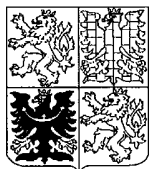


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 19.06.1998

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 20.06.1997 09.03.1998

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/050267 1998/077265

(33) Země priority: US US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.04.2000
(Věstník č. 4/2000)

(86) PCT číslo: PCT/US98/12892

(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/58669

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 4616

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/00

A 61 P 37/06

A 61 P 3/08

A 61 P 3/10

(71) Přihlašovatel:

BIOGEN, INC., Cambridge, MA,
US;
UNIVERSITY OF MIAMI, Miami, FL,
US;

(72) Původce:

Kenyon Norma S., Miami, FL, US;
Ricordi Camillo, Miami Beach, FL, US;
Thomas David W., Wellesley, MA, US;
Burkly Linda, West Newton, MA, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
170 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154
pro přípravu léku k zabránění odhojení štěpu
tkáně tvořící inzulin**

(57) Anotace:

Použití činidla rušícího vazbu CD 40 : CD 154 k inhibici odhojení tkáňového štěpu, tvořícího inzulin u příjemce, a také k prodloužení přežívání a funkce štěpu, k odvrácení odhojení (rejekce) štěpu a obnovení funkce implantovaného štěpu, a také k indukci imunologické tolerance k transplantované tkáni tvořící inzulin. Řešení je využitelné při léčení a profylaxi poruch metabolické kontroly homeostázy krevní glukózy, včetně poruch, které se projevují jako diabetes mellitus (DM).

Použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 pro přípravu léku k zabránění odhojení štěpu tkáně tvořící inzulin

Tato přihláška je přihláška částečně pokračovací k prozatímní přihlášce USA 60/050 267 podané 20. června 1997 a k prozatímní přihlášce USA 60/077 265 podané 9. března 1998. Popis vynálezu z těchto předchozích přihlášek je zahrnut formou odkazu v předkládané přihlášce.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká obecně potlačení nežádoucí imunitní odpovědi, zvláště protiadaptivní imunitní odpovědi zprostředkované T-lymfocyty. Vynález se konkrétně týká prevence, léčení, suprese nebo reverze odhojení transplantované tkáně nebo transplantovaného orgánu způsobeného imunitním systémem příjemce.

Dosavadní stav techniky

Transplantace orgánů mezi dvěma jedinci, kteří nejsou geneticky identičtí, vede vždy k imunologické rejekci (odhojení) orgánu způsobenému mechanismem závislým na T-buňkách, pokud proces odhojování není omezen podáváním léčiv, která potlačují funkce T-buněk.

Několik patentů USA, např. č. US 5104858, 5008246 a 5068323, popisuje použití imunosupresivních léčiv k inhibici odhojení štěpu (transplantátu). Jiná konvenční činidla popsali Suthanthiran et al. (1994, 331, New Eng. Med. J. 365-376). Jak inhibitory kalcineurinfosfatázy tak

glukokortikosteroidy se užívají klinicky, obě tato agens zabraňují uvolňování aktivujících cytokinů zprostředkovanému T-buňkami, zvláště IL-2. Avšak terapie tímto typem konvenčního agens je nedokonalá. Oba typy agens účinkují tak, že narušují signalizaci vedenou přes antigenní receptor T-buněk (TCR), což je jediný mediátor antigenní specifičnosti T-buněk, a účinkují tedy na všech T-buňkách bez rozdílu. Kromě toho, účinek těchto léčiv není trvalý, takže přerušeni léčení obecně vede ke ztrátě štěpu. Tudíž pro udržení životaschopnosti štěpu a jeho funkční integraci musí příjemce transplantátu trpět následky dlouhodobé nespecifické imunosuprese. K těmto důsledkům patří zvýšené riziko infekce a malignit, a také toxicita, zejména pro citlivé orgány a tkáně, jako jsou ledviny, játra a pankreas (slinivka břišní).

Transplantace buněk ostrůvků (ICT, Islet Cell Transplantation) může vést k odstranění hyperglykémii a k normalizaci metabolické kontroly krevní glukózy (Ricordi, Diabetes Reviews 4: 356-369, 1996, Sharp et al, Diabetes 39: 515-518, 1990, Socci et al., Acta Diabetol. 28: 151-157, 1991, Warnok et al., Diabetologia 34: 55-58, 1991, Ricordi et al., Transplantation 53: 407-414, 1992, Gores et al., Lancet 341: 19-21, 1993, Alejandro et al., Diabetes 46: 1983-1989, 1997) u jedinců, kteří mají *diabetes mellitus* (DM). Dokonce i v případě, že není inzulinová nezávislost, podání redukované dávky exogenního inzulínu příjemci transplantátu s funkčním alloštěpem ostrůvků (bazální tvorba c-peptidu > 1,0 ng/ml) vede k výborné metabolické kontrole a normalizaci hemoglobin Alc (HbAlc) (Ricordi, Diabetes Reviews 4: 356-369, 1996, Sharp et al, Diabetes 39: 515-518, 1990, Socci et al., Acta Diabetol. 28: 151-157, 1991, Warnok et al., Diabetologia 34: 55-58, 1991, Ricordi et al.,

Transplantation 53: 407-414, 1992, Gores et al., Lancet 341: 19-21, 1993, Alejandro et al., Diabetes 46: 1983-1989, 1997). V době více než 6 let po transplantaci nebyla pozorována hypoglykémie a byly popsány funkční alloštěpy ostrůvků u příjemce s autoimunitním diabetem (Alejandro et al., Diabetes 46: 1983-1989, 1997). I přes tyto významné pokroky je široká aplikace transplantace ostrůvků pro kontrolu DM omezena požadavkem trvalé generalizované imunosuprese u příjemce. Tato omezení se netýkají jen nebezpečí spojeného s chronickou imunosupresí, ale také diabetogenního účinku imunosupresivních léčiv užívaných v současné době.

Zmíněná omezení současných terapeutických postupů v léčení DM stimulovala široký zájem o vývoj nových terapií pro indukci donorové-specifické imunologické tolerance, čímž by se vyhnulo potřebě celoživotní imunosuprese u příjemce štěpu. Byly získány počáteční slibné výsledky v pokusech s allotransplantacemi na různých modelových systémech hlodavců. Když byly testovány na preklinických modelech velkých zvířat (psi, primáti kromě člověka), ukázaly se výsledky z modelových hlodavců jako velmi špatně prediktivní pro ICT ve srovnání s modely lépe vystihujícími ICT u člověka.

Existuje tudíž potřeba zlepšeného nebo účinnějšího léčení pomocí imunosuprese nebo imunomodulace u příjemců transplantátů. Zvláště je potřebné takové léčení, které nevede k všeobecné supresi (pansupresi) T-buněk, tj. léčení, které nezvyšuje náchylnost příjemce k malignitám nebo oportunním infekcím. Především je však potřeba léčení, které je méně toxické, než současně užívaná terapeutická agens. Současně je potřeba takového léčení, které podporuje dlouhodobou funkční integraci štěpu, tj. integraci, která přetrvává ukončení léčení.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití imunomodulačního činidla, které zmírňuje protiadaptivní odpověď T-buněk, aniž by byla potřebná celková imunosuprese T-buněk. Další předmět vynálezu je imunomodulační činidlo, které podporuje funkční integraci tkáňového štěpu, zvláště tkáňového štěpu odvozeného z ostrůvků pankreatu, u příjemce, zejména člověka. Dalším předmětem vynálezu je imunomodulační činidlo, které inhibuje imunologické odhojení transplantované tkáně, zejména transplantovaných pankreatických ostrůvků nebo jiné tkáně tvořící inzulin. Další předmět vynálezu poskytuje imunomodulační činidlo, které přerušuje přenos kostimulačního signálu aktivovaným T-buňkám. Předmětem vynálezu je pak zvláště činidlo rušící vazbu (přerušovač vazby) CD40:CD145 pro použití k léčení, zvláště pro použití ke zmírnění nebo oddálení nebo zabránění imunologické rejekce (odhojení) transplantované tkáně. Dalším obecnějším předmětem předkládaného vynálezu je zlepšení dostupnosti tkáňových štěpů, zvláště tkáňových štěpů tvořících inzulin, tím, že poskytuje imunomodulační přípravek, který dovoluje funkční integraci cizorodé (např. allogenní nebo xenogenní) tkáně příjemcem (hostitelem). Dalším obecným předmětem vynálezu je zabránění, zmírnění, oslabení nebo léčení *diabetes mellitus* (DM).

Předkládaný vynález je založen na objevu, že použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154, buďto samotného nebo v kombinaci s jinými terapeutickými činidly, jako jsou např. imunomodulační nebo tolerizační činidla (činidla vytvářející toleranci), vede k oslabení, potlačení, zabránění, zpoždění nebo odstranění rejekce transplantované tkáně produkující inzulin, způsobené protiadaptivní odpovědí imunitního systému

hostitele, aniž by byla potřebná celková suprese příjemcova imunitního systému.

Předkládaný vynález tudíž poskytuje použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 k přípravě terapeutického přípravku a vlastní přípravky k imunomodulační terapii u příjemců tkáňových štěpů (transplantátů) tvořících inzulin. Tyto přípravky lze použít v různém způsobem (dále použití podle vynálezu). První použití podle vynálezu je k inhibici odvržení tkáňového štěpu tvořícího inzulin. Druhé použití podle vynálezu je k prodloužení přežívání štěpu u příjemce. Třetí použití podle vynálezu je ke zrušení odvržení tkáňového štěpu. Čtvrté použití je k uchování funkce tkáňového štěpu. Páté použití je k obnovení funkce poškozeného štěpu. Šesté použití je k indukci imunologické tolerance ke tkáňovému štěpu. Všechna výše uvedená použití se týkají použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 (CD40L) k přípravě léku, který se podává příjemci štěpu. Činidlo rušící vazbu CD40:CD154 znamená jakékoliv činidlo rušící vazbu CD40 ligand (CD40L označovaný také CD154 nebo antigen 5c8, a někdy také gp39) ke svému protějšku, neboli rozpoznávanému receptoru (zde CD40). Výhodně je přerušujícím činidlem činidlo blokující CD154 (CD40L), čímž se myslí jakékoliv činidlo, které se váže na CD154 a tím zabraňuje vazbě nebo ruší jeho vazbu na příslušný receptor (např. CD40). Příkladem činidla blokujícího CD154 je monoklonální protilátka, konkrétně monoklonální protilátka, která má vazebné charakteristiky pro antigen shodné s monoklonální protilátkou 5c8 popsanou v patentu US 5 474 771, na jehož popis se tímto odkazujeme.

