



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 35 965 T2 2007.06.14

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 051 191 B1

(51) Int Cl.⁸: A61K 39/395 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 35 965.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/12892

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 930 436.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1998/058669

(86) PCT-Anmeldetag: 19.06.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 30.12.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 15.11.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 20.09.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 14.06.2007

(30) Unionspriorität:

50267 P 20.06.1997 US
77265 P 09.03.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Biogen Idec MA Inc., Cambridge, Mass., US;
University of Miami, Miami, Fla., US

(72) Erfinder:

KENYON, S., Norma, Miami, FL 33158, US;
RICORDI, Camillo, Miami Beach, FL 33158, US;
THOMAS, W., David, Wellesley, MA 02181, US;
BURKLY, Linda, West Newton, MA 02165, US

(74) Vertreter:

Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(54) Bezeichnung: CD154-BLOCKADETHERAPIE DER PANKREASINSELZELLTRANSPLANTATION bei Primaten

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

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

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die Erfindung betrifft allgemein die Suppression von unerwünschten Immunantworten, insbesondere von Immunantworten, die gegen eine Adaption gerichtet sind und von T-Lymphozyten vermittelt werden. Die Erfindung betrifft insbesondere die Vermeidung, die Behandlung, die Suppression oder die Umkehrung einer vom Immunsystem betriebenen Abstoßung eines transplantierten Gewebes oder eines transplantierten Organs in einem Empfänger-Wirt.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Eine Organtransplantation zwischen genetisch nicht identischen Individuen führt unweigerlich zu einer immunologischen Abstoßung des Organs durch T-Zell-abhängige Mechanismen, sofern der Abstoßungsprozess nicht durch Verabreichung von Wirkstoffen, welche die Funktion der T-Zellen unterdrücken, eingedämmt wird. Mehrere US-Patente offenbaren die Verwendung solcher immunsupprimierenden Wirkstoffe zur Inhibition der Abstoßung des Transplantats, einschließlich US 5,104,858; US 5,008,246; und US 5,068,323. Andere übliche Mittel werden in Suthanthiran et al. (1994), 331 New Eng. Med. J. 365–376 beschrieben. Sowohl Inhibitoren der Calcineurin-Phosphatase als auch Glukokortikosteroide werden in der klinischen Praxis verwendet; diese verhindern die T-Zell-vermittelte Freisetzung von aktivierenden Zytokinen, insbesondere von IL-2. Die Therapie mit diesen Arten von üblichen Mitteln bleibt jedoch unzulänglich. Beide Arten entfalten ihre Wirkung durch Eingriff in die Signalübermittlung über den T-Zell-Antigenrezeptor (TCR), den einzigen Mediator der T-Zell-Antigenspezifität, und sie wirken wahllos auf alle T-Zellen. Darüber hinaus ist die Wirkung dieser Wirkstoffe nicht anhaltend, so dass eine Unterbrechung der Behandlung üblicherweise zu einem Verlust des Transplantats führt. Um eine lebensfähige, funktionelle Integration des Transplantats zu erhalten, müssen die Transplantat-Empfänger somit die Auswirkungen einer langfristigen unspezifischen Immunsuppression erdulden. Diese Auswirkungen umfassen ein erhöhtes Risiko für eine Infektion und eine Malignität, sowie eine Toxizität, insbesondere gegenüber den empfindlichen Organen oder Geweben, wie beispielsweise der Niere, Leber oder Pankreas.

[0003] Eine Transplantation von Inselzellen (islet cell transplantation; ICT) kann in Individuen, die an Diabetes mellitus (DM) leiden, zu einer Umkehrung der Hyperglykämie und zur Normalisierung der metabolischen Kontrolle der Glucose im Blut führen (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). Selbst bei einer fehlenden Unabhängigkeit von Insulin führt die Verabreichung von verringerten Dosen von exogenem Insulin in Transplantat-Empfängern mit funktionierenden Insel-Allotransplantaten (basale c-Peptidproduktion beträgt > 1,0 ng/ml) zu einer exzellenten metabolischen Kontrolle und zur Normalisierung des Hämoglobin A1c (HbA1c) (Ricordi, Diabetes Reviews 456–369, 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). Eine Hyperglykämie wurde nicht beobachtet, und funktionierende Insel-Allotransplantate in Empfängern mit autoimmuner Diabetes sind nunmehr 6 Jahre nach der Transplantation dokumentiert (Alejandro et al., Diabetes 46: 1983–1989, 1997). Trotz dieser signifikanten Fortschritte ist eine breite Anwendung einer Inselzelltransplantation zur Kontrolle von DM durch das Erfordernis nach einer chronischen, generalisierten Immunsuppression des Empfängers eingeschränkt. Diese Einschränkung betrifft nicht nur die Risiken, die mit einer chronischen Immunsuppression assoziiert sind, sondern auch die diabetogenen Auswirkungen der derzeit verwendeten immunsupprimierenden Wirkstoffe.

[0004] Diese Einschränkungen der gegenwärtigen Therapien zur Kontrolle von DM haben zu einem weit verbreiteten Interesse an der Entwicklung von Therapien zur Induktion einer spenderspezifischen immunologischen Toleranz geführt, die folglich die Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppression von Transplantatempfängern vermeidet. Vielversprechende Anfangsergebnisse sind von mehreren Forschern erzielt worden, wobei eine Vielzahl von Nagetier-Modellsystemen für die Allotransplantation verwendet wurden. Es wurde jedoch bei Untersuchungen in präklinischen Modellen mit Großtieren (z.B. Hunde, nicht-menschliche Primaten) herausgefunden, dass die bei Nagetieren erzielten Ergebnisse nur unzureichend prädiktiv für die Ergebnisse der ICT in Modellen sind, die die humane ICT stärker imitieren.

