

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2006년10월17일
A61K 39/00 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0634847
A61P 37/06 (2006.01)	(24) 등록일자	2006년10월10일

(21) 출원번호	10-1999-7011991	(65) 공개번호	10-2001-0013965
(22) 출원일자	1999년12월18일	(43) 공개일자	2001년02월26일
번역문 제출일자	1999년12월18일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/012892	(87) 국제공개번호	WO 1998/58669
국제출원일자	1998년06월19일	국제공개일자	1998년12월30일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 인도네시아, 가나, 감비아, 기니 비사우, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장	60/050,267	1997년06월20일	미국(US)
	60/077,265	1998년03월09일	미국(US)

(73) 특허권자 바이오젠 아이텍 엠에이 인코포레이티드
미국 매사추세츠 02142 캠프리지 캠프리지 센터 14

유니버시티 오브 마이애미
미국 플로리다 33136 마이애미 노오쓰웨스트 10 애브뉴 1600

(72) 발명자 케년노르마에스
미국플로리다주33158마이애미사우스웨스트151스트리트8020

리코르디카밀로
미국플로리다주33158마이애미비치사우스허비스커스드라이브72

토마스데이비드더블유

미국매사추세츠주02181월레슬리업랜드로드9

버클리린다

미국매사추세츠주02165웨스트뉴턴원트롭스트리트34

(74) 대리인

김성기

나영환

심사관 : 퇴- 허태희

(54) 췌장도 조직 이식을 위한 C D 154 차단 요법

요약

본 발명은 이식 수용체에서 인슐린 생성 조직의 거부반응을 억제하기 위한 방법 및 조성물 뿐 아니라, 이식편 생존 또는 기능을 연장시키기 위한 방법 및 조성물, 손상된 이식편의 이식 거부반응을 반전시키거나 또는 기능을 회복하기 위한 방법 및 조성물, 및 이식된 인슐린 생성 조직에 대해 면역학적 관용성을 유도하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 진성 당뇨병(DM)으로서 나타나는 결함을 비롯하여 혈당 항상성의 대사적 제어에 있어서의 결함을 치료 또는 예방하기에 적절하다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

관련 출원

본 발명은 1997년 6월 20일에 제출된 미국 가명세서 출원 일련번호 60/050,267 및 1998년 3월 9일에 제출된 미국 가명세서 일련 번호 60/077,265의 부분 계속 출원이다. 이들 2개의 선출원된 가명세서 특허 출원의 교시 내용은 본 명세서에서 참고로 인용한다.

발명의 분야

본 발명은 일반적으로 원하지 않는 면역 반응, 특히 대항적합성(counter-adaptive) T-림프구 매개된 면역 반응의 억제에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로 수용체 숙주에서 이식 조직 또는 이식 기관에 대해 면역계가 유도하는 거부반응의 예방, 치료, 억제 또는 반전에 관한 것이다.

배경기술

유전자적으로 동일하지 않은 개체 사이의 기관 이식은, T 세포 기능을 억제하는 약물을 투여하여 거부반응을 제어하지 않으면, 불가피하게 T 세포 의존 기전을 통해 기관의 면역학적 거부반응을 초래한다. 일부 미국 특허, 예컨대 미국 특허 제 5,104,858호; 제5,008,246호 및 제5,068,323호는 이식 거부반응을 억제하기 위한 면역억제 약물의 용도를 개시하고 있다. 기타 통상적인 제제는 Suthanthiran 등의 문헌[*New Eng. Med. J.* (1994), 331, 365-376]에 개시되어 있다. 칼시네우린(calcineurin) 포스파타제 억제제 및 당코르티코스테로이드는 모두 임상적으로 사용되고 있으며, 활성화 시토킨, 특히 IL-2의 T 세포 매개된 방출을 방지한다. 그러나, 이러한 유형의 종래의 제제를 이용한 치료는 불완전하다. 이 2가지 유형의 제제는 모두 T 세포 항원 특이성의 유일한 매개체인 T 세포 항원 수용체(TCR)를 통한 시그널링을 손상시키므로써 작용하고, 모든 T 세포상에서 무차별적으로 작용한다. 또한, 이들 약물의 효과는 지속적이지 않아서 일반적으로 치료를 중단

하면 이식편 손실을 초래한다. 따라서, 이식편이 존속하여 기능하는 통합 상태를 유지시키기 위해서, 이식 수용체는 장기간 비특이적 면역억제 결과로 고생해야 한다. 이들 결과는, 특히 민감한 기관 또는 조직, 예컨대 신장, 간 및 췌장에 대한 독성 뿐 아니라 감염 및 악성 위험 증가를 포함한다.

도세포 이식(CT)은 진성 당뇨병(DM) 개체에서 과혈당증을 회복시켜 혈당의 대사 제어를 정상화시킬 수 있다(Ricordi, Diabetes Reviews 4:356-369, 1996; Scharp et al., Diabetes 39:515-518, 1990; Socci et al., Acta Diabetot 28:151-157, 1991; Warnock 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). 인슐린 비의존성의 부재하에서도, 작용성 도 동종이식편(기초 c-펩티드 생성 >1.0 ng/ml)을 보유하는 이식편 수용체에 외인성 인슐린의 감소를 투여하면 헤모글로빈 A1c(HbA1c)의 우수한 대사적 제어 및 정상화를 초래한다(Ricordi, Diabetes Reviews 4:356-369, 1996; Scharp et al., Diabetes 39:515-518, 1990; Socci et al., Acta Diabetot 28:151-157, 1991; Warnock 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). 과혈당증은 관찰되지 않았으며, 자가면역 당뇨병이 있는 수용체에서 작용성 도 동종이식편은 현재 이식후 6년에 걸쳐 보고되고 있다(Alejandro et al., Diabetes 46:1983-1989, 1997). 이와 같은 유의적인 잇점에도 불구하고, 수용체가 만성의 일반화된 면역억제를 필요로 하기 때문에 DM을 제어하기 위한 도 세포 이식의 광범위한 적용이 제한되어 왔다. 이러한 제한은 만성 면역억제와 연관된 위험 뿐 아니라 현재 사용되는 면역억제 약물의 당뇨병유발성 효과와 관련되어 있다.

DM을 제어하기 위한 현행 치료의 제약으로 인하여 공여체 특이적 면역학적 내성을 유도하는 치료법을 개발하여 이식편 수용체의 장기간 면역억제에 대한 필요성을 제거하는 데 광범위한 관심이 유발되었다. 여러 조사자들은 동종이식에 대한 각종 설치류 모델계를 사용하여 유망한 초기 결과를 얻었다. 그러나, 거대 동물의 임상전 모델(예, 개과 동물, 비인간 영장류)에서 시험하면, 설치류에서의 결과는 인간의 ICT와 거의 유사한 모방 모델에서 ICT의 결과를 추정하기 어렵다는 것이 밝혀졌다.

따라서, 인간을 비롯한 이식편 수용체에 대해 개선되거나 또는 더욱 효과적인 면역억제 또는 면역조절 치료가 필요하다. 특히, pan-T 세포 면역억제를 요하지 않는 치료, 즉 악성 또는 기회 감염에 취약한 수용체를 형성하지 않는 치료가 필요하다. 더욱 명백히 말하면, 현행 치료제보다 독성이 적은 치료가 필요하다. 유사하게, 이식편의 지속적인 기능 통합, 즉 치료 과정이 종료된 후에도 지속되는 통합을 촉진하는 치료가 필요하다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명의 목적은 pan-T 세포 면역억제를 필요로 하지 않고 대항적합성 T 세포 반응을 매개하는 면역조절제를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 수용체 숙주, 특히 인간 숙주에서 조직 이식편, 구체적으로 췌장도 유래의 조직 이식편의 기능 통합을 촉진하는 면역조절제를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 이식 조직, 구체적으로 이식된 췌장도 또는 기타 인슐린 생성 조직의 면역학적 거부반응을 억제하는 면역조절제를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 동시자극 시그널의 활성화된 T 세포로의 전달을 저해하는 면역조절제를 제공하는 것이다. 본 발명의 특정한 목적은 치료, 특히 이식된 조직의 면역학적 거부반응을 완화, 지연 또는 반전시키는 치료에 사용하기 위한 CD40:CD154 결합 저해제(interruptor), 예컨대 CD154 차단제(blocking agent)를 제공하는 것이다. 본 발명의 더욱 일반적인 목적은 수용체 숙주 내로 비자가 조직(예, 동종이계 조직 또는 이종 조직)의 기능적 통합을 허용하는 면역조절 조성물을 제공하여 조직 이식편, 특히 인슐린 생성 조직 이식편의 이용가능성을 개선시키는 것이다. 본 발명의 또 다른 일반적인 목적은 진성 당뇨병(DM)을 예방, 완화, 경감 또는 치료하는 것이다.

본 발명은 CD154 차단제와 같은 CD40:CD154 결합 저해제가 단독으로 또는 기타의 치료제(예, 면역조절제 또는 관용화제)와 함께 사용되면, 수용체의 면역계 전체를 억제할 필요없이 수용체 숙주내의 이식된 인슐린 생성 조직의 대항적합성 면역계 거부반응을 경감, 억제, 예방, 지연 또는 반전시킬 수 있다는 발견에 기초한 것이다.

따라서, 본 발명은 인슐린 생성 조직이 이식된 수용체에 대한 면역조절 치료 방법 및 조성물에 관한 것이다. 이에 관한 제1 방법은 이식편 수용체에 의한 인슐린 생성 조직 이식편의 거부반응을 억제하는 것이다. 제2 방법은 조직 이식편의 생존을 연장시키는 것이다. 제3 방법은 조직 이식편의 거부반응을 반전시키는 것이다. 제4 방법은 조직 이식편의 기능을 보존하는 것이다. 제5 방법은 손상된 이식편의 기능을 회복시키는 것이다. 제6 방법은 조직 이식편에 대한 면역학적 관용성을 유도하는 것이다. 이들 방법은 모두 CD40:CD154 결합 저해제로 이식편 수용체를 치료하는 것을 포함하는데, 상기 결합 저해제란 CD40 리간드(즉, CD40L, 또한 CD154 또는 5c8 항원으로도 알려짐, 때로 당업자들은 gp39로도 칭함)의 반대 수

용체 또는 동족 수용체(여기서는 CD40)에 대한 결합을 저해하는 임의의 제제이다. 결합 저해제는 CD154(CD40L) 차단제가 바람직하데, CD154 차단제란 CD154에 결합하여 반대 수용체(예, CD40)에 대한 결합을 억제 또는 방해하는 임의의 제제이다. CD154 차단제의 예로는 모노클론 항체(MAb), 특히 본원에서 참고로 인용한 미국 특허 제5,474,771호에 개시된 5c8 MAb의 항원 특이적 결합 특성을 보유하는 항체이다.

