CD25-Expression;

**[0029]** [Fig. 8](#) zeigt die Vermehrungsfähigkeit von T-Zellen aus anti-CD45RB-behandelten Mäusen 5 Tage nach der Immunisierung mit MBP;

**[0030]** [Fig. 9](#) zeigt die Vermehrungsfähigkeit von T-Zellen aus anti-CD45RB-behandelten Mäusen 10 Tage nach der Immunisierung mit MBP.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0031]** Die Substanzen, Antikörper und Zusammensetzungen werden vorzugsweise wie in den folgenden Beispielen beschrieben oder durch dem Fachmann ersichtliche äquivalente Mittel hergestellt.

**[0032]** Der Fachmann weiß, dass die Hybridome, auf die hier Bezug genommen wird, genetischer Mutation oder anderen Veränderungen unterworfen sein können, wobei sie die Fähigkeit behalten können, monoklonale Antikörper der gleichen erwünschten Spezifität herzustellen. Daher umfasst die vorliegende Erfindung Mutationen, andere Derivate und Abkömmlinge der Hybridome.

**[0033]** Der Fachmann weiß weiterhin, dass ein monoklonaler Antikörper den Techniken der rekombinanten DNA-Technologie unterworfen werden kann, um andere abgeleitete Antikörper, humanisierte oder chimäre Moleküle oder Antikörperfragmente, die die Spezifität des ursprünglichen monoklonalen Antikörpers behalten, herzustellen. Solche Techniken können es umfassen, DNA, die die variablen Regionen des Immunglobulins oder die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) des monoklonalen Antikörpers kodiert, mit DNA, die die konstanten Regionen oder konstanten Regionen plus „Framework“-Regionen eines anderen Immunglobulins kodiert, zu kombinieren, z. B., einen aus Mäusen gewonnenen monoklonalen Antikörper in einen, der im Wesentlichen menschliche Immunglobulincharakteristika aufweist, umzuwandeln (siehe EP 184187 A, GB 2188638 A).

#### Antikörper gegen CD45R-Isoformen

**[0034]** S. Poppema et al, J. Immunol., 147, 218 (1991) beschrieben zuvor den monoklonalen Antikörper MT3. Diese Publikation offenbart jedoch weder eine detaillierte Methode zur Herstellung noch irgendeine pharmazeutische Verwendung dieses Antikörpers und kann daher notwendiger Weise durch diesen Antikörper erkannte T-Zellpopulationen nicht offenbaren. A. Lazarovits et al, Transplantation, 54, 724 (1992) charakterisierten die *in vitro*-Wirkung dieses Antikörpers. Lazarovits et al zeigten zum ersten Mal, dass der MT3-Antikörper die Vermehrung und Hervorbringung von T-Zellen durch Störung von CD45RB behindert. Zusätzlich zum MT3-Antikörper beschrieben Lazarovits et al, dass monoklonale Antikörper gegen CD45RB, wie z. B. ein Antikörper, der von der Zelllinie HB220 hergestellt wird, die von der ATCC in Rockville, MD der Öffentlichkeit zugänglich ist (nun bezeichnet als Anti-CD45RB-mAb (MB23G2)) an CD45RB bindet und ein wirksames Mittel zur Hemmung der Immunfunktion *in vitro* und *in vivo* darstellt (siehe US-Seriennummer 08/071,009, eingereicht am 2. Juni 1993).

**[0035]** Die Erfinder haben jetzt entdeckt, dass der monoklonale Antikörper 6G3 an CD45RB bindet. Dies ist ein muriner IgG1-Antikörper gegen menschliches CD45RB. Er ist mit Affen-CD45RB kreuzreaktiv. Die Erfinder haben ebenfalls entdeckt, dass die monoklonalen Antikörper MB23G2, 6G3 und MT3 an Neuraminidase-empfindliche Epitope auf Leukozyten einschließlich von T-Zellen binden, und dass zumindest MB23G2 und 6G3 die Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C-γ1 steigern. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass HB223 (jetzt als MB4B4 bezeichnet), ein zu den erfindungsgemäßen Antikörpern analoger anti-CD45RB-Antikörper, nicht an Neuraminidase-empfindliche Epitope bindet. Es wird auch darauf hingewiesen, dass MB4B4 an ein Neuraminidase-unempfindliches Epitop bindet und die Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C-γ1 nicht verändert. MB4B4 war auch bei der Prävention der Abstoßung von Nierenallotransplantaten in Mäusen unwirksam. Die spezifischen anti-CD45R-Antikörper, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind in Tabelle 1 (unten) zusammengefasst; aus Streuli et al, J. Immunol., 141, 3910 (1988).

Tabelle 1

Klassifizierung von anti-CD45R-mAb<sup>a</sup>

CD45RC	DNL-1.9 <sup>c</sup> , OX22
CD45RA	Anti-2H4 <sup>b</sup> , 3AC5, F8-11-13, E7, HI 100 <sup>c</sup> , CMRF.11 73.5.17, G1-15, 10G3, 111-1C5, Leul8, 2A10, 5A9 MMT-1, 5E7, 4F4, HB-11
CD45R0	UCHL1 <sup>c</sup>
CD45RB	PD-7/26/16, 6B6 <sup>c</sup> , 6G3, MT3, MEM93 <sup>d</sup> , MB2362, MB4B4

<sup>a</sup> Antikörper gegen CD45R wurden anhand ihrer Bindung an die 300-19(LCA)-Zelllinien in drei Gruppen eingeteilt: CD45RA, CD45R0 und CD45RB.

<sup>b</sup> erhältlich von Coulter, Nialeah, Florida.

<sup>c</sup> erhältlich von Pharmingen, San Diego, Kalifornien.

<sup>d</sup> Siehe Bazil et al, Immunogenetics, 29, 202 (1989).

## Chimäre und umgebaute Antikörper

**[0036]** EP-A-0 120 694 (Boss et al/Celltech) beschreiben die Klonierung der Expression chimärer Antikörper. In diesen Derivaten sind die variablen Domänen eines Immunglobulins an konstante Domänen eines anderen Immunglobulins angefügt. Üblicherweise sind die variablen Domänen aus einem Immunglobulinen einer Spezies, z. B. Maus oder Ratte, gewonnen, und die konstanten Domänen sind aus einem Immunglobulinen einer anderen Spezies, etwa Mensch, gewonnen. Diese Technik ist jetzt sehr gut beschrieben. Die spätere Europäische Patentanmeldung EP-A-0 125 023, auch US-Patent Nr. 4,816,567, beschreibt im Wesentlichen den gleichen Gegenstand wie die Boss-Patentanmeldung, aber beschreibt die Produktion anderer Varianten von immunglobulinartigen Molekülen unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologie.

**[0037]** Eine andere Möglichkeit besteht darin, nur die variable Region des monoklonalen Antikörpers mit einem anderen Nicht-Immunglobulin-Molekül zu verbinden, um ein abgeleitetes chimäres Molekül zu erzeugen (siehe WO 86/01533, Neuberger und Rabbits/Celltech). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein chimäres Immunglobulin herzustellen, dessen verschiedene variable Regionen unterschiedliche Spezifitäten besitzen, z. B. die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung (siehe EP 68763A). Noch eine weitere Möglichkeit besteht darin, eine Mutation in der den monoklonalen Antikörper kodierenden DNA zu erzeugen und auf diese Weise einige seiner Eigenschaften zu verändern, ohne seine grundsätzliche Spezifität zu beeinflussen. Dies kann durch ortsgerichtete Mutagenese oder andere im Stand der Technik beschriebene Techniken erfolgen.

**[0038]** Die Winter-Patentanmeldung EP-A-0 239 400 beschreibt, wie es möglich ist, einen veränderten, derivativen Antikörper herzustellen, indem man die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) einer variablen Region eines Immunglobulins durch CDRs aus einem Immunglobulin anderer Spezifität ersetzt, indem man rekombinante DNA-Techniken verwendet; sog. „CDR-Grafting“. Dies ermöglicht es, die Antigenbindungspezifität eines Antikörpers zu verändern. (Im vorliegenden Fall könnten es die CDRs von MT3, 6G3, MB23G2, Antikörper mit den gleichen Bindungsspezifitäten wie diese anti-CD45RB-Antikörper oder einem Antikörper, der mit MT3, 6G3 oder MB23G2 kreuzreaktiv ist, sein, die auf einen anderen Antikörper übertragen werden). Auf diese Weise erlaubt CDR-Grafting die „Humanisierung“ von Antikörpern, wenn es mit einer Veränderung der Framework-Regionen verbunden wird.

**[0039]** Menschliche Antikörper können auch direkt bereitgestellt werden, indem man in Mäusen, denen ein natives Immunsystem fehlt, das menschliche Immunsystem rekonstituiert und dann in diesen „humanisierten“ Mäusen menschliche Antikörper herstellt.

**[0040]** Ein „humanisierter“ Antikörper, der die CDRs eines Nagerantikörpers als Spezifitätsdeterminanten für ein Antigen von Interesse enthält, wird mit geringerer Wahrscheinlichkeit vom menschlichen Immunsystem für fremd erkannt werden. Daraus folgt, dass ein „humanisierter“ Antikörper der gleichen Bindespezifität wie z. B. MT3 oder 6G3 oder ein Antikörper, der mit einem von beiden kreuzreaktiv ist (siehe unten), für ein therapeuti-

sches und/oder diagnostisches Verfahren am Menschen von besonderem Nutzen sein kann.

**[0041]** Wie beschrieben ist der Stand der Technik dergestalt, dass der Fachmann weiß, wie man einen beliebigen gegebenen Antikörper oder denselben kodierende Gene so manipuliert und verändert, dass man ein Derivat erhält, das den eigenen besonderen Bedürfnissen entspricht.

#### Antiidiotypische Antikörper

**[0042]** Die Verfügbarkeit eines Antikörpers wie MT3 oder 6G3 erlaubt es dem Fachmann, Bindungspartner zu erhalten, z. B. Antigene/Epitope oder Antikörper/Paratope, die daran binden. Daher beschreibt die vorliegende Erfindung auch Bindungspartner, z. B. Antigene und/oder Antikörper, die an einen der hier beschriebenen Antikörper oder Derivate davon, wie z. B. MT3 und 6G3, binden.

**[0043]** Die unter Verwendung der mAbs MT3 und 6G3 erhaltenen Bindungspartner können auch verwendet werden, um weitere Liganden zu erzeugen, z. B. andere Antikörper als MT3 oder 6G3 (oder Moleküle, die eine antikörperähnliche Bindungsfunktion haben, z. B. Fragmente, Derivate und synthetische Analoga von Antikörpern, wie z. B. „single-chain antigen-binding molecules“). Daher werden auch Liganden beschrieben, z. B. monoklonale Antikörper, die imstande sind, einen Bindungspartner zu bilden, der imstande ist, an die monoklonalen Antikörper MT3 und 6G3 zu binden. Solche Liganden („kreuzreaktive Liganden“), z. B. monoklonale Antikörper, können das gleiche Epitop erkennen, das von den monoklonalen Antikörpern MT3 und 6G3 auf den besagten Bindungspartner erkannt wird.

**[0044]** Die vorliegende Erfindung beschreibt auch Derivate, funktionale Äquivalente (z. B. ein Molekül mit einer antikörperartigen Bindungsspezifität) und Fragmente der genannten kreuzreaktiven Liganden, beispielsweise unter Verwendung von einer oder mehreren der hier erwähnten und oben beschriebenen Techniken rekombinanter DNA-Technologie hergestellt. Einzeldomänenliganden (monoklonale Antikörper), wie in WO 90/05144 beschrieben, werden ebenfalls umfasst.

#### Antigenisolierung

**[0045]** Unter Verwendung von Standardtechniken ist es möglich, einen Liganden, z. B. erfindungsgemäße Antikörper und ihre Derivate, zur immunologischen Reinigung eines bindenden Partnerantigens zu verwenden. Techniken zur Immunaffinitätssäulenchromatographie sind allgemein bekannt, siehe hier z. B. „Current Protocols in Immunology“, ed. J. E. Coligan et al, John Wiley and Sons, Unit 8.2. Beispielsweise ist es jetzt bekannt, dass das von anti-CD45RB-Antikörper MB23G2 identifizierte Epitop von dem B-Exon des gemeinsamen Leukozytenantigens kodiert wird. Isolierung des Epitops und daran bindender Substanzen sind in dieser Erfindung beschrieben.

**[0046]** Tatsächlich sollte es möglich sein, eine Immunaffinitätssäule zu verwenden, um kreuzreaktive Liganden, wie oben beschrieben, zu isolieren, ohne die Antigene selbst zu isolieren müssen. Eine erste Runde der Immunaffinitätsreinigung verwendet einen Liganden, z. B. einen monoklonalen Antikörper wie MT3, 6G3 usw., um den antigenhaltigen Bindungspartner aus einer Probe zu entfernen, der dann in der Säule verwendet werden kann, um aus einer heterogenen Ligandenpopulation diejenigen Liganden, die mit dem monoklonalen Antikörper MT3, 6G3 usw., kreuzaktiv sind und die gleichen Bindungspartner erkennen, auszuwählen.

**[0047]** Ein unter Verwendung des Liganden, z. B. des monoklonalen Antikörpers MT3, 6G3, usw., isolierter Bindungspartner, etwa ein Peptid oder kleines bindendes Molekül, kann verwendet werden, um kreuzreaktive Liganden aus einem Repertoire oder einer heterogenen Population von Antikörpern, die auf eine große Anzahl von Weisen hergestellt werden können, auszuwählen. Eine Möglichkeit besteht darin, durch die standardmäßigen Hybridomtechniken monoklonale Antikörper und Zelllinien, die diese produzieren, zu selektieren. Von der vorliegenden Erfindung werden auch immortalisierte Zellen beschrieben, z. B. Hybridome, die die besagten kreuzreaktiven Liganden produzieren.

**[0048]** Eine andere Methode zur Auswahl von mit einem Liganden wie den Antikörpern MT3 oder 6G3 kreuzreaktive Liganden besteht darin, die in WO 92/01047 (Cambridge Antibody Technology Limited and MRC/McCafferty et al) offenbarten Methoden zur Herstellung von Mitgliedern spezifisch bindender Paare anzuwenden. Diese Veröffentlichung wahrt die Expression von Polypeptidketten aus einer genetisch verschiedenen Population von Mitgliedern spezifisch bindender Paare, z. B. Antikörper, verbunden mit einer Komponente einer sezernierten replikablen genetischen Display-Einheit (RDGP), z. B. eines Bakteriophagen, der dadurch auf der Oberfläche das Polypeptid auslegt. Sehr große Repertoires ausgelegter Antikörper können erzeugt und durch-

sucht werden, wobei Antigenbindung verwendet wird, einen oder mehrere interessante Antikörper zusammen mit der kodierenden DNA zu isolieren. Die ein auf der Oberfläche eines RGDP ausgelegtes Polypeptid kodierende DNA ist im RDGP enthalten und kann daher mühelos isoliert und zur Expression isoliert und kloniert werden. Das zu durchmusternde Antikörperrepertoire kann natürlich aus einer menschlichen Quelle gewonnen sein.

#### Rekombinante Antikörper

**[0049]** Natürlich ist der Fachmann, sobald er eine immortalisierte Zelllinie besitzt, z. B. ein Hybridom oder ein RGDP, das DNA enthält, die mindestens eine Polypeptidkomponente eines bindenden Liganden kodiert, imstande, mit im Stand der Technik beschriebenen Techniken (siehe EPA 449,769) die gesamte Nukleotidsequenz, die den Liganden kodiert, z. B. den von der Zelle sekretierten monoklonalen Antikörper, zu erlangen. Daher deckt die vorliegende Erfindung auch primäre Nukleotidsequenzen, die die Liganden kodieren, z. B. monoklonale Antikörper wie oben definiert, zusammen mit Fragmenten dieser Primärsequenzen und sekundären Nukleotidsequenzen, die Derivate, Mutationen und Hybridisierungspartner der besagten primären Nukleotidsequenzen umfassen, ab.

