



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 319787

(13) B1

(51) Int Cl⁷

A 61 K 39/00, 39/395

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19964440	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.04.25 PCT/US95/04832
(22)	Inng.dag	1996.10.18	(85)	Videreføringsdag	1996.10.18
(24)	Løpedag	1995.04.25	(30)	Prioritet	1994.04.25, US, 234987
(41)	Alm.tilgj	1996.12.23			
(45)	Meddelt	2005.09.12			
(73)	Innehaver	Trustees of Dartmouth College, 6210 Raven House, NH03755 HANOVER, US University of Massachusetts Medical Center, 55 Lake Avenue North, Worcester, MA 01655, US			
(72)	Oppfinner	Randolph J. Noelle, R R 3, Box 257, NH03745 CORNISH, US Fiona H Durie, 1731 NW 58th #101, WA98107 SEATTLE, US David C Parker, 1953 SE 20th Avenue, OR97214 PORTLAND, US Michael C Appel, 2204 Foothills Drive South, CO80401 GOLDEN, US Nancy E. Philips, Shrewsbury, MA, US John P Mordes, 80 Devonshire Road, MA02168 NEWTON, US Dale L. Grenier, Hubbardston, MA, US Aldo A. Rossini, 62 Rambling Raod, MA01776 SUDBURY, US			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Måjorstua, 0306 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Anvendelse av allogenisk eller xenogenisk celle som vekselvirker med en gp39-antagonist ved fremstilling av et preparat til induksjon av T-celle-toleranse hos et vevs- eller organ-transplantat.			
(56)	Anførte publikasjoner	NO-A 19960862			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives fremgangsmåter for å inducere T-celletoleranse for et vevs- eller organtransplantat hos en transplantatmottaker. Fremgangsmåtene omfatter å administrere til en transplantatmottaker: 1) en allogeneisk eller xenogeneisk celle som uttrykker minst ett donorantigen og som har en ligand på celleoverflaten som vekselvirker med en receptor på overflaten av en mottaker-T-celle som medierer berøringsavhengig hjelperutløsningsfunksjon og 2) en antagonist av receptoren, som hemmer vekselvirkning mellom liganden og receptoren. I en foretrukken utførelsesform er den allogeneiske eller xenogeneiske, celle en B-celle, fortrinnsvis en hvilende B-celle, og molekylet på overflaten av T-cellen som medierer berøringsavhengig hjelper-utløsningsfunksjon, er gp39. En foretrukken gp39-antagonist er et anti-gp39-antistoff. Den allogeneiske eller xenogeneiske celle og gp39-antagonisten administreres vanligvis til en transplantatmottaker før transplantasjonen av vevet eller organet. Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen kan anvendes for å inducere T-celletoleranse for transplantater såsom lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, neuronalvev, mage og tarm. Det beskrives også en fremgangsmåte ved behandling av diabetes, omfattende å administrere til en pasient allogeneiske eller xenogeneiske celler som uttrykker donor-antigener, en gp39-antagonist og Langerhans øyer.

For å indusere antigenspesifikk T-celleaktivering og klonal ekspansjon, må to signaler som gis fra antigenleverende celler (APC), leveres til overflaten av hvilende T-lymfocytter (Jenkins, M. og Schwartz, R. (1987), *J. Exp. Med.* 5 165, 302-319; Mueller, D.L. et al. (1990), *J. Immunol.* 144, 3701-3709; Williams, I.R. og Unanue, E.R. (1990), *J. Immunol.* 145, 85-93). Det første signal, som gir spesifisitet til immunresponsen, medieres via T-cellereseptoren (TCR) etter gjenkjennelse av fremmed antigen peptid som over- 10 bringes i sammenheng med vevstypekomplekset ("major histocompatibility complex", MHC). Det andre signal omtales som ko-stimulering og induserer T-cellene til å formere seg og bli funksjonelle (Schwartz, R.H. (1990), *Science* 248, 1349-1356). Ko-stimuleringen er verken antigenspesifikk eller 15 begrenset til MHC, og anses levert av ett eller flere særskilte celleoverflatemolekyler som uttrykkes av APC (Jenkins, M.K. et al. (1988), *J. Immunol.* 140, 3324-3330; Linsley, P.S. et al. (1991), *J. Exp. Med.* 173, 721-730; Gimmi, C.D. et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 20 6575-6579; Young, J.W. et al. (1992), *J. Clin. Invest.* 90, 229-237; Koulova, L. et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 759-762; Reiser, H. et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 271-275; van-Seventer, G.A. et al. (1990), *J. Immunol.* 144, 4579-4586; LaSalle, J.M. et al. (1991), *J. Immunol.* 25 147, 774-780; Dustin, M.I. et al. (1989), *J. Exp. Med.* 169, 503; Armitage, R.J. et al. (1992), *Nature* 357, 80-82; Liu, Y. et al. (1992), *J. Exp. Med.* 175, 437-445). En ko-stimulerende rute som er forbundet med T-celleaktiveringen, omfatter molekylet CD28 på overflaten av T-cellene. Dette 30 molekyl kan motta et ko-stimulerende signal som leveres av en ligand på B-celler eller andre APC. Ligander for CD28 omfatter medlemmer av B7-familien av B-lymfocytaktiveringsantigener, så som B7-1 og/eller B7-2 (Freedman, A.S. et al. (1987), *J. Immunol.* 137, 3260-3267; Freeman, G.J. et al. (1989), *J. Immunol.* 143, 2714-2722; Freeman, G.J. et al. (1991), *J. Exp. Med.* 174, 625-631; Freeman, G.J. et al. (1993), *Science* 262, 909-911; Azuma, M. et al. (1993), 35 *Nature* 366, 76-79; Freeman, G.J. et al. (1993), *J. Exp.*

Med. 178, 2185-2192). B7-1 og B7-2 er også ligander for et annet molekyl, CTLA4, som forekommer på overflaten av aktiverede T-celler, men det er uklart hvilken rolle CTLA4 spiller i ko-stimuleringen.

- 5 Leveringen av et antigenspesifikt signal med et ko-stimulerende signal til en T-celle fører til T-celleaktivering, hvilket kan omfatte både T-celleformering og cytokinutsondring. I motsetning til dette anses levering av et antigenspesifikt signal uten noe ko-stimulerende signal, å indu-
10 sere en tilstand av ikke-mottakelighet eller anergi i T-cellen, hvorved det induseres en antigenspesifikk toleranse i T-cellen.

Vekselvirkninger mellom T-celler og B-celler spiller en sentral rolle innen immunresponsene. Induksjon av humoral
15 immunitet mot thymusavhengige antigener, krever "hjelp" av T-hjelperne (heretter nevnt Th-celler). Mens noe av hjelpen som gis B-lymfocytene, medieres av løselige molekyler som frigis av Th-celler (for eksempel lymfokiner, så som IL-4 og IL-5), krever aktiveringen av B-cellene også en berøringsavhengig vekselvirkning mellom B-celler og Th-celler
20 (Hirohata et al., *J. Immunol.* 140:3736-3744 (1988); Bartlett et al., *J. Immunol.* 143:1745-1754 (1989)). Dette tyder på at B-celleaktiveringen omfatter en obligatorisk vekselvirkning mellom overflatemolekylene på B-cellene og Th-cellene. Molekylet eller molekylene på T-cellen medierer
25 således berøringsavhengige hjelperutløsningsfunksjoner i T-cellen. En berøringsavhengig vekselvirkning mellom molekylene på B-cellene og T-cellene støttes ytterligere av observasjonen at isolerte plasmamembraner av aktiverte T-celler kan gi hjelperfunksjoner som er nødvendige for B-celleaktivering (Brian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:564-568 (1988); Hodgkin et al., *J. Immunol.* 145:2025-2034 (1990); Noelle et al., *J. Immunol.* 146:1118-1124 (1991)).

35 Det er blitt identifisert et molekyl, CD40, på overflaten av umodne og modne B-lymfocytter, hvilket molekyl, når det

kryssforbindes med antistoffer, induserer B-celleformering (Valle et al., *Eur. J. Immunol.* 19:1463-1467 (1989); Gordon et al., *J. Immunol.* 140:1425-1430 (1988); Gruber et al., *J. Immunol.* 142:4144-4152 (1989)). CD40 er blitt molekylært klonet og karakterisert (Stamenkovic et al., *EMBO J.* 8:1403-1410 (1989)). En ligand for CD40, gp39 (også benevnt CD40-ligand eller CD40L), er også blitt molekylært klonet og karakterisert (Armitage et al., *Nature* 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.* 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.* 11:4313-4319 (1992)). gp39-Proteinet uttrykkes på aktiverte, men ikke på hvilende, CD4⁺-Th-celler (Spriggs et al., *J. Exp. Med.* 176:1543-1550 (1992); Lane et al., *Eur. J. Immunol.* 22:2573-2578 (1992); Roy et al., *J. Immunol.* 151:1-14 (1993)). Celler som er transfektert med gp39-genet og uttrykker gp39-proteinet på sin overflate, kan utløse B-celleformering og kan sammen med andre stimulerende signaler indusere antistoffproduksjon (Armitage et al., *Nature* 357:80-82 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.* 11:4313-4319 (1992)).

20 Sammenfatning av oppfinnelsen

Celleoverflatemolekyler som medierer kontaktavhengige hjelperutløsningsfunksjoner av T-celler, er viktige for å indusere immunresponser som trenger hjelp fra T-celler. For eksempel spiller vekselvirkningen mellom gp39 på T-celler og CD40 på B-celler en sentral rolle ved aktivering av B-celleresponser til et antigen. Foreliggende oppfinnelse baserer seg i det minste delvis på oppdagelsen at celleoverflatemolekyler som medierer berøringsavhengige hjelperutløsningsfunksjoner i T-celler, også spiller en sentral rolle i T-cellers respons til alloantigener. Nærmere bestemt ble det oppdaget at forstyrning av vekselvirkningen mellom gp39 og en ligand på en allogeneisk celle som leverer alloantigener til T-cellen, under egnede betingelser kan indusere toleranse i T-cellen. Fortrinnsvis krever den allogeneiske celle som leverer alloantigener til T-cellen, en vekselvirkning mellom en gp39-ligand på cellen og gp39

på T-cellen for å kunne gi de nødvendige signaler for aktivering av T-cellen. Hemming av vekselvirkningen av gp39-liganden på den allogeneiske celle med gp39 på T-cellen, hindrer T-celleaktiveringen og induserer istedenfor alloantigen-spesifikk T-celletoleranse. Induksjon av T-celletoleranse for alloantigener som beskrevet heri, kan anvendes som en forberedende behandling ved vevs- eller organtransplantasjon.

Følgelig er anvendelsen som angitt i krav 1 spesielt nyttig for å indusere T-celletoleranse for et donorvev eller -organ i mottakeren av vevet eller organet. Anvendelsen benyttes: 1) en allogeneisk eller xenogeneisk celle som uttrykker minst ett donorantigen og som har en ligand på en celleoverflate som vekselvirker med gp39 på overflaten av mottaker-T-celler og 2) en gp39-antagonist for fremstilling av et kombinert preparat til samtidig, separat eller sekvensiell induksjon av T-celletoleranse overfor et donorvev eller -organ hos en mottaker av vevet eller organet, med det forbehold at når den allogene eller xenogene celle er en allo-gen celle, så omfatter donorvevet eller -organet øyer fra bukspyttkjertel, lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, nervevev, mage eller tarm. Antagonisten hemmer vekselvirkningen mellom molekylet på T-cellen og dets ligand på den allogeneiske eller xenogeneiske celle.

Videre angår foreliggende oppfinnelse anvendelse av a) en allogeneisk eller xenogeneisk celle som uttrykker minst ett donorantigen og som har en ligand på en overflate derav som vekselvirker med gp39 på mottaker-T-celler og b) en gp39-antagonist, og c) øyceller fra donor bukspyttkjertel for fremstilling av et kombinert preparat til samtidig, separat eller sekvensiell behandling av diabetes.