[0005] Es gibt somit ein Bedürfnis nach verbesserten und wirksameren immunsuppressiven oder immunmodulatorischen Behandlungen für Transplantatempfänger, einschließlich Menschen. Es gibt insbesondere ein

Bedürfnis nach Behandlungen, die keine Pan-T-Zell-Immunsuppression erfordern, d.h. Behandlungen, die den Empfänger nicht anfällig für Malignitäten und opportunistische Infektionen machen. Genauer gesagt besteht ein Bedürfnis nach Behandlungen, die eine geringere Toxizität als die gegenwärtig verfügbaren therapeutischen Mittel aufweisen. Ferner besteht ein Bedürfnis nach Behandlungen, die eine anhaltende funktionelle Integration des Transplantats fördert, d.h. eine Integration, die über das Ende des Behandlungsverlaufs hinausreicht.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, einen Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung, der ein monoklonaler Anti-CD40L-Antikörper oder Anti-CD154-Antikörper oder ein Fab-Fragment, ein F(ab')₂-Fragment oder ein Einzelketten-Antikörper davon ist, wie beispielsweise ein CD154-blockierendes Mittel, zur Verwendung bei der Therapie bereitzustellen, insbesondere zur Verwendung bei der Therapie zur Abschwächung, Verzögerung oder Umkehrung einer immunologischen Abstoßung eines transplantierten Gewebes. Ein allgemeineres Ziel der Erfindung ist es, die Verfügbarkeit von Gewebe-Transplantaten, insbesondere von Insulin-produzierenden Gewebe-Transplantaten, zu verbessern, indem immunmodulatorische Zusammensetzungen bereitgestellt werden, die eine funktionelle Integration von nicht autologem Gewebe (z.B. von allogenem oder xenogenem Gewebe) in einen Empfänger-Wirt ermöglichen. Ein weiteres Ziel ist es, Diabetes mellitus (DM) zu verhindern, abzuschwächen, zu lindern oder zu behandeln.

[0007] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung dass die Verwendung eines Unterbrechers der CD40:CD154-Bindung, wie beispielsweise eines CD154-blockierenden Mittels, allein oder in Kombination mit einem weiteren therapeutischen Mittel, wie beispielsweise mit einem immunmodulatorischen Mittel, oder mit einem tolerisierenden Mittel, die gegen die Adaption gerichtete Abstoßung von transplantiertem, Insulin-produzierendem Gewebe durch das Immunsystem in einem Primaten-Empfänger-Wirt lindert, unterdrückt, verhindert, verzögert oder rückgängig macht, ohne dass eine Pan-Suppression des Immunsystems des Empfängers notwendig ist.

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Unterbrechers der CD40:CD154-Bindung bei der Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung der Abstoßung, zur Verlängerung des Überlebens, zur Umkehrung der Abstoßung oder zur Erhaltung der Funktion eines Insulin-produzierenden Gewebetransplantats in einem menschlichen Transplantatempfänger oder zur Wiederherstellung der metabolischen Kontrolle des Glucosestoffwechsels in einem menschlichen Transplantatempfänger eines Insulin-produzierenden Gewebe-transplantats, wobei eine wirksame Menge des Unterbrechers der CD40:CD154-Bindung dem Transplantatempfänger verabreicht wird, und wobei der Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung ein monoklonaler Anti-CD40L (Anti-CD154)-Antikörper, ein Fab-Fragment eines monoklonalen Anti-CD40L (Anti-CD154)-Antikörpers, ein F(ab')₂-Fragment eines monoklonalen Anti-CD40L (Anti-CD154)-Antikörpers oder ein monoklonaler Anti-CD40L (Anti-CD154)-Einzelketten-Antikörper ist.

[0009] Ein beispielhaftes CD154-blockierendes Mittel ist ein monoklonaler Antikörper (MAb), insbesondere ein solcher, der die Antigen-spezifischen Bindungseigenschaften des MAb 5c8 aufweist, welcher von dem Hybriddom produziert wird, das unter der ATCC Zugangsnummer HB 10916 hinterlegt ist, wie es in US-Patent 5,474,771 beschrieben ist.

[0010] Die oben genannten Verwendungen können mit allen Arten von Insulin-produzierenden Gewebe-Transplantaten, wie beispielsweise mit Gesamt-Pankreasgewebe oder mit Pankreas-Inseln, die nach herkömmlichen Verfahren isoliert worden sind, durchgeführt werden. Die Erfindung ist daher für eine Verwendung geeignet, bei der der Transplantatempfänger (Empfänger-Wirt) ein Säugetier, vorzugsweise ein Pramat, und besonders bevorzugt ein Mensch ist. Die Erfindung ist insbesondere zur Verwendung geeignet, wenn der Transplantatempfänger an einer Beeinträchtigung der metabolischen Kontrolle des Glucosestoffwechsels, wie beispielsweise an DM, leidet, oder ein Risiko für eine solche Beeinträchtigung aufweist. Der Transplantatspender kann ein nicht-syngenes Mitglied derselben phylogenetischen Spezies sein wie der Transplantatempfänger (d.h. ein allogener Spender, der ein Allotransplantatgewebe bereitstellt), oder er kann ein Mitglied einer anderen phylogenetischen Spezies sein (d.h. ein xenogener Spender, der ein Xenotransplantatgewebe bereitstellt). Wenn ein xenogener Spender als Bezugsquelle für das Transplantatgewebe verwendet wird, ist der Spender vorzugsweise relativ MHC-kompatibel zu dem Empfänger-Wirt. Beispielsweise wäre ein Pavian oder Schimpanse als Spender für die Transplantation von Gewebe in einen Menschen bevorzugt. Die Erfindung kann verwendet werden, um die Transplantation von anderen Arten von Insulin-produzierendem Gewebe, einschließlich von Zellpopulationen von isolierten adulten oder fetalen Insel-β-Zellen oder kultivierten Insel-β-Zellen (entweder aus einer primären Zellkultur oder einer immortalisierten Zelllinie erhalten) zu fördern. Die Erfin-