**[0050]** Diese Nukleotidsequenzen können in einem rekombinanten System verwendet werden, um mit Standardtechniken ein Expressionsprodukt herzustellen. Daher umfasst die vorliegende Erfindung Vektoren (Klonierungs- und Expressionsvektoren), die die besagten Nukleotidsequenzen enthalten, transformierte Zellen, die die besagten Vektoren enthalten und Expressionsprodukte, die unter Verwendung eines rekombinanten Systems, die irgendeinen solchen Vektor oder irgendeine solche transformierte Zelle nutzen, hergestellt werden.

**[0051]** Die Herstellung von Fusionsproteinen wird ebenfalls umfasst. Siehe z. B. Stamenkovic et al., „The B Lymphocyte Adhesion Molecule CD22 Interacts with Leukocyte Common Antigen CD45R0 on T Cells and α2-6 Sialytransferase, CD75, on B Cells“, CELL, Vol. 66, S. 11-33-1144 (1991).

**[0052]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch Verfahren zur Expression eines Liganden, z. B. eines monoklonalen Antikörpers, Derivats, funktionalen Äquivalents oder Fragments davon, die die Verwendung von Nukleotidsequenzen, Vektoren oder transformierten Zellen gemäß obiger Definition umfassen.

**[0053]** Insbesondere binden MT3 und 6G3, gegen das menschliche CD45RB-Antigen gerichtete monoklonale Antikörper, an ein Epitop auf CD45RB in menschlichen Zellen, die CD45RB exprimieren. Dieses Epitop kann dann gereinigt werden, z. B. unter Verwendung einer Immunaffinitätssäule (wie beschrieben), und teilweise oder vollständig sequenziert werden, z. B. unter Verwendung wiederholter Zyklen des Edman-Abbaus.

#### Immunsuppression und Immuntoleranzinduktion

**[0054]** Die erfindungsgemäßen Antikörper und pharmazeutischen Zusammensetzungen sind zur Immunmodulation, insbesondere Immunsuppression nützlich, z. B. bei den folgenden Indikationen:

a) Behandlung oder Prävention der Zell-, Gewebe- oder Organallo- oder -xenotransplantatabstoßung, z. B. zur Behandlung menschlicher Empfänger von Transplantaten von z. B. Herz, Lunge, Pankreasinsel, Knochenmark, chromaffinen oder dopaminproduzierenden Zellen, kombinierten Herz-Lungen-Transplantaten, Leber, Nieren, Pankreas, Haut, Dünndarm, Gefäßgewebetransplantaten oder Hornhauttransplantaten. Sie sind auch für die Prävention von „graft-versus-host disease“ (GvH), das manchmal auf Knochenmarktransplantation folgt, indiziert. Die erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen unterbinden auch Abstoßung von Organtransplantaten bei Säugern wie Nagern und Primaten und machen sie rückgängig. Z. B. bewahren die Antikörper Mäuse davor, Nierentransplantate abzustoßen, und bewirken langfristiges Überleben.

b) Behandlung und Prävention von Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Zuständen, insbesondere entzündlichen Krankheitsbildern mit einer Ätiologie, die eine autoimmune Komponente enthält, z. B. Arthritis (z. B. rheumatoide Arthritis, progredienter Arthritis chronica und Arthritis deformans) und rheumatischer Erkrankungen. Zu speziellen Autoimmunerkrankungen, auf die die erfindungsgemäßen Verfahren angewandt werden können, gehören autoimmune hämatologische Krankheitsbilder (einschließlich von z. B. hämolytischer Anämie, aplastischer Anämie, reiner Erythrozytenanämie und idiopathischer Thrombozytopenie), systemischer Lupus erythematosus, Polychondritis, Sklerödem, Wegeners Granulomatose, Dermatomyositis, chronische aktive Hepatitis, Myasthenia gravis, Psoriasis, das Steven-Johnson-Syndrom, idiopathische Thrombozytopenie, autoimmune entzündliche Darmerkrankungen (einschließlich von z. B. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn), endokrine Ophthalmopathie, Morbus Basedow, Sarcoidose, Multiple Sklero-

se, primäre Gallengangzirrhose, juveniler Diabetes (Diabetes mellitus vom Typ I), Uveitis (vordere und hintere), Keratoconjunctivitis sicca und Frühlingskeratokonjunktivitis, interstitielle Lungenfibrose, psoriatische Arthritis, Glomerulonephritis (mit und ohne nephrotischem Syndrom, z. B. einschließlich von ideopathischem nephrotischem Syndrom oder minimal veränderlicher Nephropathie) und juvenile Dermatomyositis. c) Behandlung von durch übermäßige Proliferation von T-Lymphozyten gekennzeichneten Leukämien, einschließlich von viral verursachten Leukämien, z. B. HTLV-1-verursachter Leukämie und akuter lymphozytischer Leukämie.

#### Dosierungen und Darreichungsformen

**[0055]** Die Erfindung beschreibt ein Kit zur Verabreichung an Patienten, die Xenotransplantate erhalten haben, das eine oder mehrere Substanzen umfasst, die imstande sind, an CD45 zu binden. Das Kit kann die besagten Substanzen in geeigneten pharmazeutischen Formulierungen wie Einzeldosisformen enthalten, zusammen mit einem oder mehreren Pharmaka, die verwendet werden, um durch vorher existierende Antikörper vermittelte Abstoßung zu unterdrücken. Solche Pharmaka können Cyclophosphamid, Deoxyspergualin und dergleichen umfassen.

**[0056]** Die geeigneten Dosierungen der genannten Substanzen variieren natürlich, z. B. in Abhängigkeit von dem zu behandelnden Krankheitsbild (z. B. der Art der Krankheit oder der Natur der Resistenz), dem erwünschten Effekt und der Verabreichungsform. Beim Menschen wirksame Dosierungen können durch im Stand der Technik bekannte Methoden, z. B. US-Patent Nr. 5,035,878, von bei Mäusen und anderen Säugtieren wirksamen Dosierungen abgeleitet werden.

**[0057]** Allgemein werden jedoch zufriedenstellende Ergebnisse durch parenterale Verabreichung erreicht, z. B. durch intravenöse Verabreichung, z. B. intravenöse Injektion oder Infusion von Dosierungen in der Größenordnung von 0,01 bis 2,5 oder bis zu 5 mg/kg, z. B. in der Größenordnung von 0,05 oder 0,1 bis zu 1, mg/kg. Geeignete Dosierungen für menschliche Patienten bewegen sich daher im Bereich von 0,5 bis 125 bis zu 250 mg intravenös, z. B. im Bereich von 2,5 bis 50 mg intravenös. Die Substanzen können täglich oder einen jeden zweiten Tag oder seltener in sinkenden Dosierungen verabreicht werden, um einen minimalen Blutspiegel der Substanz während der Antigenbelastung zu erhalten, z. B. im Anschluss an eine Organtransplantation oder während der akuten Phase einer Autoimmunerkrankung.

**[0058]** Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können auf herkömmliche Weise hergestellt werden. Eine erfindungsgemäße Zusammensetzung wird vorzugsweise in lyophilisierter Form bereitgestellt. Für die sofortige Verabreichung wird sie in einem geeigneten wässrigen Träger aufgelöst, z. B. sterilem Wasser ad injectabilia oder steriles physiologischen Kochsalzpuffer. Scheint es wünschenswert, zur Verabreichung durch Infusion anstelle von Bolusinjektion ein größeres Lösungsvolumen herzustellen, ist es von Vorteil, menschliches Serumalbumin oder das eigene heparinisierte Blut des Patienten zum Zeitpunkt der Formulierung der Salzlösung zuzusetzen. Die Gegenwart eines Überschusses solcher physiologisch inerter Proteine beugt einem Verlust von Antikörpern durch Adsorption an die Wände des Behälters und der mit der Infusionslösung verwendeten Schläuche vor. Wenn Albumin verwendet wird, beträgt eine geeignete Konzentration von 0,5 bis 4,5 Gew.-% der Salzlösung.

**[0059]** Z. B. werden in klinischen Tests Patienten, denen Nieren-, Leber- oder Herztransplantationen bevorstehen, für eine prophylaktische Behandlung ausgewählt. Am Tag der Transplantation, zwei Stunden vor dem chirurgischen Eingriff, wird eine erste intravenöse Infusion der Substanz, des Antikörpers oder Gemischs mit einer Dosierung von 0,2 mg jeder Substanz oder jedes Antikörpers pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht. Zwei Tage nach dem chirurgischen Eingriff wird eine gleichartige Infusion der Substanz und/oder des Antikörpers mit einer Dosierung von 0,4 mg/kg Körpergewicht verabreicht, die dann einen Monat lang wöchentlich wiederholt wird. Die intravenösen Infusionen werden folgendermaßen hergestellt: Die lyophilisierten Substanzen und/oder Antikörper werden miteinander vermischt und in 100 ml sterilen Kochsalzpuffer, der 4,51 Gew.-% an menschlichem Albumin enthält, aufgenommen. Diese salzhaltige Dispersion wird den Patienten im Verlaufe von 30 min verabreicht.

**[0060]** Die erfindungsgemäßen Substanzen sind auch als Diagnosehilfe, als diagnostische Reagenzien oder als Bestandteile eines diagnostischen Kits zur Identifikation bestimmter Subpopulationen von Leukozyten nützlich. Die Substanzen können unter Verwendung herkömmlicher Techniken markiert werden, z. B. fluoreszenzmarkiert oder radioaktiv markiert. Z. B. werden 25 µg des monoklonalen Antikörpers in 0,25 ml 0,12 molarem Natriumphosphat, pH 6,8, unter Verwendung von 2 mCi Iod 125 und 10 µg Chloramin T iodiert. Nach 5 min bei 23°C wird die Reaktion durch Zugabe von 20 µg Natriummetabisulfit, 3 mg Kaliumiodid und 1 mg BSA (Rin-

derserumalbumin) beendet. Das iodierte Protein wird chromatographisch abgetrennt. Die markierten Substanzen werden auf einen eingefrorenen Gewebeschnitt aufgetragen, z. B. von einem Patienten, der Symptome der Transplantatabstoßung oder einer akuten Autoimmunerkrankung, insbesondere eine Leukozyteninfiltration, zeigt. Die überschüssige Substanz wird abgewaschen, die gebundene Substanz wird gemessen. Ein erhebliches Maß von Bindung der Substanz an im Gewebeschnitt vorliegende Leukozyten legt nahe, dass die Mehrzahl der beteiligten Leukozyten eher naive als Gedächtnis-Leukozyten sind, was darauf hinweist, dass Behandlung mit den Substanzen und/oder in erster Linie die T-Zell-vermittelte Immunantwort beeinflussenden Immunosuppressiva, z. B. Cyclosporin oder FK-506, geeignet ist.

#### Adjuvantien

**[0061]** Es wird auch dargelegt, dass eine anti-CD45RB-Substanz alleine oder zusammen mit standardmäßigen Immunosuppressiva oder entzündungshemmenden Wirkstoffen gegeben werden kann. Zu diesen können Cyclosporin, FK-506, Leflunomid, Rapamycin, Cyclophosphamid, Mycophenolatmofetil, Deoxyspergualin, Corticosteroide, Antilymphozyten-Globulin, OKT-3 und dergleichen und andere gehören. Es wird erwartet, dass eine Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen und/oder Antikörper die erforderlichen Dosierungen solcher Wirkstoffe verringert und dadurch unerwünschte Nebenwirkungen reduziert. Die Substanzen können auch in Kombination mit anderen monoklonalen Antikörpern oder anderen Substanzen, die spezifisch bestimmte Lymphozyten-Subpopulationen erkennen, z. B. monoklonale Antikörper gegen CD25, CTLA4-Ig-Fusionspeptide, usw., verwendet werden.

#### Ex vivo-Konditionierung von Empfänger-Lymphozyten

**[0062]** In einigen Fällen können Immunsuppression und/oder Toleranzentwicklung durch Verabreichung von aus dem Empfänger isolierten Lymphozyten, die in vivo oder ex vivo mit den in der vorliegenden Erfindung nützlichen anti-CD45R-Antikörpern konditioniert worden sind, verbessert werden. Die konditionierten oder anergisierten Lymphozyten können in einer Menge, die wirksam ist, Immuntoleranz im Empfänger auszulösen oder zu unterstützen, vor, gleichzeitig mit oder nach der Transplantation und/oder Verabreichung der anti-CD45R-Antikörper gegeben werden. Vorzugsweise werden die Lymphozyten vor der Transplantation oder anderen Behandlung aus dem Empfänger gewonnen, durch Kontakt mit den in der vorliegenden Erfindung eingesetzten Antikörper präkonditioniert, und den Antigenen auf dem Spendermaterial ausgesetzt, bevor sie wieder in den Empfänger eingebracht werden.

#### Beispiel 1: Monoklonaler Mäuseantikörper gegen CD45RB

**[0063]** Monoklonale Mäuseantikörper gegen menschliches CD45RB werden unter Verwendung herkömmlicher Techniken hergestellt, im Wesentlichen, wie von Kohler und Milstein in Nature 256: 49 beschrieben. Weibliche BALB/C-Mäuse (20–25 g Körpermittel) erhalten jeweils 100 µg Antigen, das menschliches CD45RB enthält, z. B. die Hodgkin-Zelllinien DEV (der Allgemeinheit zugänglich) durch intraperitoneale Injektion. (Alternativ kann das Antigen Mäusezellen, die transformiert worden sind, um menschliches CD45RB zu exprimieren, enthalten.) Nach zwei Wochen wird, wieder durch intraperitoneale Injektion, eine zweite Booster-Injektion, die 50 µg des Antigens enthält, verabreicht. Das Vorhandensein von mit dem Antigen reaktiven Antikörpern im Blutserum der Tiere wird durch immunhistologisches Screening kontrolliert. Mäuse, die maximale Blutspiegel von CD45RB-Antikörpern zeigen, erhalten eine weitere Booster-Injektion, die 20 µg Antigen umfasst. Vier Tage später werden sie getötet, und ihre Milzzellen werden isoliert und mit einer geeigneten Myelomzelllinie fusioniert, z. B. Myeloma X63 (der Allgemeinheit zugänglich). Die resultierenden Hybridome werden in Kultur genommen und auf die Expression eines Antikörpers mit hoher Affinität zu CD45RB selektiert.

**[0064]** Eine Hybridomlinie, die monoklonale Mäuseantikörper gegen das menschliche CD45RB herstellt, ist die Hybridomlinie MT3, die am 29. März 1993 gemäß dem Budapest Vertrag der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852/USA als ATCC Designation HB 11312 hinterlegt wurde.

**[0065]** Eine zweite Hybridomzelllinie, die monoklonale Rattenantikörper gegen Mäuse-CD45RB bildet, ist HB220 (jetzt MB23G2 bezeichnet). Diese Zelllinie ist bei der ATCC hinterlegt worden und kann von der ATCC käuflich erworben werden.