En spesielt foretrukket gp39-antagonist er et anti-gp39-antistoff. I en annen utførelsesform er gp39-antagonisten en løselig form av gp39-liganden, for eksempel løselig CD40. Den allogeneiske eller xenogeneiske celle er fort-

rinnsviis en lymfecelle, for eksempel en B-celle. Alternativt er den allogeneiske eller xenogeneiske celle en liten hvilende B-celle. Den allogeneiske eller xenogeneiske celle og antagonist (anti-gp39-antistoff) administreres vanligvis til mottakeren før transplantasjonen av vevet eller organet inn i mottakeren. For eksempel administreres lymfoceller (for eksempel B-celler) fra vevs- eller organdonoren til mottakeren, sammen med antagonist, før transplantasjonen av vevet eller organet inn i mottakeren.

- 10 Oppfinnelsen angår dessuten anvendelse av a) en allogenisk donorcelle som uttrykker minst ett donorantigen og som har en ligand på en overflate derav som vekselvirker med GP39 på mottaker T-celler og b) et gp39-antistoff for fremstilling av et kombinert preparat til samtidig, separat eller
- 15 sekvensiell anvendelse for å indusere T-celletoleranse overfor et donorvev eller -organ hvor donorvevet eller -organet omfatter øyer fra bukspyttkjertel, lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, neuronalvev, mage og tarmer. I en utførelsesform omfatter det transplanterte vev Langerhans øyer. Følgelig muliggjør preparatet behandling av diabetes, hvor det kan administreres til en pasient som har behov for behandling: 1) allogeneiske eller xenogeneiske celler som uttrykker donorantigener; 2) en antagonist av en reseptor på overflaten av mottaker-T-celler som medierer
- 25 berøringsavhengige hjelperutløsningsfunksjoner, en gp39-antagonist (for eksempel et anti-gp39-antistoff) og 3) donor-Langerhans øyer.

- Oppfinnelsen angår videre anvendelse av en gp39-antagonist for fremstilling av et preparat til anvendelse for å inducere T-celletoleranse overfor et donorvev eller -organ hos en mottaker, hvilken mottaker skal eksponeres for allogene eller xenogene celler som uttrykker minst donorantigenet og som har en ligand på overflaten derav som samvirker med gp39 på mottaker T-celler, med det forbehold at når de
- 35 allogene eller xenogene celler er allogene celler, så omfatter donorvevet eller -organet øyer fra bukspyttkjertel,

lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, nervevev, mage eller tarm, samt anvendelse av en gp39-antagonist for fremstilling av et medikament for anvendelse til behandling av diabetes hos et individ som skal bli eksponert for øy-donorceller fra bukspyttkjertel og allogene eller xenogene celler som uttrykker minst et donorantigen som har en ligand på en overflate derav som samvirker med gp39 på mottaker-T-celler.

Kort beskrivelse av tegningene

10 *Figur 1* er en grafisk fremstilling av overlevingen av transplanterte allografter av Langerhans øyer hos kjemisk diabetiske mus som på forhånd var blitt behandlet med kun anti-gp39-antistoffet eller på forhånd var blitt behandlet med kun ufraksjonerte eller fraksjonerte allogeneiske milt-
15 celler.

Figurene 2A og 2B er grafiske fremstillinger av overlevingen av transplanterte allografter av Langerhans øyer, målt som nedgangen i konsentrasjonen av plasmaglukose, i kjemisk diabetiske mus som på forhånd var blitt behandlet med en enkelt dose av fraksjonerte allogeneiske miltceller sammen
20 med en behandling med anti-gp39-antistoff (MR1) i enten 2 uker (*figur A*) eller 7 uker (*figur B*). Hver kurve representerer data fra en enkelt mus. Åpne symboler viser mottakere hvor øy-allograftet sviktet spontant. Lukkede symboler viser mus, hvis øy-transplantater var funksjonelle ved eksperimentets slutt.

Figurene 3A, B og C er væskestrømcytometriske profiler som angir flekkdannelsen av 6 timers aktiverte humane perifere blodlymfocytter med enten CD40Ig (*figur A*), mAb 4D9-8 (*figur B*) eller mAb 4D9-9 (*figur C*).

Figurene 4A, B og C er væskestrømcytometriske profiler som angir flekkdannelsen av 6 timers aktiverte humane perifere blodlymfocytter, kultivert i nærvær av cykloporin A, flek-

ket med enten mAb 4D9-8 (figur A), mAb 4D9-9 (figur B) eller CD40Ig (figur C).

Figurene 5A og B er væskestrømytomometriske profiler som angir flekkdannelsen av 6 timers aktiverte humane perifere blodlymfocytter med CD40Ig i nærvær av umerket mAb 4D9-8 (figur A) eller umerket mAb 4D9-9 (figur B).

Figur 6 er en grafisk fremstilling av hemmingen av human B-celleformering som induseres av løselig gp39 og Il-4 når cellene kultiveres i nærvær av anti-humant gp39-mAb 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 eller 89-79.

Figur 7 er en grafisk fremstilling av hemmingen av en allo-spesifikk blandet lymfocyttespons når cellene kultiveres i nærvær av anti-humant gp39-mAb 24-31 eller 89-79.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Kombinasjonspreparatet fremstilt ved anvendelsen ifølge oppfinnelsen er nyttig til indusering av T-celletoleranse *in vivo* for et donorvevs- eller -organtransplantat hos en transplantatmottaker. Mottakeren kan administreres 1) en allogeneisk eller xenogeneisk celle som uttrykker donor-antigener og som har en ligand på en celleoverflate som vekselvirker med en reseptor på overflaten av en mottaker-T-celle som medierer berøringsavhengig hjelperutløsningsfunksjon og 2) en antagonist av reseptoren på overflaten av T-cellen som hemmer vekselvirkningen av liganden og mottakeren. Anvendt heri, vedrører begrepet "mottaker" en pasient som et vevs- eller organtransplantat skal transplanteres inn i, transplanteres inn i eller er blitt transplantert inn i. Anvendt heri, erholdes en "allogeneisk" celle fra en annen pasient av samme art som mottakeren, og den uttrykker "alloantigener" som er forskjellige fra antigenene som uttrykkes av mottakerens celler. En "xenogeneisk" celle erholdes fra en forskjellig art enn mottakeren og uttrykker "xenoantigener" som er forskjellige fra anti-

genene som uttrykkes av mottakerens celler. Anvendt heri vedrører "donorantigener" antigener som uttrykkes av donorvevs- eller -organtransplantatet som skal transplanteres inn i mottakeren. Donorantigenene kan være alloantigener eller xenoantigener, avhengig av transplantatkilden. Den allogeneiske eller xenogeneiske celle som administreres til mottakeren som en del av tolerisasjonskuren, uttrykker donorantigener, dvs. den uttrykker enkelte av eller alle de samme antigener som forekommer på donorvevet eller -organet som skal transplanteres. En allogeneisk eller xenogeneisk celle erholdes fortrinnsvis fra donoren av vevs- eller organtransplantatet, men kan erholdes fra en eller flere kilder som har felles antigeneiske determinanter med donoren.

I tillegg til den allogeneiske eller xenogeneiske celle administreres en gp39-antagonist til mottakeren som en del av tolerisasjonsbehandlingen. Mottaker-T-celleaktivering av den allogeneiske eller xenogeneiske celle, omfatter en vekselvirkning mellom gp39 på mottaker-T-celler og en gp39-ligand på den allogeneiske eller xenogeneiske celle. Ved å hemme denne vekselvirkning med en gp39-antagonist, aktiveres ikke mottaker-T-cellene av donorantigenene som uttrykkes av den allogeneiske eller xenogeneiske celle, men blir istedenfor tolerisert for donorantigenene. Induksjon av toleranse for donorantigener i mottakeren gjør det derfor mulig å fremgangsrikt transplantere donorvevet eller -organet uten immunmediert avstøtning av donortransplantatet.

Diverse aspekter av oppfinnelsen skal beskrives i større detalj i de følgende avsnitt.

I. gp39-Antagonister

En gp39-antagonist kan administreres til en mottaker for å forstyrre vekselvirkningen av gp39 på mottaker-T-celler med en gp39-ligand på en allogeneisk eller xenogeneisk celle, så som en B-celle, som er blitt administrert til mottakeren. En gp39-antagonist defineres som et molekyl som for-

styrer denne vekselvirkning. gp39-Antagonisten kan være et antistoff mot gp39 (for eksempel et monoklonalt antistoff mot gp39), et fragment eller et derivat av et antistoff mot gp39 (for eksempel Fab eller F(ab)'₂-fragmenter, kimeriske antistoffer eller humaniserte antistoffer), løselige former av en gp39-ligand (for eksempel løselig CD40), løselige former av et fusjonsprotein av en gp39-ligand (for eksempel løselig CD40Ig) eller farmasøytiske midler som avbryter eller forstyrer gp39-CD40-vekselvirkningen.

10 A. Antistoffer

Et pattedyr (for eksempel en mus, hamster eller kanin) kan immuniseres med en immunogen form av et gp39-protein eller -proteinfragment (for eksempel peptidfragment) som utløser en antistoffrespons i pattedyret. En celle som uttrykker gp39 på sin overflate, kan også anvendes som immunogenet. Alternative immunogener omfatter isolert gp39-protein eller -proteinfragmenter. gp39 kan isoleres fra en gp39-uttrykkende celle ved standard isolasjonsteknikker. I tillegg kan gp39-cDNA (Armitage et al., *Nature* 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.* 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.* 11:4313-4319 (1992)) uttrykkes i en vert-celle, for eksempel en cellelinje fra bakterier eller et pattedyr, og gp39-protein kan isoleres fra cellekulturer ved standardteknikker. Alternativt kan gp39-peptider syntetiseres på grunnlag av aminosyresekvensen av gp39 (beskrevet i Armitage et al., *Nature* 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.* 175:1091-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.* 11:4313-4319 (1992)) under anvendelse av kjente teknikker (for eksempel F-moc- eller T-boc-kjemisk syntese). Teknikker for å tillegge immunogenisitet på et protein omfatter konjugering med bærerstoffer eller andre teknikker som er velkjent innen faget. Proteinet kan for eksempel administreres i nærvær av et hjelpestoff. Immunisasjonens fremskritt kan overvåkes ved påvisning av antistofftitere i plasma eller serum. Standard ELISA eller annen immunoassay

kan anvendes med immunogenet som antigen for å fastslå antistoffinnholdet.

Etter immunisasjon kan det erholdes antisera, og hvis ønsket kan polyklonale antistoffer isoleres fra seraene. For å fremstille monoklonale antistoffer kan antistoffproduserende celler (lymfocytter) høstes fra et immunisert dyr og sammensmeltes med myelomceller ifølge standard somatisk cellefusjonsprosedyre og dermed udødeliggjøres, hvilket gir hybridomceller. Slike teknikker er velkjent innen faget, for eksempel hybridomateknikken som opprinnelig ble utviklet av Kohler og Milstein (*Nature* (1975) 256:495-497) samt andre teknikker, så som human B-cellehybridomateknikken (Kozbar et al., *Immunol. Today* (1983) 4:72), EBV-hybridomateknikken for å fremstille humane monoklonale antistoffer (Cole et al., *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy* (1985), Allen R. Bliss, Inc., sidene 77-96) og utsortering fra kombinatoriske antistoffsamlinger (Huse et al., *Science* (1989) 246:1275). Hybridomceller kan sorteres immunokjemisk ifølge produksjonen av antistoffer som er spesifikt reaktive med proteinet eller peptidet, og monoklonale antistoffer kan isoleres.