전술한 방법은 모든 유형의 인슐린 생성 조직 이식편, 예컨대 종래의 기술로 분리한 전체 췌장 조직 또는 췌장도를 사용하여 실시할 수 있다. 따라서, 본 발명은 이식편 수용체(수용체 숙주)가 포유류, 바람직하게는 영장류, 가장 바람직하게는 인간인 경우 사용하기 적절하다. 특히, 본 발명은 이식편 수용체가 DM과 같은 당(glucose) 대사의 대사 제어 손상으로 고생하거나 또는 그럴 위험이 있는 경우 사용하기 적절하다. 이식편 공여체는 이식편 수용체와 동일한 계통발생적 종의 비동계 구성원(즉, 동종이계 공여체, 동종이식편 조직 제공) 또는 별개의 계통발생적 종(예, 이종 공여체, 이종이식편 조직 제공)의 구성원일 수 있다. 이종 공여체가 이식편 조직 공급원으로 사용되는 경우, 공여체는 수용체 숙주와 비교적 MHC 적합성인 것이 좋다. 예컨대 비비 또는 캄펜지가 인간내로 조직을 이식하기 위한 공여체로서 바람직하다. 본 발명을 이용하여 분리된 성인 또는 태아 도 β 세포의 세포군 또는 배양된 도 β 세포(1차 세포 배양물에서 유도된 것 또는 불사의 세포주에서 유도된 것)를 비롯하여 기타 유형의 인슐린 생성 조직의 생착(engraftment)을 촉진할 수 있다. 실제로, 본 발명은 유전자 조작된 것과 같이 인슐린 유전자를 유도적으로 또는 안정하게 발현하는 임의의 세포, 또는 종래의 유전자 공학 기술로 생성한 숙주 세포를 사용하여 생착을 촉진할 수 있다. 임의적으로, 인슐린 생성 조직은 면역분리 장치에 의해 수용체의 조직으로부터 물리적으로 분리될 수 있다.

전술한 바와 같이, 본 발명은 당 대사의 대사 제어를 회복시킬 필요가 있는 포유류에서 이를 회복시키는 방법을 제공하는 것이다. 이 방법은 포유류내로 인슐린 생성 조직을 이식하는 단계, 및 CD40:CD154 결합 저해제, 바람직하게는 CD154 차단제로 포유류를 치료하는 단계를 포함한다. 바람직한 양태에서, CD154 차단제는 MAb 5c8의 항원 특이적 결합 특성을 가진 모노클론 항체이다. 인간 DM과 관련된 거대 동물의 임상전 모델에서 시험하여 확인된 예시적인 프로토콜에서, 생착은 ICT 전에 MAb를 투여한 다음, (바람직하게는) ICT 후(즉, 인슐린 생성 조직의 이식 후) 2주내에 MAb를 2회 이상 투여하여 유도된다. 그 다음, 원하는 바대로 ICT 한달(4주로 정의) 후에 MAb를 투여하여 생착을 유지한다. 필요에 따라 또는 신중하게 생각하여 유지 단계를 반복할 수 있다.

경우에 따라서, 관용화제로 포유류를 동시에 치료하여 생착을 향상시킬 수 있는데, 관용화제란 면역조절 치료 또는 면역억제 치료를 중단한 뒤에도 생착을 보존하는 임의의 제제를 의미한다. 예시적인 관용화제로는 조직 이식편(여기서는 인슐린 생성 조직)과 MHC-적합성이 있는 골수 조직, 또는 골수 유래의 세포군 등이 있다. 골수 또는 세포는 인슐린 생성 조직의 공급원 또는 공여체와 동계이다. 따라서, 이식편 수용체에서 관용화제의 장기간 생존성은 수용체를, 공여체 특이적 면역학적 관용성에 의해 입증되는 면역학적 키메라 상태로 만든다. 골수 유래의 CD34(+) 조혈세포(간세포)군은 관용화제로서 특히 바람직하다. CD40(-) 세포 표면 표현형을 갖는 간세포군이 특별히 바람직하다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 포유류에서 당 대사의 대사 제어 손상을 검출하는 방법을 제공한다. 이 방법은, 예컨대 포유류가 DM을 형성할 위험에 있거나 또는 생착된 인슐린 생성 조직을 거부하는 초기 단계에 있는 경우 혈당 대사의 무증상(예, 잠재성 또는 무증후상) 손상을 밝히기에 충분히 민감하다. 이 방법은 포유류가 음식을 섭취한 지 1시간 이상 후에, 그러나 6 시간(바람직하게는 약 2 시간)을 넘지 않은 시점에서 포유류로부터 채취한 혈액을 포함하는 시료의 당 함량을 평가하는 것을 포함한다. 포유류는 식사후(PPD) 시료의 당 함량이 150 mg/dl 이상(즉, 약 150 mg/dl 초과)이면 당 대사가 손상된 것으로 본다. 연일 채취한 2개의 시료를 평가하여, 양 시료의 당 함량이 모두 150 mg/dl 이상인 것으로 밝혀지면, 방법의 신뢰도가 개선된다.

도면의 간단한 설명

본 발명 그 자체 뿐 아니라 본 발명의 전술한 목적, 특징 및 장점과 기타의 목적, 특징 및 장점은, 첨부된 도면과 함께 참고하면 다음 바람직한 양태들의 설명으로부터 더욱 완전하게 이해될 것이다.

도 1은 수술 후 경과 일수(POD)의 함수로서 ICT에 대한 CD154 차단제 치료시 비비 수용체의 단식시 혈당(FG) 농도를 플롯한 선 그래프이다.

도 2는 수술 후 경과 일수(POD)의 함수로서 ICT에 대한 CD154 차단제 치료시 붉은털 원숭이 수용체의 FG 농도를 플롯한 선 그래프이다.

도 3은 종래의 인슐린 대체 치료를 받은 DM에 걸린 인간의 FG 농도와 도 2에 도시된 붉은털 원숭이의 FG 농도를 비교한 선 그래프이다.

본 발명의 상세한 설명

T 세포 활성화 및 이에 대해 의존성인 면역학적 과정에는 T 세포 수용체(TCR) 매개된 시그널 및 동시에 전달되는 동시자극성 시그널이 필요하다. 중요한 동시 자극 시그널은 B 세포와 같은 항원 제시 세포상의 CD40이 T 세포 상의 CD40L(CD154)과 결합하여 전달된다. 인간의 CD40은 성숙 B 세포 뿐 아니라 대식세포 및 활성화된 내피세포상에서도 발현되는 50 kD 세포 표면 단백질이다. CD40은 계획된 세포 사멸과 관련된 종류의 수용체, 예컨대 Fas/CD95 및 종양 괴사 인자(TNF) 알파 수용체에 속한다. 인간의 CD154(CD40L)는 활성화된 T 세포상에서 주로 일시적으로 발현되는 TNF 알파에 상동성이 있는 32 kD II형 막 당단백질이다. CD40:CD154 결합은 모든 T 세포 의존성 항체 반응에 필요한 것으로 보인다. 특히, CD40:CD154 결합은 항-아포토시스 및/또는 림포킨 자극성 시그널을 제공한다.

T 세포 의존성 생물학적 반응을 촉진하는데 있어서 CD40:CD154 결합의 중요성이 더욱 완전하게 이해된 것은, 인간의 경우 X-연관형 과다IgM증(X-HIGM)이 작용성 CD154의 유전자 결핍으로 생기는 표현형이라는 사실을 발견했을 때였다. 영향을 받은 개체는 IgM의 수준이 정상이거나 높았지만, IgG, IgA 또는 IgE 항체를 생성하지는 않았으며, 재발, 때로는 심각한 박테리아 및 기생충 감염과 림프종 및 복부암의 발병을 증가를 경험하였다. 유사한 표현형은 CD154를 암호화하는 유전자가 무효접합성(nullizygous)이 되는 비인간 동물(넉아웃(knockout) 동물)에서 관찰된다. CD154 무효접합성의 B 세포는 CD40L:CD154 결합의 부재하에 IgM을 생성할 수 있지만, 친화도 성숙후에 정상적으로 생존하거나 아이소타입 전환을 진행할 수는 없다. 조직학적으로, 림프절 배종심은 적절하게 형성되지 않고, 메모리 B 세포는 존재하지 않거나 또는 발생되더라도 그 정도가 불량하다. 기능적으로, 이러한 단점 때문에 2차(성숙) 항체 반응의 심각한 감소 또는 부재가 유발된다. 박테리아 및 기생충 감염의 발병 증가로 입증되는 세포 면역성의 결손이 관찰된다. 다수의 세포 매개된 결손은 IL-12 또는 IFN 감마를 투여하여 극복할 수 있다. 이들 관찰 결과는 정상 CD40:CD154 결합이 I형 T-헬퍼 세포의 면역학적 반응의 발생을 촉진한다는 견해를 실증한 것이다.

다수의 임상전 연구에서 CD40:CD154 결합을 저해할 수 있는 제제가 면역조절제로서 유망하다는 것은 입증된 바 있다. 특히, 작은 동물 기관 또는 조직 이식 모델을 포함하는 연구에서는 CD40:CD154 저해제가 동종이계 이식편의 생존을 촉진한다는 것이 확인되었다. 선택된 모델에서, T 세포 동시자극을 저해하는 제제를 일시적으로 투여하면 일정치 않은 이식 수용능이 유도되었다. 특히 CD40:CD154 결합 저해는, 반대-수용체 쌍의 결합이 연대 및 분류 체계에서 기타 동시자극성 시그널보다 우선하기 때문에 유망한 결과를 산출하였다(Ranheim et al., J.Exp Med 177:925-935; 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 149:3817-3826, 1992). CD40:CD154 결합 차단은 설치류에서의 심장 동종이식편(Larsen et al., Transplantation 61:4-9, 1996; Larsen et al., Nature 381:434438, 1996), 피부 동종이식편(Larsen et al., Nature 381:434438, 1996; Markees et al., Transplantation 64:329-335, 1997) 및 도 동종이식편(Parker et al., Proc Natl Acad Sci USA 92:9560-9564, 1995; Rossini et al., Cell Transplant 5:49-52)의 생존 연장 및 영장류에서의 동종이계 신장(Kirk et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:8789-8794, 1997)의 생존 증가를 가져왔다. 이것은 또한 비만하지 않은 당뇨병(NOD) 마우스에서 자가면역 당뇨병 개시를 지연시키는 것으로 확인되었다(Balasa et al., J Immunol 159:4620-4627, 1997). 최근에, CD40:CD154 결합 저해는 염증 시토킨의 생성을 방지하는 것으로 알려졌다(Dechanet et al., J Immunol 159:5640-5647, 1997; Kiener et al., J Immunol 155:4917-4925, 1995).

따라서 CD40:CD154 차단은 I형 당뇨병과 같은 당 대사에 결함이 있는 개체에게 도 동종이식편 또는 이종이식편 부전을 예방하기 위한 잠재적으로 강력한 치료법을 제공할 수 있다. 그러나, 전술한 바와 같이 설치류 모델계 연구는 인간을 비롯한 거대 동물의 치료 또는 시험 결과와 관련성이 적다.