Použití podle předkládaného vynálezu výše zmíněná jsou vhodná pro všechny typy tkáňových štěpů tvořících inzulin, jako je např. tkáň pankreatu nebo pankreatické ostrůvky izolované konvenčními způsoby. Vynález je tedy užitečný pro

použití v případech, že příjemcem (hostitelem) štěpu je savec, výhodně primát, nejvýhodněji člověk. Zvláště je vynález výhodný, pokud příjemce štěpu trpí nebo je ohrožen poškozením glukózového metabolismu, jako např. při DM. Dárcem štěpu je syngenní člen stejného fylogenetického druhu jako je příjemce (tzn. allogenní dárce, který poskytuje tkáňový alloštěp) nebo člen odlišného fylogenetického druhu (tzn. dárce je xenogenní, poskytuje tkáňový xenoštěp). Pokud se jako zdroje transplantované tkáně užije xenogenní dárce, je výhodné, když je relativně MHC-kompatibilní s příjemcem, např. pavíán nebo šimpanz by byly výhodnými dárce pro člověka. Vynález výhodně podporuje ujetí štěpu jakékoliv jiné tkáně tvořící inzulin, včetně populací izolovaných fetálních nebo dospělých β buněk ostrůvků nebo kultivovaných β buněk ostrůvků (bez ohledu na to, zda pocházejí z primární kultury nebo imortalizované buněčné linie). Vynález je skutečně vhodný k tomu, aby podpořil ujetí štěpu jakýchkoliv buněk exprimujících, indukovaným nebo trvalým způsobem, inzulinový gen, jako jsou např. hostitelské buňky připravené konvenčními způsoby genového inženýrství. Případně může být tkáň tvořící inzulin fyzicky oddělena od tkáně příjemce imunoizolačním zařízením.

Ve světle předchozího popisu je jasné, že vynález umožňuje obnovení metabolické kontroly glukózového metabolismu u savců, kteří to potřebují. Toto obnovení spočívá v tom, že se implantuje tkáň tvořící inzulin savci a pak se savci podává činidlo rušící vazbu CD40:CD154, výhodně činidlo blokuující CD154. Ve výhodném provedení vynálezu je činidlem blokujícím CD154 monoklonální protilátka, která má antigenně specifické vazebné vlastnosti jako monoklonální protilátka 5c8. V příkladném protokolu, který byl ověřen testy na velkých zvířatech sloužících jako

relevantní preklinické modely DM, přijetí štěpu je indukováno podáváním monoklonální protilátky před ICT, po kterém pak následovalo (výhodně) alespoň dvě další podání monoklonální protilátky během 2 týdnů po provedení ICT (tj. po implantaci tkáně produkující inzulin). Poté, pokud je to třeba, je uchycení štěpu udržováno podáváním monoklonální protilátky po jeden měsíc (tj. definováno jako 4 týdny) po ICT. Toto udržování lze opakovat, pokud je to nutné, nebo pokud je to shledáno rozumným.

Volitelně lze zlepšit přijetí štěpu současným podáváním tolerizačního činidla (činidla vyvolávajícího toleranci) savci, čímž se myslí jakékoliv činidlo, které udržuje štěp po ukončení imunomodulační nebo imunosupresivní léčby. Příkladem tolerizačního činidla je tkáň kostní dřeně, nebo populace buněk odvozených z kostní dřeně, kteréžto buňky jsou MHC-kompatibilní s tkáňovým štěpem (tj. s tkání produkující inzulin). Výhodně je kostní dřeň nebo buňky kostní dřeně syngenní s dárce (donorem) nebo zdrojem tkáně produkující inzulin. Dlouhodobé přežívání tolerizačního činidla v příjemci štěpu činí tudíž z příjemce imunologickou chiméru, tj. stav projevující se donorově-specifickou imunologickou tolerancí. Populace hematopoetických buněk CD34(+) odvozených z kostní dřeně (kmenových buněk) je zvláště výhodné tolerizační činidlo. Dalším zvláště výhodným tolerizačním činidlem je populace kmenových buněk s fenotypem CD40 (-) na buněčném povrchu.

Další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje způsob detekce poškození metabolické kontroly glukózového metabolismu u savců. Tento způsob je dostatečně citlivý k tomu, aby odhalil subklinické (např. kryptické nebo asymptomatické, tj. skryté či bez příznaků) poškození metabolismu glukózy v krvi, např. u savce, který je ohrožen

vývojem DM nebo který je ohrožen počátečním stadiem odhojení implantované tkáně tvořící inzulin. Způsob spočívá v tom, že se hodnotí hladina glukózy ve vzorku krve, odebrané savci alespoň 1 hodinu a méně než 6 hodin (výhodně 2 hodiny) po tom, co savec strávil jídlo. Má se za to, že savec má poškozený glukózový metabolismus, když je obsah glukózy v postprandiálním (PPD) vzorku 150 mg/dl nebo vyšší (tj. přesahuje 150 mg/dl). Spolehlivost metody se zvýší, když se odeberou 2 vzorky ve dvou po sobě následujících dnech a oba vykáží obsah glukózy 150 mg/dl nebo vyšší.

Popis obrázků

Popisovaný vynález, jeho vlastnosti a výhody bude možné lépe pochopit pomocí následujících obrázků a popisu výhodných provedení vynálezu.

Obr. 1 je graf, kde je vynesena hladina krevní glukózy po hladovění (FG) u paviána, při terapii blokování CD154 po ICT, jako funkce dnů po provedení operace (POD).

Obr. 2 je graf, kde je vynesena hladina FG u makaka "rhesus", při terapii blokování CD154 po ICT, jako funkce dnů po provedení operace (POD).

Obr. 3 je graf, kde se srovnává hladina FG makaka "rhesus" uvedená na obr. 2 s hladinou FG člověka, který trpí DM a je léčen konvenční inzulinovou nahrazovací terapií.

Podrobný popis vynálezu

Aktivace T-buněk, a na ní závislé další imunologické procesy, vyžaduje jak signály zprostředkované receptory T-buněk (TCR), tak simultánně předávané tzv. kostimulační signály. Důležitý kostimulační signál je přenášen navázáním CD40 buněk prezentujících antigen, jako např. B-buněk, na CD40L (CD154) T-buněk. Lidský CD40 je buněčný povrchový protein velikosti 50 kD exprimovaný na zralých B buňkách, a také na makrofágách a aktivovaných endotelových buňkách. CD40 patří do třídy receptorů podílejících se na programované buněčné smrti (apoptóze), kam patří také Fas/CD95 a alfa receptor nádorového nekrotického faktoru (TNF). Lidský CD154 (CD40L) je membránový glykoprotein typu II velikosti 32 kD, který vykazuje homologii s TNF alfa, který je přechodně exprimován primárně na aktivovaných T-buňkách. Bylo ukázáno, že vazba CD40:CD154 je nutná pro všechny typy protilátkové odpovědi závislé na T-buňkách. Konkrétně vazba CD40:CD154 poskytuje antiapoptotický a/nebo stimulační signál pro lymfokiny.

Důležitost vazby CD40:CD154 pro stimulaci biologické odpovědi závislé na T-buňkách byla potvrzena objevem, že syndrom X-vázané hyper-IgM (X-HIGM) u lidí je fenotyp vyplývající z genetického nedostatku funkčního CD154. Jedinci s X-HIGM mají normální nebo vysoké hladiny IgM, ale selhává u nich tvorba protilátek IgG, IgA nebo IgE a trpí opakovanými, někdy velmi těžkými, bakteriálními a parazitárními infekcemi, a také zvýšeným výskytem lymfomů a abdominálních rakovin. Obdobný fenotyp byl pozorován u zvířat nulizygotních pro gen kódující CD154 (tzv. "knockout", tj. s vyřazenou funkcí genu). B-buňky nulizygotních zvířat mohou produkovat IgM i za absence vazby CD40:CD154, nejsou však v takových podmínkách schopny

přepnutí isotypu ("isotype switching") nebo normálně přežívat po afinitním zrání (maturaci). V nepřítomnosti funkční interakce CD40:CD154 se nevyvíjejí správně germinální centra lymfatických uzlin a paměťové B-buňky buďto mají narušený vývoj nebo úplně chybí. Tyto defekty pak funkčně přispívají k silnému snížení nebo úplnému vymizení druhotné (zralé) protilátkové odpovědi. Byly pozorovány také defekty buněčné imunity, které se projevují zvýšeným výskytem bakteriálních a parazitárních infekcí. Mnoho z těchto defektů zprostředkovaných buňkami je reverzibilních, tj. může být odstraněno podáváním IL-12 nebo IFN-gamma. Tyto údaje opodstatňují názor, že normální vazba CD40:CD154 podporuje vývoj imunitní odpovědi T-pomocných buněk typu I.

Řada preklinických výzkumů zjistila, že činidla schopná přerušit vazbu CD40:CD154 jsou slibnými imunomodulačními činidly. Zejména transplantační modely orgánů nebo tkání malých zvířat ukázaly, že činidla rušící vazbu CD40:CD154 podporují přežívání alogenních štěpů (transplantátů). Ve vybraných modelech přechodné podávání činidla interferujícího s kostimulací T-buněk vedlo k indukci trvalého přijetí štěpu. Přerušení vazby CD40:CD154 vedlo ke zvláště slibným výsledkům, neboť se zdálo, že účast tohoto páru receptoru a jeho protějšku předchází chronologicky i hierarchicky jiným kostimulačním signálům (Ranheim et al., J. Exp. Med. 177: 925-935, 1993, Roy et al., Eur. J. Immunol. 25: 596-603, 1995, Han et al., J. Immunol. 155: 556-567, 1995, Shinde et al., J. Immunol. 157: 2764-2768, 1996, Yang et al., Science 273: 1862-1864, 1996, Grewal et al., Science 273: 1864-1867, 1996, Lederman et al., J. Immunol. 149: 3817-3862, 1992. Blokování vazby CD40:CD154 vedlo k prodloužení srdečních alloštěpů (Larsen et al., Transplantation 61: 4-9, 1996, Larsen et al., Nature 381: 434-438, 1996), kožních

štěpů (Nature 381: 434-438, 1996, Merkees et al., Transplantation 64: 329-335) a alloštěpů ostrůvků (Parker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9560-9564, 1995, Rossini et al., Cell Transplant. 5: 49-52) u hlodavců a allogenních ledvin u primátů (Kirk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 194: 8789-8794, 1997). Bylo také demonstrováno zpoždění nástupu autoimunitního diabetu u neobézních diabetických (NOD)myši (Balasa et al., J. Immunol. 159: 4620-4627, 1997). Bylo také publikováno, že rušení vazby CD40:CD154 zabraňuje tvorbě zánětlivých cytokinů (Dechanet et al., J. Immunol. 159: 5640-5647, 1997, Kiener et al., J. Immunol. 155: 4917-4925, 1995).

Blokování CD40:CD154 tudíž poskytuje potenciálně účinnou terapii k prevenci selhání alloštěpu nebo xenoštěpu ostrůvků u jedinců s nemocí glukózového metabolismu, jako je např. diabetes typu I. Avšak jak bylo již zmíněno výše, všechny dříve publikované studie dlouhodobého přežívání štěpu u hlodavců se neshodovaly s výsledky testování na velkých zvířatech, zejména primátech.

Zde se popisují studie účinků výhodného činidla blokujícího CD154, humanizované protilátky s antigenně-vazebnými vlastnostmi monoklonální protilátky 5c8 (Lederman et al., J. Exp. Med. 175: 1091-1101, 1992) na preklinických modelech transplantace ostrůvků u velkých zvířat. Popisované modely zahrnují monoterapii činidlem blokujícím CD154 u paviánů (*Papio hamadryas*) a jiných primátů kromě člověka. Výsledky získané na těchto modelech silně podporují názor, že monoterapie blokování CD154 podporuje dlouhodobé přijetí tkáně tvořící inzulin u lidí, zejména u lidí trpících DM nebo podobnou poruchou homeostázy glukózy.