Begrepet antistoff som anvendt heri, skal også omfatte fragmenter derav som er spesifikt reaktive med et gp39-protein eller -peptid derav eller et gp39-fusjonsprotein. Antistoffer kan fragmenteres under anvendelse av standardteknikker, og fragmentene kan sorteres ifølge sin nytte på samme måte som beskrevet ovenfor for hele antistoffer. For eksempel kan $F(ab')_2$ -fragmenter genereres ved å behandle antistoffet med pepsin. Det erholdte $F(ab')_2$ -fragment kan behandles for å redusere disulfidbroene og dermed fremstille Fab'-fragmenter. Antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter ytterligere bispesifikke og kimeriske molekyler som har et anti-gp39-parti.

Når antistoffer som fremstilles i ikke-humane verter skal anvendes terapeutisk på mennesker, gjenkjennes de i for-

skjellig grad som fremmedmaterie, og det kan genereres en immunrespons hos pasienten. En fremgangsmåte for å minimere eller fjerne dette problem, hvilken fremgangsmåte foretrekkes foran generell immunosuppresjon, er å fremstille kimeriske antistoffderivater, dvs. antistoffmolekyler som kombinerer et ikke-humant variabelt parti fra dyr og et humant konstant parti. Kimeriske antistoffmolekyler kan for eksempel omfatte det antigenbindende parti fra et antistoff fra mus, rotte eller en annen art, med humane konstante partier. Diverse fremgangsmåter ved fremstilling av kimeriske antistoffer er blitt beskrevet og kan anvendes for å fremstille kimeriske antistoffer som inneholder det immunoglobulin-variable parti som gjenkjenner gp39; jfr. for eksempel Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1985); Takeda et al., *Nature* 314-452 (1985), Cabilly et al., US-patent nr. 4.816.567; Boss et al., US-patent nr. 4.816.397; Tanaguchi et al., Europa-patentpublikasjon EP 171496; Europa-patentpublikasjon 0173494; UK-patent GB 2177096B. Det forventes at slike kimeriske antistoffer vil være mindre immunogene i et menneske enn det tilsvarende ikke-kimeriske antistoff.

I humanterapeutisk hensikt kan de monoklonale eller kimeriske antistoffer som er spesifikt reaktive med et gp39-protein eller -peptid, ytterligere humaniseres ved å fremstille kimeras i humant variabelt parti, hvor deler av de variable partier, særlig de konserverte rammeområder av det antigenbindende parti, stammer fra et menneske, og kun de hypervariable områder er av ikke-humant opphav. Slike endrede immunoglobulinmolekyler kan fremstilles ifølge en av flere teknikker som er kjent innen faget (for eksempel Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7308-7312 (1983); Kozbor et al., *Immunology Today* 4:7279 (1983); Olsson et al., *Meth. Enzymol.* 92:3-16 (1982)), og fremstilles fortrinnsvis ifølge PCT-publikasjonen WO92/06193 eller EP 0239400. Humaniserte antistoffer kan fremstilles kommersielt av for eksempel Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Storbritannia.

En ytterligere fremgangsmåte ved generering av spesifikke antistoffer eller antistoff-fragmenter som er reaktive mot et gp39-protein eller -peptid, er sortering fra ekspresjonssamlinger som koder immunoglobulingener eller deler 5 derav, uttrykt i bakterier med et gp39-protein eller peptid. For eksempel kan komplette Fab-fragmenter, VH-områder og FV-områder uttrykkes i bakterier under anvendelse av fagekspresjonssamlinger; jfr. for eksempel Ward et al., 10 *Nature* 341:544-546 (1989); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989) og McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). Testing av slike ekspresjonssamlinger med for eksempel et gp39-peptid, kan identifisere immunoglobulinfragmenter som er reaktive med gp39. Alternativt kan SCID-hu- 15 musen (kan erverves fra Genpharm) anvendes for å fremstille antistoffer eller fragmenter derav.

Fremgangsmåter ved fremstilling av monoklonale antistoffer rettet mot gp39, bl.a. humant gp39 og muse-gp39, og egnede monoklonale antistoffer for anvendelse i henhold til fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen, skal beskrives i større 20 detalj i Eksempel 2.

Anti-humant gp39-monoklonale antistoffer foretrekkes for å indusere antigenspesifikk T-celletoleranse. Foretrukne antistoffer omfatter de monoklonale antistoffer 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 og 89-79 beskrevet i 25 Eksempel 2. Spesielt foretrukne antistoffer er de monoklonale antistoffer 89-76 og 24-31. 89-76- og 24-31-hybridomene som fremstiller henholdsvis 89-76- og 24-31-antistoffer, ble deponert ifølge Budapestkonvensjonen hos American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, Md., 30 U.S.A., den 2. september 1994. 89-76-Hybridomet fikk ATCC-tilgangsnummeret HB11713, og 24-31-hybridomet fikk ATCC-tilgangsnummeret HB11712. 24-31- og 89-76-antistoffene er av IgG1-isotypen.

I en annen utførelsesform binder et anti-humant gp39-mAb, 35 en epitop som gjenkjennes av et monoklonalt antistoff ut-

valgt fra gruppen som består av 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 og 89-79. Mer foretrukket binder anti-humant gp39-mAb en epitop som gjenkjennes av monoklonalt antistoff 24-31 eller monoklonalt antistoff 89-76.

- 5 Evnen av et mAb til å binde en epitop som gjenkjennes av et ovennevnt antistoff, kan bestemmes ved standard krysskonkurrerende assayer. For eksempel vil et antistoff som binder samme epitop som gjenkjennes av mAb 24-31, konkurrere om bindingen av merket 24-31 til aktiverte T-celler, mens
- 10 et antistoff som bindes til en annen epitop enn den som gjenkjennes av mAb 24-31, ikke vil konkurrere om bindingen av merket 24-31 til aktiverte T-celler.

B. Løselige ligander for gp39

- Andre gp39-antagonister som kan administreres for å indu-
15 sere T-celletoleranse, omfatter løselige former av en gp39-ligand. En enverdig løselig ligand for gp39, så som løselig CD40, kan bindes til gp39 og dermed hemme vekselvirkningen mellom gp39 og CD40 på B-celler. Begrepet "løselig" angir at liganden ikke er permanent forbundet med en cellememb-
20 ran. En løselig gp39-ligand kan fremstilles ved kjemisk syntese eller fortrinnsvis ved rekombinante DNA-teknikker, for eksempel ved å kun uttrykke det ekstracellulære parti (uten transmembran- og cytoplasmapartiene) av liganden. En foretrukket løselig gp39-ligand er løselig CD40. Alternat-
25 tivt kan en løselig gp39-ligand foreligge i form av et fusjonsprotein. Et slikt fusjonsprotein omfatter i det minste en del av gp39-liganden forbundet med et annet molekyl. For eksempel kan CD40 uttrykkes som et fusjonsprotein med immunoglobulin (for eksempel et CD40Ig-fusjonsprotein). I én
30 utførelsesform fremstilles det et fusjonsprotein som omfatter aminosyreresiduer fra et ekstracellulært parti av CD40 forbundet med aminosyreresiduer fra en sekvens som tilsva-
rer "hengsel"-, CH2- og CH3-partiene av en tung kjede fra immunoglobulin, for eksempel C γ 1, for å danne et CD40Ig-
35 fusjonsprotein (jfr. for eksempel Linsley et al. (1991), *J. Exp. Med.* 1783:721-730; Capron et al. (1989), *Nature* 337,

525-531; og Capon, US 5.116.964). Fusjonsproteinet kan fremstilles ved kjemisk syntese, eller fortrinnsvis ved rekombinante DNA-teknikker på grunnlag av cDNA av CD40 (Stamenkovic et al., *EMBO J.* 8:1403-1410 (1989)).

5 II Celler for induksjon av antigenspesifikk toleranse

Foreliggende oppfinnelse baserer seg i det minste delvis på oppdagelsen at levering av alloantigener til T-celler via allogeneiske celler i nærvær av en gp39-antagonist, fører til T-celletoleranse for alloantigenene. Celler som har evnen til å indusere toleranse ifølge denne mekanisme, omfatter bl.a. celler som leverer antigen og aktiverer T-celler ved vekselvirkning med gp39 (dvs. det er nødvendig med en vekselvirkning mellom gp39 på T-celler og en gp39-ligand på cellen som leverer antigenet, for å gi de riktige signaler for T-celleaktivering til T-cellen). Hemming av vekselvirkningen av liganden på den allogeneiske eller xenogeneiske celle med gp39 på mottaker-T-celler, hindrer T-celleaktivering ved allo- eller xenoantigener og induserer istedenfor T-celletoleranse for antigenene. Forstyrning av T-celleaktiveringen via gp39 kan hindre induksjonen av ko-stimulerende molekyler på den allogeneiske eller xenogeneiske celle (for eksempel molekyler av B7-familien på en B-celle), slik at cellen leverer kun et antigen signal til T-cellen uten noe ko-stimulerende signal og dermed induserer toleranse.

Således kan en allogeneisk eller xenogeneisk celle administreres til en mottaker. Den allogeneiske eller xenogeneiske celle har evnen til å levere antigen til mottaker-T-cellene, og er for eksempel en B-lymfocyt, en "profesjonell" antigenleverende celle (for eksempel en monocyt, en dendrittcelle, en langerhans-celle) eller en annen celle som leverer antigener til immunceller (for eksempel en keratinocyt, en endotelcelle, en astrocyt, en fibroblast, en oligodendrocyt). Videre foretrekkes det at den allogeneiske eller xenogeneiske celle har en redusert evne til å

stimulere et ko-stimulerende signal i mottaker-T-celler. For eksempel kan den allogeneiske eller xenogeneiske celle mangle ekspresjon av, eller den kan uttrykke kun lave nivåer av, ko-stimulerende molekyler, så som proteiner av B7-familien (for eksempel B7-1 og B7-2). Ekspresjon av ko-stimulerende molekyler på potensielle allogeneiske eller xenogeneiske celler, kan testes ifølge standardteknikker, for eksempel ved væskestrømcytometri under anvendelse av anti-stoffer som er rettet mot ko-stimulerende molekyler.

- 10 Foretrukne allogeneiske eller xenogeneiske celler for å indusere T-celletoleranse er lymfeceller, for eksempel perifere blodlymfocytter eller miltceller. Foretrukne lymfeceller for å indusere T-celletoleranse er B-celler. B-celler kan isoleres fra en blandet cellepopulasjon (for eksempel
- 15 andre celletyper i perifert blod eller milt) ved standard celleseparasjonsteknikker. For eksempel kan klebrige celler fjernes ved å kultivere miltceller på plastskåler og å høste den ikke-klebrige cellepopulasjon. T-celler kan isoleres fra en blandet cellepopulasjon ved behandling med et anti-
- 20 T-celleantistoff (for eksempel anti-Thy1,1 og/eller anti-Thy1,2) og komplement. I én utførelsesform anvendes hvilende lymfeceller, fortrinnsvis hvilende B-celler, som antigenleverende celler. Hvilende lymfeceller, så som hvilende B-celler, kan isoleres ved teknikker som er kjent innen
- 25 faget, for eksempel på grunnlag av sin lille størrelse og tetthet. Hvilende lymfeceller kan isoleres ved for eksempel motstrøms sentrifugaleluering som beskrevet i Eksempel 1. Under anvendelse av motstrøms sentrifugaleluering kan det erholdes en liten, hvilende lymfecellepopulasjon som er
- 30 blitt uttømt for celler som kan aktivere T-celleresponser, ved å samle en fraksjon eller fraksjoner ved 14-19 ml/min, fortrinnsvis 19 ml/min (ved 3200 rpm). Alternativt kan små, hvilende lymfocytter (for eksempel B-celler) isoleres ved sentrifugering med diskontinuerlig tetthetsgradient, for
- 35 eksempel under anvendelse av en Ficoll- eller Percoll-gradient, og etter sentrifugering kan det erholdes et sjikt som inneholder små, hvilende lymfocytter. Små, hvilende B-

celler kan også skjelnes fra aktiverte B-celler ved å teste for ekspresjon av ko-stimulerende molekyler, så som B7-1 og/eller B7-2, på overflaten av aktiverte B-celler ved standardteknikker (for eksempel immunofluorescens).