**[0066]** Eine dritte Hybridomzelllinie (bei der ATCC als HB-11873 hinterlegt) bildet erfindungsgemäße Antikörper (monoklonale Antikörper 6G3). Diese Hybridomzelllinie wurde durch die Fusion von Myelomzellen der Linie SP2/O und Milzzellen einer Maus, die mit der menschlichen großzelligen Nicht-Hodgkin-B-Zell-Lymphomzell-

linie VER immunisiert worden war, hergestellt. Die resultierenden Klone wurden durch ein Immunperoxidaseverfahren auf Gefrierschnitten von menschlichen Tonsillen und Rhesusaffenmilzen gescreent. Klon 6G3 wurde aufgrund der hohen Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 6G3 mit Untergruppen der T- und B-Lymphozyten in beiden Geweben ausgewählt. Die Antikörperreakтивität von 6G3 wurde aufgrund seiner selektiven Reaktivität mit das menschliche CD45RB exprimierenden Transfektanden und der Charakterisierung des Molekulargewichts des von 6G3 immunopräzipitierten Antigens als drei Banden mit Molekulargewichten von 220, 204 und 190 kD als anti-CD45RB charakterisiert. Die Reaktivität des Antikörpers konnte durch Vorbehandlung der Gewebe, Zellen oder Blots mit Neuraminidase aufgehoben werden, was die Abhängigkeit des Antigens von Sialylsäure zeigt.

**[0067]** Eine vierte Hybridomzelllinie, HB223, bildet zu MB23G2 analoge monoklonale Antikörper; auch sie sind hinterlegt bei und verfügbar durch die ATCC.

Beispiel 2: Chimäre monoklonale Antikörper gegen CD45RB

a) Klonierung des Gens, das die variable Domäne der schweren Kette kodiert

**[0068]** Die genomische DNA des gewünschten Hybridoms, in diesem Beispiel des MT3- oder 6G3-Hybridoms aus Beispiel 1, und der Ausgangs-Myelomzelllinie der Hybridome (Myelom X63 oder SP2/O) werden isoliert und mit EcoRI verdaut. Jede verdaute DNA wird dann auf dem gleichen Agarosegel aufgetrennt. Nach der Wanderung wird das Agarosegel durch Southern Blot unter Verwendung eines  $^{32}\text{P}$ -markierten, 0,7 kb-großen XbaI-EcoRI-DNA-Fragmentes, das den Enhancer  $\text{E}\mu$  für die schwere Kette der Maus (Heinrich et al, J. of Immunol. (1989) 143: 3589) kodiert, analysiert, um das gewünschte Schwerkettensubfragment zu identifizieren, d. h., das gewünschte Fragment ist in den MT3- und 6G3-Hybridomen, aber nicht in den X63- oder SP2/O-Myelomen vorhanden. Weitere Reinigung dieses Fragmentes wird dann durch präparative Agarosegelektrophorese durchgeführt.

**[0069]** DNA-Fragmente mit der gleichen Größe wie das gewünschte Fragment werden in die EcoRI-Restriktionsschnittstelle des Bakteriophagen ZAP (Stratagene) kloniert. Unter Verwendung der oben beschriebenen Sonde werden die rekombinanten Phagen durchmustert und Klone, die mit der Probe hybridisieren, ausgewählt. Die DNA-Inserts der ausgewählten Klone werden durch Polymerasekettenreaktion (PCR) aus dem Phagenplattenlysat vervielfältigt, wobei ein erstes Oligonukleotid das murine  $\text{J}_z$ -Gen und ein zweites Oligonukleotid den Anfang der schweren Kette von MT3 oder 6G3 kodiert. Die aus jedem der ausgewählten Klone erhaltenen DNA-Fragmente werden durch Southern-Blot analysiert, wobei als Probe ein Oligonukleotid verwendet wird, das einen Teil der  $\text{E}\mu$ -Sonde, wie oben beschrieben, kodiert.

b) Konstruktion eines chimären Schwerkettengens

**[0070]** Das EcoRI-Fragment (das die Gene der variablen Domäne der Schwerkette von MT3 oder 6G3 (einschließlich des Promoters und Enhancers) umfasst) wird durch Verdau der DNA eines der in Schritt a) ausgewählten Phagenklone erhalten, dann in die EcoRI-Restriktionsschnittstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pSV2 neo-human  $\gamma_1$ , constant part (Heinrich et al, s. o.) kloniert. Im Anschluss an die Vermehrung des resultierenden Plasmids wird die Nukleotidsequenz des die variable Domäne der MT3- oder 6G3-Schwerkette kodierenden Gens nochmals bestimmt, um die Möglichkeit auszuschließen, dass sich eine Mutation in diesem Gen ereignet hatte.

c) Klonierung des Gens, das die variable Domäne der leichten Kette kodiert

**[0071]** Die genomische DNA der MT3- oder 6G3-Hybridoma und der Ausgangszelllinien X63 oder SP2/O wird isoliert und mit EcoRI verdaut. Jede verdaute DNA wird dann auf dem gleichen Agarosegel aufgetrennt. Nach der Wanderung wird das Agarosegel durch Southern-Blot unter Verwendung eines  $^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Fragments, das die fünf  $\text{J}_K$  und das  $\text{C}_K$ -Gen der Maus enthält, als Sonde analysiert. Nach Größe aufgetrennte EcoRI-Fragmente, deren Größe der der gewünschten variablen Domäne der MT3- oder 6G3-Leichtkette entspricht, werden in den Phagen EMBL4 (Stratagene) kloniert.

**[0072]** Durch Durchmustern der rekombinanten Phagenklone mit der oben genannten Sonde wird ein Klon identifiziert, der das DNA-Fragment enthält, das die leichte Kette aus MT3 oder 6G3 kodiert. Das gewünschte DNA-Fragment wird dann in die EcoRI-XbaI-Restriktionsschnittstellen von pGEM4 (Promega) umkloniert, und seine Sequenz wird bestimmt.

## d) Konstruktion eines chimären Leichtkettengens

**[0073]** Ein XbaI-XbaI-Fragment, das die Sequenz, die den Enhancer für die schwere Kette der Maus kodiert (Heinrich et al, s. o.), und ein HindIII-SphI-DNA-Fragment, das die Sequenz für den menschlichen konstanten Teil κ (huCκ) enthält, werden zusammen in den Phagen mp18 (Stratagene) kloniert. Ortsgerichtete Mutagenese wird an den resultierenden rekombinanten Phagen durchgeführt, um die HindIII-Restriktionsschnittstelle in der erwünschten kodierenden Region zu entfernen, gefolgt von Verdau mit EcoRI und HindIII zur Erzeugung eines DNA-Fragments, das die Sequenzen sowohl für Eμ als auch huCκ enthält. Nach dem Auffüllen der Enden dieses Fragmentes wird das Fragment in die abgestumpfte EcoRI-BamHI-Restriktionsschnittstelle von pSV2-DHFR umkloniert, um pSV2-DHFR-Eμ-huCκ zu erzeugen. Das Plasmid pSV2-DHFR wurde erhalten, indem das BamHI-HindIII-Fragment von pSV2-neo mit einem BamHI-HindIII-Fragment, das das Gen für die Dihydrofolatreduktase kodierte, ausgetauscht wurde.

**[0074]** Zuletzt wurde ein EcoRI-XbaI-DNA-Fragment, das die Sequenz der leichten Kette von MT3 oder 6G3 enthält, aus dem rekombinanten pGEM4-Plasmid aus Schritt 3 isoliert und in pSV2-DHFR-Eμ-huCκ umkloniert, um pSV2-DHFR-Eμ-huCκ-MT3<sub>L</sub> oder pSV2-DHFR-Eμ-huCκ-6G3<sub>L</sub> zu erzeugen.

## e) Expression chimärer Antikörper

**[0075]** Die in den Schritten b) und d) erhaltenen Plasmide werden durch Elektroporation unter Verwendung eines Gene-Pulser-Gerätes von Biorad gemeinsam in die Mäusemyelomzelllinie SP2/O (ATCC CRL 1581) eingebracht. Es ist bekannt, dass diese Technik mit großer Häufigkeit stabile Transfektanten hervorbringt. Die SP2/O-Zelllinie stellt keine endogenen schweren und leichten Ketten her und ist gegenüber Geneticin (G 418) mit einer Konzentration von 0,8 mg/l empfindlich.

**[0076]** SP2/O-Zellen wachsen im normalen Wachstumsmedium (RPM11640 mit 10% fötalem Kälberserum und  $5 \times 10^{-5}$  Mol β-Mercaptoethanol). Sie werden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und mit dem Elektroporationspuffer (Biorad) gewaschen. Die Zelldichte wird auf  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml eingestellt. Zu 0,8 ml der Zellsuspension werden 15 bis 20 µg jedes Plasmids zugesetzt. Das Gemisch wird auf Eis gestellt und für 10 min inkubiert. Dann werden die Zellen einem elektrischen Schlag ausgesetzt (280 Volt, 25°F) und für weitere 15 min inkubiert. Dann werden die Zellen in das normale Wachstumsmedium übertragen und bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert.

**[0077]** Nach dreitägiger Inkubation wird die Selektion auf G 418-Resistenz begonnen. Zellen werden in frischem Medium, das 1,4 mg/ml G 418 enthält, resuspendiert. Nach 10 bis 14-tägiger Inkubation in der Gegenwart von G 418 liefern die Kulturen wachsende Zellen. Nach zweiwöchiger Inkubation werden Überstände der konfluenten Kulturen in einem Sandwich-ELISA (anti-menschliche κ-Leichtkette/Überstand/mit alkalischer Phosphatase konjugiertes antimenschliches IgG) auf Expression menschlichen IgGs überprüft.

**[0078]** Dieser Test zeigt, dass in allen Kulturen vollständige Antikörpermoleküle sezerniert werden, mit unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von 50 bis 500 ng/ml.

**[0079]** Um Zellen zu selektieren, in denen das DHFR-Gen amplifiziert ist und die daher große Mengen des gewünschten Antikörpers sezernieren, werden zwei Selektionsverfahren für Methotrexat(MTX)-Resistenz, wie nachfolgend beschrieben, durchgeführt. Zu diesem Zweck werden die G 418-resistenten Zellpools jeweils halbiert, und die Amplifikation wird entweder gemäß Verfahren A (MTX-Zunahme um einen Faktor von 2 oder 2,5) oder Verfahren B (MTX-Zunahme um einen Faktor von 5) durchgeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2

Verfahren A	Verfahren B
100 nM MTX	200 nM MTX
250 nM MTX	1 $\mu$ M MTX
500 nM MTX	5 $\mu$ M MTX
1 $\mu$ M MTX	25 $\mu$ M MTX
2,5 $\mu$ M MTX	100 $\mu$ M MTX
5 $\mu$ M MTX	
10 $\mu$ M MTX	
25 $\mu$ M MTX	
100 $\mu$ M MTX	

**[0080]** Jeder Amplifikationsschritt umfasst die Inokulation der Zellen bei einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in dem üblichen Wachstumsmedium, ergänzt um G 418 (1,4 mg/ml) und MTX (Konzentration nach Wahl). Nach 72-stündiger Inkubation werden Zellen und Überstand getrennt. Die Antikörpersekretion wird entweder durch ELISA oder durch HPLC unter Verwendung einer Protein-A-Säule überwacht. Die meisten Pools erreichen bei einer bestimmten MTX-Konzentration ein Maximum der Produktion des spezifischen Antikörpers. Die am besten produzierenden Pools werden durch begrenzende Verdünnung kloniert. Aus mehreren hundert analysierten Klonen werden die 15 besten Produzenten ausgewählt.

**[0081]** Die Produktivität der Klone liegt im Bereich von 30 bis 50 mg monoklonaler Antikörper pro  $10^9$  Zellen in 72 Stunden.

**[0082]** Der Antikörper wird durch Elution auf einer Protein-A-Affinitätssäule aus dem Kulturüberstand aufgereinigt.

#### Beispiel 3: In vivo-Prävention der Abstoßung von Nierentransplantaten in Mäusen

**[0083]** In diesem Experiment wurde an 18 Mäusen eine rechtsseitige Nephrektomie durchgeführt, und gleichzeitig wurde eine Allotransplantation (Nierentransplantation von einem anderen Mäusestamm) durchgeführt. Am siebten postoperativen Tag (POT 7) wurde eine Nephrektomie auf der entgegengesetzten Seite durchgeführt, so dass von diesem Zeitpunkt an die Tiere vollständig von der allotransplantierten Niere abhängig waren. Neun der Mäuse wurden mit 50  $\mu$ g eines Gemisches aus gegen murines CD45RB gerichteten monoklonalen Antikörpern, von den Zelllinien HB220 und HB223 hergestellt, behandelt, während der ersten beiden Tage (POT 0 und POT 1) intravenös, gefolgt von intraperitonealer Gabe von jeweils 100  $\mu$ g jedes Antikörpers während der nächsten neun Tage (POT 2 bis POT 10). Von den neun Kontrolltieren, die keine anti-CD45RB-Antikörper erhielten, waren sieben drei Tage nach Entfernung der zweiten Niere tot, die beiden übrigen zeigten eine Woche später schwere Abstoßung.

**[0084]** Von den neun mit den anti-CD45RB-Antikörpern behandelten Tieren starben drei infolge von chirurgischen Komplikationen ohne Bezug zu irgendeiner Immunreaktion, aber bemerkenswerterweise überlebten die restlichen sechs Tiere langfristig (z. B. über 100 Tage) ohne weitere Behandlung und ohne irgendeinen Hinweis auf Allotransplantatabstoßung. In einer dritten Gruppe von zehn unbehandelten Isotransplantatempfängern war die Todesrate in Folge von chirurgischen Komplikationen die gleiche. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Serumkreatinininspiegeln der Allotransplantatgruppe, die monoklonale Antikörper erhielt, und der Isotransplantatgruppe, was zeigt, dass die Nieren in beiden Gruppen normal funktionierten.

#### Beispiel 4: Umkehr der Abstoßung von Nierentransplantaten bei Mäusen

**[0085]** In diesem Experiment wurde an zehn Mäusen eine rechtsseitige Nephrektomie und zum gleichen Zeitpunkt eine Allotransplantation (Nierentransplantation von einem anderen Mäusestamm) durchgeführt.

**[0086]** Alle zehn Tiere wurden fünf Tage lang ohne immunsuppressive Therapie beobachtet. Es war be-

kannt, dass diese Tiere zu diesem Zeitpunkt unter schwerer Abstoßung litten, da getötete Kontrolltiere, die ebenfalls einer Nephrektomie und einer Nierenallotransplantation unterzogen wurden, am fünften Tag schwere Abstoßung zeigten.

**[0087]** Am Tag 5 erhielten vier der Tiere über die nächsten drei Tage täglich jeweils drei Dosen von 25 µg anti-CD45RB-Antikörper (einem Gemisch monoklonaler Antikörper aus den Zelllinien HB220 (Anti-CD45RB-Antikörper MB23G2) und HB223 (monoklonale anti-CD45RB-Antikörper MB4B4)) intraperitoneal. Alle vier Tiere durchliefen rasche Linderung ihrer Abstoßungssymptome, einschließlich einer Rückkehr zum normalen Kreatininspiegel, und lebten mehr als 100 Tage. Die unbehandelten Tiere starben bis zum neunten Tag in Folge von Organabstoßung. Tabelle 3 fasst die Ergebnisse dieses Experiments zusammen.