Následující diskuse demonstruje řadu okolností, za jakých lze vynález využít, a základní princip prokazující studii včetně příkladů specifických provedení vynálezu.

Příjemci

Vynález je možné využít při léčení nebo profylaxi u jakéhokoliv příjemce tkáňového štěpu produkujícího inzulin nebo u jakéhokoliv savce, který potřebuje transplantaci tkáně produkujícího inzulin. Výhodný příjemce (někdy též označován jako příjemce-hostitel nebo jen hostitel) je ten, který trpí nebo je ohrožen poruchou metabolické kontroly metabolismu krevní glukózy (glukózové homeostázy). Např. je příjemce hyper- nebo hypoglykemický. Vynález je zejména výhodný pro příjemce trpící diabetem, zvláště pro příjemce s *diabetes mellitus* (DM). Příjemce je výhodně primát, výhodněji vyšší primát a nejvýhodněji člověk. V jiných provedeních vynálezu je příjemcem jiný živočich, který potřebuje tkáňový štěp, zejména komerčně významný živočišný druh, nebo společenské domácí zvíře nebo jiný hodnotný živočich, jako např. příslušník ohroženého druhu. Takže k vhodným příjemcům patří (přičemž výčet není omezující) ovce, koně, krávy, kozy, prasata, psi, kočky, králíci, morčata, křečci, pískomilové, krysy a myši.

Dárci tkáňového štěpu

Vynález je možné využít při jakémkoliv druhu transplantace nebo přenosu tkáně produkující inzulin, zvláště pak tam, kde dárcovská tkáň (štěp) je ohrožena tím, že bude odhojena díky příjemcovu imunitnímu systému. Konkrétně je možné vynález využít vždy tam, kde dárcovská tkáň není histokompatibilní (MHC-kompatibilní) s příjemcem. Takže kromě autologní nebo syngenní dárcovské tkáně je možné užít vynález

pro allogenní nebo dokonce i xenogenní dárcovskou tkáň. Dárcovská tkáň může být získána konvenčním způsobem od dobrovolných dárců nebo jiných živých dárců nebo se může získat od zemřelého dárce (tj. z kadaveru). Výhodně je dárce histokompatibilní s příjemcem v nejvyšší možné míře. Pokud je příjemcem člověk, výhodná dárcovská tkáň je autologní a allogení. Avšak dárcovskou tkáň je možné získat z heterologního druhu (v takovém případě se označuje jako heteroštěp) jako např. z primátů jiných než člověk (šimpanz nebo pavián) nebo jiného relativně kompatibilního zvířete (např. prasete).

V některých provedeních vynálezu dárcovská tkáň (štěp, transplantát) je celý pankreas (slinivka břišní). V jiných provedeních vynálezu obsahuje štěp část nebo biopsii dárcovského pankreatu. Dárcovský pankreas může být získán od živého dárce nebo může být odebrán ze zemřelého dárce. Pokud se užije odběr z kadaveru, neměl by být pankreas vystaven chladu v ischemickém stavu déle než 8 hodin. V ještě dalších provedeních vynálezu dárcovskou tkáň představují buňky produkující inzulin, zvláště izolované nebo suspendované ostrůvky nebo buňky ostrůvků, včetně buněk vyjmutých nebo vyříznutých z fetálního či dospělého dárce, buněk udržovaných v primární kultuře nebo buněk imortalizovaných buněčných linií. Vhodné postupy k přípravě dárcovských ostrůvků nebo suspenzí buněk ostrůvků z celého pankreatu jsou odborníkům známy (viz např. Ricordi et al., 1988, 37 Diabetes, 413-420, Tzakis et al., 1990, 336 Lancet, 402-405, Linetsky et al., 1997, 46 Diabetes, 1120-1123). Vhodný pankreat lze získat od dárce, který v podstatě netrpí žádným defektem homeostázy krevní glukózy. K dalším zdrojům buněk tvořících inzulinu patří fetální prekursorové buňky ostrůvků, případně namnožené v primární kultuře. Je možné užít jakékoliv buňky, včetně

buněk obsahujících exogenní genetický materiál kódující exprimovatelný inzulinový gen. Takže vynález se také týká buněk nesoucích exogenní genetický materiál, jako jsou např. transfekované nebo transformované hostitelské buňky, které byly (nebo jsou odvozeny z takových buněk, které původně byly) upraveny metodami genového inženýrství tak, aby exprimovaly inzulin, buďto konstitutivním nebo indukovatelným způsobem (např. pod kontrolou promotoru nebo enhanceru odpovídajícího na glukózu). V dalších provedeních vynálezu mohou být pankreatické buňky nebo dárcovské buňky jiného typu získány z transgenních savců, kteří byly upraveni metodami genového inženýrství tak, aby obsahovaly v některých nebo ve všech tkáních těla genetický materiál nutný k produkci inzulinu.

Tkáň produkující inzulin (dárcovská tkáň) se vnáší systémově nebo lokálně do příjemce. Tak např. izolované, suspendované nebo dispergované buňky tvořící inzulin se podávají intravaskulární infúzí nebo implantovány na požadované místo jako jsou např. dutiny v kostní dřeni, játra, ledvinné pouzdro, nebo se mohou podat intramuskulárně nebo intraperitoneálně. V některých provedeních vynálezu jde o buňky, které nejsou mitoticky kompetentní, ale zůstávají živé v dárci a tvoří nebo exprimují inzulin. V každém případě se implantuje účinné množství tkáně nebo buněk tvořících inzulin, čímž se myslí množství, které je dostatečné k tomu, aby oslabilo (detekovatelně zmírnilo) nedostatky v glukózovém metabolismu příjemce (např. hypo- nebo hyperglykémii). V optimálním případě je toto množství dostatečné k tomu, aby obnovilo schopnost příjemce udržovat glukózovou homeostázu, tzn. osvobodilo ho od závislosti na konvenční (tj. pomocí injekcí nebo inhalací) inzulinové nahrazovací terapii.

V některých provedeních je tkáň tvořící inzulin fyzicky oddělena (izolována) od okolních tkání příjemce imunoizolačním zařízením. Vhodné zařízení chrání tkáň tvořící inzulin před výkonnými prvky buněčné a humorální imunity, včetně (aniž by výčet byl omezující) leukocytů, imunoglobulinů a komplementu. Imunoizolační zařízení obecně poskytuje semipermeabilní bariéru, jako je např. membrána, s póry velikosti dostatečné k tomu, aby zabránily difúzi molekul větších než 50 až 100 kD. Touto bariérou je vymezena izolační komůrka, ve které je uložena tkáň tvořící inzulin, a neobsahuje žádná místa, kde by přišla tkáň tvořící inzulin do fyzického kontaktu s buňkami nebo tkáněmi vně této bariéry. Je možné užít jakékoliv konvenční zařízení, obal, tobolku nebo mikrotobolku, včetně alginátových mikrotobolek s jednoduchou nebo dvojitou stěnou (viz např. patent US 5 227 298). K dalším konvenčním mikrotobolkám patří alginát-polylysinové tobolky, tobolky z chemicky zesítěného alginátu nebo jiných biokompatibilních polymerů, tvarované do strukturně spolehlivého imunoizolačního zařízení jakéhokoliv požadovaného tvaru a velikosti (viz např. Jaink et al., 1996, 61 Transplantation, 4).

V dalších provedeních vynálezu se implantuje hostiteli také tolerizační činidlo, jako jsou např. buňky kostní dřeně nebo buňky z ní pocházející. Jakákoliv tolerogenní tkáň nebo buňky se mohou použít jako tolerizační činidlo, včetně pankreatických stromálních buněk a buněk kostní dřeně. Tolerogenní buňky jsou MHC-kompatibilní s tkání tvořící inzulin a výhodně jsou získány z dárce, který poskytl tkáň tvořící inzulin nebo jsou s ním syngenní. Vhodné postupy k přípravě kostní dřeně nebo buněčných populací kostní dřeně jsou odborníkovi známy (viz např. Sharp et al., 1984, 69, J. Immunol. Meth. 187-195, Fontes et al, 1995, In: Methods in

Cell Transplantation, Ricordi, ed., R.G.Landes Co., s. 619-628). Výhodně se kostní dřeň zpracovává systémem Ceprate® SC Stem Cell Concentration System (CellPro, Inc., Bothell, WA, viz příručka CellPro Investigator, revidovaná 06.01.97, nebo obdobným, čímž se získá populace buněk kostní dřeně obohacená o hematopoetické buňky CD34(+). Standardní metodou fluorescencí aktivovaného třídění buněk (FACS) nebo imunofluorescenčním barvením lze zjistit, že populace buněk CD34(+) je v podstatě zbavena buněk CD40(+), avšak je možné pozorovat slabé barvení na CD40. Jelikož populace buněk CD34(+) je dynamická populace kmenových buněk, věří se, že přítomnost nízké hladiny buněk CD40(+) odpovídá frekvenci, s jakou zahajují diferenciaci směrem k buňkám B-řady. Skutečně předběžné studie s FACS ukázaly, že pouze buňky CD40(+) (které typicky představují ne více než 0,7 % celkového počtu) v populaci kmenových buněk CD34(+) jsou také CD19(+). CD19 je nejčasnější marker z dosud známých markerů buněk řady B. Tudiž aby se zajistilo, že se jako tolerizační činidlo užije skutečně populace kmenových buněk, buňky CD34(+) mohou být dále odděleny od buněk CD40(+) konvenčními metodami negativní selekce (např. selektivní cytolýzou, buněčným tříděním, tzv. rýžováním a pod.).

Příklady činidel rušících vazbu CD40:CD154

K terapeutickým sloučeninám vhodným pro způsoby podle vynálezu patří jakákoliv sloučenina, která blokuje interakci CD40 na buněčném povrchu (např. na B-buňkách) s CD40L (CD154) exprimovaným např. na povrchu aktivovaných T-buněk. Sloučeniny rušící vazbu CD40:CD154, jako je např. činidlo blokující CD154, které jsou specificky zahrnuty do vynálezu, jsou např. polyklonální protilátky a monoklonální protilátky (MAb), a také deriváty protilátek jako jsou chimérické

molekuly, humanizované molekuly, molekuly se sníženou efektorovou funkcí, bispecifické molekuly a konjugáty protilátek. Ve výhodném provedení vynálezu jde o protilátku, která má v podstatě stejné antigenně-specifické vazebné charakteristiky jako protilátka 5c8, která byla popsána v Patentu US 5 474 771, na který se tímto plně odkazujeme. V současném velmi výhodném provedení vynálezu je protilátka humanizovaná protilátka 5c8 (hu5c8). K dalším známým protilátkám proti CD154 patří protilátky ImxM90, ImxM91 a ImxM92 (od firmy Immunex Corp., Seattle, WA), monoklonální protilátka anti-CD40L komerčně dostupná od firmy Ancell (klon 24-31, katalog. č. 353-020, Bayport, MN) a monoklonální protilátka anti-CD154 komerčně dostupná od firmy Genzyme (Cambridge, MA, katalog. č. 80-3703-01). Také je komerčně dostupná monoklonální protilátka anti-CD154 firmy PharMingen (San Diego, katalog. č. 33580D). Mnohé další protilátky anti-CD40L byly připraveny a charakterizovány (viz např. přihláška WO 96/23071, Bristol-Myers Squibb, na jejíž popis se tímto odkazujeme).