- 5 De allogeneiske eller xenogeneiske celler som administreres til mottakeren, har den virkning å i det minste delvis levere donorantigener til mottaker-T-celler. Således uttrykker cellene antigener som også uttrykkes av donorvevet eller -organet. Vanligvis kan dette oppnås ved å anvende
- 10 allogeneiske eller xenogeneiske celler fra donoren av vevs- eller organtransplantatet. For eksempel kan perifere lymfoceller, B-celler eller miltceller fra vevs- eller organdonoren isoleres og anvendes i henhold til fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. Alternativt kan allogeneiske eller
- 15 xenogeneiske celler erholdes fra en annen kilde enn vevs- eller organdonoren, forutsatt at cellene har felles antigene determinanter med vevs- eller organdonoren. Det kan for eksempel anvendes allogeneiske eller xenogeneiske celler som uttrykker (de fleste eller alle) de samme vevstype-
- 20 kompleksantigener som donorvevet eller -organet. Således kan allogeneiske eller xenogeneiske celler anvendes fra en kilde som er MHC-haplotypeparret med vevs- eller organdonoren (for eksempel en nær slektning av transplantatdonoren).

III. Administrasjon av celler og gp39-antagonister

T-celletoleranse for et organ- eller vevstransplantat kan induseres ved å administrere til transplantatmottakeren en gp39-antagonist sammen med en allogeneisk eller xenogeneisk
5 celle som uttrykker donorantigener og som vekselvirker med mottaker-T-celler via gp39. Den allogeneiske eller xenogeneiske celle og gp39-antagonisten kan administreres sammen eller samtidig til mottakeren. Alternativt kan gp39-antagonisten administreres før administrasjonen av de allogeneiske
10 ke eller xenogeneiske celler, for eksempel når antagonisten er et antistoff med lang halveringstid. I en foretrukket utførelsesform administreres antagonisten og de allogeneiske eller xenogeneiske celler til mottakeren før transplantasjon av organet eller vevet inn i mottakeren (dvs.
15 mottakeren behandles på forhånd med antagonisten og cellene). Administrasjonen av de allogeneiske eller xenogeneiske celler og antagonisten kan for eksempel utføres flere dager (for eksempel 5-8 dager) før vevs- eller organtransplantasjonen.

20 Administrasjonen av en enkelt dose allogeneiske celler (sammen med antagonisten) ble funnet å være tilstrekkelig for å inducere T-celletoleranse for et donorvev eller -organ (jfr. Eksempel 1). Antallet celler som administreres, kan variere avhengig av den anvendte celletype, typen
25 vevs- eller organtransplantat, mottakerens vekt, hans almentilstand og andre variabler som er kjent for fagmannen. Et egnet antall celler kan bestemmes av en person med normale kunnskaper innen faget ved konvensjonelle fremgangsmåter (for eksempel som beskrevet i Eksempel 1). Cellene
30 administreres i en form og via en rute som er egnet for induksjon av T-celletoleranse hos mottakeren. Cellene kan administreres i en fysiologisk akseptabel løsning, så som bufret saltløsning, eller et lignende bæremateriale. Cellene administreres fortrinnsvis intravenøst.

En antagonist administreres til pasienten i en biologisk kompatibel form som er egnet for farmasøytisk administrasjon *in vivo* for å indusere T-celletoleranse. Med "biologisk kompatibel form som er egnet for administrasjon *in vivo*" menes en administrasjonsform for antagonisten som skal administreres, hvor mulige toksiske virkninger oppveies rikelig av forbindelsens terapeutiske virkninger. Begrepet pasient skal omfatte levende organismer som en immunrespons kan oppnås i, for eksempel pattedyr. Eksempler på slike pasienter omfatter mennesker, hunder, katter, mus, rotter og transgene arter derav. En gp39-antagonist kan foreligge i hvilken som helst farmakologisk form, valgfritt med et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff. En terapeutisk virksom mengde antagonist defineres som en mengde som ved de nødvendige doseringer og behandlingstidsrom virksomt oppnår det ønskede resultat (for eksempel T-celletoleranse). For eksempel kan en terapeutisk virksom mengde av en antagonist av gp39 variere ifølge faktorer så som sykdomstilstanden, alderen, kjønnen og vekten av pasienten samt antagonistens evne til å oppnå en ønsket respons hos pasienten. Doseringsplanen kan justeres for å gi den optimale terapeutiske respons. For eksempel kan det administreres flere oppdelte doser daglig, eller dosen kan reduseres proporsjonalt som indikert av den terapeutiske situasjons krav. Som beskrevet i Eksempel 1 for behandling med et anti-gp39-antistoff, kan en virksom behandlingsplan omfatte å starte antistoffadministrasjonen før vevs- eller organtransplantasjonen (for eksempel 5-8 dager før transplantasjonen), etterfulgt av en gjenadministrasjon av antistoffet (for eksempel annenhver dag) i flere uker (for eksempel 2-7 uker) etter transplantasjonen.

Den aktive forbindelse (for eksempel en antagonist, så som et antistoff) kan administreres på en hensiktsmessig måte, så som ved injeksjon (subkutan, intravenøs osv.), oral administrasjon, inhalasjon, transdermal applikasjon eller rektal administrasjon. Avhengig av administrasjonsruten kan den aktive forbindelse belegges med et middel som beskytter

forbindelsen mot innvirkning av enzymer, syrer og andre naturlige betingelser som kan inaktivere forbindelsen. En foretrukket administrasjonsrute er ved intravenøs injeksjon.

- 5 For å administrere en antagonist mot gp39 via en annen rute enn parenteralt, kan det være nødvendig å belegge antagonisten med, eller administrere antagonisten sammen med, et materiale for å hindre at den inaktiveres. For eksempel kan en antagonist administreres til en pasient i et egnet bærerstoff eller fortynningsmiddel, den kan administreres sammen med enzymhemmere eller i et egnet bærerstoff, så som liposomer. Farmasøytisk akseptable fortynningsmidler omfatter saltvann og vandige bufferløsninger. Enzymhemmere omfatter pankreatisk trypsinhemmer, diisopropylfluorfosfat (DEP) og trasylol. Liposomer omfatter vann-i-olje-i-vann-emulsjoner samt konvensjonelle liposomer (Strejan et al. (1984), *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Den aktive forbindelse kan også administreres parenteralt eller intraperitonealt. Dispersjoner kan også fremstilles i glyserol, flytende polyetylenglykoler og blandinger derav samt i oljer. Under vanlige lagrings- og bruksbetingelser kan disse preparater inneholde et konserveringsmiddel for å hindre veksten av mikroorganismer.

Farmasøytiske sammensetninger som er egnet for injisering, omfatter sterile vandige løsninger (når vannløselig) eller dispersjoner av sterile pulvere for fremstilling av sterile injiserbare løsninger eller dispersjoner på bestilling. I hvert tilfelle må sammensetningen være steril og må være flytende i en grad som tillater en enkel sprøyting. Den må være stabil under betingelsene for fremstilling og lagring, og må beskyttes mot den forurensende virkning av mikroorganismer, så som bakterier og sopp. Bærerstoffet kan være et løsningsmiddel eller et dispersjonsmedium som for eksempel inneholder vann, etanol, polyol (for eksempel glyserol, propylenglykol, flytende polyetylenglykol og lignende) og

egnede blandinger derav. Den egnede fluiditet kan opprettholdes ved for eksempel anvendelse av et belegg, så som lecitin, ved opprettholdelse av den ønskede partikkelstørrelse i tilfellet av en dispersjon, og ved anvendelsen av overflateaktive midler. Forebygging av mikroorganismers innvirkning kan oppnås med diverse antibakterielle og antifungale midler, for eksempel parabener, klorbutanol, fenol, askorbinsyre, timerosal og lignende. I mange tilfeller vil det foretrekkes å innlemme isotoniske midler, for eksempel sukkere, polyalkoholer, så som mannitol, sorbitol, natriumklorid i sammensetningen. Det kan oppnås et forlenget opptak av de injiserbare sammensetninger ved å innlemme i sammensetningen et middel som sinker absorpsjonen, for eksempel aluminiummonostearat og gelatin.

Sterile injiserbare løsninger kan fremstilles ved å innlemme den aktive forbindelse (for eksempel en antagonist mot gp39) i den nødvendige mengde i et egnet løsningsmiddel med en av eller en kombinasjon av de ovennevnte ingredienser om nødvendig, etterfulgt av filtersterilisering. Generelt fremstilles dispersjoner ved å innlemme den aktive forbindelse i et sterilt bæremateriale som inneholder et grunnleggende dispersjonsmedium og de nødvendige andre av de ovennevnte ingredienser. I tilfellet av sterile pulvere for fremstilling av sterile injiserbare løsninger, er de foretrukne fremstillingsmetoder vakuomtørking og frysetørking, hvilket gir et pulver av den aktive ingrediens (for eksempel antagonist) pluss eventuelt ytterligere ønskede ingredienser fra en på forhånd sterilfiltrert løsning derav.

Når den aktive forbindelse er beskyttet på egnet måte som beskrevet ovenfor, kan proteinet administreres oralt, for eksempel med et inert fortynningsmiddel eller et fordøyelig, spiselig bærerstoff. Anvendt heri omfatter "farmasøytisk akseptabelt bærerstoff" hvilket som helst og alle løsningsmidler, dispersjonsmedier, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske og absorpsjonssinkende midler og lignende. Anvendelsen av slike medier og midler for

farmasøytisk aktive forbindelser, er velkjent innen faget. Så lenge et konvensjonelt medium eller middel ikke er inkompatibelt med den aktive forbindelse, overveies dets anvendelse i de terapeutiske sammensetninger. Det kan også
5 innlemmes ytterligere aktive forbindelser i sammensetningene.

Det er spesielt fordelaktig å formulere parenterale sammensetninger i doseenhetsform for en enklere administrasjon og enhetlig dosering. Doseenhetsformen anvendt heri vedrører
10 fysisk atskilte enheter som er egnet som enhetlige doser for pattedyrene som skal behandles, hvor hver enhet inneholder en forutbestemt mengde aktiv forbindelse som beregnes fremkalle den ønskede terapeutiske virkning i forbindelse med det nødvendige farmasøytiske bærerstoff. Spesifikasjonen for doseenhetsformer bestemmes av og er direkte
15 avhengig av (a) den aktive forbindelses ensartede kjennetegn og den bestemte terapeutiske virkning som skal oppnås og (b) begrensninger som ligger i naturen av faget å formulere en slik aktiv forbindelse for behandling av pasientens
20 følsomhet.

Etter eller samtidig med tolerisasjonskuren beskrevet heri, transplanteres et donorvev eller -organ inn i en transplantatmottaker på vanlig måte.