Tabelle 3

Beendung der Abstoßung von Nierentransplantaten bei Mäusen

Maus	Therapie	Überleben in Tagen	Todesursache
1	Keine	8	Abstoßung/Urämie
2	Keine	9	Abstoßung/Urämie
3	Keine	8	Abstoßung/Urämie

Maus	Therapie	Überleben in Tagen	Todesursache
4	Keine	9	Abstoßung/Urämie
5	Keine	9	Abstoßung/Urämie
6	Keine	9	Abstoßung/Urämie
7	CD45RB	> 100	-
8	CD45RB	> 100	-
9	CD45RB	> 100	-
10	CD45RB	> 100	-

**[0088]** Diese Daten sind mit Blick auf die Beendung der Abstoßung signifikant, da sie bestätigen, dass die Antikörpertherapie hoch wirksam bei der Unterdrückung einer Immunantwort ist. Behandlung und Heilung werden durch Antikörpertherapie erreicht.

Beispiel 5: Bestätigung der Resultate unter getrennter Verwendung von MB23G2 und MB4B4 für Nierentransplantate bei Mäusen

**[0089]** BALB/C (h-2d)-Empfängermäusen wurde die rechte Niere entfernt, bevor sie eine transplantierte Niere von C57B1 (h-2b)-Spendermäusen erhielten. Die Entfernung der linksseitigen natürlichen Niere wurde am siebten darauffolgenden Tag durchgeführt. Es gab vier Gruppen von Tieren. Dreizehn erhielten Isotransplantate, siebzehn erhielten Allotransplantate ohne Immunsuppression (Kontrolle des Trägers), 44 erhielten Allotransplantate und zwei Dosen gereinigter gegen murines CD45RB gerichteter monoklonaler Rattenantikörper MB23G2 von jeweils 1 mg/kg (30 µg) intravenös an den Tagen 0 und 1, und sechzehn erhielten Allotransplantate, aber wurden mit zwei Dosen gereinigten gegen murines CD45RB gerichteten monoklonalen Rattenantikörpern MB4B4 von 1 mg/kg (30 µg) intravenös an den Tagen 0 und 1. Keine weiteren Antikörper wurden verabreicht.

**[0090]** Erwartungsgemäß zeigten die MB23G2-behandelten Tiere verlängerte Überlebenszeiten verglichen mit der unbehandelten Gruppe ( $p < 0,002$ ) (siehe [Fig. 1](#)) und waren mit der Isotransplantat-Gruppe vergleichbar. Bemerkenswerterweise verhinderte der anti-CD45RB-Antikörper MB4B4 die Abstoßung nicht besser als das Vehikel alleine. MB23G2 und MB4B4 sind gleichermaßen Ig2a, aber es existiert ein Unterschied zwischen ihnen. Beide monoklonale Antikörper binden an BALB/C-Leukozyten, wie durch FACS gezeigt. Jedoch wird die Bindung von MB23G2 durch Neuraminidase behindert, während die Bindung von MB4B4 durch eine solche Behandlung nicht beeinflusst wird. [Fig. 2](#) zeigt die Serumkreatininspiegel in Tieren aus jeder Gruppe zum Zeit-

punkt der Tötung oder jenseits von Tag 100 für die langfristig Überlebenden. Es gab keine Unterschiede zwischen der Isotransplantatgruppe und der MB23G2-behandelten Gruppe, während die unbehandelten und MB4B4-behandelten Tiere an Urämie starben. Daher ist das glykosylierte Epitop für MB23G2 entweder beteiligt oder nahe gelegen an Stellen, die in die biochemische Aktivität von CD45RB involviert sind. Nicht glykosylierte Epitope für MB4B4 scheinen für die CD45RB-Aktivität unkritisch zu sein.

**[0091]** Immunperoxidase-Mikroskopieuntersuchungen wurden an Nieren-Allotransplantaten nach sieben Tagen in drei Gruppen von Mäusen durchgeführt: An unbehandelten, MB4B4-behandelten und MB23G2-behandelten Mäusen. Die Schnitte wurden mit gegen murines CD3, CD4, CD8, CD45RB und Ia gerichteten monoklonalen Rattenantikörpern gefärbt. Die Aufnahmen wurden auf maskierte Weise im Hinblick auf Aggregate und diffuse Infiltrate bewertet, wie beschrieben bei Ibrahim et al, Transplantation Vol. 59, S. 724–728. Die Zellzahlen in den diffusen Infiltraten wurden in 10 ( $\times 400$ ) „high power fields“ (HPF) pro Schnitt bei fünf Mäusen pro Gruppe gezählt, und die Daten sind in Tabelle 4 (unten) dargestellt.

Tabelle 4

Diffuse zelluläre Infiltrate in Nieren-Allotransplantaten nach 7 Tagen (Mittelwerte/HPF)

Phänotyp	mAb	Unbehandelt	MB4B4-behandelt	MB23G2-behandelt
CD3	KT3	33	38	22*
CD4	GK1,5	10	11	9
CD8	3,155	27	26	13*
CD45RB	MB23G2	12	10	9

\*  $P < 0,05$  Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MB23G2-behandelten und unbehandelten Gruppen und zwischen MB23G2-behandelten und MB4B4-behandelten Gruppen.

**[0092]** Interessanterweise wurden nach getrennter Zählung der Zellen in Aggregaten und diffusen Infiltraten Unterschiede zwischen den drei Mäusegruppen sichtbar. Die Färbung auf Ia war in den MB23G2-behandelten Allotransplantaten deutlich weniger als in den anderen Gruppen, aber infolge positiver Färbung anderer interstitieller Zelltypen konnte die Anzahl der Lymphozyten nicht verlässlich quantifiziert werden. Die Aggregate enthielten bei allen drei Gruppen hohe Zahlen von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen. Während die Zahlen der CD4<sup>+</sup>- und CD45RB<sup>+</sup>-Zellen in den diffusen Infiltraten in allen drei Gruppen ungefähr gleich waren (Tabelle 3, 2. und 4. Zeile), waren die Anzahlen von CD3<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen in den diffusen Infiltraten zwischen MB23G2-behandelten und anderen Tieren statistisch unterschiedlich (Tabelle 3, 1. und 3. Zeile). Somit zeigten die MB23G2-behandelten Tiere verglichen mit MB4B4-behandelten und unbehandelten Tieren ein erhöhtes CD4:CD8-Verhältnis. Bemerkenswerterweise waren wenige der infiltrierenden Zellen positiv für CD45RB, was in Anbetracht der Tatsache, dass der gegen CD45RB gerichtete monoklonale Antikörper MB23G2 die akute Abstoßung verhindern konnte, besonders hervorzuheben ist.

#### Beispiel 6: Immuntoleranz

**[0093]** Um die Möglichkeit der antigenspezifischen Toleranz zu überprüfen, wurden an dreizehn Tieren aus Beispiel 5, die ein Nierentransplantat für mehr als 100 Tage behalten hatten, nachdem sie zur Zeit der Nierenallotransplantation zwei Dosen MB23G2 erhalten hatten, Hauttransplantationen durchgeführt. Jedes Tier enthielt Haut-Allotransplantate mit voller Dicke von einer C57B1/6-Maus (isogen zum Spender des Nierenallotransplantats) und ein Kontroll-Hauttransplantat: Neun erhielten ein BALB/C-Isotransplantat und vier erhielten ein CBA-Allotransplantat (Dritter als Spender). Es wurde keine weitere Immunsuppression gegeben. Von den dreizehn Tieren mit nierenspezifischer Toleranz gab es eine Untergruppe von vier, die Donor-Alloantigen-spezifische Toleranz zeigten, da sie die C57B1/6-Haut nicht abstießen. Alle vier Tiere stießen die von dritter Seite gespendete CBA-Haut ab, während alle neun BALB/C-Isotransplantate unbegrenzt überlebten. Keine Abstoßung eines Nierenallotransplantates wurde durch die Hauttransplantate ausgelöst.

#### Beispiel 7: Umkehr der Allotransplantatabstoßung

**[0094]** Um zu bestimmen, ob MB23G2 die akute Abstoßung unterdrücken konnte, wurden sieben Allotransplantationen wie in Beispiel 5 beschrieben durchgeführt, aber vor dem vierten Tag wurde keine Immuntherapie

verabreicht. Unbehandelte allotransplantierte Nieren zeigten zu diesem Zeitpunkt Abstoßung. Die behandelten Tiere erhielten 1,5 mg/kg (50 µg) MG23G2 intravenös an jedem der Tage 4, 5 und 6, danach keine weitere Behandlung. Drei Tiere in der MG23G2-behandelten Gruppe starben an Harnleiterkomplikationen – die Transplantathistologie zeigte zum Todeszeitpunkt an den Tagen 8, 9 und 25 keine Abstoßung. Bei allen Tieren wurde die Abstoßung unterdrückt, die restlichen vier überlebten für mehr als sechzig Tage mit normalem Serumkreatinin.

#### Beispiel 8: Einfluss von MB23G2 auf die Blutzusammensetzung

**[0095]** Die pharmakologischen Wirkungen von MB23G2 auf das periphere Blut wurden unter Verwendung von Multiparameter-FACS-Analyse an Mäusen untersucht. Mäuse wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit 30 µg MB23G2 intravenös behandelt. Wie in [Fig. 3A](#) gezeigt, löste MB23G2 eine erhebliche Depletion der zirkulierenden Lymphozyten aus, die innerhalb von einer Woche nach Absetzen des monoklonalen Antikörpers zu Normalwerten zurückkehrte. MB23G2 band an fast alle übriggebliebenen zirkulierenden T- und B-Lymphozyten ([Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#)). FACS-Analyse zeigte am Tag 8 keine überschüssigen MB23G2-Antikörper im Plasma. Die FACS-Analyse der Milz zeigte, dass die verabreichte Therapie 24 Stunden nach der zweiten Dosis MB23G2 das Lymphgewebe durchdrang. Eine FACS-Inhibitionsmessung zeigte keine Sensitivierung irgendeiner Maus gegenüber dem MB23G2-Antikörper innerhalb von zwei Wochen nach der Behandlung.

**[0096]** Da CD45 eine Proteintyrosinphosphatase ist, wurden Versuche entworfen, um zu zeigen, dass die Auslösung der Allotransplantat-Toleranz durch MB23G2-Antikörper im Zusammenhang mit einer Veränderung in der Tyrosinphosphorylierung von Substraten in T-Zellen steht, die notwendig sind, damit Signalübertragung erfolgen kann.

#### Beispiel 9: Mechanismus der Toleranzauslösung durch monoklonale Antikörper gegen CD45RB: Erhöhte Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C-γ1 und verringerte Expression entzündungsfördernder Cytokine

**[0097]** Murine T-Zell-Hybridome A1.1 wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von MB23G2 oder MB4B4 mit dem gegen CD3 gerichteten monoklonalen Antikörper 2C11 stimuliert. Zellen wurden in Brij 96 lysiert, die phosphotyrosinhaltigen Proteine wurden mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY72 immunopräzipitiert. Die immunopräzipitierten Proteine wurden extrahiert und auf 10%-SDS-Polyacrylamid-Gelen getrennt, elektrophoretisch auf PVDF-Membranen übertragen und einer Immunoblotting-Prozedur unterzogen (siehe Lazarovits et al, J. Immunol., 153, 3956 (1994)), wobei der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 verwendet wurde.

**[0098]** Es wurde in Anwesenheit des gegen CD45RB gerichteten monoklonalen Antikörpers MB23G2 eine Steigerung der Tyrosinphosphorylierung eines 145 kDa schweren Substrats gefunden. Der monoklonale Antikörper MB4B4 veränderte die Tyrosinphosphorylierung dieses Substrates nicht. Die Identität dieser 145 kDa-Bande mit PLC-γ1 wurde bestätigt, indem der monoklonale Antikörper 4G10 von den Blots abgezogen und der Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Phospholipase C-γ1 (PLC-γ1) (Upstate Biotech, Lake Placid, NY) nochmals sondiert wurde. Somit konnte in Gegenwart von MB23G2 erheblich mehr tyrosinphosphorylierte PLC-γ1 identifiziert werden als in seiner Abwesenheit, während MB4B4 die Menge an PLC-γ1, die immunopräzipitiert werden konnte, nicht veränderte. Die erhöhte Tyrosinphosphorylierung von PLC-γ1 ist von Gajewski et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, S. 38–42 (1994)) als Eigenschaft anergischer T-Zellen beschrieben worden.

**[0099]** Da Genaktivierung eine Folge der Signaltransduktion in T-Zellen ist, wurden Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob der monoklonale Antikörper MB23G2 in vivo die Expression von Cytokingen, von denen bekannt ist, dass sie bei der Abstoßung von Allotransplantaten erhöht sind, beeinflussen kann. Allgemein wird angenommen, dass ein sogenanntes T<sub>H</sub>1-Cytokinprofil (Interleukin 2, γ-Interferon) mit Abstoßung einhergeht, während ein T<sub>H</sub>2-Phenotyp (Interleukin 4, 5, 6, 10) mit Abwesenheit von Reaktionen einhergehen kann (siehe T. R. Mosmann et al, J. Immunol., 136, 2348 (1986)).

**[0100]** Zur Untersuchung der Genexpression bei murinen Nieren-Allotransplantaten wurden die Spiegel spezifischer mRNA-Transkripte im Gleichgewichtszustand durch Northern-Blot-Analyse unter Verwendung von <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Sonden gemessen. Genexpression wurde in vier Gruppen von Tieren untersucht: Diese Transplantate am Tag 7 nach der Operation, Allotransplantate von unbehandelten Tieren am Tag 7 nach der Operation, und Allotransplantate von MB23G2-behandelten Tieren an den Tagen 7 und 28 nach der Operation. Es wurde kein spezifisches Muster von Interleukin 1, 2, 4, 5, 6 oder 10 beobachtet. Doch gab es am Tag 28 eine selektive Absenkung der mRNA-Transkripte für γ-Interferon und TNFα im Vergleich zu unbehandelten Al-

lotransplantaten. Am Tag 7 wurde kein Unterschied beobachtet. Interessanterweise war mRNA für das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) bei den MB23G2-behandelten Tieren am 28. Tag ebenfalls verringert, ohne dass am 7. Tag ein Unterschied beobachtet wurde. Somit kann die Therapie mit MB23G2 Toleranz teilweise durch Behinderung der Expression entzündungsfördernder Cytokine in Folge von Störungen in der Signalübertragungskaskade auslösen.

**[0101]** In noch weiteren Experimenten wurde gefunden, dass die Verwendung von anti-CD45RB-Antikörpern wirksam war, wenn sie Primaten verabreicht wurden.

Beispiel 10: Prävention der Organabstoßung bei Primaten und Umkehr der Organabstoßung

**[0102]** An zwei Cynomolgus-Affen wurden unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen CD45RB (der an ein Neuraminidase-empfindliches Epitop bindet) als Immunsuppresson Nieren-Allotransplantationen durchgeführt, und die Details sind nachfolgend beschrieben:

Details der experimentellen Vorgehensweise:

1. Tierpflege:

**[0103]** Die Tiere waren im Primatenstall der University of Western Ontario untergebracht. Sie wurden mit Zwangskäfigen versehen, die Substanzinjektion und Probenabnahme erlauben, ohne dass das Tier betäubt werden muss, wodurch die Belastung reduziert wird. Sie erhielten standardisierte Affennahrung und andere Nahrungsmittel zur Abwechslung. In einem Bewegungskäfig wurde ihnen normale Bewegungsfreiheit gewährt. Die Tierpflege erfolgte nach den Standardbetriebsanweisungen für nichtmenschliche Primaten, wie von tierärztlichen Diensten bereitgestellt.

**[0104]** Die Tiere wurden nach Blutgruppen klassifiziert. Nach der Ankunft wurden den Tieren wenigstens zwei Wochen Ruhe gewährt. Die Tiere wurden mit Atropin und Ketamin zur physischen Untersuchung, einschließlich von Prüfung auf oralen B-Virus und Tuberkulose betäubt und mit Ivermectin 2828 entwurmt. In der Nacht vor jeder Betäubung fasteten die Tiere.