dung kann dazu verwendet werden, die Transplantation einer beliebigen Zelle zu fördern, die induzierbar oder stabil ein Insulin-Gen exprimiert, wie beispielsweise eine manipulierte Zelle oder eine Wirtszelle, die durch herkömmliche genetische Manipulationsverfahren erzeugt worden ist. Das Insulin-produzierende Gewebe kann wahlweise auf physikalische Weise durch eine Immunisolierungsvorrichtung von den Geweben des Empfängers getrennt sein.

[0011] Im Hinblick auf das oben Gesagte sollte klar sein, dass die Erfindung die Verwendung eines Unterbrechers der CD40:CD154-Bindung bei der Herstellung eines Medikaments zur Wiederherstellung der metabolischen Kontrolle des Glucosestoffwechsels in einem Primaten bereitstellt, der dieser Behandlung bedarf. Das Verfahren umfasst das Implantieren von Insulin-produzierendem Gewebe in den Primaten und die Behandlung des Primaten mit einem Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung, vorzugsweise mit einem CD154-blockierenden Mittel. In bevorzugten Ausführungsformen ist das CD154-blockierende Mittel ein monoklonaler Antikörper mit den Antigen-spezifischen Bindungseigenschaften des MAb 5c8. In einem beispielhaften Protokoll, das durch Untersuchungen in relevanten präklinischen Modellen der humanen DM mit Großtieren validiert worden ist, wird die Transplantation durch Verabreichung des MAb vor der ICT eingeleitet, (vorzugsweise) gefolgt von mindestens zwei Verabreichungen des MAb innerhalb eines zweiwöchigen Zeitraums nach der ICT (d.h. nach Implantation des Insulin-produzierenden Gewebes). Anschließend wird das Transplantat wie gewünscht durch Verabreichung des MAb einmal monatlich (definiert als 4 Wochen) nach der ICT aufrecht erhalten. Die Erhaltung kann wiederholt werden, sofern dies notwendig oder angemessen erscheint.

[0012] Die Transplantation kann wahlweise verstärkt werden, indem der Pramat gleichzeitig mit einem tolerisierenden Mittel behandelt wird, womit jedes Mittel gemeint ist, welches das Transplantat über die Absetzung der immunmodulatorischen oder immunsuppressiven Therapie hinaus aufrecht erhält. Ein beispielhaftes tolerisierendes Mittel umfasst Knochenmarkgewebe oder eine Population von Zellen, die von Knochenmarkgewebe abgeleitet sind und zu dem Gewebe-Transplantat (vorliegend mit dem Insulin-produzierenden Gewebe) MHC-kompatibel sind. Vorzugsweise ist das Knochenmark oder sind die Zellen syngen in Bezug auf den Spender oder die Bezugsquelle des Insulin-produzierenden Gewebes. Das langfristige Überleben des tolerisierenden Mittels in dem Transplantat-Empfänger macht den Empfänger immunologisch chimär, wobei es sich um einen Zustand handelt, der sich durch spenderspezifische immunologische Toleranz manifestiert. Populationen von hämatopoietischen CD34(+) Zellen (Stammzellen), die aus Mark abgeleitet wurden, sind als tolerisierende Mittel besonders bevorzugt. Besonders bevorzugt sind Populationen von Stammzellen mit einem CD40(-) Zelloberflächen-Phänotyp.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0013] Das oben Gesagte und andere Ziele, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung sowie die Erfindung selbst werden anhand der nachfolgenden Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen verständlicher sein, wenn diese zusammen mit den anliegenden Zeichnungen gelesen wird, in denen:

[0014] [Fig. 1](#) ein Liniendiagramm ist, das die Mengen der Nüchtern-Blutglucose (fasting blood glucose; FG) von Pavian-Empfängern einer Therapie mit einem CD154-blockierenden Mittel für eine ICT als Funktion gegen den post-operativen Tag (POD) aufträgt.

[0015] [Fig. 2](#) ein Liniendiagramm ist, das die FG-Mengen von Rhesusaffen-Empfängern einer Therapie mit einem CD154-blockierenden Mittel für eine ICT als Funktion gegen den post-operativen Tag (POD) aufträgt.

[0016] [Fig. 3](#) ein Liniendiagramm ist, das die FG-Mengen in Rhesusaffen, welche in [Fig. 2](#) gezeigt sind, mit den FG-Mengen eines Menschen vergleicht, der an DM leidet und eine herkömmliche Insulin-Ersatztherapie erhält.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0017] Die T-Zell-Aktivierung sowie immunologische Prozesse, die von dieser abhängen, erfordern sowohl vom T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelte Signale als auch gleichzeitig übertragene co-stimulatorische Signale. Es wird angenommen, dass ein wichtiges co-stimulatorisches Signal durch die Ligation von CD40 auf einer Antigen-präsentierende Zelle, wie beispielsweise auf einer B-Zelle, mit CD40L (CD154) auf einer T-Zelle übertragen wird. Humanes CD40 ist ein Zelloberflächenprotein von 50 kD, das auf reifen B-Zellen sowie auf Makrophagen und aktivierte Endothelzellen exprimiert wird. CD40 gehört zur Klasse der Rezeptoren, die am programmierten Zelltod beteiligt sind, und Fas/CD95 und den Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha-Rezeptor umfassen. Humanes CD154 (CD40L) ist ein 32 kD-Membranglykoprotein vom Typ II mit Homologie zum TNF-alpha,

das in erster Linie auf aktivierten T-Zellen transient exprimiert wird. Es wurde gezeigt, dass die CD40:CD154-Bindung für alle T-Zell-abhängigen Antikörperantworten erforderlich ist. Die CD40:CD154-Bindung stellt insbesondere Anti-apoptotische und/oder Lymphokin-stimulatorische Signale bereit.