도 동종이식을 실시한 거대 동물의 임상전 모델에서, 바람직한 CD154 차단제인 MAbs 5c8의 항원 특이적 결합 특성을 보유하는 인간화된 MAbs의 효과를 평가하는 연구가 본 명세서에 개시되어 있다(Lederman et al., J. Exp. Med. 175:10911101, 1992). 구체적으로, 본 발명의 모델은 비비(파피오 하마드리아스(Papio hamadryas)) 및 기타 비인간 영장류의 CD154 차단 단일치료를 포함한다. 이들 연구로부터 얻은 결과는, CD154 차단 단일치료가 인간, 특히 DM에 걸린 인간 또는 당 항상성에 유사한 결함이 있는 인간에서 인슐린 생성 조직의 장기간 생착을 촉진하는 것을 강력하게 시사한다.

하기의 설명은 본 발명이 실시될 수 있는 각종 정황 및 환경을 예시 및 예증하고, 본 발명의 특정 양태를 포함하는 원리 입증 연구를 제공한다.

수용체 속주

본 발명은 인슐린 생성 조직 이식편의 임의의 포유류 수용체 또는 인슐린 생성 조직이 필요한 임의의 포유류의 치료 또는 예방에 사용할 수 있다. 따라서, 수용체 숙주(본원에서는 수용체 또는 숙주라고도 칭함)는 혈당 대사의 대사 제어(당 항상성)에 결함이 있거나 또는 그럴 위험이 있다. 예를 들어 수용체는 과혈당증 또는 저혈당증일 수 있다. 본 발명은 당뇨병 수용체, 특히 진성 당뇨병(DM)에 걸린 수용체에게 사용하기 특히 적절하다. 수용체는 바람직하게는 영장류, 더욱 바람직하게는 고등 영장류, 가장 바람직하게는 인간이다. 기타 양태에서, 수용체는 조직 이식이 필요한 또 다른 포유류, 특히 상업적 중요성이 있는 포유류, 또는 애완동물 또는 기타 가치 있는 동물, 예컨대 멸종될 위기에 있는 종일 수 있다. 따라서, 수용체 숙주의 비제한적인 예로는 양, 말, 소, 염소, 돼지, 개, 고양이, 토끼, 기니아 피그, 햄스터, 게르빌루스쥐, 래트 및 마우스가 있다.

공여체 또는 이식 조직

본 발명은 임의 유형의 인슐린 생성 조직 이식(transplant) 또는 이식(graft) 과정, 특히 공여체의 (이식된) 조직이 수용체 숙주 면역계에 의해 부전증이나 거부반응을 나타내거나 나타낼 위험이 있는 과정에 사용할 수 있다. 특히, 본 발명은 공여체 조직이 수용체 숙주와 조직적합성(MHC 적합성)이 아닌 임의의 정황에서 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 자가 또는 동계 공여체 조직 이외에도 동종이계 또는 심지어 이종 공여체 조직을 사용할 수 있다. 공여체 조직은 통상적인 수단으로 지원자나 기타 살아있는 공여체, 또는 사체 공여체로부터 유래할 수 있다. 공여체는 수용체 숙주를 사용하여 실행가능하도록 조직적합성인 것이 바람직하다. 따라서, 수용체 숙주가 인간인 경우, 자가 및 동종이계 공여체 조직이 바람직하다. 그러나, 공여체 조직을 비인간 영장류(예, 침팬지 또는 비비) 또는 기타 비교적 적합성이 있는 동물(예, 돼지)과 같은 이종으로부터 얻을 수도 있다(이 경우 이종 이식편이라고 칭함).

일부 양태에서, 공여체 조직은 완전한 췌장을 포함한다. 다른 양태에서, 공여체 조직은 공여체 췌장의 일부, 부분 또는 생검체를 포함한다. 공여체 췌장은 생공여체로부터 얻을 수 있거나 또는 적절한 사체로부터 회수할 수 있다. 사체 공여체를 사용하는 경우, 췌장은 저온 허혈 조건에서 약 8시간을 넘지 않도록 노출시키는 것이 바람직하다. 또 다른 양태에서, 공여체 조직은 인슐린 생성 세포, 특히 분리 또는 현탁된 도 또는 도 세포, 예컨대 태아 또는 성인 공여체로부터 배출되거나 절제한 세포, 1차 배양물에서 유지되는 세포, 또는 불사의 세포주를 포함한다. 전체 췌장으로부터 공여체 도 또는 도 세포 현탁액을 제조하기 위한 적절한 수단은 공지되어 있다(Ricordi et al. (1988), 37 Diabetes 413-420; Tzakis et al. (1990), 336 Lancet 402-405; Linesky et al. (1997) 46 Diabetes 1120-1123). 적절한 췌장은 혈당 항상성에 거의 결함이 없는 공여체로부터 얻는다. 인슐린 생성 세포의 기타 공급원은, 임의적으로 1차 배양물까지 확장되는 태아 도 선조 세포를 포함한다. 그러나, 인슐린 발현성 유전자를 암호화하는 외래 유전자 물질 보유 세포를 비롯한 임의의 적절한 세포형을 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 구조적으로 또는 유도적으로(예, 당 반응성 프로모터 또는 인핸서의 제어하) 인슐린을 발현하도록 유전자 조작된 (또는 이러한 조작을 한 선조 세포로부터 유래한) 형질감염되거나 형질전환된 숙주 세포의 사용을 포함한다. 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 신체 조직의 전체 또는 일부에서 인슐린을 생성하는데 필요한 유전자 물질을 포함하도록 유전자 조작한 유전자이식 포유류로부터 유도된 췌장 또는 기타 공여체 세포형의 사용을 포함한다.

인슐린 생성 조직(공여체 조직)을 전신 또는 국소적으로 수용체 숙주내로 도입한다. 예컨대 분리, 현탁 또는 분산된 인슐린 생성 세포를 혈관내 주입하거나 또는 원하는 부위, 예컨대 골수강, 간, 신장 캡슐내, 근육내 또는 복강내로 이식할 수 있다. 일부 양태에서, 세포는 유사분열능이 있어 공여체 기원의 신규 조직을 생성한다. 다른 양태에서, 세포는 유사분열능은 없지만, 공여체에서 생존하여, 인슐린을 생성 또는 발현한다. 어떤 경우에도, 인슐린 생성 세포 또는 조직의 유효량을 이식하는데, 여기서 유효량이란 수용체의 당 대사 결함(예, 과혈당증 또는 저혈당증)을 약화시키는데(검출가능하게 완화시키는데) 충분한 양이다. 그 양은 당 항상성을 유지하는 수용체의 능력을 회복하는데 충분한 양, 즉 수용체가 종래(예, 주사 또는 흡입)의 인슐린 대체 치료에 의존하지 않게 하는데 충분한 양이 적절하다.

일부 양태에서, 인슐린 생성 조직은 면역분리 장치에 의해 수용체의 주변 조직으로부터 물리적으로 분리된 것이다. 적절한 장치는, 비제한적인 예로서 백혈구, 면역글로블린 및 보체 등을 비롯하여 세포 및 체액 면역성의 최대 효과기로부터 인슐린 생성 조직을 보호한다. 따라서, 일반적으로 면역분리 장치는 질량이 약 50~100 kD 이상인 분자의 확산을 방지하는데 충분한 기공 크기를 가지는 반투성 차단층, 예컨대 막을 제공한다. 차단층은 인슐린 생성 조직이 배치된 분리 챔버를 구획하며, 인슐린 생성 조직이 물리적으로 차단층에 대해 외부에 있는 세포 또는 조직과 접촉할 수 있는 임의의 부위를 포함하지 않는다. 단일벽 또는 이중벽 알기네이트 마이크로캡슐을 비롯한 임의의 통상적인 장치, 엔벨로프, 캡슐 또는 마이크로캡슐을 사용할 수 있다(예, 본원에서 참고로 인용한 미국 특허 제5,227,298호에 기재). 기타 종래의 마이크로캡슐로는 구조적으로 견실한 소정의 형상 또는 크기의 면역분리 장치로 형성된 알기네이트 폴리리신 마이크로캡슐, 화학적으로 가교된 알기네이트 마이크로캡슐 및 기타 생체적합성 중합체로 형성된 캡슐이 있다(본원에서 참고로 인용한 교시물인 Jaink et al. (1996), 61 Transplantation 4 참고).

또 다른 양태에서, 관용화제, 예컨대 골수 또는 그로부터 유도된 세포를 수용체 숙주내로 이식한다. 췌장 기질 세포 뿐 아니라 골수 세포를 비롯한 임의의 관용화 조직 또는 세포형을 관용화제로 사용할 수 있다. 관용화 세포는 인슐린 생성 조직과 MHC 적합성이 있으며, 인슐린 생성 조직을 제공하는 공여체로부터 얻는 것이 바람직하며, 또는 공여체와 동계이다. 골수 또는 이의 세포군을 제조하는 적절한 수단은 잘 알려져 있다(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., pup., p619-628). 골수는 Ceprate(등록상표) SC 간세포 농축 시스템(미국 워싱턴주 보텔에 소재하는 셀프로 인코포레이티드; CellPro Investigator Brochure, rev. 06.01.97), 또는 그 등가물을 사용하여 프로세싱하여 CD34(+) 조혈세포가 농축된 골수 유도된 세포군을 제공한다. 표준 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 분석 또는 면역형광 염색 결과 CD34(+) 세포군에는 CD40(+) 세포가 거의 없다는 것이 밝혀졌지만, CD40에 대한 일부 희미한 염색이 관찰될 수 있다. CD34(+) 세포군은 동적인 간세포군이기에 때문에, 저 레벨의 CD40(+) 세포의 존재는 간세포가 B 세포계를 따라 분화를 개시하는 빈도에 해당한다. 실제로, 예비적인 FACS 연구로부터 CD34(+) 간세포군내 CD40(+) 세포(통상적으로 전체의 약 0.7% 이하로 나타남)만이 CD19(+)라는 것이 입증되었다. CD19는 최초로 널리 알려진 B 세포계 마커이다. 따라서, 관용화제로서 진정한 간세포군의 용도를 유지하기 위해서, CD34(+)에서는 종래의 음성 선별 수단(예, 선별적 세포 분해, 세포 분류, 패닝 등)에 의해 CD40(+) 세포를 추가로 고갈시킬 수 있다.