2. Nierentransplantation:

1. Spenderverfahren:

**[0105]** Zwei Tiere wurden mit Ketamin betäubt, in den OP gebracht, intubiert und auf Isofluran/Stickoxid gesetzt. Ein dreiphasiges chirurgisches Verfahren wurde verwendet. Nach einem Einschnitt in der Körpermitte der beiden wurden die linke Nierenarterie, Vene und Harnleiter sorgfältig isoliert und abgetrennt. Transplantate wurden ex vivo perfundiert und bei 4°C in "University of Wisconsin"-Lösung gelagert. Die Wunden wurden geschlossen, und die Tiere wurden in den Käfig zurückgebracht, um sich von dem Betäubungsmittel zu erholen. Während des chirurgischen Eingriffs wurden 200 bis 300 ml Kochsalzpuffer kontinuierlich intravenös verabreicht. Während der Operation wurden die Tiere unter Verwendung einer Heizlampe, vorgewärmten Kochsalz-puffers, einer vorgewärmten Operationsfläche etc. warmgehalten.

**[0106]** Postoperative Pflege erfolgte gemäß den Standardarbeitsanweisungen. Zusammenfassend blieben die Tiere 24 Stunden lang auf einer Warmwasserdecke und unter einer Wärmelampe für 24 Stunden. 24 Stunden lang nach der Operation wurde alle 6 Stunden Buprenorphin verabreicht. Die Tiere wurden täglich kontrolliert. Die Spendertiere, die sich gut erholten, wurden als Empfänger in zukünftigen Transplantationen verwendet. Der Zeitraum zwischen den beiden Operationen beträgt mindestens zwei Wochen.

2. Empfängerverfahren:

**[0107]** Der Empfänger wurde betäubt und präoperativ vorbereitet, wie für den Spender beschrieben. Bei einem Einschnitt in der Körpermitte wurden die Baucharterie und untere Hohlvene freigelegt. Zwischen der Nierenarterie des Spenders und der Aorta des Empfängers wurden, ebenso wie zwischen der Nierenvene des Spenders und der unteren Hohlvene des Empfängers, Anastomosen vom Ende zur Seite durchgeführt. Die Harnröhre des Spenders wurde an die Harnblase des Empfängers angenäht. Die rechte Niere wurde entfernt, und die Wunde wurde geschlossen.

## 3. Postoperative Pflege:

**[0108]** Postoperative Pflege ist die gleiche wie für den Spender beschrieben. Die Tiere wurden nach der Operation mindestens 24 Stunden lang durchgehend überwacht, nötigenfalls länger. Sie wurden engmaschig überwacht (d. h. mehrmals am Tag), bis sie normal fraßen und sich putzten. Danach wurden sie mindestens täglich überprüft, wenn sie ihren monoklonalen Antikörper erhielten.

**[0109]** Sieben Tage lang erhielten die Tiere täglich intravenös 4 mg des gegen CD45RB gerichteten monoklonalen Antikörpers 6G3. Das Ergebnis der Nierentransplantate wurde wöchentlich durch perkutane Biopsie gemessen, und Blutkreatininspiegel wurden zwei Mal in der Woche bestimmt. Zu diesen Verfahren wurden die Tiere mit Ketamin betäubt. Kriterien für frühe Euthanasie waren Lethargie, Fehlen von Nahrungsaufnahme oder Körperpflege, erheblicher Gewichtsverlust (mehr als 20 %) und Nierenversagen (angestiegene Kreatinin-Spiegel).

**[0110]** Wie oben beschrieben, erhielten die Empfängertiere nach der Operation sieben Tage lang 4 mg (1 mg/kg) des gegen CD45RB gerichteten monoklonalen Antikörpers 6G3. Diese Infusionen wurden von keinen Nebenwirkungen begleitet. Beide Tiere überlebten normal bis zum 16. Tag, an dem jedes eine akute Abstoßungskrise erlitt. Das erste Tier wurde zwei Tage später, am 18. Tag, euthanasiert. Das zweite Tier wurde erneut mit 4 mg/kg (16 mg) des anti-CD45RB-Antikörpers 6G3 behandelt. Diese Therapie wurde über vier Tage hinweg täglich intravenös gegeben. Bemerkenswerterweise wurde die Abstoßungskrise vollständig unterdrückt, und es wurde beobachtet, dass das Tier seine normalen Aktivitäten wieder aufnahm und der Kreatinin-Spiegel von einem „Krisenspiegel“ von 738 µmol/l auf 366 µmol/l sank. Es ging dem Tier gut bis zum 36. Tag, an dem eine weitere Abstoßungskrise eintrat. Das Tier wurde dann euthanasiert. Die Histologie des Allotransplantats zeigte, dass am postoperativen Tag 15, unmittelbar bevor zusätzliche Therapie verabreicht wurde, die zu Unterdrückung führte, tiefgehende Endothelentzündung vorlag. Eine Biopsie des Allotransplantats dieses Tieres wurde am 23. Tag nach der Operation durchgeführt und zeigte, dass die Endothelentzündung verheilt war.

**[0111]** Es ist bekannt, dass Kontrolltiere bis zum 10. Tag sterben, wenn in dieser Art von Modell keine Therapie verabreicht wird. (Lazarovits et al, Kidney Intern., 25, 344 (1984)).

**[0112]** Die Daten legen zwei Schlussfolgerungen nahe:

- [1] Da beide Affen über den bekannten Zeitpunkt der Kontrollen hinaus lebten, ist erkennbar, dass die erfindungsgemäße Behandlung erhebliches Überleben von Transplantaten bei einem Primaten bewirkt.
- [2] Noch dramatischer ist die Beobachtung, dass man akute Abstoßung durch monoklonale Antikörper gegen CD45RB unterdrücken kann.

## Beispiel 11: Zusätzliche Affenexperimente

**[0113]** Zwei zusätzliche Cynomolgusaffen (Nr. 3 und Nr. 4) erhielten Nierenallotransplantate und wurden als einzige Form von Immunsuppression mit dem monoklonalen Antikörper 6G3 gegen CD45RB behandelt. Eine Blutgruppenbestimmung wurde durchgeführt, um auf AB0-Kompatibilität zu testen, und Profile des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) wurden durch PCR-basiertes DNA-Typing erhalten, um sicher zu stellen, dass allogene Nierentransplantationen durchgeführt wurden.

**[0114]** Am Tag 0 wurde am Empfängertier eine Nephrektomie durchgeführt, und die Nieren-Allotransplantation wurde durchgeführt. Am Tag sieben wurde die zweite eigene Niere entfernt, und von diesem Zeitpunkt an war das Tier von seiner transplantierten Niere abhängig. Tiere, die keine Immunsuppression erhalten, oder die unwirksame Immunsuppression erhalten, stoßen das Transplantat im Durchschnitt nach  $10 \pm 2$  Tagen ab (Lazarovits et al, Kidney Intern., 25, 344 (1984)).

## Affe 3

**[0115]** Das Tier wurde sieben Tage lang mit 2 mg/kg und Tag (8 mg) 6G3-Antikörper behandelt, dann wurden im Verlauf der nächsten beiden Wochen sechs weitere Dosen gegeben, jeweils montags, mittwochs und freitags. Somit sah der Plan vor, 8 mg des 6G3-Antikörpers zu verabreichen. Das Tier entwickelte am 14. Tag eine Abstoßungsreaktion und wurde euthanasiert.

**[0116]** Diese Tier erhielt die gleiche Therapie wie Affe 3. Das heißt, 8 mg 6G3-Antikörper wurden im Verlauf von drei Wochen in 13 Dosen intravenös verabreicht. Diesem Tier geht es bemerkenswert gut, es ist für mehr als 70 Tage weiterhin am Leben. Keine Abstoßung wurde diagnostiziert.

**[0117]** Somit hatten die mit 6G3 behandelten Tiere 3 und 4 erheblich erhöhte Überlebenszeiten des Allotransplantats, wie in [Fig. 4](#) dargestellt. Affe 2 aus Beispiel 8 ist besonders interessant, da der Antikörper erfolgreich eine akute Abstoßung unterdrückte, die infolge der Nierentransplantationsexperimente an Mäusen vorhergesagt war. Zusätzliche Experimente sind in Arbeit, um zu versuchen, die Gründe für das relativ frühe Versagen des Transplantats bei den Affen 1 und 3 festzustellen, obwohl auch diese beiden Tiere erheblich verlängerte Überlebenszeiten des Allotransplantats zeigten.

#### Beispiel 12: In vivo-Prävention der Abstoßung von Herztransplantaten bei Mäusen

**[0118]** Heterotope Herztransplantationen von C57B1/6-Mäusen in BALB/C-Empfänger wurde im wesentlichen wie von R. L. Kirkman et al (1985) Transplantation 40: 719–722 beschrieben durchgeführt. Sieben der Mäuse erhielten an den Tagen 0 und 1 nach der Herztransplantation 30 µg des gegen murines CD45RB gerichteten monoklonalen Rattenantikörpers MB3G2 intravenös. Vier weitere Mäuse erhielten an den Tagen 0 und 1 jeweils 30 µg intravenös und 100 µg des gegen murines CD45RB gerichteten monoklonalen Rattenantikörpers MB23G2 an jedem der Tage 2 bis 11 nach Herztransplantation. Vierzehn Kontrollmäuse erhielten keinen Antikörper. Das Überleben des heterotopen Transplantats wurde bestimmt anhand der Frage, ob das Herz schlug, und eine Abstoßung wurde durch histologische Analyse bestätigt.

**[0119]** Alle Kontrollmäuse hatten ihre Herzen bis zum 14. postoperativen Tag abgestoßen, wobei die durchschnittliche Überlebenszeit bei neun Tagen lag. Die durchschnittliche Überlebenszeit der Herzen in der Gruppe, die den Antikörper zwei Tage lang erhielt, betrug 20 Tage, die durchschnittliche Überlebenszeit der Herzen in der Gruppe, die den Antikörper 11 Tage lang erhielt, war 34 Tage. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse dieses Experiments zusammen.

Tabelle 5

#### Herz-Allotransplantate bei Mäusen

Gruppen	Anzahl (n)	Überlebenszeit in Tagen	Durchschnitt
Unbehandelt	14	8, 8, 9, 9, 9, 9, 9, 9, 10, 11, 11, 11, 14	9
CD45RB mAb 30 µg D0, D1	7	16, 16, 17, 22, 24, 23, 24	20
CD45RB mAb 30 µg IV D0, D1 und 100 µg intraperitoneal 9 Tage	4	15, 30, 38, 38	34

**[0120]** Zusätzliche Beweise für die Nützlichkeit von anti-CD45RB wurden in den folgenden Studien erbracht.

#### Beispiel 13: In vivo-Prävention der Abstoßung von Transplantaten von Pankreasinseln bei Mäusen

**[0121]** Allotransplantate pankreatischer Inseln wurden im Wesentlichen wie von M. C. Fabian et al, Transplantation, 56, 1137 (1993) beschrieben von CBA/J-Spendern in Streptozotocinbehandelte BALB/C-Empfänger unter die Nierenkapsel verpflanzt. Fünf Kontrollmäuse erhielten keinen Antikörper, während elf Mäuse an den Tagen 0 und 1 nach der Operation 30 µg des gegen das murine CD45RB gerichteten monoklonalen Rattenantikörpers MB23G2 intravenös erhielten. Als Abstoßung wurde ein Einsetzen von Glykosurie definiert. Alle Inselallotransplantate bei den Kontrollmäusen wurden bis zum 34. Tag abgestoßen, wobei die durchschnittliche Abstoßungszeit 17 Tage betrug. Antikörper-behandelte Mäuse zeigten eine durchschnittliche Abstoßungs-

zeit von 34 Tagen, wobei zwei Mäuse bei Experimentende am 50. Tag keine Zeichen einer Abstoßung zeigten.

**[0122]** Tabelle 6 fasst die Ergebnisse dieses Experiments zusammen.

Tabelle 6

## Allotransplantate von Pankreasinseln bei Mäusen

Gruppen	Anzahl (n)	Überleben in Tagen	Durchschnitt
Unbehandelt	5	12, 12, 15, 24, 20	17
CD45RB mAb 0 µg iv D0, D1	11	23, 32, 20, 30, 30, > 50, > 50, 21, 23, 47, 50	34

Beispiel 14: Auslösung von Xenotransplantattoleranz im Transplantationsmodell von der Ratte zur Maus

**[0123]** Um zu ermitteln, ob ein monoklonaler Antikörper gegen CD45RB der Abstoßung xenogener Nierentransplantate vorbeugen kann, wurden an BALB/C-Mäusen mit Lewis-Ratten als Spendern orthotope Nieren-xenotransplantationen durchgeführt. Fünf Gruppen von Empfängern wurden studiert: Keine Behandlung (Kontrollen), Cyclosporin (CsA)-Behandlung (5 mg/kg täglich subkutan), Splenektomie (Spl), Cyclophosphamid (CyP)-Behandlung (20 mg/kg Körpergewicht an postoperativen Tagen 0, 2, 4 und 7), Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper MB23G2 (100 µg täglich über 11 Tage, intraperitoneal), kombinierte Behandlung mit MB23G2-Antikörpern (100 µg über 11 Tage) und CyP (20 mg/kg intravenös an postoperativen Tagen 0, 2, 4 und 7). Wie in Tabelle 7 (unten) gezeigt, hatten die mit MB23G2 und CyP behandelten Tiere eine erheblich längere Überlebenszeit als nur mit dem monoklonalen Antikörper oder mit CyP behandelte Tiere, was zeigt, dass bei Mäusen der monoklonale Antikörper CD45RB und CyP synergistisch eine Verlängerung der Überlebensrate von Nieren-Xenotransplantaten bewirken.

Tabelle 7

## Nieren-Xenotransplantation von der Ratte zur Maus

Gruppe	n	Behandlung	Überleben in Tagen	Mittlere Überlebenszeit in Tagen
Kontrolle	6	Keine	6(4), 7, 16	6
CsA	3	Cyclosporin	4, 6, 8	6
Spl	5	Splenektomie	4, 5, 6, 7, 11	6
CyP	8	Cyclophosphamid	10, 18, 23, 24, 28, 49,	26

Gruppe	n	Behandlung	Überleben in Tagen	Mittlere Überlebenszeit in Tagen
			58, > 100	
mAb	6	MB23G2	4, 6, 8, 8, 11, 13	8
mAb + CyP	9	CyP + MB23G2	9, 11, 23, 24, 70, 76, > 100(3)	70*

\* P < 0,01, Antikörpergruppe gegen Kontrollgruppe

**[0124]** Das Endziel für klinische Xenotransplantation ist es, Xenotransplantattoleranz auszulösen und dadurch fortgesetzte Verwendung toxischer, hoch dosierter Immunsuppression aufzuheben. Es wurde vor kurzem in einem Herz-Xenotransplantationsmodell vom Hamster zur Maus gezeigt, dass die Kombination der Pulstherapie mit CyP und kontinuierlicher Behandlung mit CsA verlängertes Überleben des Transplantats bewirkt. Siehe Hasan et al, Transplantation, 54, 408 (1992). Jedoch wurden nach Absetzen der Cyclosporin-Be-

handlung die Xenotransplantate innerhalb von kurzer Zeit abgestoßen, d. h., die durchschnittliche Überlebenszeit betrug weniger als drei Wochen. Somit war die Behandlung mit CyP und CsA nicht imstande, Xenotransplantattoleranz auszulösen.