[0018] Die Bedeutung der CD40:CD154-Bindung bei der Unterstützung von T-Zell-abhängigen biologischen Reaktionen wurde besser verstanden, als entdeckt wurde, dass das X-gebundene Hyper-IgM-Syndrom (X-HIGM) in Menschen der Phänotyp ist, der auf das genetische Fehlen von funktionellem CD154 zurückzuführen ist. Betroffene Individuen haben normale oder hohe IgM-Spiegel, können jedoch keine IgG-, IgA- oder IgE-Antikörper produzieren und leiden unter wiederkehrenden, manchmal schweren bakteriellen und parasitären Infektionen sowie an einer gesteigerten Inzidenz von Lymphomen und Unterleibskrebs. Ein ähnlicher Phänotyp wird in nicht-humanen Tieren beobachtet, die nullizygot für das Gen gemacht wurden, welches für CD154 kodiert (Knockout-Tiere). B-Zellen von CD154-Nullizygoten können in Abwesenheit einer CD40L:CD154-Bindung IgM produzieren, sind jedoch nicht in der Lage, ein Isotyp-Switching zu durchlaufen oder nach der Affinitätsreifung normal zu überleben. Histologisch gesehen entwickeln sich die Keimzentren der Lymphknoten nicht richtig, und Gedächtnis-B-Zellen fehlen oder sind nur schwach entwickelt. In funktioneller Hinsicht tragen diese Defekte zu einer starken Verringerung oder zum Fehlen einer sekundären (reifen) Antikörperantwort bei. Defekte hinsichtlich der zellulären Immunität werden ebenfalls beobachtet, die sich durch eine gesteigerte Inzidenz von bakteriellen oder parasitären Infektionen manifestieren. Viele dieser Zell-vermittelten Defekte können durch die Verabreichung von IL-12 oder IFN-gamma rückgängig gemacht werden. Diese Beobachtungen festigen die Ansicht, dass eine normale CD40:CD154-Bindung die Entwicklung von immuno- logischen Reaktionen durch T-Helferzellen vom Typ I unterstützt.

[0019] Mehrere präklinische Untersuchungen haben gezeigt, dass Mittel, die in der Lage sind, die CD40:CD154-Bindung zu unterbrechen, vielversprechende immunmodulatorische Mittel sind. Insbesondere Untersuchungen, bei denen Organ- oder Gewebetransplantationsmodelle von Kleintieren verwendet wurden, haben gezeigt, dass die Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung das Überleben von allogenen Transplantaten unterstützen. In ausgewählten Modellen führte eine transiente Verabreichung von Mitteln, die mit der Co-Stimulation von T-Zellen interferieren, zur Induktion einer unbegrenzten Transplantat-Akzeptanz. Die Unterbrechung der CD40:CD154-Bindung hat insbesondere vielversprechende Ergebnisse geliefert, denn es scheint, dass die Bindung dieses Paares aus Gegenrezeptoren anderen co-stimulatorischen Signalen hinsichtlich der zeitlichen Abfolge und der Hierarchie vorgeht (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: 3817–3826, 1992). Die Blockade der CD40:CD154-Bindung führte zu einer Verlängerung von Herz-Allotransplantaten (Larsen et al., Transplantation 61: 4–9, 1996; Larsen et al., Nature 381: 434–438, 1996), Haut-Allotransplantaten (Larsen et al., Nature 381: 434–448, 1996; Markees et al., Transplantation 64: 329–335, 1997) und Insel-Allotransplantaten (Parker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9560–9564, 1995; Rossini et al., Cell Transplant 5: 49–52) in Nagetieren, und von allogenen Nieren in Primaten (Kirk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 194: 8789–8794, 1997). Es ist gezeigt worden, dass sie das Einsetzen einer autoimmunen Diabetes in nicht-adipösen diabetischen (non-obese diabetic; NOD) Mäusen verzögert (Balasa et al., J. Immunol. 159: 4620–4627, 1997). Schließlich ist berichtet worden, dass die Störung der CD40:CD154-Bindung die Produktion von Entzündungs-Zytokinen unterbindet (Dechanet et al., J. Immunol. 159: 5640–5647, 1997; Kiener et al., J. Immunol. 155: 4917–4925, 1995).

[0020] Die CD40:CD154-Blockade stellt daher möglicherweise wirkungsvolle Therapien bereit, um das Versagen von Insel-Allotransplantaten oder -Xenotransplantaten in Individuen mit defektem Glucosestoffwechsel, wie beispielsweise mit Diabetes vom Typ I, zu vermeiden. Wie jedoch oben angemerkt haben Untersuchungen in Modellsystemen mit Nagetieren nur schwach mit den Ergebnissen von Untersuchungen und Therapien in Großtieren, einschließlich dem Menschen, korreliert.