예시적인 CD40:CD154 저해제

본 발명의 실시예에 유용한 치료 화합물은, 예컨대 활성화된 T 세포의 표면에서 발현되는 CD40L(CD154)과 세포 표면 CD40(예, B 세포에서 발현됨)의 상호작용을 차단하는 임의의 화합물을 포함한다. 특별히 주목받고 있는 CD40:CD154 결합 저해제 화합물, 예컨대 CD154 차단제는 폴리클론 항체 및 모노클론 항체(MAb) 뿐 아니라 키메라 분자, 인간화된 분자, 효과가 기능이 감소된 분자, 2특이적 분자 및 항체의 접합체와 같은 항체 유도체를 포함한다. 바람직한 양태에서, 항체는 본원에서 참고로 인용한 미국 특허 5,474,771호에 개시된 바와 같이, MAb 5c8의 항원 특이적 결합 특성을 갖는다. 현재 상당히 바람직한 양태에서 항체는 인간화된 5c8이다. CD154에 대항하는 기타 알려진 항체로는 항체 ImxM90, ImxM91 및 ImxM92(임뮤넥스에서 입수가 가능), 안셀에서 시판하는 항CD40L mAb(클론 24~31, 카탈로그 #353-020, 미네소타주 베이포트에 소재), 및 젠자임에서 시판하는 항CD40L mAb(미국 매사추세츠주 캄브리지, 카탈로그 # 80-3703-01) 등이 있다. 또한 파밍엔에서 시판하는 항CD40L mAb도 있다(미국 샌디에고, 카탈로그 #33580D). 수많은 추가의 항CD40L 항체가 제조되고 특성규명되어 있다(본원에서 참고로 인용한 브리스톨 메이어스 스쿼브의 WO96/23071 참고).

본 발명은 기타 유형의 CD154 차단제, 예컨대 완전한 Fab 단편, F(ab')₂ 화합물, V_H 영역, F_V 영역, 단일쇄 항체(예컨대 WO 96/23071 참조), 폴리펩티드, 폴리펩티드의 융합 작제물, CD40의 융합체(예컨대 본원에서 참고로 인용한 Hollenbaugh 등의 문헌[J. Immunol. Meth. 188:1-7, 1995]에 개시된 바와 같은 CD40Ig), 및 소분자 화합물, 예컨대 작은 반펩티드성 화합물이나 비펩티드성 화합물의 사용을 포함하며, 이들은 모두 CD40:CD154 결합을 차단 또는 저해할 수 있다. 작은 분자를 고안, 검색 및 최적화시키는 방법은 본원에서 참고로 인용한 명세서인 특허 출원 PCT/US96/10664 (1996년 6월 21일 제출)에 제시되어 있다.

표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 각종 형태의 항체를 제조할 수 있다(Winter and Milstein, Nature 349:293-99, 1991). 예를 들어, "키메라" 항체(재조합 DNA 기법을 사용하여 힌지와 중쇄의 불변부 및/또는 경쇄의 불변부 전체 또는 일부를 인간의 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄에서 유래한 해당 영역으로 대체한 초기에 비인간 포유류로부터 유도한 항체)를 작제할 수 있으며, 이 때 동물 항체에서 유래한 항원 결합 부위를 인간의 불변 도메인에 결합시킨다(Cabilly 등, 미국 특허 출원 제4,816,567; Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55, 1984). 키메라 항체를 인간의 치료 또는 예방에 사용한 경우 동물 항체에 의해 유발되는 면역원성 반응을 감소시킨다.

또한, 재조합 "인간화된" 항체를 합성할 수 있다. 인간화된 항체란 재조합 DNA 기법을 사용하여 항원 결합에 필요하지 않은 아미노산 일부 또는 전체를 인간의 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 해당 영역에서 유래한 아미노산으로 치환한 비인간 포유류로부터 초기에 유도된 항체이다. 즉, 인간화된 항체는 특이적 항원 결합을 담당하는 영역이 삽입된 대부분의 인간 면역글로불린 서열을 포함하는 키메라이다(예컨대 PCT 특허 출원 WO94/04679 참조). 동물을 소정의 항원으로 면역화시키고, 해당 항체를 분리하고 특이적 항원 결합을 담당하는 가변 영역 서열의 일부를 제거한다. 그 다음 동물에서 유래한 항원 결합 영역을, 항원 결합 영역이 결실된 인간 항체 유전자의 적절한 위치로 클로닝한다. 인간화된 항체는 인간 치료에 사용하기 위한 항체에서 이중(중간) 서열의 사용을 최소화하고, 원하지 않는 면역 반응을 덜 유발하는 것 같다. 유사하게 영장류화된 항체도 생성할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태는 인간의 항체를 사용하는 것이며, 이 항체는 비인간 동물, 예컨대 하나 이상의 인간의 면역글로불린 이식 유전자를 보유하는 유전자이식 동물에서 생성할 수 있다. 미국 특허 제5,569,825호에 개시된 바와 같이, 이러한 동물은 하이브리도마를 생성하는 비장세포 공급원으로서 사용할 수 있다.

본 발명의 실시예 항체 단편 및 1가 항체를 사용할 수 있다. 1가 항체는 제2 중쇄의 Fc(또는 간(stem)) 영역에 결합된 중쇄/경쇄 이량체를 포함한다. "Fab 영역"은 중쇄의 Y 분지 부분을 포함하는 서열 및 전체 경쇄에 대해 대체로 동일하거나 또는 유사하고, 총체적으로(전체로서) 항체 활성을 나타내는 쇄의 부분을 의미한다. Fab 단백질은 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄의 집합체(보통 Fab'로 알려짐) 뿐 아니라 항체 Y의 2개의 분지 분절에 해당하는 사량체(보통 F(ab)₂로 알려져 있음)를 포함하며, 집합체가 특정 항원 또는 항원계와 선별적으로 반응할 수 있는 한 전술한 임의의 집합체는 공유 집합체이든 비공유 집합체이든 상관없다.

또한, 표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 항원 결합 부위 부근에서 아미노산 잔기를 변형시켜 항원과 재조합 항체의 결합 친화도를 변경할 수 있다. 인간화된 항체의 항원 결합 친화도는 분자 모델링을 기초로 한 돌연변이 유발법으로 증가시킬 수 있다(Queen 등, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:10029-33, 1989; PCT 특허 출원 WO94/04679). 표적화된 조직 유형 또는 생각한 특정 치료 계획에 따라 CD40L에 대한 항체의 친화도를 증가 또는 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 증가 또는 감소는 파지 디스플레이 기법을 이용하여 수행할 수 있다(예컨대, Winter 등, Ann. Rev. Immunol. 12:433-455, 1994; and Schier 등, J. Mol. Biol. 255:28-43, 1996, 본원에서 참고로 인용함). 예를 들어, 반예방적 치료를 위해 CD40L에 대한 친화도가 감소된 항체 일정량으로 환자를 치료하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, CD40L에 대한 친화도가 증가한 항체는 단기간 치료에 유리할 수 있다.

투여 경로

본 발명에 사용되는 CD40:CD154 결합 저해제, 예컨대 CD154 차단제는 의학적으로 허용가능한 임의의 방식으로 투여할 수 있다. 특정 환경에 따라, 국부 투여 또는 전신 투여가 바람직하다. 상기 제제는, 정맥내, 동맥내, 피하, 근육내, 안와내, 심실내, 복강내, 피막하, 두개내, 척수내 또는 비강내 주사, 주입 또는 흡입과 같은 비경구 경로를 통해 투여하는 것이 바람직하다. 또한 제제는, 공여체 조직의 이식 전 또는 후에 수용체 숙주내로 주입 펌프, 또는 생체적합성 또는 생체부식성 서방형 이식물을 이식하여 투여할 수 있다. 별법으로, 본 발명의 특정 화합물 또는 이의 제제는 경구 또는 장 투여하는 데 적절할 수 있다. 본 발명의 또 다른 화합물은 국부 투여하는 데 적절할 수 있다.

또 다른 실시 양태에서, CD40:CD154 결합 저해제를 암호화하는 벡터 또는 기타 발현성 유전 물질을 투여함으로써 수용체에게 간접적으로 상기 결합 저해제를 제공한다. 유전 물질을 수용체의 세포 또는 조직내로 내면화 및 발현시켜 동일계에서 차단제를 생성한다. 예컨대, 적합한 핵산 작제물은 미국 특허 제5,474,771호에 개시된 바와 같이 MAb 5c8 면역글로불린(Ig)쇄 하나 이상을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 기타 적합한 작제물은 MAb 5c8 Ig쇄 또는 이의 항원 결합 단편의 키메라 또는 인간화된 형태를 암호화하는 서열을 포함한다. 또 다른 적합한 작제물은 기타 CD154-특이적 MAb의 일부 또는 전부를 암호화하는 서열을 포함한다. 이 작제물을 전신 또는 국부 전달, 예컨대, 인슐린 발현 조직의 이식 부위 근처 부위로 전달한다.

한편, 저해제를 암호화하는 벡터 또는 기타 유전물질을 적합한 분리된 세포군에서 내면화시켜 저해제 생산 숙주 세포를 생산한다. 이들 숙주 세포를 수용체에게 국부적으로 또는 전신으로 이식하거나 또는 주입하여 CD40:CD154 결합 차단제를 동일계에서 생산한다. 적합한 숙주 세포로는 배양된 세포, 예컨대 불사의 세포 뿐만 아니라, 수용체로부터 얻은 세포(예컨대, 천연 킬러(NK) 세포와 같은 말초혈 또는 림프절 세포)를 들 수 있다.

일반적으로 본 발명의 화합물은 수용체 숙주에게 투여한다. 그러나, 화합물은 공여체 또는 공여체 조직에 투여할 수도 있다. 예를 들어, 수용체 숙주내로 통합시키기 전에 공여체 조직이 저장되거나 이송된 관류액 또는 보존액내에 본 발명의 화합물을 포함시킬 수 있다.

제제

일반적으로, 본 발명의 실시예 사용되는 화합물(들)을 약학적 허용 담체 또는 부형제에 현탁, 용해 또는 분산시킨다. 생성 치료 조성물은 수용체의 항상성, 특히 전해질 균형에 불리한 영향을 미치지 않는다. 따라서, 예시적인 담체로는 통상의 생

리학적 염수(0.15 M NaCl, pH 7.0 내지 7.4)가 있다. 기타 허용가능한 담체는 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., 1990]에 개시되어 있다. 허용가능한 담체로는 생체적합성, 불활성 또는 생체흡수성 염, 완충제, 올리고당, 다당류, 중합체, 점도 개량제, 보존제 등이 있다.

본 발명의 방법에 사용된 임의의 CD40:CD154 결합 저해제, 예컨대 CD154 차단제를 제형화하여 약학적 유효량 또는 치료학적 유효량을 전달한다. 여기서 약학적 유효량 또는 치료학적 유효량이란 검출가능하고, 바람직하게는 수용체에게 의학적으로 이로운 효과를 주는 양이다. 의학적으로 이로운 효과란 수용체의 의학적 증상을 예방하거나, 이 증상의 악화를 지연 또는 경감시키거나 또는 증상을 눈에 띄게 개선시키는 것을 의미한다. 예로서, 신장 동종이식편 또는 이종이식편의 상태 지표인 신장 기능 및 건강 상태는 혈중 요소성 질소 또는 크레아티닌의 농도, 뇨의 양 또는 용질 함량, 또는 혈액에서 뇨로의 관련 용질의 제거율을 측정하여 모니터링할 수 있다. 유사하게, 인슐린 생성 동종이식편 또는 이종이식편의 건강 및 당조절 기능은 혈당 또는 뇨당, 당 대사물질, 또는 인슐린의 농도를 일반적으로 측정하거나, 또는 예컨대 종래의 내당성 시험에서 당 투여에 반응하는 인슐린을 측정하여 모니터링할 수 있다. 따라서, 본 발명의 치료 화합물, 예컨대 CD154 차단제의 유효량은 인슐린 대체 치료에 대한 수용체의 의존성을 검출가능하게 감소시키는 임의의 양이다. 최적 유효량은 외래 인슐린에 대한 수용체의 의존성을 거의 없게 하는 양이다. 더욱 구체적으로 유효량은 공여체 인슐린 생성 조직의 부분적 또는 거의 완전한 생착(수용능 및 기능)을 유도하는 양이다.