Vynález se také týká použití dalších činidel blokujících CD154, jako jsou např. úplné fragmenty Fab, $F(ab')_2$, úseky V_H , V_L , jednořetězcové protilátky (viz např. WO 96/23071), polypeptidy, fúzní konstrukty polypeptidů, fúze obsahující CD40 (jako např. CD40Ig, viz publikace Hollenbaugh et al., J. Immunol. Meth. 188: 1-7, 1995) a sloučeniny s malými molekulami jako jsou malé semipeptidové sloučeniny nebo nepeptidové sloučeniny, schopné blokovat nebo přerušovat vazbu CD40:CD154. Způsoby, jak navrhovat malé molekuly, provádět jejich screening a optimalizovat je, byly popsány v patentové přihlášce PCT/US96/10664, podané 21. června 1996, na kterou se tímto odkazujeme.

Ve vynálezu lze užít protilátky připravené standardními technikami rekombinantní DNA (Winter a Milstein, Nature 349: 293-99, 1991). Např. lze připravit chimérické protilátky nebo fúzní proteiny, které jsou konstruovány tak, že antigen vázající doménu protilátky zvířete požadované specifčnosti spojena s lidskou konstantní doménou (protilátka získaná původně ze savce jiného než člověka, kde byla pomocí technologie rekombinantní DNA nahrazena celá nebo část kloubové oblasti a konstantní úsek těžkého řetězce a/nebo konstantní úsek lehkého řetězce odpovídajícími úseky lehkého nebo těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, viz např. Cabilly et al., patent US 4 816 567, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-55, 1984). Chimérické protilátky redukují imunogenní odpověď vyvolanou zvířecími protilátkami, když se použijí v klinickém ošetření nebo profylaxi u člověka.

Kromě toho mohou být syntetizovány rekombinantní "humanizované" protilátky. Humanizované protilátky jsou protilátky s požadovanou specifčností získané ze savce jiného než člověka, ve kterých byla technologie rekombinantní DNA užita k nahrazení některých nebo všech kodonů pro aminokyseliny, které nejsou potřeba pro navázání antigenu, jinými kodony pro aminokyseliny z odpovídajících úseků lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu člověka. Neboli jsou to chiméry obsahující z větší části lidské imunoglobulinové sekvence, do kterých byly vloženy metodami genového inženýrství úseky odpovídající za specifickou vazbu antigenu (viz např. patentová přihláška PCT W094/04679). Humanizované protilátky se získají tak, že se imunizují zvířata požadovaným antigenem, izolují se odpovídající protilátky a odstraní se část sekvence variabilního úseku zodpovědná za specifickou vazbu antigenu. Úseky vážící antigen pocházející

ze zvířete se pak klonují do vhodných míst lidských genů pro protilátky, ze kterých byly odstraněny úseky pro vazbu antigenu. Humanizované protilátky minimalizují použití heterologních (mezidruhových) sekvencí v protilátkách pro léčení lidí a vyvolávají tudíž s menší pravděpodobností nežádoucí imunitní odpověď. Podobně mohou být připraveny i primatizované plky.

Další provedení vynálezu zahrnují použití lidských protilátek, které lze připravovat ve zvířatech, např. v transgenních zvířatech, která nesou integrovaný jeden nebo několik lidských imunoglobulinových transgenů. Taková zvířata se mohou užít např. jako zdroj splenocytů pro přípravu hybridomů, jak bylo popsáno v patentu US 5 569 825.

Je také možné užít fragmenty monoklonálních protilátek nebo univalentní monoklonální protilátky. Univalentní protilátky obsahují dimer těžký/lehký řetězec vázaný k Fc úseku ("stonku") druhého těžkého řetězce. Úsek Fab označuje takový úsek řetězců, který je zhruba ekvivalentní nebo analogický sekvenci, která obsahuje úsek těžkého řetězce z oblasti rozvětvení ve tvaru Y a celý lehký řetězec, a který v agregátech projevuje protilátkovou aktivitu. Protein Fab obsahuje agregáty těžkého a lehkého řetězce (obecně známé jako Fab') a také tetramery, které odpovídají rozvětveným segmentům protilátky tvaru Y (známým jako $F(ab)_2$), ať už jsou agregovány kovalentně nebo nekovalentně, pokud jsou agregáty schopny selektivně reagovat s určitým antigenem nebo antigenní rodinou.

Kromě toho lze užít standardní techniky rekombinantní DNA ke změně vazebné afinity rekombinantních protilátek s jejich antigeny tím, že se změní aminokyselinové zbytky v blízkosti míst vázajících antigen. Vazebná afinita pro antigen humanizované protilátky se dá zvýšit mutagenezí

založenou na molekulárním modelování (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-33, 1989, PCT patentová přihláška WO 94/04679. Může totiž být žádoucí zvýšit nebo snížit vazebnou afinitu protilátek k CD40L, v závislosti na typu cílové tkáně nebo předpokládaném konkrétním léčebném schématu. To lze udělat pomocí metody fágové expozice ("phage display technique", viz např. Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12: 433-445, 1994 a Schier et al., J. Mol. Biol. 255: 28-43, 1996, které tímto zahrnujeme do odkazů). Např. může být výhodné podávat pacientovi konstantní hladinu protilátek se sníženou afinitou k CD40L s částečně profylaktickým cílem. Podobně protilátky se zvýšenou afinitou k CD40 mohou být výhodné pro krátkodobá léčení.

Způsoby podávání

Činidla rušící vazbu CD40:CD154, včetně činidel blokuujících CD154, použitá podle vynálezu, se mohou podávat jakýmkoliv lékařsky přijatelným způsobem. V závislosti na specifických okolnostech může být žádoucí lokální nebo systémové podávání. Výhodně se činidlo podle vynálezu podává parenterálně, např. intravenózní, intraarteriální, subkutánní, intramuskulární, intraorbitální, intraventrikulární, intraperitoneální, subkapsulární, intrakraniální, intraspinální nebo intranasální injekcí, nebo infúzí či inhalací. Činidlo může být také podáváno subjektu implantací infúzní pumpy nebo formou biokompatibilního nebo bioerodovatelného implantátu s dlouhodobým uvolňováním léčiva. Alternativně, některé sloučeniny podle vynálezu nebo přípravky, které je obsahují, jsou vhodné pro perorální podávání nebo enterální podávání. Další přípravky podle vynálezu jsou vhodné pro topické podávání.

V jiném provedení vynálezu se činidlo rušící vazbu CD40:CD154 poskytuje subjektu nepřímo, a to tak, že se podává vektor nebo jiný exprimovatelný genetický materiál kódující uvedené činidlo. Genetický materiál je internalizován a exprimován v buňkách nebo tkáni subjektu, čímž je *in situ* tvořeno činidlo rušící vazbu. Např. vhodný konstrukt nukleové kyseliny obsahuje sekvenční kódující jeden nebo několik imunoglobulinových (Ig) řetězců monoklonální protilátky MAb 5c8, jak je popsáno v patentu US 5 474 771. Další vhodné konstrukty obsahují sekvenční kódující chimérické nebo humanizované verze imunoglobulinových řetězců monoklonální protilátky 5c8 nebo její antigen vážící fragmenty. Ještě další vhodné konstrukty obsahují sekvenční kódující část nebo celou jinou monoklonální protilátku specifickou pro CD154. Konstrukty jsou podávány systémově nebo lokálně, např. do místa v blízkosti místa implantace inzulin-exprimující tkáně.

Alternativně je vektor nebo jiný genetický materiál kódující činidlo rušící vazbu internalizován vhodnou populací izolovaných buněk, čímž vzniknou hostitelské buňky produkující uvedené činidlo. Tyto hostitelské buňky se pak implantují příjemci nebo podávají infúzí, buďto lokálně nebo systémově, což poskytuje *in situ* tvorbu činidla rušícího vazbu CD40:CD154. K vhodným hostitelským buňkám patří kultivované buňky jako jsou např. imortalizované buňky, a také buňky získané z příjemce (např. buňky periferní krve nebo buňky lymfatických uzlin, např. tzv. cytotoxické NK buňky).

Obecně lze shrnout, že přípravky podle vynálezu se podávají příjemci štěpu. Avšak je možné je podávat také dárci nebo do dárcovské tkáně. Např. činidlo podle vynálezu může být součástí promývacího nebo konzervačního roztoku, ve

kterém se dárcovská tkáň uchovává nebo transportuje před přenesením do příjemce.

Formulace přípravků

Obecně jsou sloučeniny podle vynálezu suspendovány, rozpuštěny nebo dispergovány ve farmaceuticky přijatelném nosiči nebo excipientu. Výsledný terapeutický přípravek neovlivňuje nepříznivě příjemcovu homeostázu, zvláště pak elektrolytovou rovnováhu. Tak např. vhodný nosič obsahuje normální fyziologický roztok (0,15M NaCl, pH 7,0 až 7,4). Mnohé další přijatelné nosiče jsou odborníkovi dobře známy a jsou popsány v odborné literatuře, např. v publikaci "Remington's Pharmaceutical Sciences", Gennaro (ed), Mack Publishing Co., 1990. K přijatelným nosičům také patří nosiče obsahující biokompatibilní, inertní nebo biologicky absorbovatelné soli, pufrující činidla, oligo- nebo polysacharidy, polymery, činidla upravující viskozitu, konzervační látky apod.

Jakékoliv činidlo rušící vazbu CD40:CD154, jako je např. činidlo blokující CD154, které se užívá podle vynálezu, je formulováno tak, že se podává ve farmaceuticky účinném nebo terapeuticky účinném množství nebo dávce, což je množství, které je schopné vyvolat detekovatelný, výhodně lékařsky prospěšný, účinek u příjemce. Lékařsky prospěšný účinek znamená prevenci, zpoždění nebo zmírnění zhoršování zdravotního stavu nebo znatelné zlepšení zdravotního stavu příjemce. Např. funkce ledvin a stav alloštěpu nebo xenoštěpu ledvin se mohou monitorovat rutinním měřením koncentrace močovinového dusíku nebo kreatininu v krvi, objemem moči nebo látek rozpouštěných v moči nebo sledováním clearance relevantní látky z krve do moči. Podobně glukoregulační funkce a stav alloštěpu nebo xenoštěpu produkujícího inzulin

je možné monitorovat rutinním měřením koncentrace glukózy v krvi nebo moči, glukózových metabolitů nebo inzulinu, nebo měřením odpovědi inzulinu na glukózovou výzvu, např. pomocí konvenčního glukózového tolerančního testu. Takže účinné množství terapeutického přípravku podle vynálezu, jako je např. činidlo blokující CD154, je jakékoliv množství, které detekovatelným způsobem sníží závislost příjemce na inzulinové nahrazovací terapii. Optimální účinné množství je takové množství, které v podstatě odstraní závislost příjemce na exogenním inzulinu. Konkrétně účinné množství je takové množství, které indukuje částečné nebo úplné přijetí štěpu (přijmutí a funkci) dárcovské tkáně tvořící inzulin.