[0021] Es werden vorliegend Untersuchungen offenbart, die sich mit den Wirkungen eines bevorzugten Mittels zur CD154-Blockade (eines humanisierten MAbs mit den Antigen-spezifischen Bindungseigenschaften des MAbs 5c8) in präklinischen Modellen der Insel-Allotransplantation in Großtieren befassen (Lederman et al., J. Exp. Med. 175: 1091–1101, 1992). Die vorliegenden Modelle betreffen insbesondere die CD154-Blockademono- notherapie von Pavianen (*Papio hamadryas*) und anderen nicht-menschlichen Primaten. Die Ergebnisse, die aus diesen Untersuchungen erhalten wurden, legen deutlich nahe, dass die CD154-Blockademono-therapie die langfristige Transplantation von Insulin-produzierenden Gewebe in Menschen, insbesondere in Menschen, die an DM oder an ähnlichen Defekten der Glucose-Homöostase leiden, fördert.

[0022] Die nachfolgende Diskussion veranschaulicht und verdeutlicht die Vielzahl von Zusammenhängen und

Umständen, in denen die Erfindung angewendet werden kann, und stellt darüber hinaus Untersuchungen zur praktischen Realisierbarkeit (proof-of-principle) bereit, die spezifische Ausführungsformen der Erfindung beitreffen.

Empfänger-Wirte

[0023] Die Erfindung kann zur Behandlung oder Prophylaxe eines beliebigen Primaten-Empfängers eines Insulin-produzierenden Gewebe-Transplantats oder eines beliebigen Primaten, der ein Insulin-produzierendes Gewebe-Transplantat benötigt, verwendet werden. Die Empfänger-Wirte (auch als Empfänger oder Wirts bezeichnet) leiden dementsprechend an einem Defekt der metabolischen Kontrolle des Blutglucosestoffwechsels (Glucose-Homöostase) oder weisen ein Risiko dafür auf. Der Empfänger kann beispielsweise hyper- oder hypoglykämisch sein. Die Erfindung ist insbesondere zur Verwendung in diabetischen Empfängern geeignet, insbesondere in Empfängern, die an Diabetes mellitus (DM) leiden. Der Empfänger ist ein Primat, vorzugsweise ein höherer Primat und am stärksten bevorzugt ein Mensch.

Spender- oder Transplantat-Gewebe

[0024] Die Erfindung kann mit jeder Art von Insulin-produzierendem Gewebe-Transplantat oder mit jedem Transplantationsverfahren durchgeführt werden, insbesondere mit Verfahren, in denen das Spender-(Transplantat-)Gewebe vom Versagen oder von einer Abstoßung durch das Immunsystem des Empfänger-Wirts betroffen ist oder ein Risiko aufweist, davon betroffen zu sein. Die Erfindung kann insbesondere in jedem Kontext verwendet werden, in dem das Spendergewebe nicht histokompatibel (MHC-kompatibel) zu dem Empfänger-Wirt ist. Daher kann die Erfindung nicht nur mit autologem oder syngennem Spendergewebe, sondern auch mit allogenem oder sogar xenogenem Spendergewebe durchgeführt werden. Das Spendergewebe kann durch herkömmliche Mittel von einem Freiwilligen oder von einem anderen lebenden Spender oder von einem Leichenspender erhalten werden. Der Spender ist vorzugsweise so histokompatibel wie möglich mit dem Empfänger-Wirt. Wenn der Empfänger-Wirt ein Mensch ist, ist autologes oder allogenes Spendergewebe bevorzugt. Das Spendergewebe kann jedoch von einer heterologen Spezies erhalten werden (in diesem Fall wird es als Heterotransplantat bezeichnet), wie beispielsweise von einem nicht-humanen Primaten (z.B. einem Schimpanse oder einem Pavian), oder von einem anderen relativ kompatiblen Säugetier (z.B. einem Schwein).

[0025] In einigen Ausführungsformen umfasst das Spendergewebe ein intaktes Pankreas. In anderen Ausführungsformen umfasst das Spendergewebe ein Stück, einen Teil oder eine Biopsie eines Pankreas eines Spenders. Das Pankreas des Spenders kann von einem lebenden Spender erhalten werden, oder es kann von einer geeigneten Leiche erhalten werden. Sofern ein Leichenspender verwendet wird, wird das Pankreas vorzugsweise für nicht mehr als 8 Stunden Bedingungen der kalten Ischämie ausgesetzt. In weiteren Ausführungsformen umfasst das Spendergewebe Insulin-produzierende Zellen, insbesondere isolierte oder suspendierte Inseln oder Insel-Zellen, einschließlich Zellen, die einem fetalen oder adulten Spender entnommen wurden, oder aus diesem entfernt wurden, Zellen, die in Primärkultur gehalten werden, oder eine immortalisierte Zelllinie. Geeignete Mittel zur Herstellung von Spender-Inseln oder Insel-Zellsuspensionen ausgehend von einem vollständigen Pankreas sind hinreichend bekannt (siehe z.B. Ricordi et al. (1988), 37 Diabetes 413–420; Tzakis et al. (1990), 336 Lancet 402–405; Linetsky et al. (1997), 46 Diabetes 1120–1123). Geeignete Pankreas werden von Spendern erhalten, die im Wesentlichen frei von Defekten hinsichtlich der Homöostase der Blutglucose sind. Andere Quellen für Insulin-produzierende Zellen umfassen fatale Insel-Vorläuferzellen, die wahrscheinlich in Primärkultur expandiert werden. Es kann jeder geeignete Zelltyp verwendet werden, was jedoch Zellen einschließt, die exogenes genetisches Material enthalten, das für ein exprimierbares Insulin-Gen kodiert. Die Erfindung umfasst daher die Verwendung von transfizierten oder transformierten Wirtszellen, die so modifiziert wurden, dass sie Insulin exprimieren (oder von Vorläuferzellen abstammen, die entsprechend modifiziert wurden), wobei die Expression entweder konstitutiv oder induzierbar ist (z.B. unter der Kontrolle eines auf Glucose ansprechenden Promoters oder Verstärkers). In anderen Ausführungsformen umfasst die Erfindung die Verwendung von pankreatischen oder anderen Spenderzelltypen, die von einem transgenen Säugetier abgeleitet sind, das so modifiziert wurde, dass es genetisches Material enthält, welches für die Herstellung von Insulin in einigen oder allen seiner Körperfertigkeiten erforderlich ist.