25 IV. Anvendelsesområder for preparatene fremstilt ved anvendelsen ifølge oppfinnelsen

De aktuelle preparatene som fremstilles ved anvendelsen ifølge foreliggende oppfinnelse, kan anvendes i diverse forskjellige vevs- og organtransplantasjonssituasjoner. Preparatene kan anvendes for å indusere T-celletoleranse hos en
30 mottaker av et transplantat av et vev eller organ, så som Langerhans øyer, lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, neuronalvev, mage og tarmer. Således kan preparatene anvendes ved behandling av sykdommer eller tilstander som følges av vevs- eller organtransplantasjoner (for eksempel lever-

- transplantasjon for å behandle hyperkolesterolemi, transplantasjon av muskelceller for å behandle muskeldystrofi, transplantasjon av neuronalvev for å behandle Huntingtons sykdom eller Parkinsons sykdom osv.). I en foretrukket utførelsesform omfatter det transplanterte vev Langerhans øyer. Det aktuelle kombinerte preparat kan benyttes ved behandling av diabetes ved transplantasjon av Langerhans øyceller. Det kan således administreres til en pasient som har behov for behandling: 1) allogeneiske eller xenogeneiske celler som uttrykker donorantigener, 2) en gp39-antagonist (for eksempel anti-gp39-antistoff) og 3) donor-Langerhans øyceller. Fortrinnsvis administreres de allogeneiske eller xenogeneiske celler og antagonisten til mottakeren før administrasjonen av Langerhans øyer.
- 15 Oppfinnelsen beskrives videre ved hjelp av de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1 Induksjon av toleranse for Langerhans øy-allografter ved behandling av mottakeren med allogeneiske celler og anti-39

- 20 Aktuelle allotransplantasjonsstudier er avhengig av generalisert immunosuppresjon som ikke-spesifikt fjerner immunutløsningsfunksjoner. Imidlertid kan immunosuppressive farmasøytika forårsake alvorlige bivirkninger. I tillegg har allotransplantasjon av Langerhans øyer for behandling av diabetes, vist seg å være upåvirkelig med denne fremgangsmåte (jfr. for eksempel Robertson, R.P. (1992) *N. Engl. J. Med.* 327, 1861). Terapier med antistoffer som er rettet mot T-celler, kan muliggjøre en fremgangsrik allotransplantasjon av øyer til gnagere, men den fører altfor ofte til en generell immunosuppresjon (Carpenter, C.B. (1990) *N. Engl. J. Med.* 322, 1224; Roark, J.H. et al. (1992) *Transplantation* 54, 1098; Kahan, B.D. (1992) *Curr. Opin. Immunol.* 4, 553). I dette eksempel ble toleranse for øy-allografter induisert hos en transplantatmottaker ved å manipulere leveringen av alloantigen til T-celler for å forhindre at de
- 35

aktiveres. Overlevelsen av øy-allograftene i kjemisk diabetiske C57BL/6(H-2^b)-mus ble undersøkt under anvendelse av de følgende metoder:

Induksjon av diabetes

- 5 C57Bl/6J(H-2^b)-mus av hannkjønn ble gjort diabetiske ved intravenøs administrasjon av streptozotocin (140 mg/kg). Permanent diabetes ble bekreftet ved påvisning av en glukosekonsentrasjon i plasma på ≥ 400 mg/dl ved tre forskjellige tidspunkter i løpet av 1 uke.

10 Allogeneisk miltcellefraksjonering

- Allogeneiske donorceller for forbehandling av transplantatmottakere, ble erholdt fra (C57 x BALB/c) (H-2^{b/d}) F₁-hybrid-dyr for å forhindre "graft versus host disease". For å isolere små lymfocytter ble miltcellesuspensjoner fra 8 uker gamle (C57 x BALB/c) F₁-mus av hunnkjønn tappet for erytrocytter og deretter størrelsesfraksjonert ved eluering som beskrevet av Tony, H.P. et al. (1985), *J. Exp. Med.* 161, 223; og Gosselin, E.J. et al. (1988), *J. Immunol.* 140, 1408. Kort sagt ble små lymfocytter isolert ved motstrøms sentrifugaleluering, for eksempel ved anvendelse av en sentrifuge av modell J-6B (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, U.S.A.). Ca. $1-5 \times 10^8$ celler i 8 ml kulturmedium eller en balansert saltløsning med 1,5% føtalt bovins serum ble behandlet med deoksyribonuklease, plassert i elueringskammeret med en utgangshastighet av motstrømmen på 13,5 ml/min og ble rotert ved 4°C ved en konstant hastighet på 3200 rpm. En fraksjon med små celler og meget få forurensende, større celler, elueres vanligvis ved 14-19 ml/min, selv om den nøyaktige strømningshastighet kan være avhengig av mediet som cellene er suspendert i. I de nedenfor beskrevne eksperimenter ble en fraksjon med små celler samlet ved 19 ml/min (ved 3200 rpm). Denne fraksjon var fullstendig fri for strålningsresistente (3000 rads) cellulære tilleggsfunksjoner ifølge assay med T-cellelinjer som var spesi-

fikke for enten kanin-IgG og H-2^d (CDC35) eller alloreaktive mot H-2^b (D10.G4). Små celler og ufraksjonerte celler ble vasket to ganger i serumfritt medium før de ble injisert inn i halevenen av allograft-mottakerne. Det ble
5 anvendt ca. 40-100 x 10⁶ ufraksjonerte (C57 x BALB/c)F₁ (H-2^{b/d})-miltceller eller 40-100 x 10⁶ eluerte, små (C57 x BALB/c)F₁(H-2^{b/d})-miltceller.

Forbehandling av transplantatmottakere

Transplantatmottakerne ble forbehandlet med enten ufraksjonerte, allogeneiske (C57 x BALB/c)F₁(H-2^{b/d})-miltceller,
10 eluerte "Fraksjon 19"-miltceller med liten diameter, hvis APC-aktivitet var blitt fjernet (isolert som beskrevet ovenfor), et anti-gp39-monoklonalt antistoff (MR1, jfr. Eksempel 2, Eksperiment 3) eller en kombinasjon av allo-
15 geneiske celler og anti-gp39-antistoff. Fraksjon 19-cellene ble testet i to forskjellige doser: en lav dose på 40-44 x 10⁶ celler eller en høy dose på 77-88 x 10⁶ celler. Kontrolldyrene ble verken behandlet med allogeneiske celler eller antistoff. De allogeneiske celler ble administrert
20 til transplantatmottakerne ved injeksjon i halevenen 5-8 dager før øy-allografttransplantasjonen. MR1-antistoff-behandlingen skjedde i en dose på 250 µg/mus to ganger pr. uke, begynnende 7 dager før øy-transplantasjonen og fortsettende i 2-7 uker eller inntil transplantatet sviktet.
25 Den første antistoffinjeksjon ble vanligvis gitt på samme dag som den første injeksjon av allogeneiske miltceller.

Øy-allografttransplantasjon

Allogeneiske BALB/c(H-2^d)-øyer ble isolert ved en modifisert kollagenasefordøyelsesmetode (Gottlieb, P.A. et al.
30 (1990), *Diabetes* 39, 643). Øyene ble implantert i en dose på 30 øyer/g kroppsvekt i den subrenale kapsel hos mottaker-C57B1/6J(H-2^b)-mus direkte etter isolasjonen. Transplantatoverlevelsen ble definert som opprettholdelsen av en glukosekonsentrasjon på ≤200 mg/dl i plasma.

Resultater

I en første rekke eksperimenter ble øy-allograftmottakerne forbehandlet med enten kun allogeneiske miltceller eller med kun anti-gp39-antistoff. Som vist på Figur 1 ble i fravær av miltcelleforbehandling, alle øy-allografter utstøtt innen 13 dager etter transplantasjonen (9 ± 2 d; område 5-13 d; $N = 23$). Det ble også observert en dårlig overlevelse av øyene i dyr som var blitt forbehandlet med kun ufraksjonnerte miltceller med normal APC-aktivitet (6 ± 3 d; område 4-12 d; $N = 7$) eller en lav dose ($40-44 \times 10^6$ celler) Fraksjon 19-miltceller med fjernet APC (7 ± 3 d; område 3-14 d; $N = 16$). I motsetning til dette førte injeksjon av en større dose Fraksjon 19-små splenocytter med fjernet APC ($75-88 \times 10^6$ celler) til en lengre overlevelse av allograftet (19 ± 10 d; område 7-40 d; $N = 16$). Denne virkning på varighet-
en av transplantatoverlevelsen var statistisk signifikant ($F_{3,58} = 17,3$, $p < 0,001$ sammenlignet med grupper som ikke ble behandlet, ble behandlet med hele milttransfusjoner eller ble behandlet med en lavere dose Fraksjon 19-miltceller), men var ikke permanent. Den forlengede, men begrensede, overlevelse av allogeneiske øyer i diabetiske mottakere av Fraksjon 19-små celler med fjernet APC, antydnet at disse celler i og for seg ikke kan opprettholde en allograftoverlevelse. En ytterligere gruppe transplantatmottakere ble behandlet med $77-88 \times 10^6$ Fraksjon 20-celler. Denne fraksjon bestod også overveiende av små lymfocytter, men skilte seg fra Fraksjon 19-populasjonen ved at den inneholdt en påvisbar APC-funksjon. Mottakerne av disse celler ($N = 6$) utstøtte alle sine transplantater raskt (middeltall = $8,5$ d; område 6-12). En ytterligere gruppe transplantatmottakere ble behandlet med kun anti-gp39-monoklonalt antistoff, MR1. Figur 1 viser at øy-allograftene sviktet innen 15 dager i 7 av 11 mus som var blitt behandlet med kun anti-gp39-mAb. De gjenværende fire mus hadde funksjonelle transplantater i slutten av eksperimentet på dag 48. Resultatene viser at administrasjon til mottakeren av MR1 anti-gp39-antistoffet i og for seg kan

forlengte øy-allograftets overlevelse (middeltall 20 = 19 d; område 9 til ubegrenset; N = 5). Forlengelsesgraden lignet statistisk sett den forlengelsesgrad som ble oppnådd ved å anvende en høyere dose av kun Fraksjon 19-miltceller, og var signifikant lengre enn den som ble oppnådd i de tre andre gruppene ($p < 0,05$).

Den ovenfor beskrevne rekke eksperimenter tyder på at behandling med en høy dose Fraksjon 19-miltceller med fjernet APC eller anti-gp39-mAb i og for seg kan forbedre overlevelsen av Langerhans øy-allografter sammenlignet med når mottakeren ikke behandles. Imidlertid kunne ingen behandling i og for seg virksomt indusere langtids toleranse for øy-allograftene hos mottakerne. I den følgende rekke eksperimenter ble behandlingen av mottakeren med allogeneiske miltceller kombinert med en behandling med anti-gp39-behandling. Den kombinerte administrasjon av allogeneiske miltceller og anti-gp39 ble funnet å være mer virksom enn enten reagens i og for seg. Resultatene vises på Figur 2, hvor hver kurve representerer data fra en enkelt mus. Åpne symboler viser mottakere hvor øy-allograftet sviktet spontant. Lukkede symboler representerer mus, hvis øytransplantater var funksjonelle i slutten av eksperimentet. Figur 2B viser at det ble oppnådd en ubegrenset transplantatoverlevelse i alle dyr som ble behandlet i 7 uker med anti-gp39-mAb og en enkelt injeksjon av Fraksjon 19-miltceller med fjernet APC (N = 6). Forandring av denne kur ved å redusere varigheten av behandlingen med anti-gp39 svekket, men opphevet ikke, den positive virkning på transplantatoverlevelsen. Det ble oppnådd en ubegrenset transplantatoverlevelse i 6 av 8 mottakere når anti-gp39-mAb ble administrert i kun 2 uker, i kombinasjon med Fraksjon 19-miltceller (Figur 2A). Det ble også observert en ubegrenset transplantatoverlevelse hos mottakere som var blitt behandlet med anti-gp39 i 2 eller 7 uker i kombinasjon med én injeksjon av ufraksjonerte allogeneiske miltceller.

For å bekrefte øy-transplantatfunksjonen og fraværet av insulinutsondring fra gjenværende egne øyer som ikke var blitt ødelagt ved streptozotocinbehandlingen, ble nyrene som bar de subrenale implantater fjernet. I alle tilfeller
5 førte unilateral nefrektomi til gjenopptreden av hyperglycemi (>300 mg/dl) innen 3 dager.

Øy-allograftene og den egne pankreas ble studert histologisk hos alle dyr, enten når transplantatet sviktet eller i slutten av eksperimentet. Histologiske snitt av øy-allograftene i nyren av mottakere av fraksjonerte allogeneiske små lymfocytter og kontinuerlig (7 uker) MR1-mAb-behandling, viste en overflod av intakte øyer som var synlig under renalkapselen og som var fri for mononukleær infiltrasjon og inneholdt velgranulerte insulin- og glukagonpositive celler. I motsetning til dette viste histologiske
10 snitt av øy-allografter i nyrene av mottakere som kun var blitt behandlet med anti-gp39-mAb, vanligvis en karakteristisk intens mononukleær celleinflammasjon og en medfølgende øycelleødeleggelse. I alle vertpankreatata var øymorfologien
15 20 enhetlig overensstemmende med streptozotocindiabetes.