Dávkování a frekvence léčení

Velikost a frekvence dávek jakékoliv konkrétního přípravku podle vynálezu, který se má podávat pacientovi, spadá do kompetence a klinického úsudku příslušného odborníka v oboru lékařství, např. transplantačního chirurga. Všeobecné dávkování a režim podávání se stanoví na základě preklinických a klinických studií, které zahrnují extenzivní, ale rutinní studie k určení optimálních parametrů pro podávání dané sloučeniny. Dokonce i poté, co jsou poskytnuty tyto všeobecné pokyny pro podávání, ošetřující lékař často mění dávkování pro různé příjemce na základě řady úvah, týkajících se např. věku, zdravotního stavu, hmotnosti, pohlaví a případně léčení dalšími přípravky u konkrétního jedince. Stanovení účinných dávek a léčebného režimu pro každé z činidel přerušujících vazbu CD40:CD154 podle vynálezu, je rutinní záležitostí pro odborníky v oboru farmacie a lékařství. Dávky a léčebný režim by měly být dostatečné k tomu, aby způsobily klinicky prospěšnou změnu alespoň v jednom nebo několika klinických příznacích

pacientova zdravotního stavu. Příklady časového průběhu léčení a dávkovacího režimu jsou uvedeny v základní princip dokazující studii zahrnuté v příkladech. V podstatě se podává činidlo rušící vazbu CD40:CD154 (např. humanizovaná monoklonální protilátka 5c8, hu5c8) v režimu indukujícím přijetí, který je následován, pokud se považuje za potřebný, režimem udržovacím.

Abychom uvedli nějaký příklad dávkování anti-CD40L sloučeniny, uvádíme dávkovací strategii monoklonální protilátky anti-CD40L. Dávky lze podle toho snadno stanovit i pro jiné typy sloučenin anti-CD40L. Obecně připadá v úvahu jednotlivá dávka 0,05 až 50 mg/kg tělesné hmotnosti pacienta, přičemž nejčastější jsou dávky 1 až 20 mg/kg. Pro akutní léčení, např. před nebo v době transplantace nebo jako reakce na počáteční příznaky odvržení štěpu, účinná dávka protilátky je 1 mg/kg až 20 mg/kg tělesné hmotnosti podávaná denně po dobu 1 až 5 dnů, výhodně injekcí jako bolus. Stejně dávky a dávkovací režim je možné použít v zátěžové fázi a v udržovací fázi, kdy se v udržovací fázi podává intravenózně nebo intramuskulárně protilátky v dávce 0,1 mg/kg až 20 mg/kg tělesné hmotnosti po celou dobu léčení jedenkrát týdně až jedenkrát za tři měsíce. Chronické léčení lze provádět v udržovacím režimu, kdy se protilátky podávají intravenózně nebo intramuskulárně v dávce 0,1 mg/kg až 20 mg/kg tělesné hmotnosti jedenkrát týdně až jedenkrát za tři měsíce. Kromě toho lze chronické léčení provádět intermitentním intravenózním bolusovým režimem, kdy se podává protilátka v dávce 1,0 mg/kg až 100 mg/kg tělesné hmotnosti s intervalem mezi dvěma následnými dávkami 1 až 6 měsíců. Ve všech případech, kromě intermitentního bolusového režimu, může být způsob podávání také perorální, pulmonární, nasální nebo subkutánní.

Pokud je to třeba, účinnost protilátek je možné zvýšit tím, že se podávají sériově nebo v kombinaci s konvenčními přípravky a léky proti odhojení štěpu (např. kortikosteroidy nebo imunosupresiva). Alternativně mohou být protilátky konjugovány s konvenčními činidly. To výhodně dovoluje podávání konvenčních činidel v množství, které je menší než obvykle užívané dávky, např. méně než 50 % konvenční dávky, pokud by se činidlo podávalo v monoterapii. Tímto způsobem lze odstranit mnohé vedlejší účinky konvenčních činidel.

Kombinované terapie odhojení štěpu podle vynálezu zahrnuje použití protilátek anti-CD40L společně s činidly cílenými na B-buňky jako jsou např. protilátky anti-CD19, anti-CD28 nebo anti-CD20 (nekonjugované nebo radioaktivně značené), antagonisté IL-14, LJP394 (blokátor receptoru, LaJolla Pharmaceuticals), IR-1116 (malá molekula, Takeda) a anti-Ig idiotypové monoklonální protilátky. Alternativně mohou kombinace obsahovat činidla zaměřená na T-buňky/B-buňky, jako jsou např. CTLA4Ig, antagonisté IL-2, antagonisté IL-4, antagonisté IL-6, antagonisté receptorů, monoklonální protilátky anti-CD80/CD86, TNF, antagonisté LFA1/ICAM, antagonisté VLA4/VCAM, konjugáty brequinaru a IL-2 toxinu (např. DAB), prednison, monoklonální protilátka anti-CD3 (OKT3), mykofenolátmofetil (MMF), cyklofosfamid a další imunosupresiva jako jsou např. blokátory signalizace kalcineurinu, kam patří (aniž by výčet byl limitující) např. tacrolimus (FK506). Kombinace může také obsahovat činidla zaměřená na T-buňky, jako jsou antagonisté CD4, antagonisté CD2 a IL-12.

Pro udržování integrace štěpu nebo v období následujícím po akutní epizodě odhojení štěpu, se podávají, pokud je to třeba, udržovací dávky protilátek anti-CD40L, ať samotných nebo v kombinaci s konvenčními přípravky proti odhojení. Po

té je možné snížit dávku nebo frekvenci podávání nebo obojí. Pokud nejsou žádné příznaky odhojení štěpu, léčení může ustát, přičemž trvá pečlivé monitorování příznaků odhojování. V jiných případech, pokud tak stanoví odborník, lze podávat přípravky občasné, např. v intervalu 4 týdny nebo delším. Avšak příjemce může potřebovat intermitentní léčení dlouhodobě pokud se kdykoliv znovu objeví symptomy nemoci.

Příklady provedení vynálezu

Preklinické modelové systémy pro hodnocení léčebných režimů činidla rušící vazbu CD40:CD154

Příkladem výhodného modelového systému pro testování účinnosti činidla rušícího vazbu CD40:CD154 (např. anti-CD40L sloučeniny nebo činidla blokujícího CD154 jako je monoklonální protilátka se specificitou protilátky 5c8) jsou modely alloštěpu ostrůvků u primátů (pavián an makak "rhesus") popsané v prozatímní patentové přihlášce US S.N. 60/050 267 (06/20/97), na jejichž popis se tímto odkazujeme. Popisované modely na primátech se ukázaly opakovaně jako velmi rigorózní modely pro testování ovlivňování imunity, jsou extrémně citlivé na sebemenší změny ve funkci alloštěpu nebo na nepříznivé změny v hojení rány u příjemce nebo funkce imunitního systému. Kromě toho vykazují zřejmou biologickou podobnost s transplantací ledvin u člověka. Zvláště geny, které kódují proteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) jsou velmi konzervativní při srovnání těchto primátů a člověka a odhojení (rejekce) vaskularizovaných orgánů je paralelou toho, co je pozorováno klinicky.

Příklad 1

ICT u paviána jako model pankreatektomií indukovaného diabetu

Identifikace párů dárce-příjemce

Ve smíšené leukocytové kultuře (MLC) se užily mononukleární buňky periferní krve (PMBC) z 10 paviánů (*Papio hamadryas*, samice i samci, stáří 1 až 2 roky, hmotnost asi 4 kg) - potenciálních příjemců z Mannheimské stanice (Homestead, FL) jako buňky odpovídající na PMBC z 11 dárců (samice, stáří více než 2 roky, zakoupené od Southwest Foundation, Texas). MLC z paviánů se prováděly standardizovaným způsobem pro lidské MLC. Vzhledem k nízkému pozadí a vysoce specifické reaktivitě, použití média doplněného lidským sérem vedlo k vynikajícím výsledkům, ve srovnání s médiem s telecím sérem nebo sérem paviána. Dárci byly dostatečně velcí na to, aby se získalo z jednoho dárce dostatek tkáně ostrůvků a kostní dřeně pro transplantaci dvěma příjemcům. V kontrastu k mírné reakci MLC, když byly použity PMBC zvířat z Mannheimu jako odpovídající a stimulující buňky byla reaktivita MLC mezi těmito zvířaty vynikající, se všemi potenciálními příjemci byl stimulační index (S.I.) nejméně 10 proti stimulátoru (dárce, pozadí menší než 200 až 300 impulzů za minutu, cpm). Byla snaha vybrat dva příjemce s podobnou MLC reaktivitou k jednomu určenému dárce a byly vybrány páry příjemce-dárce s různou mírou alloreaktivity. MLC S.I. vyšší než 10 byl považován za indikaci vysoké reaktivity a byl zvolen jako nejmenší přijatelná rozdílnost. Jen pro srovnání, pokud byla zvířata z Mannheimu užita jako dárce a příjemci, MLC S.I. byl obvykle menší než 5.

Příprava ostrůvků/kostní dřeně a přenos

Ostrůvky byly vyjmuty z pankreatu jeden den před ICT (tj. den -1 studie) mírně modifikovanou automatizovanou metodou pro izolaci lidských ostrůvků (viz Ricordi et al., Diabetes 37: 413-420, 1988, Selvaggi et al., Transplant. Proc. 29: 1967-1968, 1997) pomocí liberázy (Liberase®, 0,47 mg/ml roztok kolagenázy, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). Doba chladové ischemie pankreatu byla přibližně $0,5 \pm 0,1$ hodiny. Ostrůvky byly izolovány pomocí trojvrstevného diskontinuálního gradientu Euroficollu (1,108, 1,096, 1,037), kde natrávená tkáň pankreatu byla nanášena do spodní vrstvy 1,108. Separátor buněk COBE 299 1 (COBE, Lakewood, CO) byl použit k odstředění gradientů (Robertson, Chadwick, Contractor, James, London, Acta Diabetologica 30: 93-98, 1993). Počet, objem a čistota získaných ostrůvků byly stanoveny následujícím způsobem: poslední preparát ostrůvků byl suspendován ve 250 ml roztoku RPMI 1640 a tři vzorky po 100 μ l byly obarveny dithizonem (Latif et al., Transplantation 45: 827-830, 1988) a spočítány, aby se vyhodnotil celkový výtěžek ostrůvků, a data pak byla matematicky zpracována, aby byl stanoven celkový počet ostrůvků s průměrnou hodnotou průměru 150 μ m (ostrůvkový ekvivalent, IEQ) (Ricordi, Acta Diabetol. Lat. 27: 185-195, 1990).