[0026] Das Insulin-produzierende Gewebe (Spendergewebe) wird systemisch oder lokal in den Empfänger-Wirt eingebracht. Beispielsweise können isolierte, suspendierte oder dispergierte Insulin-produzierende Zellen durch Infusion intravaskulär eingebracht werden, oder sie können an eine gewünschte Stelle implantiert werden, wie beispielsweise in eine Knochenmarkshöhle, in die Leber, in die Nierenkapsel, intramuskulär oder intraperitoneal. In einigen Ausführungsformen sind die Zellen mitotisch kompetent und produzieren neues Ge-

webe, das vom Spender abstammt. In anderen Ausführungsformen sind die Zellen nicht mitotisch kompetent, bleiben jedoch in dem Spender lebensfähig und produzieren oder exprimieren Insulin. In jedem Fall wird eine wirksame Menge von Insulin-produzierenden Zellen oder Insulin-produzierendem Gewebe implantiert, womit eine Menge gemeint ist, die ausreichend ist, um den Defekt im Glucosestoffwechsel des Empfängers (z.B. die Hypoglykämie oder Hyperglykämie) zu lindern (nachweisbar abzuschwächen). Im optimalen Fall ist die Menge ausreichend, um die Fähigkeit des Empfängers wiederherzustellen, die Glucose-Homöostase aufrecht zu erhalten, d.h. ausreichend, um den Empfänger von der Abhängigkeit von herkömmlichen (z.B. injizierten oder inhalierten) Insulin-Ersatztherapien zu befreien.

[0027] In einigen Ausführungsformen ist das Insulin-produzierende Gewebe physikalisch von den umgebenden Geweben des Empfängers durch eine Immunisolierungsvorrichtung getrennt (isoliert). Geeignete Vorrichtungen schützen das Insulin-produzierende Gewebe vor den meisten Effektoren der zellulären und humoralen Immunität, einschließlich (jedoch nicht beschränkt auf) Leukozyten, Immunglobulin und dem Komplementsystem. Die Immunisolierungsvorrichtung umfasst daher im Allgemeinen eine semipermeable Barriere, wie beispielsweise eine Membran, mit einer Porengröße, die ausreicht, um die Diffusion von Molekülen, die größer sind als etwa 50 bis 100 kD, durch die selbige zu verhindern. Die Barriere definiert eine isolierte Kammer in der das Insulin-produzierende Gewebe eingebracht ist, und sie weist keine Stellen auf, an der das Insulin-produzierende Gewebe physikalisch mit Zellen oder Geweben, die außerhalb der Barriere liegen, in Kontakt treten kann. Jede herkömmliche Vorrichtung, Hülle, Kapsel oder Mikrokapsel kann verwendet werden, einschließlich einzel- oder doppelwandige Alginat-Mikrokapseln (z.B. wie beispielsweise in US-Patent 5,227,298 beschrieben). Andere herkömmliche Mikrokapseln umfassen Alginat-Polylysin-Mikrokapseln, chemisch quervernetzte Alginat-Mikrokapseln und Kapseln, die aus anderen biokompatiblen Polymeren zusammengesetzt sind, und die in eine strukturell geeignete Immunisolierungsvorrichtung von beliebiger Form oder Größe ausgeformt werden (siehe z.B. Jain et al. (1996), 61 Transplantation 4).

[0028] In weiteren Ausführungsformen wird darüber hinaus ein tolerisierendes Mittel, wie beispielsweise Knochenmark oder Zellen, die von diesem abgeleitet sind, in den Empfänger-Wirt implantiert. Jedes tolerogene Gewebe oder jeder tolerogene Zelltyp kann als tolerisierendes Mittel verwendet werden, einschließlich Stammzellen des Pankreas sowie Knochenmarkszellen. Die tolerogenen Zellen sind MHC-kompatibel zu dem Insulin-produzierenden Gewebe, und sie werden vorzugsweise von dem Spender erhalten, der das Insulin-produzierende Gewebe bereitgestellt hat, oder sie sind syngen in Bezug auf diesen. Geeignete Mittel zur Herstellung von Knochenmark oder Zellpopulationen desselben sind hinreichend bekannt (siehe beispielsweise: Sharp et al. (1984), 69, J. Immunol. Meth. 187–195, Fontes et al. (1995), in Methods in Cell Transplantation, Ricordi, Hrsg., R.G. Landes Co., pub. S. 619–628). Vorzugsweise wird das Knochenmark unter Verwendung des Ceprat® SC Stem Cell Concentration Systems (CellPro. Inc., Bothell, WA; siehe CellPro Investigator Brochure, rev. 06.01.97) oder eines ähnlichen Systems bearbeitet, um eine von Knochenmark abgeleitete Zellpopulation bereitzustellen, die in Bezug auf hämatopoietischen CD34(+) Zellen angereichert ist. Eine Standard-Analyse mittels Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting; FACS) oder Immunfluoreszenz-Färbung zeigt, dass diese Population von CD34(+) Zellen im Wesentlichen frei von CD40(+) Zellen ist, obwohl jedoch eine schwache Färbung für CD40 beobachtet werden kann. Da die CD34(+) Zellpopulation eine dynamische Stammzellpopulation ist, wird angenommen, dass das Vorhandensein einer geringen Menge von CD40(+) Zellen der Häufigkeit entspricht, mit der die Stammzellen in eine Differenzierung entlang der B-Zelllinie eintreten. Tatsächlich haben vorläufige FACS-Untersuchungen gezeigt, dass die einzigen CD40(+) Zellen (die üblicherweise nicht mehr als etwa 0,7 % der Gesamtheit ausmachen) in der CD34(+) Stammzellpopulation auch CD19(+) sind. CD19 ist der früheste derzeit bekannte Marker für B-Zelllinien. Um die Verwendung einer wirklichen Stammzellpopulation als tolerisierendes Mittel zu gewährleisten, können die CD34(+) Zellen somit durch herkömmliche negative Selektionsmittel (z.B. selektive Cytolyse, Zellsortierung, Panning) weiter von CD40(+) Zellen angereichert werden.