치료 용량 및 빈도수

본 발명의 실시예에 사용하고자 하는 임의의 특정 화합물의 투여 용량 및 투여 빈도는 이식 전문의와 같은 조직 이식 분야의 일반적인 의사의 임상적 판단 및 기술로 결정할 수 있다. 일반적인 용량 및 투여 방법은 임상전 시험 및 임상 시험으로 정하는데, 이러한 시험은 화합물의 효과적인 투여 매개 변수, 예컨대 최적 투여 매개 변수를 결정하기 위한 광범위하지만 일반적인 연구를 포함한다. 권장사항이 결정된 후에라도 의사는 종종 각종 고려사항, 예컨대 개체의 연령, 의학적 상태, 체중, 성별 및 다른 약제와의 동시 치료를 기초로 하여 다른 수용체 숙주에게 용량을 다양하게 할 수 있다. 이식 거부반응을 억제하기 위해서 사용되는 각 CD40:CD154 결합 저해제에 대한 최적 용량 및 투여 방법을 결정하는 것은 약학 분야 및 의학 분야의 업자들에게는 일상적인 일이다. 투여량 및 시간은 수용체의 건강 상태의 1 이상의 지표에 있어서 임상적으로 이로운 변화를 형성하기에 충분해야 한다. 투여량 및 시간의 예는 본원에 개시된 원리 입증 연구에 설명되어 있다. 본질적으로, 본 발명은 수용능 유도 방법에서 CD40:CD154 결합 저해제(예, 인간화된 MAb 5c8, hu5c8)를 투여한 후에, 신중해야 할 것으로 생각되는 경우에는 수용능 유지법을 수행한다.

항CD40L 화합물에 대한 용량 고려사항을 예시하기 위해서, 하기 투여 방법의 예를 항CD40L mAb에 대해 제공한다. 투여 용량은 다른 유형의 항CD40L 화합물에 대해 쉽게 조정할 수 있다. 일반적으로 환자 체중 1kg 당 약 0.05~약 50 mg, 가장 빈번하게는 환자 체중 1kg 당 1~20 mg의 단일 용량을 사용한다. 급성 치료, 예컨대 이식 전이나 이식시에, 또는 이식 거부반응이 개시된 임의의 증후에 대하여, 항체의 유효량은 체중 1 kg 당 약 1 mg~약 20 mg의 항체로서, 약 1~5일 동안 매일, 바람직하게는 환과 정맥내 투여로 투여된다. 동일한 투여량 및 투여 계획을 적재 유지 방법의 적재기에 사용할 수 있으며, 유지기에는 1주 간격 내지 3개월 간격의 임의의 치료 기간 동안 체중 1 kg 당 약 0.1 mg~약 20 mg의 항체를 정맥내 또는 근육내 투여한다. 만성 치료는 유지 방법으로 수행할 수 있는데, 항체는 투여와 투여 사이에 약 1주 내지 약 3개월의 간격을 두고 체중 1 kg당 약 0.1 mg~약 20 mg의 항체를 정맥내 또는 근육내 경로로 투여한다. 또한, 만성 치료는 간헐적 환과 정맥내 방법으로 실시할 수 있다. 이 방법은 체중 1 kg당 약 0.1 mg~약 100 mg의 항체를 투여하는데, 이 때 연속 치료 사이의 간격은 1~6개월이다. 간헐적인 환과 방법을 제외하고 모든 투여는 경구, 폐, 비강 또는 피하 경로일 수 있다.

필요에 따라, 항체의 효과는 종래의 거부반응 억제 치료제 또는 약물, 예컨대 코르티코스테로이드 또는 면역억제제와 함께 또는 연속하여 투여함으로써 증가시킬 수 있다. 대안적으로 항체는 종래의 제제에 접합시킬 수 있다. 이렇게 하면, 제제를 단일 치료로서 투여하는 경우 종래의 용량보다 소량, 예컨대 종래 용량의 약 50% 미만의 양으로 종래 제제를 투여할 수 있다. 따라서, 제제와 관련된 여러 부작용의 발생을 피할 수 있다.

이식 거부반응을 치료하기 위한 본 발명의 조합 치료는 항CD40L 항체와 함께 B 세포에 표적화된 제제, 예컨대 항CD19, 항CD28 또는 항CD20 항체(미접합되거나 방사능표지됨), IL-14 길항물질, LJP394(라졸라 파마슈티칼스 수용체 차단기), IR-1116(다케다 소분자) 및 항Ig 이디오타입 모노클론 항체를 사용하는 것을 포함한다. 대안적으로, 조합 제제는 T 세포/B 세포 표적화된 제제, 예컨대 CTLA4Ig, IL-2 길항물질, IL-4 길항물질, IL-6 길항물질, 수용체 길항물질, 항CD80/CD86 모노클론 항체, TNF, LFA1/ICAM 길항물질, VLA4/VCAM 길항물질, 브레퀴나르 및 IL-2 특신 접합체(예, DAB), 프레드니손, 항CD3 MAb(OKT3), 마이코페놀레이트 모페틸(MMF), 시클로포스파미드, 및 칼시네우린 시그널 차단기와 같은 기타의 면역억제제, 비제한적인 예로서 타크롤리무스(FK506)를 포함할 수 있다. 조합 제제는 T 세포 표적화된 제제, 예컨대 CD4 길항물질, CD2 길항물질 및 IL-12를 포함할 수도 있다.

이식편 통합을 유지하기 위해서, 또는 이식 거부반응의 급성 발생 억제 후의 일정 기간 동안에는, 필요에 따라 항CD40L 항체의 유지 용량을 단독으로 또는 종래의 거부반응 억제제와 함께 투여한다. 그 후에는, 투여 용량 또는 빈도, 또는 둘 다 감소시킬 수 있다. 이식 거부반응의 증후가 명백하지 않으면, 치료를 중단하고, 주의하여 이식 거부반응의 징후에 대하여 모니터링한다. 다른 경우, 의사들의 결정에 따라 때때로 치료제를 4주 이상의 간격을 두고 투여한다. 그러나, 수용체 숙주는 임의의 질병 증상이 재발하면 장기간 동안 간헐적인 치료를 요구할 수 있다.

실시에

CD40:CD154 저해제 치료 방법을 평가하기 위한 임상전 모델계

CD40:CD154 저해 화합물(예, 항CD40L 화합물 또는 CD154 차단제, 예컨대 MAb 5c8의 특이성을 갖는 MAb)의 효능을 시험하기 위한 바람직하고 예시적인 모델계는, 본원에서 참고로 인용한 종래의 관련 미국 가명세서 출원 일련번호 60/050,267호(1997년 6월 20일 제출)에 개시된 영장류(비비 및/또는 붉은털 원숭이) 도의 동종이식 모델이다. 이러한 영장류 모델에서는 면역 조작을 엄밀하게 시험하였다. 이 모델은 수용체 상처 치유 및 면역계 기능에 대한 부작용 또는 동종이식편 기능에서의 작은 변화에도 대단히 민감한 것이다. 또한, 인간의 신장 이식편과 명백한 생물학적 유사성을 갖는다. 구체적으로, MHC 단백질을 암호화하는 유전자는 기초 모델로서 사용되는 영장류 및 인간간에 잘 보존되어 있고, 혈관신생 기관의 영장류 거부반응은 임상 설정에서 관찰되는 것과 상당히 유사하다.

췌장 절제술로 유도된 당뇨병에 대한 ICT의 비비 모델

공여체-수용체 쌍의 동정

만하임 시설(미국 플로리다주 홈스테드에 소재)로부터 10 마리의 가능한 수용체(비비, 파피오 하마드리아스(*Papio Hamadryas*), 수컷 및 암컷, 1~2년령, 약 4.0 kg)에서 유래한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를, 11마리의 수컷 공여체(2년령 이상, 텍사스에 있는 사우스웨스트 파운데이션으로부터 구입)에서 유래한 PBMC에 대한 반응인자로서 일방향 혼합 단핵구 배양물(MLC)에서 사용하였다. 인간 MLC에 대한 표준 방법을 통해 비비 MLC를 수행하였다. 낮은 배경 및 높은 특이적 반응성에 대해서, 인간 혈청이 보충된 배지를 사용하여 비비 또는 태아 소 혈청을 사용한 배지와 비교하여 우수한 결과를 얻었다. 공여체는 도 및 골수를 1마리의 공여체로부터 얻어 2마리의 수용체에게 이식할 수 있도록 충분히 컸다. 만하임에서 동물로부터 얻은 PBMC를 MLC 반응인자 및 자극인자로서 사용한 경우 보통의 MLC 반응이 관찰되는 것과는 대조적으로, 이들 동물 사이에 MLC 반응성은 우수하며, 모든 가능한 수용체는 자극인자에 대하여 자극 지수(S.I.)가 ≥ 10.0 이다(공여체, 배경 $< 200 \sim 300$ cpm(분당 계수)). 지정 공여체에 대해 유사한 MLC 반응성이 있는 2개의 수용체를 선택하였고, 동종반응성 정도가 다양한 공여체-수용체 쌍을 선택하였다. S.I.가 > 10 인 MLC는 반응성이 매우 큰 것으로 생각하였으며, 최소 용인성 부등으로서 선택하였다. 비교를 위해서 만하임으로부터 얻은 동물을 공여체 및 수용체로서 사용한 경우 MLC S.I.는 일반적으로 5 미만이다.

도/골수 제조 및 투여

Liberase(등록 상표)(미국 인디애나주 인디애나폴리스에 소재하는 비링거 만하임에서 입수가 가능한 0.47 mg/ml 콜라게나제 용액)를 사용하여 인간의 도 분리(Ricordi et al., *Diabetes* 37:413420, 1988; Selvaggi et al., *Transplant. Proc.* 29:1967-1968, 1997)의 자동화 방법을 약간 변형시켜 ICT 하루전(즉 연구 -1일에) 췌장으로부터 도를 분리하였다. 췌장의 저온 허혈 시간은 평균 0.5 ± 0.1 시간이었다. 도는 3층의 비연속적인 유로피콜 구매(1.108, 1.096, 1.037)로 농축되며, 분해된 췌장 조직은 1.108 층으로 하부 적재되었다. 세포 분리기(COBE 299.1, COBE, Lakewood, CO)를 구매의 원심분리에 사용하였다(Robertson, Chadwick, Contractor, James, London. *Acta Diabetologica* 30:93-98, 1993). 얻은 도의 수, 부피 및 순도는 다음과 같이 측정하였다. 최종 도 제제를 250 ml RPMI 1640 용액에 현탁시키고, 3개의 100 μ l 시료를 디티존으로 염색하고(Latif et al., *Transplantation* 45: 827-830, 1998), 총 도 수율을 평가하기 위해서 계산하였다. 자료를 수학적으로 변환하여 평균 직경이 150 pm인 도의 총 수를 측정하였다(도 등가물; IEQ)(Ricordi et al., *Acta Diabetol.Lat.* 27:185-195, 1990).