EKSEMPEL 2: Fremstilling og karakterisering av anti-gp39-antistoffer

Eksperiment 1 Antistoffer mot humant gp39

For å indusere antigenspesifikk T-celletoleranse hos et
25 menneske foretrekkes det å administrere et antistoff mot humant gp39. Den følgende metodikk ble anvendt for å fremstille anti-humant gp39-monoklonale antistoffer i mus. Balb/c-mus ble immunisert med et løselig gp39-fusjonsprotein, gp39-CD8, i "Complete Freund's Adjuvant" (CFA).
30 Musene ble deretter behandlet 6 uker senere med løselig gp39-CD8 i "Incomplete Freund's Adjuvant" (IFA). Løselig gp39-CD8 ble gitt i løselig form 4 uker etter den andre immunisering. Musene ble deretter injisert med aktiverte humane perifere blodlymfocytter 2 uker senere, etterfulgt

av en endelig injeksjon av løselig gp39-CD8 etter ytterligere 2 uker. Splenocytter ble sammensmeltet med NS-1-fusjonspartneren på dag 4 etter den sluttlige immunisering, ifølge standardprotokoller.

- 5 Kloner som produserte anti-humant gp39-antistoffer ble utvalgt etter en flertrinns utsorteringsprosedyre. Klonene ble først testet ved platebindingsassay under anvendelse av gp39-CD8. Positive kloner ble deretter testet mot et kontroll-CD8-fusjonsprotein, CD72-CD8. Kloner som testet positive på CD8-CD72-platebindingsassayet ble fjernet. De gjenværende kloner ble deretter testet på hvilende og 6 timers aktiverte humane perifere blodlymfocytter (PBL) ved væskestrømcytometrisk analyse. Hybridomer som flekket aktiverte, men ikke hvilende, PBL, ble ansett være positive. Til slutt 15 ble de gjenværende kloner testet for sin evne til å blokkere bindingen av CD40Ig til platebundet gp39.

- Ca. 300 kloner ble i utgangspunktet testet mot gp39-CD8 og CD72-CD8 i platebindingsassayene. Av disse kloner ble det funnet at 30 påviser platebundet gp39 og ikke CD8. Disse 20 kloner ble deretter testet for påvisning av gp39 på aktivert humant PBL. Ca. 15 kloner gjenkjente et molekyl på aktivert PBL, men ikke på hvilende celler. Spesifisiteten ble ytterligere bekreftet ved å bestemme klonenes kapasitet til å blokkere CD40Ig-påvisning av platebundet gp39. 3 av 10 25 testede kloner blokkerte CD40Ig-bindingen i dette assay. Disse kloner var 3E4, 2H5 og 2H8. Slike kloner foretrekkes for anvendelse i de heri beskrevne fremgangsmåter. Kloner som testet positive på aktiverte, men ikke på hvilende, PBL, ble også testet for reaktivitet med en aktivert rotte- 30 T-celleklone, POMC8. Klonen 2H8 uttrykte kryssreaktivitet med denne T-cellelinje fra rotte.

Eksperiment 2 Antistoffer mot humant gp39

Det ble anvendt en lignende immunisasjonsprosedyre som beskrevet i Eksperiment 1 for å fremstille ytterligere anti-

stoffer mot humant gp39. En Balb/c-mus ble immunisert med løselig gp39-CD8 i CFA, etterfulgt av behandling med 6 timers aktiverte humane perifere blodlymfocytter 4 uker senere. Musen ble deretter injisert med løselig gp39-CD8 4 dager før fusjon av splenocytter med NS-1-fusjonspartneren ifølge standardprotokoller. Testing av hybridomakloner ble utført ved væskestrømytometrisk flekkdannelse av 6 timers aktiverte humane PBL. Klonene som flekket aktiverte, men ikke hvilende, humane PBL ble utvalgt. Seks kloner, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 og 89-79, ble utvalgt for ytterligere analyse.

Spesifisiteten av de utvalgte antistoffer ble bekreftet ved flere assayer. Først demonstrerte en væskestrømytometrisk analyse at alle seks mAb flekket aktiverte, men ikke hvilende, perifere blod-T-celler (jfr. Figurene 3B og 3C for et representativt eksempel, som avbilder flekkdannelsen av aktiverte T-celler med henholdsvis 4D9-8 og 4D9-9). Ekspresjonen av molekylet som gjenkjennes av hver av de seks antistoffer, er påvisbart innen 4 timer etter aktiveringen, holder i maksimalt 6-8 timer etter aktiveringen og kan ikke lenger påvises 24 timer etter aktiveringen. Alle seks mAb gjenkjenner et molekyl som uttrykkes på aktiverte CD3⁺PBL, fortrinnsvis av CD4⁺-fenotypen, men en del CD8⁺T-celler uttrykker også molekylet. Ekspresjon av molekylet som gjenkjennes av de seks mAb, hemmes av forekomsten av syklosporin A i kulturmediet, liksom også ekspresjonen av gp39 (jfr. Figurene 4A og 4B for et representativt eksempel, som avbilder flekkdannelsen av syklosporinbehandlede T-celler med henholdsvis 4D9-8 og 4D9-9). Kinetikken og fordelingen av ekspresjonen av molekylet som gjenkjennes av disse mAb er identiske med de av gp39 ifølge påvisning med fusjonsproteinet av humant CD40Ig. I tillegg blokkerer alle seks mAb flekkdannelsen av gp39 med CD40Ig (jfr. Figurene 5A og 5B for et representativt eksempel, som avbilder hemmingen av gp39-flekkdannelse med CD40Ig i nærvær av henholdsvis 4D9-8 og 4D9-9). I et ELISA-assay gjenkjenner alle seks mAb gp39-CD8, en løselig fusjonsform av gp39-molekylet. Videre

immunofeller alle seks mAb et molekyl på ca. 36 kd fra ³⁵S-metionin-merkede aktiverte humane PBL. Det immunofelte molekyl er identisk med molekylet som felles av det humane CD40Ig-fusjonsprotein.

- 5 Den funksjonelle aktivitet av de seks utvalgte mAb (4D9-8, 4D9-9, 24-32, 24-43, 89-76 og 89-79) ble testet som følger. Først ble evnen til mAb til å hemme formeringen av isolerte humane B-celler som ble kultivert med IL-4 og gp39, målt. Isolerte humane B-celler ble kultivert med gp39 og IL-4 i
- 10 nærvær eller fravær av isolerte monoklonale antistoffer eller CD40Ig i doser mellom 0 og 12,5 µg/ml. B-celleformeringen ble bestemt etter 3 dager i kultur ved tilsetning av tymidin. Resultatene (vist på Figur 6) viser at alle seks mAb kan hemme B-celleformering som induseres av gp39 og
- 15 IL-4. mAb 89-76 og 24-31 hadde den mest virksomme hemming av den induserte B-celleformering.

- Dernest undersøkte man evnen av mAb til å hemme B-celledifferensiering ifølge Ig-produksjon som ble indusert av anti-CD3-aktiverte T-celler og IL-2. Isolerte IgD⁺-humane
- 20 B-celler ble preparert ved positivt utvalg med FACS og deretter kultivert med anti-CD3-aktiverte humane T-celler (behandlet med mitomycin-C) og IL-2 i 6 dager i nærvær eller fravær av isolerte anti-gp39-monoklonale antistoffer i doser mellom 0 og 10 µg/ml. IgM-, IgG- og IgA-produk-
- 25 sjonen ble fastslått ved ELISA på dag 6. Resultatene (vist nedenfor i Tabell 1) viser at alle seks antistoffer kan hemme T-celleavhengig B-celledifferensiering ifølge IgM-, IgG- og IgA-produksjon.

Tabell 1

mAb	µg/ml	Immunoglobulinproduksjon		
		IgM	IgG	IgA
intet	-	17500	6710	4471
4D9-8	0,1	4813	2130	2819
	1,0	4394	2558	1519
	10,0	1081	389	396
4D9-9	0,1	3594	919	1731
	1,0	2659	1233	1606
	10,0	374	448	266
24-31	0,1	3863	981	344
	1,0	1287	314	165
	10,0	1120	596	23
24-43	0,1	6227	4132	432
	1,0	3193	2130	192
	10,0	7021	1232	1081
89-76	0,1	3783	1069	344
	1,0	2180	352	171
	10,0	818	551	19
89-79	0,1	9763	1924	3021
	1,0	2314	460	156
	10,0	183	135	434

For å undersøke innvirkningen av anti-gp39-mAb på T-celle-
 responsen ble mAb anvendt i standard blandede lymfocytt-
 reaksjoner (MLR). 300000 humane perifere blodlymfocytter
 5 (respondere = R) ble kultivert med 100000 bestrålte allo-
 geneiske perifere blodlymfocytter (stimulatorer = S) i
 nærvær eller fravær av anti-gp39-mAb (10 µg/ml). Kulturer
 ble pulsert med 3H-tymidin på dag 4, 5 og 6 og høstet 18
 10 timer senere. Alle seks anti-humant gp39-mAb hemmet allo-
 spesifikke responser ifølge MLR (jfr. Figur 7 for et repre-
 sentativt eksempel, som avbilder hemmingen av allospesi-
 fikke responser når R og S inkuberes i nærvær av 24-31
 eller 89-76; et CTLA4-immunoglobulinfusjonsprotein og et
 15 anti-CD28-mAb ble anvendt som positive kontroller).

For å bestemme om de seks mAb gjenkjente spesielle epitoper
 på humant gp39-molekyl ble det utført kryssblokkerende
 eksperimenter. Aktiverte humane PBL ble først blokkert med
 hver av de seks mAb (25 µg/ml unkonjugert antistoff).

Cellene ble vasket og deretter merket med 10 µg/ml biotin-konjugert antistoff, etterfulgt av en omsetning med fytterytrinkonjugert avidin (PE-Av). Flekkdannelsen av cellene med PE-Av ble analysert ved FACS. Resultatene vises nedenfor i Tabell 2.

Tabell 2

Blokkerende antistoff	Flekkende antistoff					
	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
intet	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	IB	-	++++	++++	+++	+++
4D9-9	+++	IB	+++	++++	+++	+++
24-31	+	+	IB	+++	++	++
24-43	+	+	+++	IB	++	+
89-76	+	+	+++	+++	IB	+++
89-79	+	++	+++	+++	+++	IB

Flekkdannelsens intensitet og prosentandelen positive celler representeres ved +-symbolet (++++ = MI>200; +++ = MI>125; ++ = MI>50; + = MI>25; - = ingen flekkdannelse over bakgrunnen). IB = ikke bestemt.

Alle antistoffer blokkerte bindingen av CD40Ig til aktiverede humane PBL. Imidlertid viser dataene i Tabell 2 tydelig enkelte antistoffers manglende blokkering av bindingen av andre antistoffer til aktiverte humane PBL, hvilket tyder på at de gjenkjenner bestemte epitoper på de humane gp39-molekyler.

89-76- og 24-31-hybridomene som fremstiller henholdsvis 89-76- og 24-31-antistoffene, ble deponert ifølge Budapest-konvensjonen hos American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, MD, U.S.A. den 2. september 1994. 89-76-hybridomet fikk ATCC-tilgangsnummeret HB11713, og 24-31-hybridomet fikk ATCC-tilgangsnummeret HB11712.

Eksperiment 3 Antistoffer mot gp39 av mus

I en utførelsesform av oppfinnelsen er gp39-antagonisten et anti-muse-gp39-monoklonalt antistoff, MR1. Den følgende fremgangsmåte ble anvendt for å fremstille MR1-monoklonalt antistoff og kan anvendes for å generere andre antistoffer mot gp39.