[0029] Beispielhafte Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung Therapeutische Verbindungen, die für die Ausführung der Erfindung nützlich sind, umfassen beliebige Verbindungen, welche die Interaktion von CD40 auf der Zelloberfläche (z.B. auf B-Zellen) mit CD40L (CD154), das beispielsweise auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, blockieren. Die die CD40:CD154-Bindung unterbrechenden Verbindungen, wie beispielsweise CD154-blockierende Mittel, die spezifisch vorgeschlagen werden, umfassen polyklonale Antikörper und monoklonale Antikörper (MAbs) sowie Antikörperderivate, wie beispielsweise chimäre Moleküle, humanisierte Moleküle, Moleküle mit reduzierten Effektorfunktionen, bispezifische Moleküle und Antikörperkonjugate. In einer bevorzugten Ausführungsform hat der Antikörper die antigenspezifischen Bindungseigenschaften des MAbs 5c8, welcher von dem Hybridom produziert wird, das unter der ATCC Zugangsnummer HB 10916 hinterlegt ist, wie es in US-Patent 5,474,771 beschrieben ist. In einer derzeit stark bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper ein humanisierter 5c8. Andere bekannte Antikörper gegen CD154 umfassen die

Antikörper ImxM90, ImxM91 und ImxM92 (erhalten von Immunex), einen Anti-CD40L mAb, der kommerziell von Ancell erhältlich ist (Klon 24-31, Katalog #353-020, Bayport, MN) und einen Anti-CD40L mAb, der kommerziell von Genzyme (Cambridge, MA, Katalog #80-3703-01) erhältlich ist. Ebenfalls kommerziell erhältlich ist ein Anti-CD40L mAb von PharMingen (San Diego, Katalog #33580D). Zahlreiche zusätzliche Anti-CD40L-Antikörper sind hergestellt und charakterisiert worden (siehe beispielsweise WO 96/23071 von Bristol-Myers Squibb).

[0030] Die Erfindung umfasst ferner die Verwendung von CD154-blockierenden Mitteln eines anderen Typs, wie beispielsweise vollständige Fab-Fragmente, $F(ab')_2$ -Verbindungen, V_H -Regionen, F_v -Regionen, Einzelketten-Antikörper (siehe beispielsweise WO 96/23071), Polypeptide, Fusionskonstrukte von Polypeptiden, Fusionen von CD40 (wie beispielsweise CD40Ig, das in Hollenbaugh et al., J. Immunol. Meth. 188: 1-7, 1995 beschrieben ist) und kleine Molekülverbindungen, wie beispielsweise kleine semi-peptidische Verbindungen oder nicht-peptidische Verbindungen, wobei alle die CD40:CD154-Bindung blockieren oder unterbrechen können. Verfahren zum Erstellen, zum Screening und zum Optimieren kleiner Moleküle werden in PCT/US96/10664, die am 21. Juni 1996 eingereicht wurde, bereitgestellt.

[0031] Verschiedene Formen von Antikörpern können auch unter Verwendung von Standard-DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden (Winter und Milstein, Nature 349: 293-99, 1991). Beispielsweise können "chimäre" Antikörper erzeugt werden, in denen die Antigenbindungsdomäne aus einem tierischen Antikörper mit einer humanen konstanten Domäne verknüpft ist (ein Antikörper der ursprünglich von einem nicht-humanen Säugetier stammt, und bei dem rekombinante DNA-Verfahren verwendet wurden, um die gesamte oder einen Teil der Hinge-Region und der konstanten Region der schweren Kette und/oder der konstanten Region der leichten Kette gegen entsprechende Regionen aus der schweren oder leichten Kette eines menschlichen Immunglobulins zu ersetzen) (siehe beispielsweise Cabilly et al., US-Patent Nr. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-55, 1984). Chimäre Antikörper verringern die immunogenen Antworten, die von tierischen Antikörpern hervorgerufen werden, wenn diese für die humane Therapie oder Prophylaxe verwendet werden.

[0032] Darüber hinaus können rekombinante "humanisierte" Antikörper synthetisiert werden. Humanisierte Antikörper sind Antikörper, die ursprünglich von einem nicht-menschlichen Säugetier stammen, und bei denen rekombinante DNA-Verfahren verwendet wurden, um einige oder alle Aminosäuren, die nicht für die Antigenbindung erforderlich sind, gegen Aminosäuren aus entsprechenden Regionen der leichten oder schweren Kette eines humanen Immunglobulins zu ersetzen. Dies bedeutet, dass sie Chimäre sind, die zumeist humane Immunglobulinsequenzen umfassen, in welche die für die spezifische Antigenbindung verantwortlichen Regionen eingebracht wurden (siehe beispielsweise PCT-Anmeldung WO 94/04679). Es werden Tiere mit den gewünschten Antigenen immunisiert, die entsprechenden Antikörper werden isoliert, und der Teil der Sequenzen der variablen Region, der für die spezifische Antigenbindung verantwortlich ist, wird entfernt. Die von Tieren abgeleiteten Antigen-Bindungsregionen werden dann in die geeignete Position des humanen Antikörpers kloniert, in dem die Antigen-Bindungsregionen deletiert sind. Humanisierte Antikörper minimieren die Verwendung von heterologen (inter-Spezies) Sequenzen in Antikörpern bei der Verwendung in humanen Therapien, und es ist weniger wahrscheinlich, dass sie unerwünschte Immunantworten hervorrufen. Primatisierte Antikörper können auf ähnliche Weise hergestellt werden.