관용성 증가에 대한 연구를 위해서, 척추체를 췌장 공여체로부터 수거하고, 인간 척추체의 처리를 위한 방법을 일반적으로 변형시킨 방법에 따라 처리하여 공여체 골수 세포(DBMC)를 얻었다. 공여체 골수의 수용체를 위해서, ICT후 5일 및 11에 주입을 실시하였다. 수용체 체중 1 kg당 10^9 핵화된 세포의 총 용량을 제공하였다.

동물 구속

화학적 구속을 위해서, 케타민 히드로클로라이드를 볼기 근육내로 주사하였다(10 mg/체중 kg). 케타민 HCl을 5 mg/kg 용량으로 근육내 투여하여 진정작용을 유지하였다. 동물이 앞발을 위축시키는 자극에 반응할 때마다 추가의 케타민을 제공하였다. 이전의 연구로부터 케타민이 당에 대한 제1기 인슐린 반응(FPIR)을 감소시킨다는 것을 확인하였기 때문에, 케타민 용량을 모든 대사 시험에서 가능한 한 낮게 유지하였다(Lehmann et al., *J.Med.Primatol*, 26:312-321, 1997). 30분의 기간 동안 만족스러운 진정 작용을 유지하기 위한 케타민 총량은 35 ± 2 mg/kg이었다. 케타민을 이용하여 진정시키는 동안 동물을 물리적으로 구속하였다. 수술 및 혈관 침투 부위는 베타딘 및 알코올을 교대로 문질러서 준비하였다. 내재 카테터를 정맥내 배치하고 고정하였다.

체장절제 및 ICT

ICT 당일(연구 0일), 도 제제를 원심분리하고 펠렛을 보충된 CMRL 1066에 재현탁시킨 다음 22°C에서 밤새 배양하였다. 이식 전에, 제제를 원심분리하고, 펠렛을 2.5% 공여체 혈청 및 200 IU 헤파린을 함유하는 20 ml RPMI 1640 용액에 재현탁시켰다. IEQ 수를 이식 직전에 측정하였다. 기존의 수술 기법에 따라 전체 체장 절제를 수행하였다. 전체 체장절제를 완료한 후에, 20 g 혈관카테터를 문정맥의 장간막 혈관 지류 중 하나에 삽입하고, 10분 동안 도 제제의 중력에 의한 주입으로 ICT를 실시하였다.

면역억제 및 수술후 관리

현재 FK506(타크롤리무스)이 인간 ICT에서 이용되고 있기 때문에 이 약물을 면역억제제로서 선택하였다. FK506 투여는 ICT 5일 전에 개시하였다. 0.1 mg/kg/일의 용량을 근육내로 수용체 비비에게 투여하였다. 약물 농도를 매일 모니터링하고 약 15 ng/ml의 농도를 유지하도록 용량을 조정하였다. 인간화된 항CD154(MAb 5c8로부터 유도됨, Lederman et al., *J.Exp.Med.* 175:1091-1101, 1992)를 연구 -1, 3 및 10일에 10 mg/ml 또는 20 mg/ml의 용량으로 정맥내 주사하였고, 5c8 및 항5c8의 혈청 농도를 ELISA로 평가하였다.

수술 제1일(연구 1일 또는 POD 1)에, 비비에게 정맥내 유체를 제공하였다. 이어서, 하루에 탄수화물 60 g을 함유하는 음식물을, 원숭이 비스켓(비오키스 보충) 45 g 및 과일 15 g과 함께 동물에게 공급하였다. 처음 2마리의 동물을 항CD154로 처리한 경험에 기초하여, 도 이식 후 14~20일 동안 피하 인슐린 소용량(일일 체중 1 kg 당 약 0.5 U)으로 비비를 처리하여 도의 "고갈(exhaustion)"을 방지하고, 따라서 성공적인 생착에 필요한 조건을 최적화한다.

모니터링

공복 혈당 및 식사후 혈당(각각 FG 및 PPG)은 뒷꿈치를 찔러 당측정기 Elite로 혈액을 시험하여 모니터링하고, 일주일에 1회 이상 혈액 시료를 채취하여 백곤 당 분석기로 FG 레벨을 측정하기 위한 혈장을 얻었다. 일반적으로, 혈액 시료를 얻어 비상하게 높은 수치를 확인하였다. 각 용량의 MAb를 투여하기 전(-1일 전과 3일 및 10일에 항체를 투여하기 직전) 및 그 후 매주마다 항CD154 연구 중인 모든 동물로부터 혈액 시료를 취하였다. 이식한 지 약 3개월 후에, 시험 간격을 격주로 줄였다. 말초 혈액의 표현형 분석을 위해 혈액 시료를 사용하여 백혈구 서브세트, CBC 및 화학물질 측정, 5c8 및 항5c8 레벨, 인슐린 및 C-펩티드 레벨 및 키메라 현상을 평가하였다. 공여체 및 제3자 항원에 대한 MLC 반응성을 재시험하기 위해서 정기적으로 채혈하였다.

분석

혈장 인슐린은 이중 항체법(미조리주 세인트 찰스에 소재하는 린코 리서치 인코포레이티드)으로 분석하였다. 검출 하한선은 20 pmol/l이고 평균 내부 분석 계수 편차는 6%였다. C-펩티드를, 검출 하한선이 6%이고 내부 분석 계수 편차가 6%인 혈장에서 분석하였다. 혈장의 당은 당 분석기(미국 캘리포니아주 팔로 알토에 소재하는 벡크만 인스트루먼츠)를 사용하여 측정하였다. 총 모세혈당량을 Elite 당 측정기(미국 인디애나주 엘크하드에 소재하는 베이어)를 사용하여 측정하였다. 비비에서의 인슐린 분석의 유효성은 인슐린 표준 곡선과 혈청의 희석물 중에서의 인슐린 농도의 병행법으로 확인하였다. 이중 항체 분석(미국 캘리포니아주 로스앤젤레스에 소재하는 DPC)을 이용하여 글루카곤을 측정하였다. 이들 시판용 키트는 계대 배양으로, 그 유효성을 이미 입증받았다(Goodner et al., *Diabetes* 38:925-931, 1989).

정맥내 내당력 시험(IVGTT)

생체내 도 세포 기능 시험은 β 세포량에서의 변화를 정확히 반영하는 것으로 확인된 바 있다(McCulloch et al., *Diabetes* 40:673-679, 1991). 정맥내 내당력 시험은 전술한 바와 같이 16~18 시간 밤새 단식시킨 후에 실시하였다(Lehmann et al., *J. Med. Primatol.* 26:312-321, 1997). 간단히 설명하면, 혈액 시료는 -10분, -5분 및 0분에 수거하였다. 그 다음 50% 당용액 중의 0.5g 당/체중 1 kg을 복재정맥내로 20초 동안 주사하였다. 주사후 1분, 3분, 5분, 7분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분에 반대측 대퇴 동맥으로부터 1.5 ml 시료를 회수하였다. 따라서, 총 12개의 혈액 시료를 40분 동안 채취하였다. 시료를 0.05 ml 15% 유체 EDTA 및 0.2 ml 트라실올(500 K.I.U. 아프로티닌/ml 혈액)을 함유하는 유리관 중에 취하고, 얼음 위에 두고, 10분 내로 원심분리하였다. 혈장을 -80°C에서 냉동시키고, 이후에 당, 면역반응성 인슐린 및 글루카곤에 대해 분석하였다.

통계적 분석 및 계산

결과는 평균 \pm SEM으로 표시한다. 당 제거 상수(Kg)는 당 주사후 10분 내지 30분 사이에 $\log_e(\ln)$ 혈장 당 감소의 기울기에 100을 곱하여 IVGTT로부터 계산하였다. 당에 대한 급성 인슐린 반응(AIRG)은 IV 당 주사후 1~10분 사이에 인슐린 곡선(AUG)하의 증분 면적으로서 계산하였다. 증분 반응(AUCGlucose, AUCInsulin)은 I에서 30 분까지 기저값을 감한 부등사변형 법칙을 이용하여 계산하였다. 자료는 윈도우 소프트웨어용 Statistica(버전 5.0, 1997, 미국 오클라호마주 톨사에 소재하는 스타트소프트 인코포레이티드)로 분석하였다.

결과

CD154 차단 치료는 도 동종이식편의 기능 및 생존을 연장시킨다

모든 비비는 이식 직후 정상혈당치를 나타내었다. 표 1에 도시된 바와 같이, 면역억제 또는 CD154 차단 치료의 부재하에 동종이식 도의 ICT는 8일째 거부반응을 나타내었다. FK506(단독으로 또는 전체 골수 또는 간세포 선택된 골수와 함께)을 이용한 종래의 면역억제는 도 생존을 개선시키지 못하였으며, 동물은 각각 10일, 8일 및 10일에 거부반응을 나타내었다. 현저하게 대조적으로, 항CD154(5C8) MAb로 5 마리의 비비 중 4마리를 치료하여, 대조군 또는 FK506 처리 동물의 경우보다 월등하게 도 동종이식편 생존을 연장시켰다. 이 연구 결과는, POD의 함수로서 공복 혈당(FG)을 플롯한 도 1의 선 그래프 형태로 제시되어 있다. 이 결과는, CD154 차단 치료가 췌장 절제로 유도된 당뇨병의 비인간 영장류 모델에서 도 동종이식편의 수용능을 연장시킨다는 것을 처음으로 입증한 것이다. 유의적으로, 이들 결과는 또한 항CD154 치료의 급성 거부반응을 반전시키는 능력을 입증한다.

CD154 차단 치료는 골수 세포 이식과 병행하여 적용할 수 있다.

POD 5 및 11일에 전체 골수(n=2) 또는 간세포 선택된 골수(미국 워싱턴주 보텔에 소재하는 셀프로의 Ceprate(등록상표) 컬럼상에서 선택)를 비비에게 지연형으로 주입하였다. 이들 비비에게 5C8 유도 치료를 하고(-1일, 3일 및 10일에 20 mg/kg), POD 28일로부터 시작하여 매일 유지 치료를 하였다. 1마리의 동물은 매우 잘 생존하여, POD241일 까지 거부반응이 없었다. 다른 1마리의 동물은 POD112일에 거부반응을 나타내었으며, 거부반응을 치료하여 POD162일까지 유지하였다. 또 다른 1마리의 동물은 70일에 거부반응을 치료하여 POD124일까지 유지하였다.