**[0125]** Im Gegensatz hierzu und wie in Tabelle 7 (oben) gezeigt, überlebten Xenotransplantate in mit CD45RB-Antikörpern und CyP behandelten Tieren nach Einstellung der Immunsuppressionstherapie mehrere Monate lang. Überdies hatten bei Behandlung mit Antikörpern und CyP die langfristig überlebenden Nieren-Xenotransplantate eine normale Nierenfunktion und eine normale Pathologie bei der Tötung der Tiere am 100. Tag nach der Operation. Diese Ergebnisse zeigen, dass in einem Transplantationsmodell von der Ratte zur Maus Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD45RB und CyP funktionierende Xenotransplantattoleranz auslösen kann. Diese Behandlung kann zur Prävention gegen Transplantatabstoßung beim Menschen anwendbar sein.

Beispiel 15: In vivo-Behandlung von NOD-Mäusen zur Verhinderung des Eintretens von Diabetes

**[0126]** Fünf weibliche NOD-Mäuse wurden an den Tagen 28, 29 und 30 nach der Geburt mit 30 µg des gegen das murine CD45RB gerichteten monoklonalen Rattenantikörpers MB23G2 intravenös behandelt. Fünf Kontrollmäuse erhielten keine Antikörperbehandlung. Bis zur 27. Woche waren alle Kontrollmäuse in Folge von Diabetes tot. Von den antikörperbehandelten Mäusen starben zwei an Diabetes, während die anderen drei lebend und gesund blieben bis zur 35. Woche, zu welchem Zeitpunkt sie getötet wurden und ihre Bauchspeicheldrüsen histologisch untersucht wurden. Bei keinem der drei überlebenden Tiere war irgendein Hinweis auf Insulitis zu finden.

**[0127]** Tabelle 8 fasst die Ergebnisse dieses Experiments zusammen.

Tabelle 8

Eintreten von Diabetes in NOD-Mäusen

Gruppen	Anzahl	Überleben ohne Diabetes
Unbehandelt	5	0 (alle tot innerhalb von 27 Wochen)
CD45RB mAb 30 µg iv an Tagen 28, 29, 30	5	3 > 35 Wochen

**[0128]** Zu diesem vorläufigen Experiment wurden weitere Experimente durchgeführt. Bei diesen Experimenten umfasste die Therapie die Verabreichung von 100 µg MG23G2 zwei Mal in der Woche von der zweiten bis zur 35. Woche, zu welchem Zeitpunkt alle übrig gebliebenen Mäuse euthanasiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 (unten) dargestellt:

Tabelle 9

Überleben von NOD-Mäusen (Wochen)

Therapie	Überleben (Wochen)	Insulitis-Wert Durchschnitt*
MB23G2 (N=9)	35(6), 20(2), 13	0,99
Kontrollen (N=12)	34 (2), 30 (2), 28, 23, 18, 16, 15, 14, 13, 12	1,81

**[0129]** Insulitis-Wert wurde von sechs zusätzlichen Tieren nach 15 Wochen erhalten. Wie aus den Daten ersichtlich, überlebte eine verglichen mit den Kontrollen erheblich größere Anzahl von Tieren unbegrenzt, d. h. bis zum Ende des 35-wöchigen Experimentes. Die durch MB23G2 ausgelöste Verbesserung ist nicht nur am Überleben der Tiere erkennbar, sondern auch an den Blutzuckerspiegeln, weil keines der Tiere in der behandelten Gruppe, das bis zur 35. Woche überlebte, irgendein Zeichen von Hyperglykämie zeigte. Der positive Effekt von MB23G2 wurde auch durch den Insulitis-Wert bestätigt, bei dem es sich um eine sorgfältige histologische Überprüfung des Pankreas handelt. Der Unterschied zwischen 1,81 und 0,99 ist sowohl biologisch als

auch statistisch bedeutsam.

Beispiel 16: Prävention der Abstoßung von Hauttransplantaten

**[0130]** Vier Gruppen von A-Stamm-Mäusen (weiß) erhalten Hauttransplantate von C57BL/10-Mäusen (schwarz): Gruppen I und II erhalten vorige Behandlung mit dem gegen murines CD45RB gerichteten monoklonalen Rattenantikörper, und die Gruppen III und IV erhalten keine vorhergehende Behandlung mit einem gegen murines CD45RB gerichteten monoklonalen Rattenantikörper. Im Anschluss an die Hauttransplantationsoperation werden die Gruppen I und III mit monoklonalen Antikörpern gegen murines CD45RB an verschiedenen Tagen behandelt, während Gruppen II und IV keine weitere Antikörperbehandlung erhalten. Die Wirksamkeit der Antikörperbehandlung bei der Prävention der Abstoßung des Hauttransplantats wird durch Vergleich der Überlebenszeitlängen des schwarzen Hauttransplantats auf den weißen Empfängermäusen in den vier Gruppen bestimmt.

Beispiel 17: Lokalisierte „Graft-Versus-Host“(GvH)-Reaktion

**[0131]** In vivo-Wirksamkeit der Substanzen wird an einem geeigneten Tiermodell nachgewiesen, wie z. B. von Ford et al, Transplantation, 1, 258 (1970) beschrieben. Milzzellen ( $1 \times 10^7$ ) aus sechs Wochen alten weiblichen Mäusen werden am Tag 0 subkutan in die linke Hinterpfote von Mäusen eines anderen Stammes, die etwa 100 g wiegen, injiziert. Die Tiere werden an vier aufeinander folgenden Tagen behandelt, und am siebten Tag werden die poplitealen Lymphknoten entfernt und gewogen. Der Gewichtsunterschied zwischen den beiden Lymphknoten wird als Parameter zur Messung der Reaktion verwendet.

Beispiel 18: Arthritis durch Freund's Adjuvant

**[0132]** Die Wirksamkeit gegen experimentell ausgelöste Arthritis kann unter Verwendung des z. B. in Winter & Nuss, Arthritis & Rheumatism 9 (1966) 394; Billingham Davies, Handbook of experimental pharmacol., (Vane & Ferreira Eds, Springer-Verlag, Berlin) 50/II (1979) 108–144 beschriebenen Verfahrens gezeigt werden. Mäuse (männlich oder weiblich, 150 g Körpergewicht) erhalten an der Schwanzbasis oder in die hintere Pfote Injektionen von 0,1 ml Mineralöl, die 0,6 mg an lyophilisierten, hitzeinaktivierten *Mycobacterium smegmatis* enthalten. In dem Modell der sich entwickelnden Arthritis wird die Behandlung sofort nach der Injektion des Adjuvant begonnen (Tage 1 bis 18); in dem Modell der etablierten Arthritis wird die Behandlung am 14. Tag begonnen, wenn die sekundäre Entzündung gut entwickelt ist (Tage 14 bis 20). Am Ende des Experiments wird die Schwellung der Extremitäten mit einer Mikroschiebelehre gemessen. ED<sub>50</sub> ist die orale Dosis in mg/kg, die die Schwellung (primäre oder sekundär) auf die Hälfte der bei den Kontrollen beobachteten reduziert.

Beispiel 19: In vivo-Behandlung von NZB-Mäusen zur Verhinderung des Ausbruchs von Lupusartiger Autoimmunerkrankung

**[0133]** Mäuse des Stammes „New Zealand Black“ (NZB) sterben mit umfangreichen und verschiedenartigen Symptomen hämolytischer Anämie, Glomerulonephritis und Vaskulitis, alle sehr ähnlich dem menschlichen systemischen Lupus erythematosus (SLE). Die Wirksamkeit der vorliegenden Erfahrung bei der Behandlung von SLE wird im Mäusemodell bestimmt, in dem neugeborene NZB-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt mit dem gegen das murine CD45RB gerichteten monoklonalen Rattenantikörper MB23G2 behandelt werden und man dann behandelte und unbehandelte Mäuse auf den Ausbruch der Autoimmunerkrankung hin untersucht, insbesondere auf Glomerulonephritis, was auch ein hervorstechendes Charakteristikum menschlichen SLEs ist.

Beispiel 20: in vitro-Bestimmung der immunmodulatorischen Wirkung von CD45-Reagenzien

**[0134]** Die Fähigkeit von gegen menschlichen CD45-Antikörpern, die Aktivierung menschlicher T-Zellen zu unterdrücken, wurde gemäß der folgenden Methode in vitro untersucht.

**[0135]** Aus dem Blut freiwilliger Probanden wurden durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation mononukleare Zellen isoliert. Die Zellen wurden über Zeiträume von ein bis vier Tagen hinweg in RPM11640 mit 10 % FCS mit OKT3 oder einem nicht-reaktiven Kontrollantikörper stimuliert. Die prozentualen Anteile von CD3-, CD4- und CD8-Zellen, die als Marker der frühen Aktivierung CD69-positiv und als Marker der späten Aktivierung CD25-positiv waren, wurden durch FACS-Scan-Analyse bestimmt (Poppema et al, Leukemia and Lymphoma, 20, 217 (1996). Die Wirkungen von Antikörpern gegen CD45 und CD45R wurden gemessen, indem diese Substanzen einzeln oder als Gemisch zugesetzt wurden. Western-Blots der Zelllysate wurden mit

den Antikörper 4G10 gegen phosphoryliertes Tyrosin gefärbt, um die mögliche Rolle der Dephosphorylierung als Ergebnis der Tyrosinphosphataseaktivität von CD45 zu untersuchen (June et al, J. Immunol., 144, 1591 (1990)).

**[0136]** Wie in Tabelle 13 (unten) gezeigt, verursachte OKT3 Expression von CD25 auf etwa 70 % der T-Zellen am vierten Tag, während Kontakt mit einem nicht-reaktiven Kontrollantikörper zu etwa 10 % CD25-Expression führte. Keiner der Antikörper gegen CD45R alleine führte zu T-Zell-Aktivierung. Die Ergebnisse der Koinkubation der CD45R-Antikörper mit OKT3-stimulierten peripheren mononuklearen Zellen sind in [Fig. 5](#) zusammengefasst. Die vier getesteten CD45RA-Reagenzien hatten keine Wirkung oder führten zu leichter Stimulation. Von den vier getesteten CD45RB-Reagenzien ergaben zwei (6B6, 6G3) erhebliche Hemmung, während die anderen beiden (MT3, PD7) nur minimale Effekte auslösten. Von den drei getesteten CD45R0-Reagenzien ergab eines (UCHL1) signifikante Hemmung, während die anderen beiden (A6, OPD4) erheblich geringere Hemmung zeigten. Von den vier getesteten CD45-Reagenzien hatte eines (4C9) keinen Effekt, zwei (4D11, 2G1) ergaben Hemmung und eines (4F9) führte zu einer Stimulation, die deutlich über der Wirkung von OKT3 alleine lag.

Tabelle 10

## Korrelation zwischen Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung

Antikörper	% CD25	Tyrosinphosphorylierung 110-kDA-Bande
OKT3 + Kontrollantikörper	70 %	Ja
OKT3 + Kontrollantikörper 6B6 (RB)	45 %	Nein
OKT3 + Kontrollantikörper 6G3 (RB)	45 %	Nein
OKT3 + Kontrollantikörper MT3 (RB)	65 %	Ja (etwas schwächer)
OKT3 + Kontrollantikörper PD7 (RB)	70 %	Ja

**[0137]** Die Expression von CD25 und CD69 wurde auch nach Einschränkung der Analyse auf CD4- oder CD8-positive T-Zellen analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das anti-CD45RB-Reagenz 6G3 auf CD8-Zellen einen erheblich stärkeren inhibitorischen Effekt ausübt als auf CD4-Zellen. Siehe [Fig. 6](#). Kombinationen von Reagenzien wurden ebenfalls gezeigt und sind in [Fig. 7](#) dargestellt, wobei eindeutig Synergismus eines Gemischs aus CD45, CD45RB und CD45R0 gefunden wurde, was das Niveau der CD45-Expression auf ein von dem der unstimulierten Kontrollen nicht signifikant verschiedenes Maß senkte.

**[0138]** Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass für CD45R spezifische Antikörper die CD3-vermittelte T-Zell-Aktivierung *in vitro* modulieren können. Die Ergebnisse von Antikörperkombinationen zeigen, dass möglicherweise verschiedene Mechanismen zu dem gemessenen Effekt beitragen.

**[0139]** Der Befund, dass einige, aber nicht alle anti-CD45RB-Antikörper die T-Zell-Aktivierung behindern, ist in Übereinstimmung mit dem Befund, dass ein CD45RB-spezifischer Antikörper das Überleben von Nierenallograften in Mäusemodellen verlängert, während ein anderer dies nicht tut. Siehe Beispiel 5. Der vorherrschende inhibitorische Effekt der CD45RB-Antikörper auf CD8-Zellen ist in Übereinstimmung mit der Feststellung, dass der hauptsächlichste immunophenotypische Befund bei den erfolgreich behandelten Mäusen eine Verringerung der CD8-Zellen in den Allograft ist.

**[0140]** Somit zeigt Analyse der CD25-Expression von *in vitro* durch CD3 stimulierten T-Zellen aus peripherem Blut die immunmodulatorische Aktivität von Antikörpern gegen CD45R. Ein Gemisch von Antikörpern gegen menschliches CD45R ist *in vitro* ein starker Inhibitor der T-Zell-Aktivierung und kann für die Prävention und Umkehrung von Allograftabstoßung gut geeignet sein.

Beispiel 21: Der gegen CD45RB gerichtete monoklonale Antikörper MB23G2 kann der Entwicklung von EAE bei mit MBP immunisierten NZW-Mäusen vorbeugen

A. Material und Methoden

1. Tiere:

**[0141]** NZW-Mäuse (6–8 Wochen alt) und B6.SJL-Mäuse wurden von Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, erhalten.

2. Antikörper:

**[0142]** Der gereinigte monoklonale Antikörper MB23G2 (HB220) gegen CD45RB wurde verwendet (ATCC, Rockville, Maryland). Monoklonales Ratten-IgG wurde von Jackson Research Laboratories, Bar Harbor, Maine, erhalten.

3. Herstellung von bovinem MBP:

**[0143]** Rinderrückenmarksgewebe (Pel-Freeze, Inc., Rogers, AR) wurde homogenisiert und in einem 2:1-Ge- misch von Chloroform und Methanol entfettet. Der feste Rückstand wurde eine Stunde lang bei pH 3,0 extra- hiert, und das Extrakt wurde auf mit 6 M Harnstoff, 0,08 M Glycin, pH 10,4 äquilibriertem CM-52 chromatogra- phiert. Das Eluat wurde über Nacht unter Verwendung einer 6000–8000 M Schlauchmaterials in 0,1-molare Essigsäure dialysiert. Es wurde dann lyophilisiert und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, um es auf Reinheit zu überprüfen.

4. Auslösung von EAE:

**[0144]** Die Mäuse wurden subkutan mit emulgiertem Rinder-MBP (100 µl) in komplettem Freund's Adjuvant (CFA) plus H37 Ra (4 mg/ml) immunisiert. Es wurden an den Tagen 0 und 10 nach der Immunisierung intraperitoneal 500 ng Pertussistoxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA) injiziert. Bis zum 10. bis 14. Tag nach der Immunisierung entwickelten die Mäuse EAE-Symptome. Der klinische Schweregrad wurde anhand einer Skala bestimmt, bei der 0 normal ist; 1 verringerte Schwanzspannung; 2 Schwanzlähmung; 3 Paraparese; 4 Paraplegie; 5 Sterben/Tod. Das Schweregradsystem wurde auf der Basis der Anzahl der Tiere multipli- ziert mit dem klinischen Schweregrad jedes Tieres entwickelt.