Hamstere ble immunisert intraperitonealt med $5-10^6$ aktiver-
te T_{h1} -celler (d1,6) i 1-ukes intervaller i 6 uker. Når
serumtiteren mot murint T_{h1} var høyere enn ca. 1:10000, ble
10 cellefusjoner utført med polyetylen glykol under anvendelse
av immune hamstersplenocytter og NS-1. Supernatanten fra
brønner som inneholdt voksende hybridomer ble testet ved
væskestrømcytometri på hvilende og aktiverte T_{h1} . Et bes-
temt hybridom som produserte et Mab som selektivt gjen-
15 kjente aktivert T_{h1} , ble ytterligere testet og subklonet for
å erholde MR1. MR1 ble produsert i ascites og rensset ved
ioneutbytte-HPLC. Et hybridom-MR1 er blitt deponert hos
American Type Culture Collection, og fikk tilgangsnummeret
HB11048.

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av

a) en allogeneisk eller xenogeneisk celle som uttrykker minst ett donorantigen og som har en ligand på en overflate derav som vekselvirker med gp39 på mottaker-T-celler og

b) en gp39-antagonist

for fremstilling av et kombinert preparat til samtidig, separat eller sekvensiell anvendelse for å indusere T-celletoleranse overfor et donorvev eller -organ hos en mottaker av vevet eller organet,

med det forbehold at når den allogene eller xenogene celle er en allogen celle, så omfatter donorvevet eller -organet øyer fra bukspyttkjertel, lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, nervevev, mage eller tarm.

2. Anvendelse av

a) en allogeneisk eller xenogeneisk celle som uttrykker minst ett donorantigen og som har en ligand på en overflate derav som vekselvirker med gp39 på mottaker-T-celler og

b) en gp39-antagonist, og

c) øyceller fra donor bukspyttkjertel

for fremstilling av et kombinert preparat til samtidig, separat eller sekvensiell behandling av diabetes.

3. Anvendelse ifølge krav 1 eller krav 2, hvor antagonist er et anti-gp39-antistoff.

4. Anvendelse av

a) en allogeneisk donorcelle som uttrykker minst ett donorantigen og som har en ligand på en overflate derav som vekselvirker med gp39 på mottaker-T-celler og

b) et anti-gp39-antistoff

5 for fremstilling av et kombinert preparat til samtidig, separat eller sekvensiell anvendelse for å indusere T-celletoleranse overfor et donorvev eller -organ hos en mottaker av vevet eller organet, hvor donorvevet eller -organet omfatter øyer fra bukspyttkjertel, lever, nyre,
10 hjerte, lunge, hud, muskel, nervevev, mage eller tarm.

5. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 4 hvor den allogene eller xenogene celle er en lymfoid celle.

6. Anvendelse ifølge krav 5, hvor den lymfoide celle er en B-celle.

15 7. Anvendelse ifølge krav 6, hvor B-cellen er en hvilende B-celle.

8. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 eller 5 til 7, hvor den allogene eller xenogene celle og antagonist skal administreres til mottaker før transplantasjon av vevet
20 eller organet.

9. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 eller 4 til 8, hvor vevet eller organet omfatter øyer fra bukspyttkjertel.

10. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 eller 4 til 8, hvor vevet eller organet er valgt fra gruppen omfattende
25 øyer fra bukspyttkjertel, lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, nervevev, mage eller tarm.

11. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 3 til 10, hvor anti-gp39-antistoffet er et monoklonalt antistoff.

12. Anvendelse ifølge krav 11, hvor det monoklonale antistoffet kan bli dannet fra hybridomcellelinje MR1 deponerte hos ATCC HB11048.
13. Anvendelse ifølge krav 11, hvor det monoklonale antistoff er et chimerisk monoklonalt antistoff.
14. Anvendelse ifølge krav 11, hvor det monoklonale antistoff er et humanisert monoklonalt antistoff.
15. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 3 til 14, hvor anti-gp39-antistoffet er et anti-humant gp39-antistoff.
- 10 16. Anvendelse ifølge krav 1 eller krav 2, hvor gp39-antagonisten er en oppløselig form av en gp39-ligand.
17. Anvendelse ifølge krav 16, hvor den oppløselige form av en gp39-ligand er et CD40 fusjonsprotein.
- 15 18. Anvendelse av en gp39-antagonist for fremstilling av et preparat til anvendelse for å indusere T-celletoleranse overfor et donorvev eller -organ hos en mottaker,
- 20 hvilken mottaker skal eksponeres for alloge eller xenogene celler som uttrykker minst donorantigenet og som har en ligand på overflaten derav som samvirker med gp39 på mottaker T-celler,
- med det forbehold at når de alloge eller xenogene celler er alloge celler, så omfatter donorvevet eller -organet øyer fra bukspyttkjertel, lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, nervevev, mage eller tarm.
- 25 19. Anvendelse ifølge krav 18, hvor de alloge eller xenogene celler som uttrykker minst donorantigenet, omfatter lymfoide celler eller antigenpresenterende celler.

20. Anvendelse ifølge krav 19, hvor nevnte lymfoide celle er en B-lymfocyt.

21. Anvendelse ifølge krav 19, hvor nevnte antigenpresenterende celle er valgt fra monocytter, dendrittiske celler, 5 Langerhanske celler, keratinocytter, endoteliale celler, astrocytter, fibroblaster og oligodendrocytter.

22. Anvendelse ifølge krav 19, hvor den antigenpresenterende celle er en B-celle.

23. Anvendelse ifølge krav 18, hvor donorvevet eller - 10 organet omfatter lever, nyre, hjerte, lunge, hud, muskel, nervevev, mage eller tarm.

24. Anvendelse av en gp39-antagonist for fremstilling av et medikament for anvendelse til behandling av diabetes hos et individ som skal bli eksponert for øy-donorceller fra 15 bukspyttkjertel og allogene eller xenogene celler som uttrykker minst et donor-antigen som har en ligand på en overflate derav som samvirker med gp39 på mottaker-T-celler.

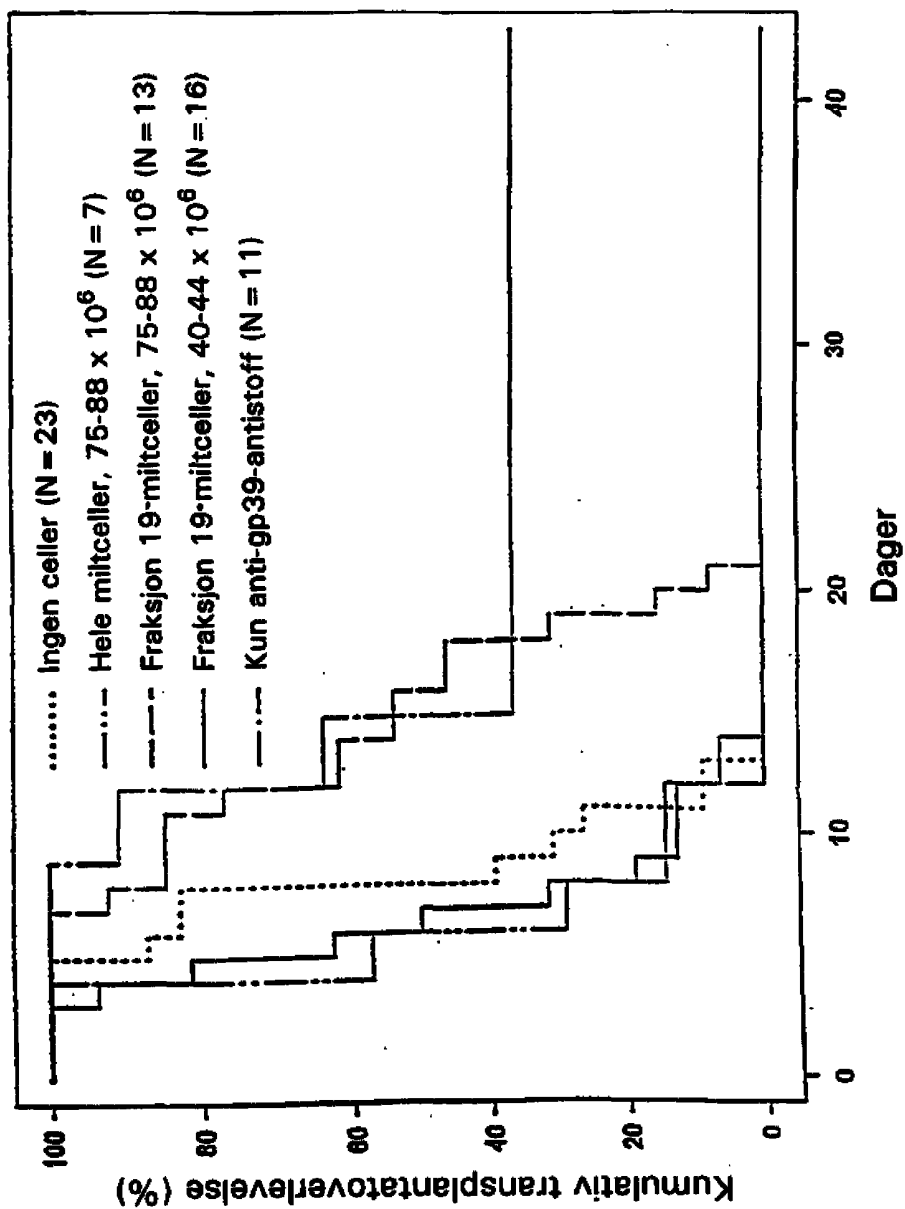
25. Anvendelse ifølge krav 24, hvor de allogene eller 20 xenogene celler som uttrykker minst et donorantigen, innbefatter lymfoide celler så som B-lymfocytter, dendrittiske celler, monocytter og Langerhanske celler.

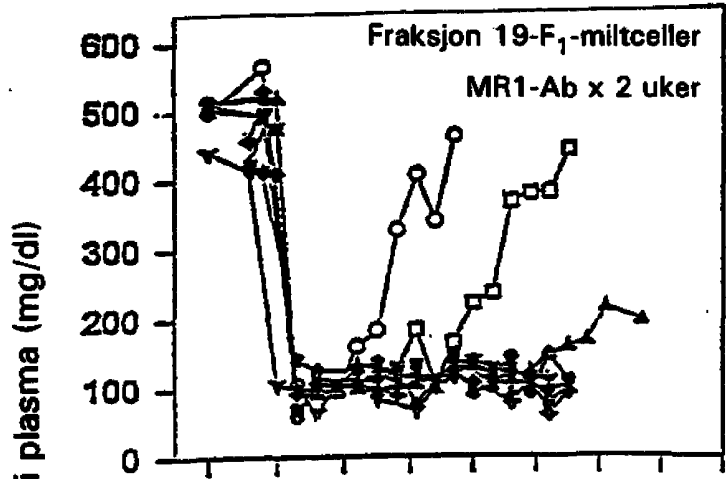
26. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 18 til 25, hvor gp39-antagonisten er et anti-gp39-antistoff eller et opplø- 25 selig CD40 fusjonsprotein.

27. Anvendelse ifølge krav 26, hvor antistoffet er et monoklonalt antistoff gp39-antistoff.

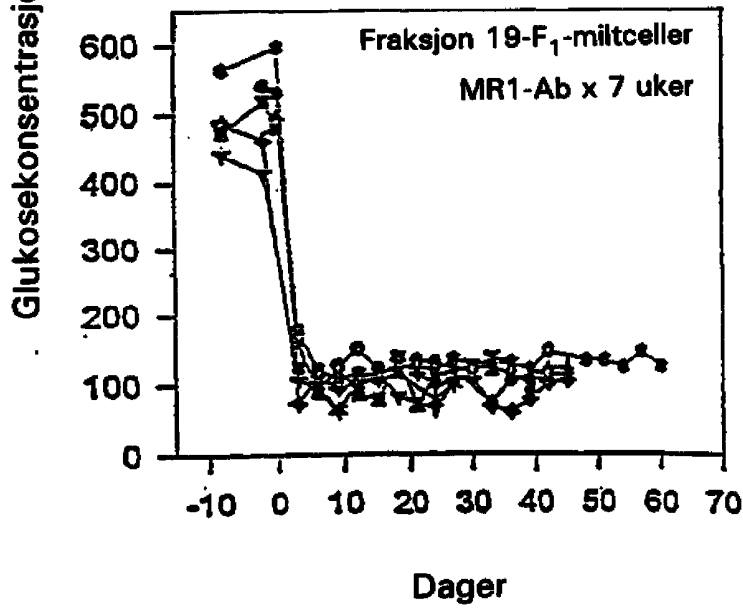
28. Anvendelse ifølge krav 27, hvor det monoklonale anti- 30 stoff er et chimerisk antistoff eller et humanisert monoklonalt antistoff.