당 대사 제어를 비롯한 이식편 기능에 대한 CD154 차단 치료의 효과

대조군 동물에서 반복한 IVGTT는, 제1기 인슐린 분비(FPIS)의 우수한 재현성을 나타내었다. 특히, 79일에 안락사시킨 동물에서 1회의 내당성 시험(IPGTT) 및 면역조직화학을 수행하여, 간에서 이식편 조직이 기능하는 것을 확인하였으며, 간의 이외의 부위에서는 잔여 인슐린 생성이 없었다. 이 연구에서 다른 동물들은, >125일 내지 >220일 동안 생존하는 작용성 도 동종이식편을 보유하는 것으로 밝혀졌다. 췌장 절제 및 도 이식 후에 4~16 주 반복한 IVGTT는, 수술 후 최대 8주 동안 모든 동물에서 거의 동일한 Kg를 나타내었다. 그 이후 Kg 값은 거부 반응시 hu5c8로 처리한 비비에서 감소하였다. hu5c8의 유지 용량으로 처리한 비비에서는 안정한 값이 관찰되었다. FPIS로 평가되는 바와 같이, 도 질량은 경시적으로 각 거부반응 에피소드와 함께 감소하였다. 대조적으로, hu5c8 유지 치료를 받은 동물의 도 이식 후 FPIS(16주까지)는 잘 보존되었다. 또한 2 마리의 대조군 동물을 연구하였다. 일부 IVGTT에 있어서, 기술적 문제로 전술한 연구에서보다 케타민을 더 투여하여 감소된 Kg 값 및 FPIR을 산출하였다. 그러나, 표준량의 케타민을 이용한 경우의 사후 조사시, 이들 지표는 정상으로 돌아왔다.

본 연구 과정에서, 이식편 거부반응은 2시간의 PPG를 평가하여 FG 상승 전에 검출할 수 있다는 것을 밝혀냈다. 조직학적으로, 도 이식 거부반응은 2회 연속 FG가 250 mg/dl 이상을 나타내는 것으로 규정하였다. 그러나, 2회 연속 2 시간 PPG가 150 mg/dl를 나타내는 것은 거부반응의 초기 단계의 민감성 지표라는 것을 발견하였다. CD154 차단제 또는 종래의 거부반응 억제제의 사용과는 무관하게, 거부반응 억제 치료의 적용은, 대사적으로 생존가능한 이식편 조직을 구제할 수 있도록 거부반응 과정 중 충분히 조기에 적용할 수 있다. hu5c8에 의한 이식편의 거부반응을 구제하기 위해서, 이식편 수용능을 유도하는데 사용된 동일한 투여법을 반복하였다.

비비 연구로부터의 결과

전술한 연구 결과는, hu5c8이 도 생착을 촉진하고, 동종이계 도를 장기간 생존시키고, 인슐린 분비 또는 총 인슐린 감성에 불리한 효과를 미치지 않는다는 것을 증명하였다. 또한, 이들 연구는 CD154 차단 치료를 사용하여 생착이 유지될 수 있고, 거대 동물 모델에서 도 거부반응 에피소드의 반전이 가능하다는 것을 처음으로 확인하였다. 본원에 개시된 치료법은 거대 동물에서 ICT전 레벨로 총 인슐린 민감성 및 보존 인슐린 분비를 산출할 수 있다.

[표 1]
항CD154를 이용한 비인간 영장류 동종이식편 생존 연장

그룹	N	종	인슐린 독립성 지속 기간(POD)
대조군	1	비비	8
FK506	3	비비	8, 10, 10
항CD154 유도+거부반응 억제	5	비비	^a 8, ^b 59, ^c 229, ^d 264, ^e 284
항CD154 유도+ 유지	2	비비	^f 113, ^g 238
항CD154 유도+ 유지	4	^h 붉은털 원숭이	ⁱ 16, >80, >94, >166

a) 5c8의 감소량을 투여
b) 동물 34R; 부분적 기능이 있고, POD58에 거부반응 에피소드를 나타내었으나, 성공적으로 회복된 것을 POD79에 희생시킴.
c) 동물 12R; 부분적 기능이 있고, POD59에 시작하여 거부반응 에피소드를 6회 성공적으로 처리한 것을 POD302에 희생시킴.
d) 동물 29R; 완전히 거부반응을 나타내었고, 거부반응의 1회 에피소드가 있었던 것을 POD300에 희생시킴.
e) 동물 14R; POD31에 시작하여 4회 성공적으로 치료한 거부반응 에피소드를 경험한 부분적 기능이 있는 것을 POD301에 희생시킴.
f) 완전히 거부반응을 나타낸 동물을 POD130에 희생시킴.
g) 부분적 기능이 있는 POD 253에 희생시킴.
h) 후술
i) 부분적 장 장애에 의한 인슐린 비의존성으로 POD16에 사망.

췌장절제로 유도된 당뇨병에 대한 ICT의 붉은털 원숭이 모델

특별한 언급이 없으면, 모든 과정은 일반적으로 비비 모델 연구에 대해 전술한 바와 같다.

동물 절차

2~7연령의 SPF 붉은털 원숭이를 COVANCE(텍사스주 앨리스) 또는 만하임 파운데이션 인코포레이티드(플로리다주의 홈스테드에 소재)나 유사한 판매원으로부터 용이하게 입수한다. 입원시, 모든 원숭이를 검사하여 일반적 건강 상태, 신체 증상 및 생리학적 상태를 측정하였다. 모든 수술 절차는 무균 상태에서 수행하였다. 수술전 12~18 시간 동안 동물을 절식시키고, 케타민(10 mg/kg) 및 아트로핀(0.04 mg/kg)을 근육내 주사하여 미리 마취시킨다. 동물이 진정되면, 기관내 관 및 정맥내 카테터를 신속하게 설치한다. 기관내 관을 사용하여 기도를 보호하고, 비상시에 약물을 쉽게 이용할 수 있게 한다. 이 동물을 이소플루란과 산소의 혼합물로 마취시킨다. 주사용 일반 식염수 용액을 10 ml/kg/시간의 속도로 전체 ICT 과정 중에 카테터를 통해 주입한다.

중양선을 절개하여 복부 기관에 접근한다. 공여체 및 수용체 동물에 대해, 십이지장을 보존하면서 전체 췌장절제술을 수행한다. 췌장을 절제한 당뇨병 원숭이로 후속 이식을 위해 종래의 수단으로 공여체 췌장으로부터 도를 분리한다. 마취하에서 공여체의 방혈 후에, Striker Saw로 복부 절개를 통해 척추체를 제거하였다. 뼈를 즉시 처리하여 골수를 분리하였다. 일부 수용체에서, 필터가 있는 y형 혈액 세트를 사용하여 두부 정맥을 통해 수용체로 골수 세포를 주입한다.

수용체 동물의 췌장 절제 후에, 하부 또는 상부 장간막 정맥의 지류에 카테터를 연결하고, 간내로 중력 배수구를 따라서 도를 주입한다. 그 다음, 종래의 수술 기법에 따라 수술 절개 부위를 봉합하였다. 이 수술 후에, 동물을 산소만 있는 공간에 두고, 동물이 충분히 회복되어 기도를 제어할 수 있을 때 기관내 관을 제거한다. ICT 후에, 수용체를 ICU 우리에 두고, 임상적으로 안정될 때까지 관찰한다. 항생제(베이트릴)를 수술 후(5일간 1일 5 mg/kg, 근육내) 투여하였다. 부포모르핀(0.05 mg/kg, 근육내)은 진통제로서 필요에 따라 사용한다.

수술 후에 원숭이를 절식시키고, POD1에 게토레이를 p.o. 투여한다. POD2에, 바이오카스를 함유하는 (물로) 연화된 고단백질 원숭이 사료와 바나나로 구성된 소프트 식품(1 바나나 + 4 비스킷)을 이들 원숭이에게 매일 2회 제공하기 시작한다. 정상적인 음식은 POD3(매일 2회, 바이오카스를 함유하는 6~8개의 비스킷 + 과일)에 다시 시작하였다. 식사 제공시 각 동물이 음식에 대해 경쟁하지 않도록 개별적으로 공급한다. 일반적인 건강 및 영양을 개선시키기 위해서 아픈 원숭이에게는 손으로 먹이를 공급한다. 아픈 동물은 호전될 때까지 격리 치료하는 것이 중요하다. 말기 또는 치료할 수 없다고 결정된 원숭이는 정맥내 카테터를 통해 염화칼륨을 빠르게 정맥내 주사하여 희생시킨다.

모니터링

당 및 인슐린 모니터링, 면역 모니터링 등을 위한 혈액 시료 채취는 1개월 동안 체중의 7% 또는 한번에 체중의 1%를 초과하지 않게 한다. 공복 혈당(FG) 농도는, 란셋을 사용하여 뒷꿈치를 찔러 당측정기 스트립상에 놓기 위한 소적을 얻어서 측정한다. 특정 상황에서는, 예컨대 당이 높게(>200 mg/dl) 나타나는 상황에서는, 정맥천자를 수행하여 백크만 당 분석기상에서 분석하기 위한 혈장 시료를 얻는다. 이식 전과 이식 후에 간격을 두고 혈액 시료를 얻어 수용체 항-공여체 면역반응성을 평가한다. 정맥내 내당성 시험(IVGTT)은 전술한 바와 같이, 이식전 및 그 후 4~6주의 간격을 두고 수행한다.

결과

CD154 차단 치료법은 당뇨병 붉은털 원숭이와 비비에서 도 자가이식편의 생존 및 기능을 연장시킨다

표 1에 도시한 바와 같이, 본 연구로부터 hu5c8 단일치료가 제2의 비인간 영장류 중에서 도 동종이식편 수용능을 연장시킨다는 것을 확인하였다. 이 연구는, 연구 -1, 0, 3 및 10일에 hu5c8을 투여하는 수용능 유도법을 이용하였다. 매일 수용능 유지 방법을 수행하여 hu5c8의 혈청 레벨을 유지한다. 그 결과는 인상적인 것으로서 도 2에 제시되어 있다. 작용성 도 동종이식편은 거부반응 에피소드의 발생 없이 유지된다. 이러한 발견의 중요성은 도 3에 도시된 비교 자료에 의해 강조되는데, 도 3은 붉은털 원숭이 연구 동물외에 DM을 앓고 있고 현재 집중 인슐린 대체 치료를 받고 있는 인간(LAURA로 명명)의 FG 플롯이다. LAURA는 14개월령에 DM으로 진단받아, 연구시 6연령이었으며 매일 2~3회 인슐린 주사를 맞고 있다.