5. Behandlung mit Antikörpern gegen CD45RB:

**[0145]** Den Mäusen wurden 40 µg Antikörper gegen CD45RB oder polyklonales Ratten-Immunglobulin (Jack- son Research Laboratories, Bar Harbor, Maine) als Kontrolle in einem Gesamtvolumen von 100 µl an den Ta- gen 0 und 5 nach der Immunisierung intraperitoneal injiziert.

6. Proliferationsmessungen:

**[0146]** Für Vβ8- und CD3-spezifische Stimulationen wurden Mikrotiterplatten mit 50 µg/ml an gereinigtem an- ti-Vβ8 bzw. anti-CD3 beschichtet. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und vor der Zugabe von Milzzellen drei Mal mit steriles PBS gewaschen. Die Milzzellen wurden aus EAE-positiven (kontrollbehandel- ten) und EAE-negativen (anti-CD45RB-behandelten) Mäusen erhalten. Die Zellen wurden zur Entfernung von Erythrozyten 5 min lang bei RT einer Lösung von 0,84 % Ammoniumchlorid ausgesetzt, dann drei Mal mit ste- rilem PBS gewaschen und mit einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Napf ausplatiert. Die Zellen wurden auch mit optimalen Konzentrationen von PMA/Ionomycin stimuliert. Am zweiten Tag nach der Inkubation wurden die kul- tivierten Zellen 18 Stunden lang mit 1 µCi (37 kBq) [Methyl-<sup>3</sup>H]thymidin gepulst, dann mit einem PHD-Zell-Har- vester (Cambridge Technology, Cambridge, MA) geerntet.

7. TNF-α-ELISA:

**[0147]** Überstände von PMA/Ionomycin-, anti-CD3-, anti-Vβ8- und Con-A-stimulierten Zellen wurden gesam- melt. Kits für TNF-α-ELISA wurden von Genzyme Immunologicals, Cambridge, MA, erworben. Die TNF-α-Kon- zentrationen wurden anhand einer Eichkurve, die von einer seriellen Verdünnung der mitgelieferten Positivkon- trolle abgeleitet wurde, bestimmt. Proben wurden doppelt gemessen.

## 8. Durchflusscytometrie:

**[0148]** Lymphknoten der Kontrolltiere und behandelten Tiere wurden gesammelt und gepoolt. Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt, und Erythrozyten wurden mit 0,84 % in Ammoniumchlorid lysiert. Zellen wurden zwei Mal in PBS gewaschen, dann gezählt, und  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 96-Napf-Mikrotiterplatten zur Färbung plaziert. Sättigende Mengen der passenden Antikörper (mit Phykoerythrin (PE) direkt konjugiertes VLA-4, biotinyliertes LFA-1, und biotinyliertes ICAM-I, alle von Pharmingen, San Diego, CA, erhalten) wurden hinzugefügt. Der zweite Schritt bestand darin, wo notwendig mit PE-konjugiertem Streptavidin (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) zu inkubieren. Die Zellen wurden dann drei Mal in PBS gewaschen und mit einem gleichen Volumen 2%igem Paraformaldehyd fixiert. Die Durchflusscytometrie wurde unter Verwendung von PC Lysis-Software auf einem FACS-Scan-Durchflusscytometer (Becton Dickinson, Palo Alto, CA) durchgeführt. Tote Zellen wurden anhand von „forward scatter“ und „side scatter“ ausgeschlossen. Die Daten wurden unter Verwendung von Lysis II-Software analysiert.

## 9. ELISA für Gesamt-IgE:

**[0149]** Das gesamte Serum-IgE wurde unter Verwendung eines Sandwich-ELISA bestimmt. Zur Herstellung der Festphase wurde EM95.3 (monoklonale Rattenantikörper gegen murines IgE, zur Bindung verwendet (M. Baniyash et al, Eur. J. Immunol., 14, 799 (1984)) in boratgepuffertem Kochsalzpuffer (BBS; 25 mM Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>7</sub> × 10 H<sub>2</sub>O, 75 mM NaCl, 100 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8,4) auf 3 mg/ml verdünnt. Immolon®2-Mikrotiterplatten (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) wurden mit 100 µl dieser Lösung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Mikrotiterplatten jeweils drei Mal mit BBS, das 0,05 % Tween 20 enthielt, gewaschen. Alle Inkubationen fanden eine Stunden lang bei Zimmertemperatur statt, sofern nicht anders angegeben. Seren wurden in BBT (BBS ergänzt um 0,5 % BSA und 0,4 % Tween 80) auf 1:40 bis 1:200 verdünnt. Biotinyliertes B1E3 (zur Detektion verwendeter Rattenantikörper gegen murines IgE) wurde als zweiter Antikörper hinzugegeben. Das Nachweissystem bestand aus ExtrAvidin®-alkalischer Phosphatase und Sigma 104®-Phosphatasesubstrat (r-Nitrophenylphosphat, Dinatriumhexahydrat) als Substrat. Der Substratumsatz wurde anhand des Unterschiedes der OD<sub>405</sub> bestimmt, der Gesamtgehalt des Serums an IgE in gleichwertigen Verdünnungsfaktoren standardisierter B6.SJL-Bezugsseren bestimmt. Hierbei gilt die Formel:

$$\text{EDF} = (\text{Verdünnung eines Standardbezugsserums, das die gleiche OD wie das Testserum ergibt}) \times 10^4$$

## 10. Indirekte Immunofluoreszenz:

**[0150]** Mäuseseren wurden auf die Gegenwart von IgG-ANA durch indirekte Immunofluoreszenz unter Verwendung kommerziell erhältlicher Gefrierschnitte von Mäusenieren (Sanofi, Chaska, MN) untersucht. Die Schnitte wurden 30 min lang bei RT mit in PBS verdünnten Seren inkubiert. Ungebundenes Serum wurde durch drei weitere Waschungen mit PBS entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 30 min lang bei Zimmertemperatur mit 50 µl von 1:50 in PBS verdünntem FITC-konjugierten, gegen Mäuseproteine gerichtetem Ziegen-IgG (spezifisch für das Fc-Fragment, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) inkubiert. Der ungebundene Sekundärantikörper wurde entfernt, indem jeder Napf drei Mal mit PBS gewaschen wurde. Die Zellen wurden unter Fluoreszenzbeleuchtung untersucht, indem die 96-Napf-Platte auf dem Mikroskopisch invertiert wurde (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY). Antinukleoläre Färbung wurde durch eine intensive homogene Färbung der Nukleoli nachgewiesen.

## 11. Statistische Auswertung:

**[0151]** Statistische Auswertungen wurden unter Verwendung von SigmaStat-Statistiksoftware (Jandel Scientific, San Rafael, CA) durchgeführt. Für alle paarweisen Vergleiche wurde Students t-Test verwendet. Für die Analyse von ANA-Titern wurde ein Rangsummentest nach Mann-Whitney verwendet.

## B. Resultate

## 1. Klinische Wirkung von anti-CD45RB-Antikörpern auf den Verlauf der EAE:

**[0152]** Die Fähigkeit von anti-CD45RB, die Entwicklung von EAE bei mit MBP immunisierten NZW-Mäusen zu verhindern, wurde als erstes untersucht. Wie in Tabelle 11 gezeigt, entwickelten an den Tagen 0 und 5 mit anti-CD45RB behandelte Mäuse mit einer Ausnahme niemals EAE.

Tabelle 11

	EAE(+)	EAE(-)	Wert
<b>Experiment 1</b>			
Kontrolle	7	0	29/35
Behandelt	0	6	0/30
<b>Experiment 2</b>			
Kontrolle	6	3	20/45
Behandelt	1	9	2/50
<b>Experiment 3</b>			
Kontrolle	4	2	11/30
Behandelt	0	5	0/0

**[0153]** In der behandelten Gruppe entwickelte nur eine von 21 Mäusen die Krankheit, verglichen mit 17 von 22 in der mit Kontrollantikörpern behandelten Gruppe. Eine Untersuchung des Zentralnervensystems zeigte bei den behandelten Tieren keine Lymphozyteninfiltrate (zwei Tiere aus jeder Gruppe wurden untersucht). Die Kontrollgruppe zeigte jedoch erhebliche Schäden im Zentralnervensystem. Somit war Behandlung mit anti-CD45RB zum Zeitpunkt der Immunisierung mit MBP imstande, die Entwicklung von EAE zu verhindern.

2. Behandlung mit anti-CD45RB verändert das Proliferationsvermögen von T-Zellen:

**[0154]** Um die Mechanismen zu untersuchen, durch die anti-CD45RB EAE unterdrückt, wurde die Fähigkeit von anti-CD45RB, Anzahl und Funktion der Zellen zu beeinflussen, untersucht. Zuerst wurde die Gesamtzahl der in den Milzen von behandelten und Kontrolltieren vorhandenen Zellen bestimmt, ebenso die Gesamtzahl der T-Zellen in den Lymphknoten am 5. und 10. Tag nach der Behandlung. Eine durchgängige Verringerung der Zellzahlen wurde zwischen den behandelten und Kontrolltieren gefunden.

**[0155]** Das Proliferationsvermögen der T-Zellen bei behandelten Mäusen wurde als nächstes untersucht. T-Zellen wurden aus den Lymphknoten von CD45RB- und Kontrollbehandelten Tieren isoliert und auf ihre Fähigkeit, in Reaktion auf Stimulation durch PMA/Ionomycin, anti-CD3, anti-V $\beta$ 8 und Con A in vitro zu proliferieren, untersucht. Wie in [Abb. 8](#) gezeigt, verringerte Behandlung mit anti-CD45RB in vivo erheblich das Proliferationsvermögen isolierter T-Zellen als Reaktion auf alle Arten von Stimulation in vitro am 5. Tag nach der Verabreichung von MBP (ebenfalls fünf Tage nach der ersten Dosis anti-CD45RB). Überraschenderweise war am 10. Tag (zehn Tage nach MBP, aber fünf Tage nach der zweiten Dosis anti-CD45RB) die Proliferation der Lymphknoten-T-Zellen in behandelten Mäusen gegenüber Kontrollmäusen tatsächlich erhöht ([Fig. 9](#)). Nichtsdestoweniger erkrankte kein Tier, auch nicht bei Beobachtung über mehrere Wochen hinweg. Somit wurde kein Hinweis auf klinische EAE beobachtet, obwohl die T-Zell-Funktion bis zum 10. Tag zurückzukehren schien. Obwohl B-Zellen keine primäre Rolle bei der Entwicklung von EAE zu spielen scheinen, wurde gefunden, dass Behandlung mit anti-CD45RB die Fähigkeit von B-Zellen, auf Aktivierung mit Lipopolysaccharid (LPS) zu reagieren, verringert (nicht gezeigt). Somit scheint anti-CD45RB einen erheblichen Einfluss auf die Fähigkeit von T-Zellen, auf eine Reihe aktivierender Signale zu reagieren, zu haben. Dies stimmt mit den beschriebenen Effekten von CD45 auf T-Zellaktivierung überein. Doch wurde in diesem Modell keine konsistente Wirkung des Antikörpers auf die Zellzahl demonstriert.

**[0156]** Somit ist ersichtlich, dass erfindungsgemäß Verwendungen und pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt worden sind, die Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Empfängern von Organtransplantaten erheblich nützen werden.

#### Patentansprüche

1. Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an ein CD45R0-Epitop des CD45R0-Isotyps des Leukozytenantigens bindet, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prävention einer Zell-, Gewebe- oder Organtransplantatabstoßung über die Hemmung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort im Empfänger.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Zell-, Gewebe- oder Organtransplantat allogen zum Empfänger ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Zell-, Gewebe- oder Organtransplantat xenogen zum Empfänger ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Antikörper vor der Transplantation der Zelle, des Gewebes oder des Organs verwendet wird.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Antikörper nach der Transplantation der Zelle, des Gewebes oder des Organs verwendet wird.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Antikörper gleichzeitig mit der Transplantation der Zelle, des Gewebes oder des Organs verwendet wird.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die des Weiteren die Verwendung wenigstens eines entzündungshemmenden oder immunsuppressiven Wirkstoffs beinhaltet.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei der entzündungshemmende oder immunsuppressive Wirkstoff ausgewählt ist unter Cyclosporin, Cyclophosphamid, FK-506, Rapamycin, Cortikosteroiden, Mycophenolat-mofetil, Leflunomid, Antilymphozyten-Globulin, Desoxyspergualin und OKT-3.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei es sich bei dem Gewebe um Pankreasinseln oder Gefäßgewebe handelt.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Organ eine Niere, ein Herz oder eine Leber ist.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Zellen hämatopoetische Zellen sind.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 9 bis 10, wobei der Empfänger ein Mensch ist.
13. Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an ein CD45R0-Epitop des CD45R0-Isotyps des Leukozytenantigens bindet, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Autoimmunerkrankung über die Hemmung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Autoimmunerkrankung eine entzündliche Darmerkrankung, Multiple Sklerose, Diabetes vom Typ I, systemischer Lupus erythematoses oder Rheumatoide Arthritis ist.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, die des Weiteren einen Antikörper, der an ein CD45RB-Epitop des CD45RB-Isotyps des Leukozytenantigens spezifisch bindet, einen Antikörper, der an ein CD45RA-Epitop des CD45RA-Isotyps des Leukozytenantigens spezifisch bindet, einen Antikörper, der an ein CD45RC-Epitop des CD45RC-Isotyps des Leukozytenantigens spezifisch bindet, oder ein Gemisch davon beinhaltet.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei in dem Empfänger des allogenen oder xenogenen Organ-, Gewebe- oder Zelltransplantats eine Immuntoleranz induziert wird.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der Empfänger sequenzielle Organ-, Gewebe- oder Zelltransplantate erhält.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper, ein antigenbildendes Fragment davon, oder ein Gemisch davon ist.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei das Medikament für die Verabreichung mit einer Lymphozytenmenge aus dem Empfänger, die dem Antikörper zuvor ex vivo ausgesetzt worden ist, geeignet ist.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Lymphozyten für die Verabreichung in Kombination mit dem Antikörper geeignet sind.

21. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Antikörper, der an ein CD45R0-Epitop des CD45R0-Isotyps des Leukozytenantigens spezifisch bindet, in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Vehikel.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21, die des Weiteren eine Lymphozytenmenge, die aus dem zum Empfang der Zusammensetzungen vorgesehenen Säuger stammen, beinhaltet.

23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21 oder 22, die des Weiteren einen wie in Anspruch 15 definierten Antikörper oder eine wie in Anspruch 19 definierte Lymphozytenmenge beinhaltet.

24. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21 oder 22, wobei der Antikörper wie in Anspruch 18 definiert ist.

25. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 21 bis 24 zur Behandlung einer wie in Anspruch 13 oder 14 definierten Autoimmunerkrankung oder zur Behandlung oder Prävention einer Zell-, Gewebe- oder Organtransplantatabstoßung über die Hemmung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort im Empfänger, wie in einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 9 bis 12 definiert.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

FIG. I

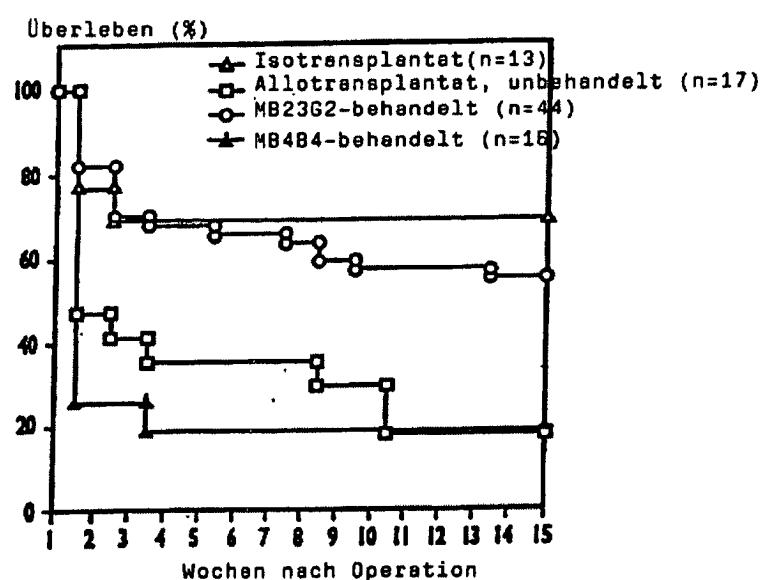
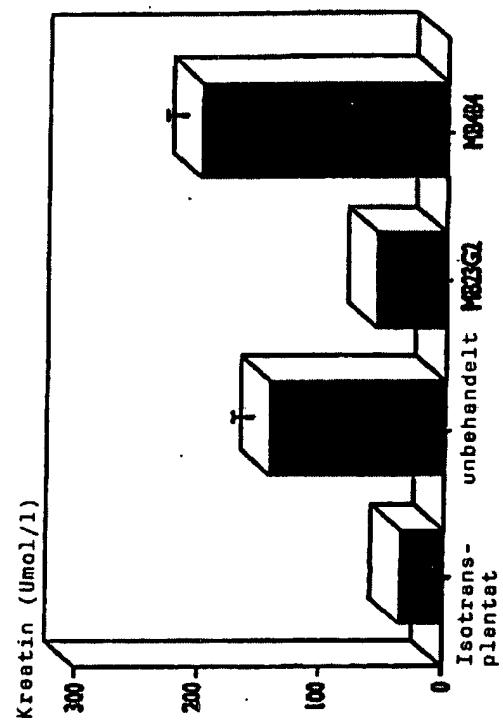
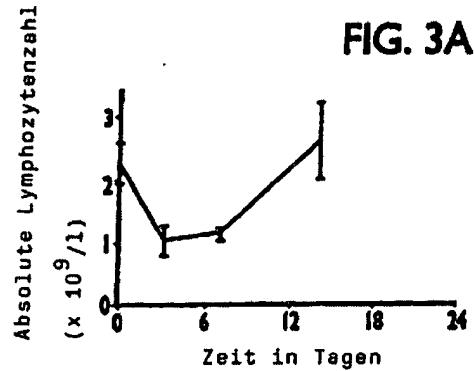


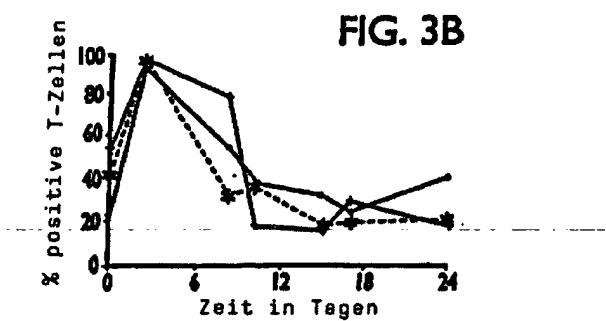
FIG. 2



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIG. 3C**

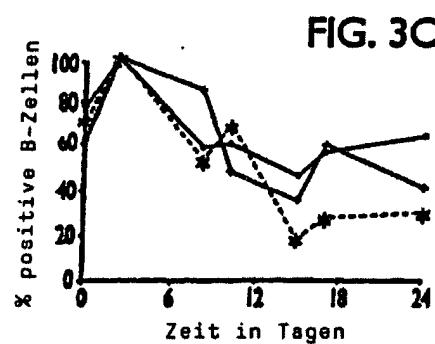
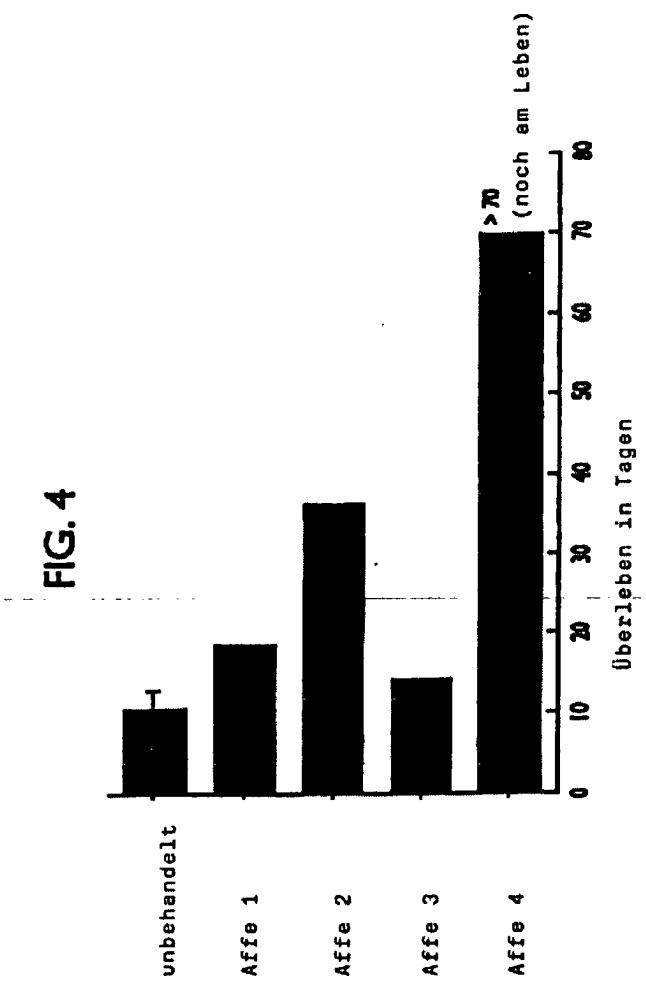
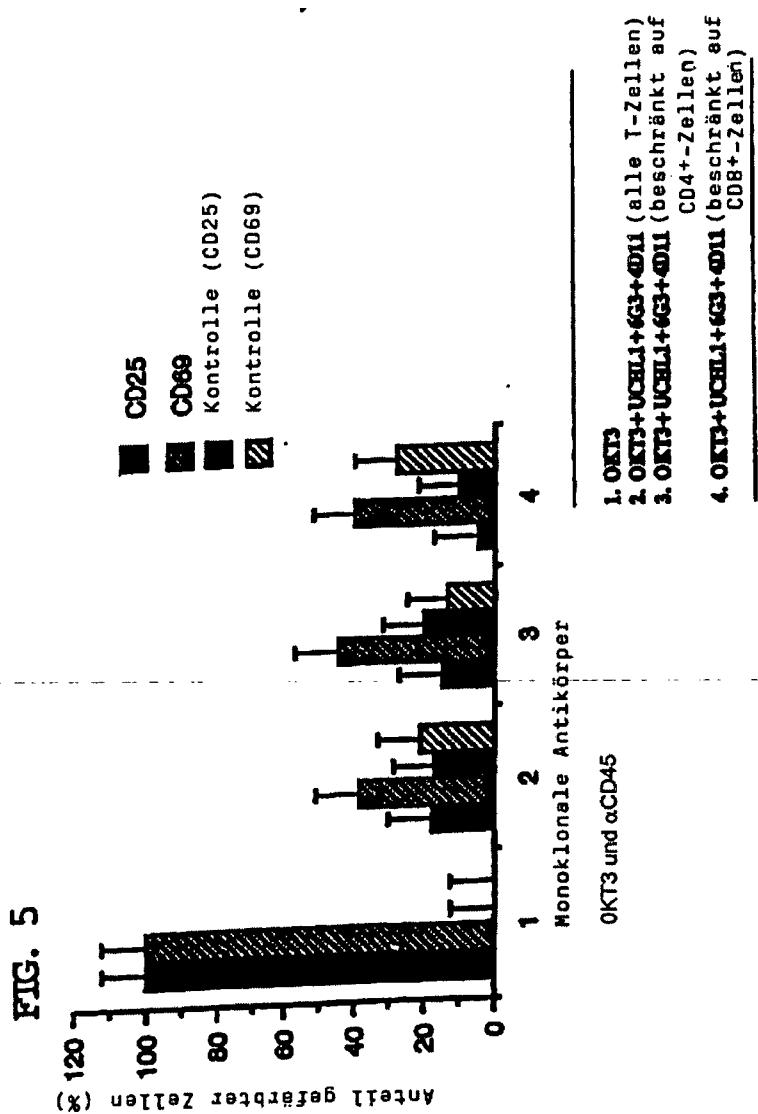


FIG. 4





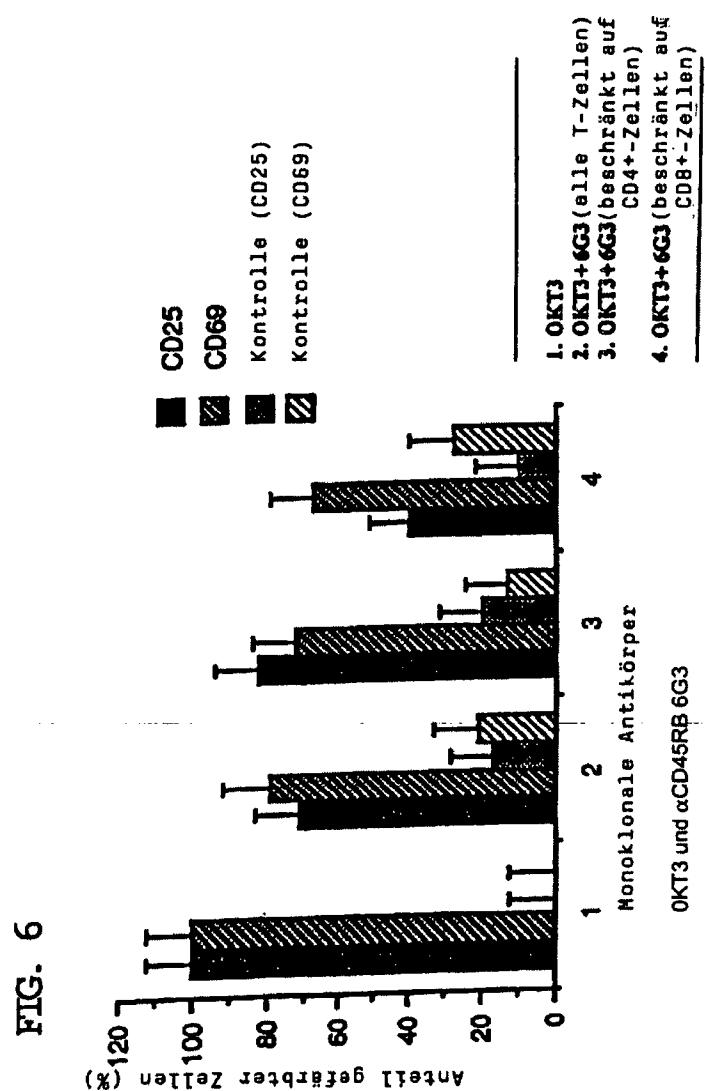


FIG. 7

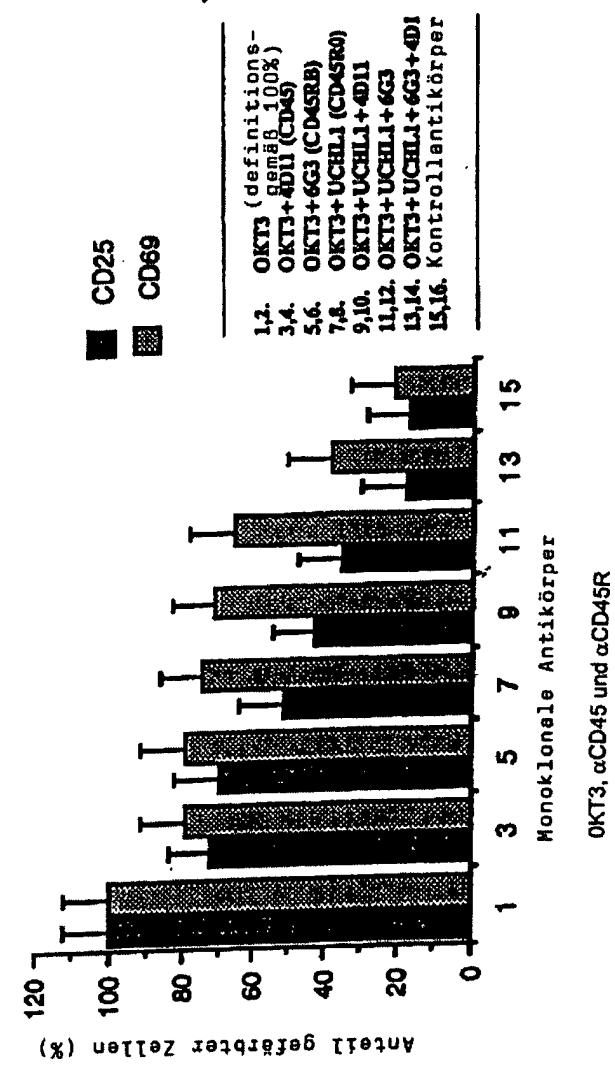


FIG. 8

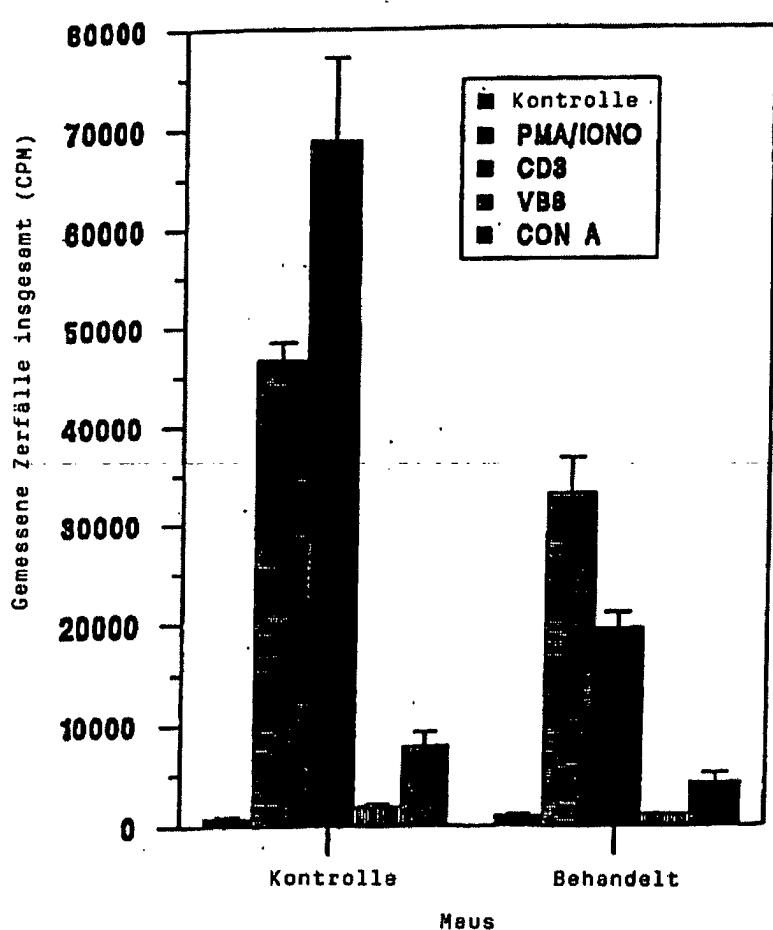


FIG. 9