FIGUR 1



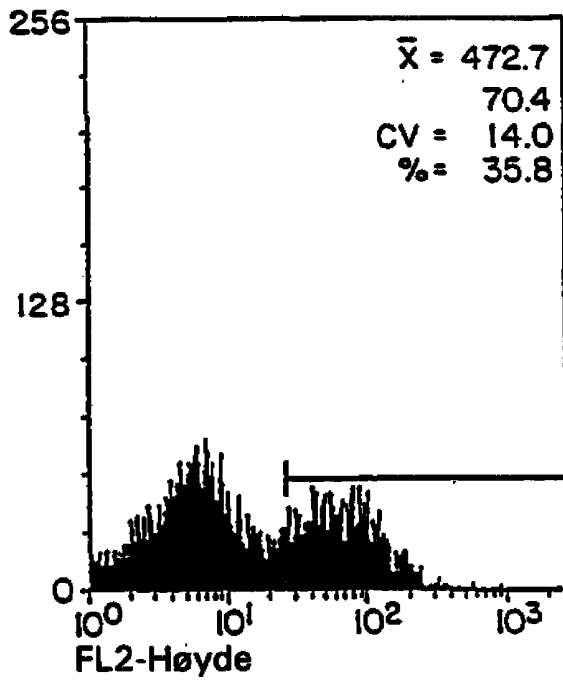


FIGUR 2A

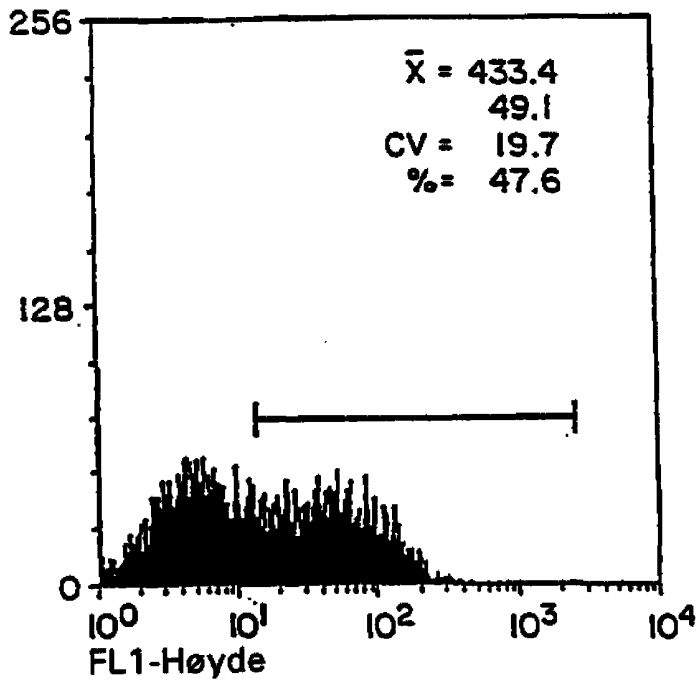


FIGUR 2B

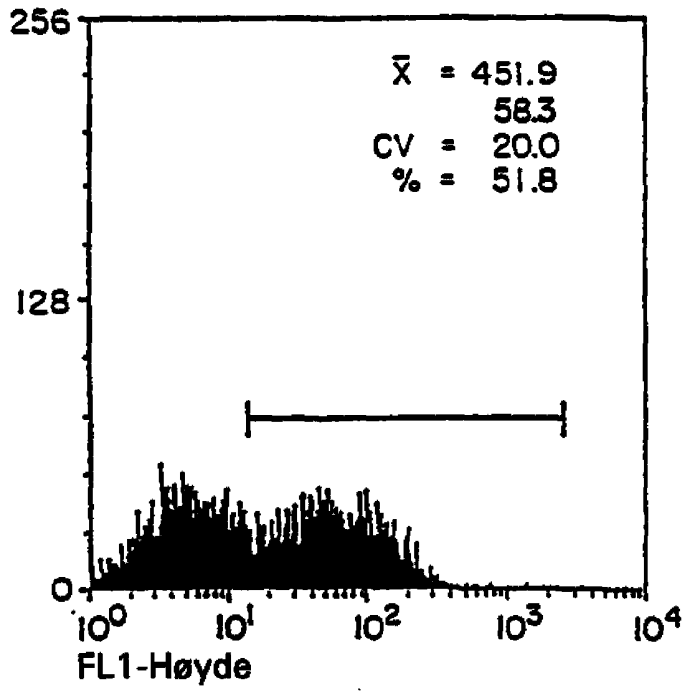
FIGUR 3A



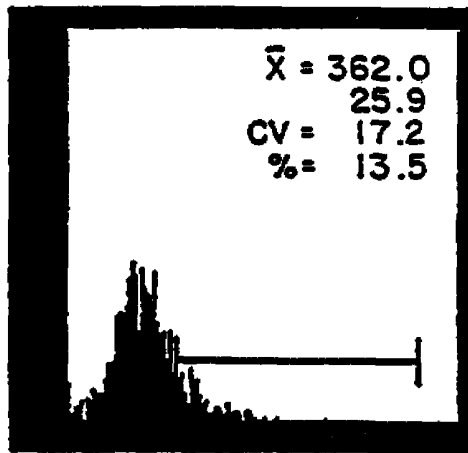
FIGUR 3B



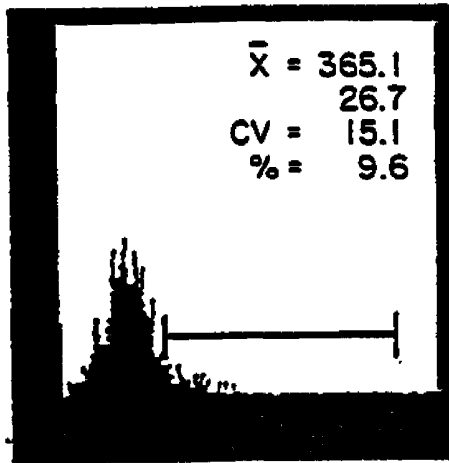
FIGUR 3C



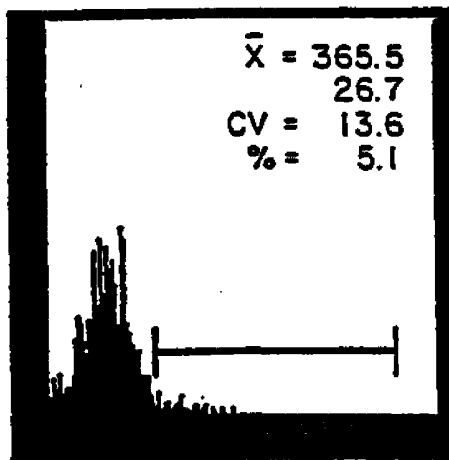
FIGUR 4A



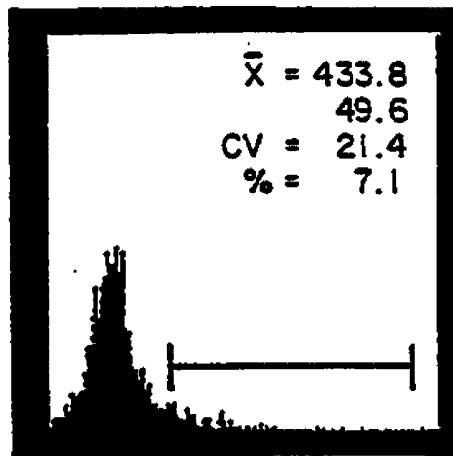
FIGUR 4B



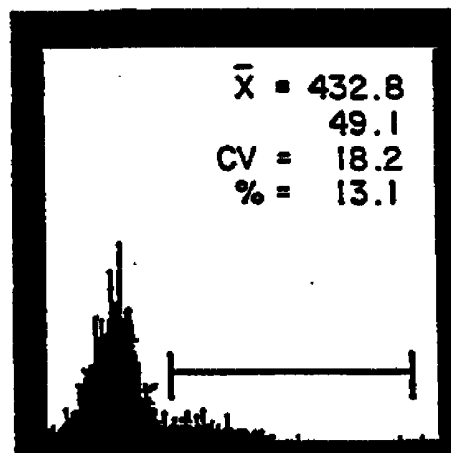
FIGUR 4C



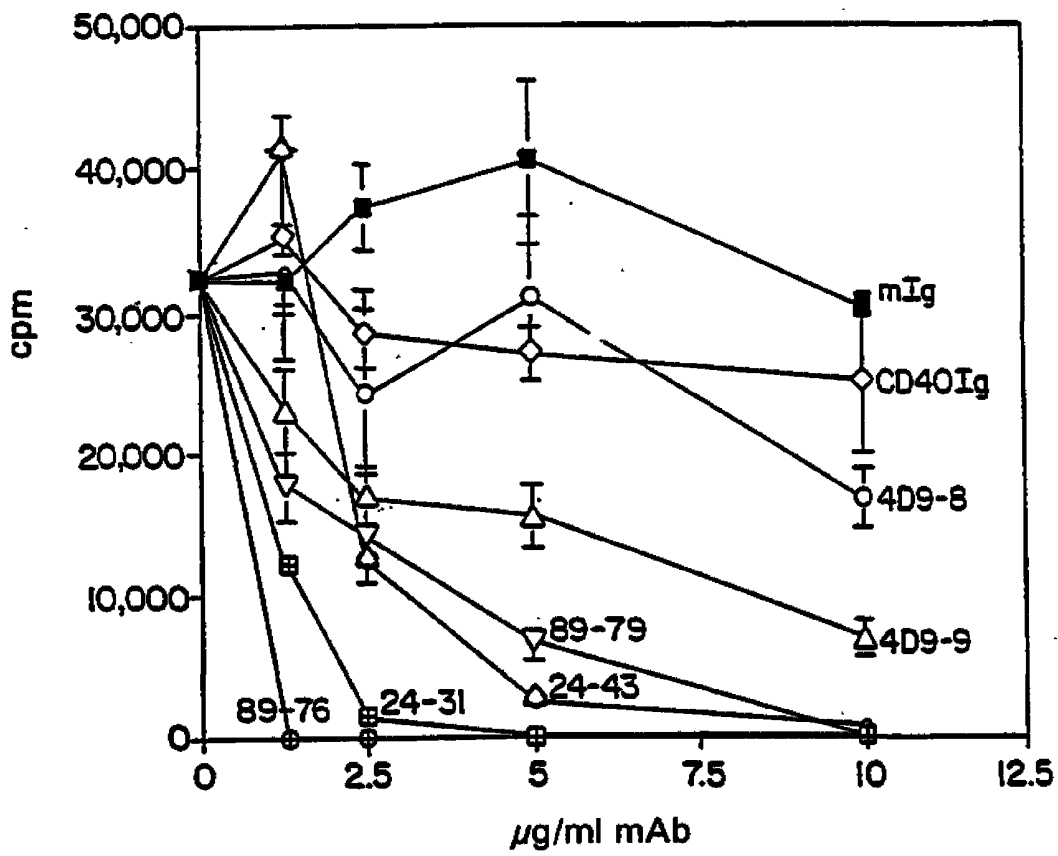
FIGUR 5A



FIGUR 5B



FIGUR 6



FIGUR 7