본 발명은 이의 취지 또는 본질적 특성을 벗어나지 않고 다른 특정형으로 구체화될 수 있다. 따라서 전술한 양태들은 본원에 개시된 본 발명을 제한한다기 보다는 예시한 것으로 간주해야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 첨부된 청구항에 의해 제시되며, 청구범위와 등가의 의미 및 범위내의 모든 변화는 본 발명에 포함되는 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

항-CD40L (항-CD154) 항체 또는 항체 유도체를 포함하는 약제로서, 상기 약제는 영장류 이식 수용체에 의한 인슐린 생성 조직 이식편의 거부반응을 억제 또는 반전시키거나, 또는 영장류 이식 수용체에서 이식된 인슐린 생성 조직의 기능을 생존 연장 또는 보존시키거나, 또는 영장류 이식 수용체에서 손상된 이식 인슐린 생성 조직의 기능을 회복시키는데 유용하고, 상기 약제는 상기 이식 수용체에 유효량의 항-CD40L (항-CD154) 항체 또는 항체 유도체를 제공하는 양으로 이식 수용체에게 투여되는 것인 약제.

청구항 2.

항-CD40L (항-CD154) 항체 또는 항체 유도체를 포함하는 약제로서, 상기 약제는 인슐린 생성 조직의 영장류 수용체에서 글루코스 대사의 대사 제어를 회복시키는데 유용하고, 상기 약제는 상기 이식 수용체에 유효량의 항-CD40L (항-CD154) 항체 또는 항체 유도체를 제공하는 양으로 이식 수용체에게 투여되는 것인 약제.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-CD40L (항-CD154) 항체 또는 항체 유도체가 항-CD40L (항-CD154) 모노클론 항체 또는 항체 유도체인 것인 약제.

청구항 4.

제3항에 있어서, 항-CD40L (항-CD154) 모노클론 항체가 ATCC 수탁 번호 HB10916이 생성하는 5c8 항체의 항원 특이적 결합 특성을 보유하는 것인 약제.

청구항 5.

제3항에 있어서, 항-CD40L (항-CD154) 모노클론 항체가 ATCC 수탁 번호 HB10916이 생성하는 모노클론 항체 5c8인 것인 약제.

청구항 6.

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-CD40L (항-CD154) 모노클론 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 및 영장류화된 항체로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 약제.

청구항 7.

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-CD40L (항-CD154) 항체 유도체가 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, V_H 영역 및 단일쇄 항체로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 약제.

청구항 8.

제1항 또는 제2항에 있어서, 인슐린 생성 조직이

(a) 전체 췌장 조직; 또는

(b) 분리된 췌장도; 또는

(c) 분리된 성인 도 β 세포를 포함하는 세포군; 또는

(d) 분리된 태아 도 β 세포를 포함하는 세포군; 또는

(e) 배양된 도 β 세포를 포함하는 세포군; 또는

(f) 불사의 도 β 세포를 포함하는 세포군; 또는

(g) 인슐린 유전자를 안정하게 발현하는 숙주 세포를 포함하는 세포군; 또는

(h) 인슐린 유전자를 유도적으로 발현하는 숙주 세포를 포함하는 세포군

으로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 약제.

청구항 9.

제1항 또는 제2항에 있어서, 인슐린 생성 조직이 면역분리 장치에 의해 이식 수용체의 조직으로부터 물리적으로 분리되는 것인 약제.

청구항 10.

제1항 또는 제2항에 있어서, 인슐린 생성 조직이 이식 수용체에 대해 동종이계 또는 이종인 것인 약제.

청구항 11.

제1항 또는 제2항에 있어서, 이식 수용체가 인간인 것인 약제.

청구항 12.

제11항에 있어서, 이식 수용체가 글루코즈 대사의 대사 제어 장애를 겪고 있는 것인 약제.

청구항 13.

제11항에 있어서, 이식 수용체가 진성 당뇨병을 겪고 있는 것인 약제.

청구항 14.

제2항에 있어서, 약제가 조직 이식 전에 이식 수용체에게 투여되는 것인 약제.

청구항 15.

제2항에 있어서, 이식 수용체에게 약제의 투여를 조직 이식 후 2주 이내에 2회 이상 반복하는 것인 약제.

청구항 16.

제15항에 있어서, 이식 수용체에게 약제의 투여를 조직 이식 후 1 개월 이상시에 반복하는 것인 약제.

청구항 17.

제16항에 있어서, 이식 수용체에게 약제의 투여를 조직 이식 후 2 개월 이상시에 개시하여 월 단위로 반복하는 것인 약제.

청구항 18.

제2항에 있어서, 인슐린 생성 조직의 이식 수용체가 관용화제의 수용체인 것인 약제.

청구항 19.

제18항에 있어서, 관용화제가 인슐린 생성 조직과 MHC 적합성이 있는 골수 조직인 것인 약제.

청구항 20.

제18항에 있어서, 관용화제가

(a) 인슐린 생성 조직과 동계인 골수 조직; 또는

(b) 전체 골수; 또는

(c) CD34(+) 조혈세포군; 또는

(d) CD40(-)인 CD34(+) 조혈세포군

으로 구성된 군 중에서 선택된 것인 약제.

청구항 21.

삭제

청구항 22.

삭제

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.
삭제

청구항 30.
삭제

청구항 31.
삭제

청구항 32.
삭제

청구항 33.
삭제

청구항 34.
삭제

청구항 35.
삭제

청구항 36.
삭제

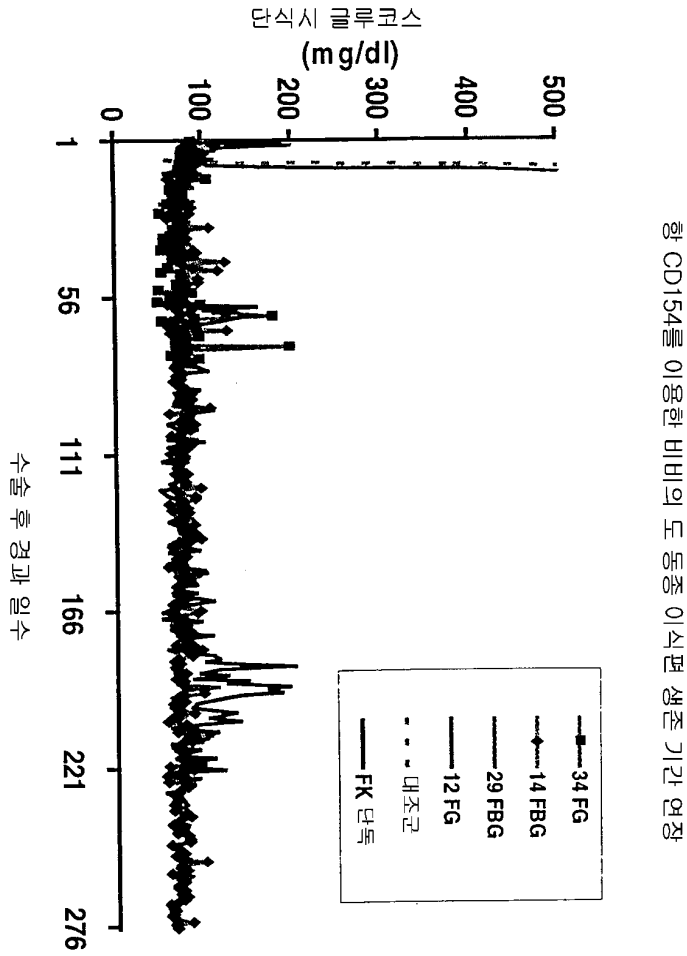
청구항 37.
삭제

청구항 38.
삭제

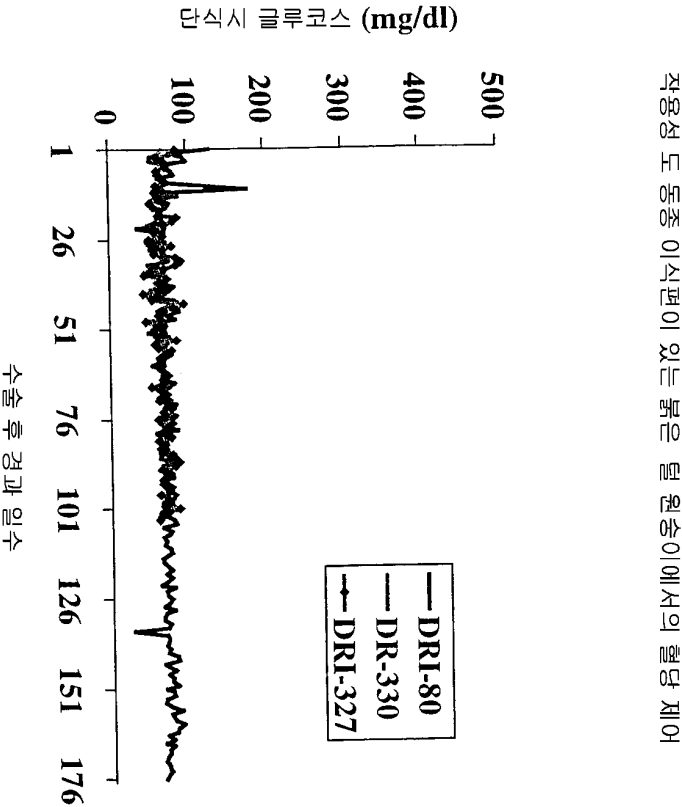
청구항 39.
삭제

도면

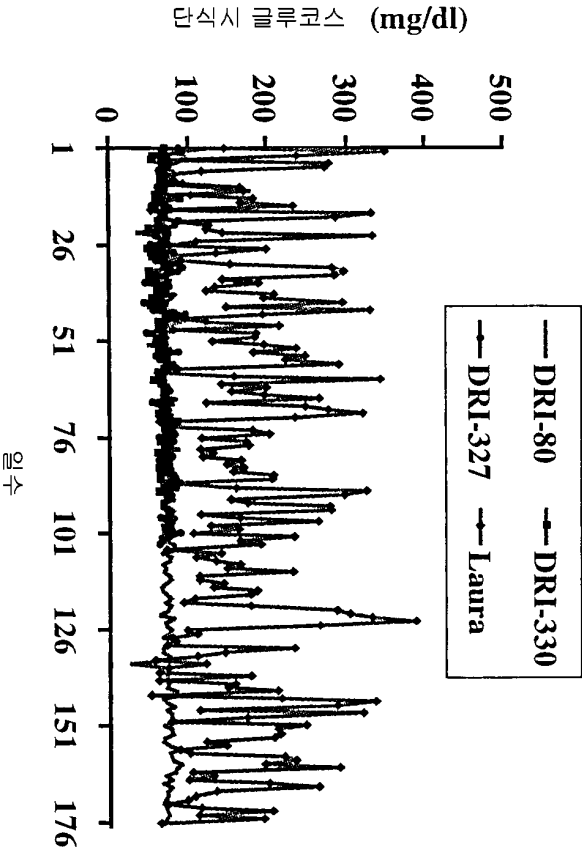
도면1



도면2



도면3



작용성 도 동종 이식편 대 집중 인슐린 치료에 의한 혈당 제어