Pro studium zvyšování tolerance byla odebrána tkáň těla obratlů z dárců pankreatu a zpracována modifikovaným rutinním způsobem používaným pro lidské obratle, aby se získaly buňky kostní dřeně dárce (DBMC). Příjemcům dárcovské kostní dřeně byly podávány infuze 5. a 11. den po ICT, celková podaná dávka byla 10^9 jaderných buněk na 1 kg tělesné hmotnosti příjemce.

Znehybnění zvířat

pro chemické znehybnění zvířat byl injikován ketaminhydrochlorid do sedacího svalu (10 mg/kg tělesné hmotnosti). Prodlouženého sedativního účinku bylo dosaženo podáváním ketaminhydrochloridu i.m. v dávce 5 mg/kg. Další ketamin byl podáván kdykoliv se ukázalo, že zvíře reaguje na podnět štípnutím. Jelikož předchozí studie ukázaly, že ketamin redukuje první fázi inzulinové odpovědi na glukózu (FPIR), byly dávky ketaminu udržovány na nejnižší možné míře ve všech metabolických testech (lehmann et al., J. Med. Primatol. 26: 312-321, 1997). Celková dávka ketaminu k udržení dostatečného zklidnění po dobu 30 minut byla 35 ± 2 mg/kg. Zvířata byla fyzicky znehybněna sedativním účinkem ketaminu. Místa, kde došlo k chirurgické nebo cévní penetraci byla ošetřena betadinem a alkoholem. Vnitřní katétry byly umístěny intravenózně a zajištěny.

Pankreatektomie (odstranění pankreatu) a ICT

V den, kdy se prováděla ICT (den 0 studie) byl preparát ostrůvků centrifugován a palet byl resuspendován v doplněném médiu CMRL1066 a pak přes noc kultivován ve 22 °C. Před transplantací byl preparát centrifugován a pelet byl resuspendován ve 20 ml roztoku RPMI 1640 obsahující 2,5% dárcevého sérum a 200 IU heparinu. Počet IEQ byl stanoven bezprostředně před transplantací. Celková pankreatektomie byla provedena obvyklým chirurgickým způsobem. Po jejím provedení byl angiokatétr 20G zaveden do jednoho z mesenterických přítoků vrátnice a ICT byla provedena gravitační infúzí preparátů ostrůvků po dobu 10 minut.

Imunosuprese a pooperační péče

Jako vhodné imunosupresivum byl vybrán FK506 (tacrolimus), neboť tento lék se běžně užívá při ICT u člověka. Podávání FK506 bylo zahájeno 5 dnů před ICT. Paviánům - příjemcům se podávala dávka 0,1 mg/kg/den i.m. Hladina léčiva se monitorovala denně a dávky se upravovaly tak, aby se udržovala hladina přibližně 15ng/l. Humanizovaná anti-CD154 (odvozená z monoklonální plky 5c8, viz Ledermann et al., J. Exp. Med. 175:1091-1101, 1992) byla podána i.v. v den studie -1, 3 a 10 v dávce 10 nebo 20 mg/kg a hladina 5c8 a anti-5c8 v krvi byla stanovena pomocí ELISA testu.

První pooperační den (den studie 1, POD1) dostaly paviáni intravenózně tekutiny. Pak byla zvířata krmena dietou obsahující 60 g sacharidů denně sestávající z 45 g opičích sušenek (s přídatkem viokázy) a 15 g ovoce. Na základě zkušeností s prvními dvěma zvířaty léčenými anti-CD154, byla dalším zvířatům podávána subkutánně malá dávka inzulínu (0,5 U/kg tělesné hmotnosti na den) po dobu 14 až 20 dnů po transplantaci ostrůvků, aby se zabránilo "vyčerpání" ostrůvků a tím se optimalizovaly podmínky nezbytné pro úspěšné přijetí štěpu.

Monitorování

Hladina krevní glukózy po hladovění (FG) a po jídle (PPG) odběry krve z paty a testováním pomocí glukometru Elite alespoň jednou týdně a vzorky krve byly odebrány k získání plazmy pro stanovení FG pomocí analyzátoru glukózy firmy Beckmann. Krevní vzorky byly také odebrány pro potvrzení obvykle vysokých hodnot. Krevní vzorky byly odebrány od všech zvířat ve studii anti-CD154 před každou dávkou monoklonální protilátky (před dnem -1 a pak právě před podáním protilátky 3. a 10. den). Přibližně 3 měsíce po transplantaci byla

frekvence testování snížena na 1x za 2 týdny. Krevní vzorky byly užity pro fenotypizaci periferní krve k vyhodnocení populací leukocytů a stanovení CBC a chemického složení, hladiny 5c8 a anti-5c8, inzulinu a C-peptidu a chimérismu. Krev byla také pravidelně odebírána pro opakované testování MLC reaktivity na antigeny dárce a antigeny třetí strany.

Testy

Plazmatický inzulin byl stanovován metodou s dvěma protilátkami (Linco Research, Inc., St. Charles, MO). Spodní limit detekce byl 20 pmol/l a průměrný mezitestový koeficient rozptylu byl 6 %. Plazmatická glukóza byla měřena pomocí analyzátoru glukózy (Beckmann Instruments, Palo Alto, Ca). celková hladina glukózy v krevních kapilárách byla měřena glukometrem Elite (Bayer, Elkhart, IN). Platnost inzulinových testů byla demonstrována srovnáním koncentrací inzulinu v ředěném séru s inzulinovou standardní křivkou. Glukagon byl měřen také metodou s dvěma protilátkami (DPC, Los Angeles, CA). Tyto komerční soupravy byly před použitím ověřeny pomocí sériového ředění (Goodner et al., Diabetes 38: 925-931, 1989).

Intravenózní glukózový toleranční test (IVGTT)

Bylo již dříve ukázáno, že *in vivo* test funkce buněk ostrůvků poskytuje přesný obraz změn v hmotnosti β buněk (McCulloch et al., Diabetes 40: 673-679, 1991). Intravenózní glukózový toleranční test se prováděl po 16 až 18hodinovém hladovění přes noc, jak bylo již publikováno (Lehmann et al., J. med. Primatol. 26: 312-321, 1997). Ve stručnosti: vzorky krve byly odebrány v čase -10, -5 a 0 minut. Pak bylo injikováno 0,5 g glukózy na 1 kg tělesné hmotnosti ve formě 50% roztoku glukózy během 20 sekund do vena saphena. Pak se

odebíraly 1,5ml vzorky z kontralaterální femorální arterie 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 a 30 minut po injekci. Celkem bylo tedy odebráno 12 vzorků krve během 40 minut. Vzorky byly přeneseny do skleněné zkumavky obsahující 0,05 ml 15% EDTA a 0,2 ml trasyolu (500 K.I.U. aprotinin/ml krve), umístěny na led a do deseti minut stočeny. Plazma pak byla zamražena v -80 °C a později testována na glukózu, imunoreaktivní inzulin a glukagon.

Statistická analýza a výpočty

Výsledky jsou uváděny jako průměrná hodnota $\pm$ střední chyba průměru (SEM). Z IVGTT byla vypočtena konstanta ubývání glukózy (Kg) jako velikost směrnice poklesu funkce $\log_e$ (ln) plazmatické glukózy mezi 10. a 30.minutou po injekci glukózy vynásobená 100. Akutní inzulinová odpověď na glukózu (AIRG) se vypočetla jako přírůstek plochy pod křivkou inzulinu (AUC) mezi 1. a 10. minutou po IV injekci glukózy. Přírůstkové odpovědi (AUCglukóza, AUCinzulín) byly počítány pomocí lichoběžníkového pravidla s odečtením základní hodnoty od 1 do 30. minuty. Data byla analyzována programovým vybavením "Statistica for Windows" (verze 5,0, 1997, Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Výsledky

Terapie blokování CD154 prodlužuje přežívání a funkci alloštěpu ostrůvků

Všichni pavíani měly bezprostředně po transplantaci normální glykemii. Jak je ukázáno v tabulce 1, ICT allogenních ostrůvků, v nepřítomnosti imunosupresiv nebo terapie blokující CD154, vedla k odhojení 8. den. Konvenční imunosuprese pomocí FK506 (samotného nebo v kombinaci

s buňkami kostní dřeně nebo selektovanými kmenovými buňkami z kostní dřeně) nevedla ke zlepšení přežívání ostrůvků, k odhojení došlo 10, 8 a 10. den. naproti tomu, léčení monoklonální protilátkou anti-CD154 (5c8) vedlo u 4 zvířat z 5 k podstatnému prodloužení života alloštěpu ostrůvků ve srovnání s kontrolními zvířaty léčenými FK506. Výsledky z této studie jsou ukázány také v grafu na obr. 1, kde je vynesena hladina krevní glukózy po hladovění (FG) jako funkce dnů po operaci (POD). Předkládané výsledky ukazují, a to poprvé, že terapie blokování CD154 prodlužuje dobu snášení alloštěpu ostrůvků na modelu pankreatektomií indukovaného diabetu u primátů. Významné je, že výsledky také demonstrují schopnost terapie anti-CD154 zvrátit akutní rejekci.

Terapie blokování CD154 se může aplikovat společně s přenosem buněk kostní dřeně

Tři paviáni obdrželi opožděnou infúzi kompletní kostní dřeně (n=2) nebo selektovaných kmenových buněk (pomocí kolony Ceprate® firmy CellPro, Bothell, WA) kostní dřeně (n=1) 5. a 11. pooperační den (POD 5 a 11). Paviáni byli podrobeni 5c8 indukční terapii (20 mg/kg ve dny -1, 3 a 10) a pak měsíční udržovací terapii počínaje dnem POD 28. Jedno zvíře si vedlo extrémně dobře, bylo zcela bez příznaků rejekce až do 241. dne (POD 241). U druhého zvířete se projevila rejekce 112. pooperační den (POD 112), pak bylo udržováno až do 162. pooperačního dne. Léčení třetího zvířete začalo 70. den a udrželo se do 124. dne.

Účinek terapie blokování CD154 na funkci štěpu včetně kontroly glukózového metabolismu

Opakované testy IVGTT u kontrolních zvířat ukázaly vynikající reprodukovatelnost první fáze sekrece inzulinu

(FPIS). Zvláště jeden test tolerance glukózy (IPGTT) a imunohistochemie provedené na zvířeti utraceném 79. den prokázaly funkční tkáňový štěp v játrech bez jakékoliv reziduální tvorby inzulinu jinde než v játrech. U ostatních zvířat byly zjištěny funkční alloštěpy ostrůvků s přežíváním delším než 125 až 220 dnů. Opakované IVGTT v období 4 až 16 týdnů po pankreatektomii a transplantaci ostrůvků ukázaly téměř shodné hodnoty Kg u všech zvířat až po 8. pooperační týden. Hodnota Kg se pak snižovala u paviánů léčených hu5c8 v okamžiku rejekce. Stabilní hodnoty byly pozorovány u paviánů léčených udržovacími dávkami hu5c8. Hmotnost ostrůvků, určená pomocí FPIS, se s časem snižovala po každé epizodě rejekce. Naproti tomu hodnota FPIS (až dop 16. týdne) po transplantaci u zvířat na udržovací terapii hu5c8 se dobře držela. Byla sledována také dvě kontrolní zvířata. při některých IVGTT technické problémy vyvolaly potřebu podat více ketaminu než v předchozí studii, což vedlo ke snížení hodnot Kg a FPIR. Avšak dále po standardních dávkách ketaminu se tyto indikátory vrátily k normálu.

V průběhu této studie bylo zjištěno, že odhojení štěpu je možné detekovat ještě před zvýšením FG hodnocením 2hodinového PPG. Historicky rejekce štěpu ostrůvků byla definována tím, když dvě po sobě následující FG byly vyšší než 250 mg/dl. Avšak nyní bylo zjištěno, že dvě po sobě následující 2hodinové PPG vyšší než 150 mg/dl poskytují citlivý indikátor časného stadia rejekce štěpu. Aplikace terapie proti rejekci, ať už činidla blokujícího CD154 nebo konvenčního činidla, může být nasazena dostatečně včas v rané fázi odhojení, takže umožní zachránit metabolicky aktivní tkáň štěpu. Pro záchranu odhojované tkáně pomocí 5c8 byl opakován stejný dávkovací režim jako byl užít pro indukci přijetí štěpu.

Závěry ze studie na paviánech

Studie prokázala, že 5c8 podporuje přijetí ostrůvků, dovoluje dlouhodobé přežívání allogenních ostrůvků a nemá žádné vedlejší škodlivé účinky ani na sekreci inzulínu ani na celkovou inzulínovou citlivost. Navíc tyto studie poprvé prokázaly, že pomocí blokování CD154 může být štěp udržován a že je možný zvrát epizod rejekce ostrůvků na modelu velkých zvířat. Zde uvedené terapie mohou vést k uchování sekrece inzulínu a celkové inzulínové citlivosti na úrovni před transplantací buněk ostrůvků u velkých zvířat.

Tabulka 1

prodloužení přežívání alloštěpu u primátů (kromě člověka)
pomocí anti-CD154

Skupina	N	Druh	Doba nezávislosti na inzulínu (dny po operaci, POD)
Kontrola	1	Pavián	8
FK506	3	Pavián	8, 10, 10
anti-CD154 indukce+antirejekce	5	Pavián	^a 8, ^b 59, ^c 229, ^d 264, ^e 284
anti-CD154 indukce+udržování	2	Pavián	^f 113, ^g 238
anti-CD154 indukce+udržování	4	Makak "rhesus"	16, >80, >94, >166

a) dostal sníženou dávku 5c8

b) zvíře 34R, utraceno 79. den po operaci (79 POD) s částečnou funkcí, epizoda rejekce 58. POD úspěšně zastavena

c) zvíře 12R, utraceno 302. POD s částečnou funkcí, šest úspěšně léčených epizod rejekce od 59. POD

- d) zvíře 29R, utraceno 300. POD s úplnou rejekcí, jedna epizoda rejekce
- e) zvíře 14R, utraceno 301. POD s částečnou funkcí, čtyři úspěšně léčené epizody rejekce od 31. POD
- f) utraceno 130. POD, úplná rejekce
- g) utraceno 253. POD, částečná funkce
- h) viz diskuse dále
- i) uhynulo, nezávislé na inzulinu, z důvodu částečné intestinální obstrukce

Příklad 2

ICT u makaka jako model pankreatektomií indukovaného diabetu

Pokud nebude uvedeno jinak, všechny postupy byly obecně shodné s postupy popsányi ve studii na paviánech.

Zvířata

Makakové "rhesus" SPF stáří 2 až 7 let se dají získat od COVANCE (Alice, TX) nebo Mannheimer Foundation, Inc. (Homestead, FL) nebo podobného prodejce. Po přijetí byla všechna zvířata vyšetřena, aby se určil jejich všeobecný zdravotní stav, fyzický a psychický stav. Zvířata hladověla 12 až 18 hodin před chirurgickým zákrokem a byla předběžně anestetizována i.m. ketaminem (10 mg/kg) a atropinem (0,04 mg/kg). Jakmile bylo zvíře zklidněno, bylo endotracheálně intubováno a byl zaveden i.v. katetr. Endotracheální intubace byla užita pro ochránění dýchacích cest a pro případ nouzového podání léku. Zvířat byla anestetizována kombinací isofluranu a kyslíku. V průběhu celé procedury ICT byla katetrem podávána infúze fyziologického roztoku pro injekce rychlostí 10 ml/kg/hod.

Středovou incizí byl vytvořen přístup k orgánům břišní dutiny. Jak u dárce tak u příjemce byla provedena totální

pankreatektomie s uchováním duodena. Ostrůvky byly izolovány konvenčními prostředky z pankreatu dárce pro následnou transplantaci do diabetického příjemce. Po odkrvení dárce v anestézii byla odebrána břišní incizí hmota obratlů pomocí Strikerovy pilky. Kost byla ihned ošetřena tak, aby se získala kostní dřeň. U některých příjemců byly buňky kostní dřeně použity k infúzi příjemci prostřednictvím cefalické cévy pomocí soupravy typu y s filtrem.

Po pankreatektomii příjemce byl do přívodu dolní nebo horní mesenterické žíly zaveden katetr a ostrůvky byly přeneseny gravitační drenáží do jater. Poté byl řez uzavřen obvyklým způsobem. Na konci procedury byla zvířat pouze pod kyslíkem a když zvířata procitla natolik, že byla schopna sama dýchat, byla odstraněna endotracheální intubace. Po ICT byly příjemci umístěni v klecích na jednotce intenzivní péče a pozorování dokud se klinicky nestabilizovali. Pooperačně byla podávána antibiotika (Baytril, 5 mg/kg i.m., jednou za 24 hod po 5 dnů). Bupomorfin (0,05 mg/kg, i.m.) byl v nutném případě jako analgetikum.

Po operaci opice hladověly a 1. den (POD 1) dostaly gatorade p.o. 2. den (POD 2) dostávaly 2x denně slabou dietu, obsahující banán a zředěnou (vodou) vysokoproteinovou stravu pro opice obsahující viokázu (1 banán a 4 sušenky). Od 3. dne pokračovala normální strava (6 až 8 sušenek s viokázou, ovoce, 2x denně). Každé zvíře bylo krmeno jednotlivě, aby se zabránilo kompetici během krmení. Nemocní jedinci byli krmeni ručně, aby se zlepšil jejich celkový stav a výživa. Zvířata v kritickém stavu byla v izolaci, doku se jejich stav nezlepšil. Zvířata, u kterých byla shledána neléčitelnými nebo v terminálním stadiu, byla utracena rychlou i.v. injekcí chloridu draselného i.v. katetrem.

Monitorování

Vzorky krve pro sledování glukózy a inzulinu a imunologie nepřesáhly nikdy 1 % tělesné hmotnosti nebo 7 % během měsíčního období. Hladina glukózy po hladovění (FG) byla stanovena z malé kapky krve získané bodnutím skalpelu paty pomocí glukometrického proužku. V určitých případech, např. pokud byla vysoká glukózy (>200 mg/dl) byla napíchnuta žíla, aby se získala plazma pro změření na analyzátoru glukózy Beckmann. Vzorky krve byly také odebírány před a pak v několika intervalech po transplantaci ke stanovení protidárcovské imunoreaktivity příjemce. Intravenózní glukózové toleranční testy (IVGTT) byly prováděny jak bylo popsáno v předchozím příkladu, před transplantací a v 4 až 6 týdenních intervalech po transplantaci.

Výsledky

Terapie blokování CD154 prodlužuje přežívání a funkci alloštěpu ostrůvků u makaků "rhesus" s diabetem a pavíánů

Jak bylo již ukázáno v tab. 1, tato studie demonstrovala, že terapie s hu5c8 prodlužuje dobu snášení štěpu ostrůvků i u dalšího druhu primátů. V této studii byl užit režim indukce přijetí podáváním hu5c8 v den -1, 0, 3 a 10. Pak následoval měsíční udržovací režim, aby se udržela sérová hladina 5c8. Výsledky, uvedené také na obr. 2, jsou překvapivé: funkční alloštěpy ostrůvků se udržují aniž by došlo k epizodě rejekce (odhojení). Význam tohoto zjištění je podtržen ještě srovnatelnými údaji uvedenými na obr. 3, kde kromě studie na makaku je ukázána FG člověka (jménem LAURA) trpícího DM a léčeného intenzivní inzulinovou nahrazovací terapií. DM byla u LAURY diagnostikována ve věku 14 měsíců

a v době studie, kdy byla stará 6 let, dostávala inzulínové injekce 2 až 3x denně.

Ekvivalence

Předkládaný vynález může mít i jiné výhodné formy provedení, které jsou taktéž výsledkem stejné vynálezecké činnosti. Uvedené příklady jsou proto pouze ilustrativní a vynález nijak neomezuje. Předmět vynálezu je definován následujícími patentovými nároky a spadají do něho také všechny změny a modifikace ve smyslu ekvivalence.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 pro výrobu léku k inhibici odhojení (rejekce) tkáňového štěpu tvořícího inzulin příjemcem štěpu, kterým je primát, přičemž se lékem podává příjemci štěpu účinné množství činidla.
2. Použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 pro výrobu léku k prodloužení přežívání transplantované tkáně tvořící inzulin u příjemce štěpu, kterým je primát, přičemž se lékem podává příjemci štěpu účinné množství činidla.
3. Použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 pro výrobu léku pro reverzi akutního odhojení transplantované tkáně tvořící inzulin u příjemce štěpu, kterým je primát, přičemž se lékem podává příjemci štěpu účinné množství činidla.
4. Použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 pro výrobu léku k uchování funkce transplantované tkáně tvořící inzulin u příjemce štěpu, kterým je primát, přičemž se lékem podává příjemci štěpu účinné množství činidla.
5. Použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 pro výrobu léku k obnovení funkce poškozené transplantované tkáně tvořící inzulin u příjemce štěpu, kterým je primát, přičemž se lékem podává příjemci štěpu účinné množství činidla.
6. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4 nebo 5, kde činidlo rušící vazbu CD40:CD154 je: a) činidlo blokující CD154 (CD40L), nebo b) monoklonální protilátka, nebo c) monoklonální

protilátka, která má antigenně specifické vazebné charakteristiky protilátky 5c8 připravené z ATCC č. HB 10916.

7. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4, nebo 5, kde tkáň tvořící inzulin je a) tkáň celého pankreatu, b) izolované pankreatické ostrůvky, c) populace buněk obsahující izolované dospělé β buňky ostrůvků, d) populace buněk obsahující izolované fetální β buňky ostrůvků, e) populace buněk obsahující kultivované β buňky ostrůvků, f) populace buněk obsahující imortalizované β buňky ostrůvků, g) populace buněk obsahující hostitelské buňky stabilně exprimující inzulinový gen, nebo h) populace buněk obsahující hostitelské buňky indukovatelně exprimující inzulinový gen.
8. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4, nebo 5, kde tkáň tvořící inzulin je fyzicky oddělena od tkáně příjemce imunoizolačním zařízením.
9. Použití podle nároku 8, kdy imunoizolační zařízení a) obsahuje semipermeabilní membránu, kterou je vymezena izolovaná komůrka, v níž je umístěna tkáň tvořící inzulin, nebo b) je tobolka, nebo c) je mikrotobolka.
10. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4, nebo 5, kde tkáň tvořící inzulin je allogenní nebo xenogenní pro příjemce tkáňového štěpu.
11. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4, nebo 5, kdy příjemcem tkáňového štěpu je člověk.

12. Použití podle nároku 11, kdy příjemce štěpu trpí poruchou metabolické kontroly metabolismu glukózy.
13. Použití podle nároku 12, kdy příjemce štěpu má *diabetes mellitus*.
14. Použití činidla rušícího vazbu CD40:CD154 pro výrobu léku k obnovení metabolické kontroly metabolismu glukózy u primáta, který to potřebuje, kdy a) primátovi se implantuje účinné množství tkáně tvořící inzulin a b) primátovi se podá účinné množství uvedeného činidla.
15. Použití podle nároku 14, kdy činidlo rušící vazbu CD40:CD154 je monoklonální protilátka, která má antigenně specifické vazebné charakteristiky protilátky 5c8 připravené z ATCC č. HB 10916.
16. Použití podle nároku 15, kdy monoklonální protilátka se podává před implantací tkáně.
17. Použití podle nároku 15, které obsahuje dodatečný krok, kdy se opakuje podávání monoklonální protilátky alespoň dvakrát během období dvou týdnů po implantaci tkáně.
18. Použití podle nároku 17, které obsahuje další dodatečný krok, kdy se opakuje podávání monoklonální protilátky přinejmenším jeden měsíc po implantaci tkáně.
19. Použití podle nároku 17, které obsahuje ještě další dodatečný krok, kdy se opakuje podávání monoklonální protilátky měsíčně, počínaje přinejmenším dva měsíce po implantaci tkáně.

20. Použití podle nároku 14, kde se dále a) implantuje primátovi účinné množství činidla vyvolávajícího toleranci.
21. Použití podle nároku 20, kde činidlo vyvolávající toleranci je tkáň kostní dřeně, která je MHC-kompatibilní s tkání tvořící inzulín.
22. Použití podle nároku 21, kde činidlo vyvolávající toleranci je a) tkáň kostní dřeně, která je syngenní s tkání tvořící inzulín, nebo b) úplná kostní dřeň, nebo c) populace hematopoetických buněk CD34(+), nebo d) populace hematopoetických buněk CD34(+), které jsou současně CD40(-).
23. Způsob detekce poškození metabolické kontroly glukózového metabolismu u savce v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se a) získá, alespoň jednu hodinu a méně než šest hodin po té, co savec přijal potravu, první vzorek obsahující krev savce, b) stanoví obsah glukózy v prvním vzorku, a c) určí se, zda obsah glukózy v prvním vzorku přesahuje 150 mg/dl.
24. Způsob podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje další kroky, kdy se a) získá druhý vzorek obsahující krev savce, nejméně čtyřiaadvacet hodin po získání prvního vzorku a alespoň jednu hodinu a méně než šest hodin po té, co savec přijal potravu, b) stanoví obsah glukózy v druhém vzorku, a c) určí se, zda obsah glukózy v druhém vzorku přesahuje 150 mg/dl.

25. Způsob podle nároku 23 nebo 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeden z prvního či druhého vzorku nebo oba vzorky se získají dvě hodiny po té, co savec přijal potravu.
26. Způsob podle nároku 23 nebo 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že savec má subklinickou poruchu metabolismu krevní glukózy.
27. Způsob podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že savec je ohrožen tím, že se u něho vyvine *diabetes mellitus*.
28. Způsob podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že savec je příjemce allogenní nebo xenogenní tkáně tvořící inzulín.
29. Způsob podle nároku 23 nebo 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že savec je člověk.

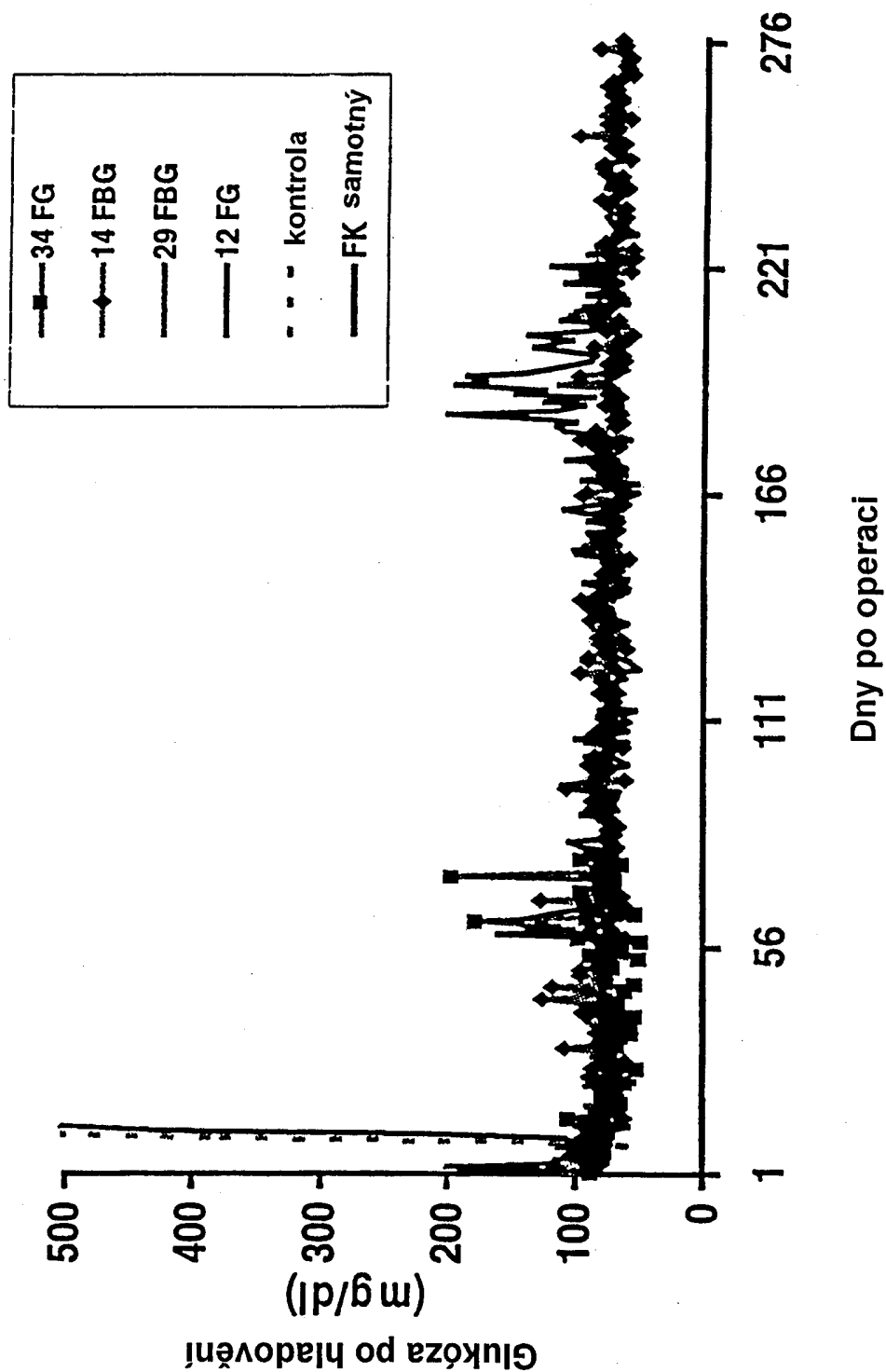
17.10.99

PV 1999 - 4616

1/3

Obr. 1

Prodloužení přežívání alloštěpu ostrůvků
u paviana pomocí anti-CD154



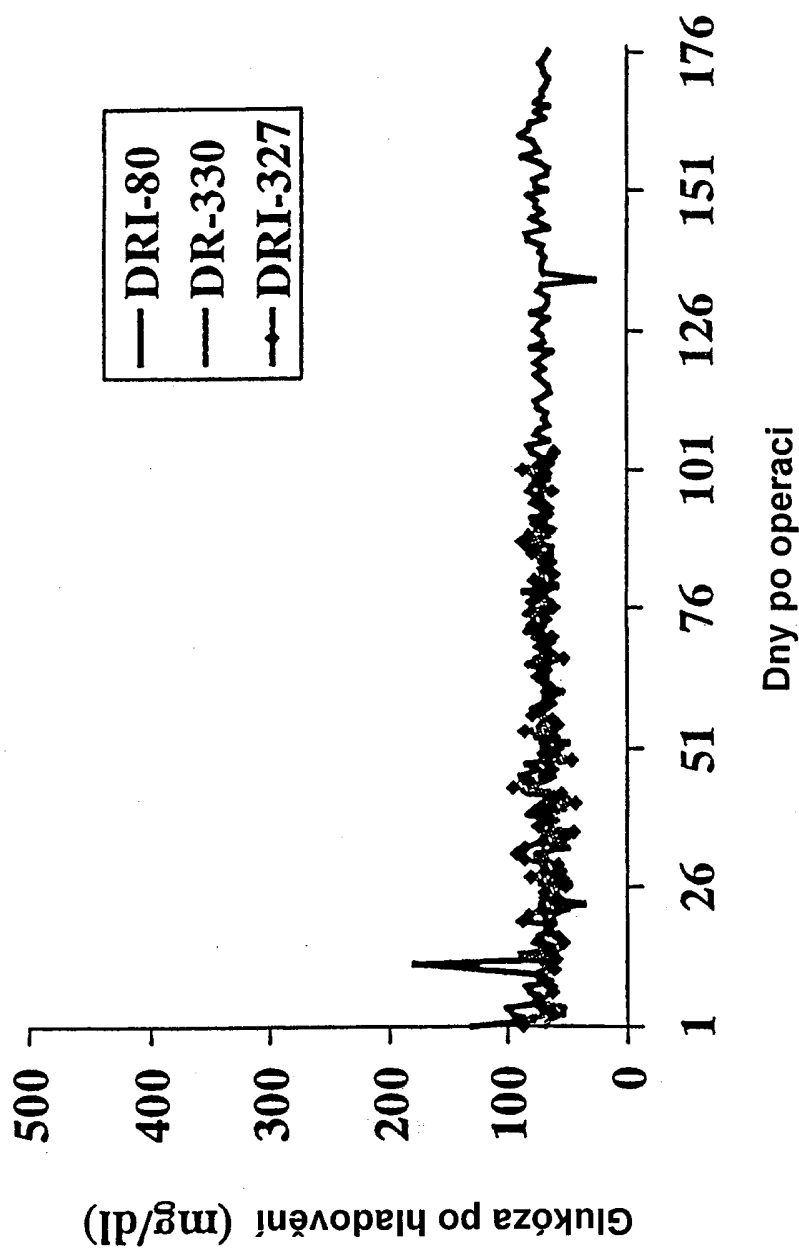
17.12.99

PV 1999-4616

2/3

Obr. 2

Kontrola krevní glukózy u makaka "rhesus"
s funkčním alloštěpem ostrůvků



Obr. 3

Srovnání kontroly krevní glukózy při funkčním
alloštěpu ostrůvků s intenzivní inzulinovou terapií