[0033] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung umfasst die Verwendung von humanen Antikörpern, die in nicht-humanen Tieren, wie beispielsweise in transgenen Tieren, die ein oder mehrere humane Immunglobulin-Transgene umfassen, erzeugt werden können. Solche Tiere können als Bezugsquelle für Milzzellen zur Herstellung von Hybridoma verwendet werden, wie es in US 5,569,825 beschrieben ist.

[0034] Antikörperfragmente und univalente Antikörper können ebenfalls zur Ausführung der Erfindung verwendet werden. Univalente Antikörper umfassen ein Dimer aus schwerer Kette/leichter Kette, das an die Fc(oder Stamm-)Region einer zweiten schweren Kette gebunden ist. "Fab-Region" bezeichnet diejenigen Teile der Kette, die annähernd äquivalent oder analog zu den Sequenzen sind, die die Y-Zweigteile der schweren Kette umfassen, und zur gesamten leichten Kette, und von denen gezeigt wurde, dass sie kollektiv (in Aggregaten) eine Antikörperaktivität aufweisen. Ein Fab-Protein umfasst Aggregate aus einer schweren und einer leichten Kette (im Allgemeinen als Fab' bezeichnet) sowie Tetramere, die den zwei verzweigten Segmenten des Y des Antikörpers entsprechen (im Allgemeinen als $F(ab)_2$ bezeichnet), wobei beliebige der oben genannten kovalent oder nicht-kovalent aggregiert sein können, solange die Aggregation in der Lage ist, selektiv mit einem bestimmten Antigen oder mit einer bestimmten Antigenfamilie zu reagieren.

[0035] Darüber hinaus können Standard-DNA-Rekombinationsverfahren verwendet werden, um die Bin-

dungsaaffinitäten von rekombinanten Antikörpern mit ihren Antigenen zu verändern, indem die Aminosäurereste in der Nähe der Antigen-Bindungsstellen verändert werden. Die Antigen-Bindungsaaffinität eines humanisierten Antikörpers kann durch eine Mutagenese, die auf molekularer Modellierung beruht, erhöht werden (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 10029–33, 1989; PCT-Patentanmeldung WO 94/04679). Es kann erstrebenswert sein, die Affinität des Antikörpers für CD40L in Abhängigkeit von dem Gewebetyp, auf den abgestellt wird, oder im Hinblick auf den angestrebten Behandlungsplan zu erhöhen oder zu verringern. Dies kann durch Verwendung der Phagendisplay-Technologie erreicht werden (siehe beispielsweise Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12: 433–455, 1994; und Schier et al., J. Mol. Biol. 255: 28–43, 1996). Es kann beispielsweise für die semi-prophylaktische Behandlung vorteilhaft sein, einen Patienten mit konstanten Mengen von Antikörpern mit reduzierter Affinität für CD40L zu behandeln. Auf ähnliche Weise können Antikörper mit erhöhter Affinität für CD40L für kurzfristige Behandlungen vorteilhaft sein.

Verabreichungsarten

[0036] Die Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung, einschließlich der CD154-blockierenden Mittel, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können auf jede Weise verabreicht werden, die in medizinischer Hinsicht akzeptabel ist. Abhängig von den spezifischen Umständen kann eine lokale oder systemische Verabreichung erstrebenswert sein. Das Mittel wird vorzugsweise über den parenteralen Weg, wie beispielsweise durch eine intravenöse, intraarterielle, subkutane, intramuskuläre, intraorbitale, intraventrikuläre, intraperitoneale, subkapsuläre, intrakraniale, intraspinale oder intranasale Injektion, Infusion oder Inhalation verabreicht. Das Mittel kann ferner entweder vor oder nach der Implantation des Spendengewebes durch Implantation einer Infusionspumpe oder eines biokompatiblen oder bioerodierbaren Implantats mit anhaltender Freisetzung in den Empfänger-Wirt verabreicht werden. Alternativ dazu können bestimmte erfindungsgemäße Verbindungen oder Formulierungen derselben für die orale oder enterale Verabreichung geeignet sein. Wieder andere erfindungsgemäße Verbindungen werden für die topische Verabreichung geeignet sein.

[0037] In weiteren Ausführungsformen wird ein Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung dem Empfänger indirekt durch Verabreichung eines Vektors oder eines anderen exprimierbaren genetischen Materials bereitgestellt, das für diesen Unterbrecher kodiert. Das genetische Material wird in das Innere transportiert und in Zellen oder in einem Gewebe des Empfängers exprimiert, wodurch der Unterbrecher *in situ* hergestellt wird. Geeignete Nukleinsäurekonstrukte würden beispielsweise eine Sequenz umfassen, die für einen oder für mehrere der Immunglobulin (Ig)-Ketten des MAb 5c8 kodiert, wie in US 5,474,771 offenbart ist. Andere geeignete Konstrukte würden Sequenzen umfassen, die für Chimäre oder humanisierte Versionen der Ig-Ketten des MAb 5c8 oder der antigenbindenden Fragmente desselben kodieren. Wieder andere geeignete Konstrukte würden Sequenzen umfassen, die für einen Teil oder für alle anderen CD154-spezifischen MAbs kodieren. Das Konstrukt wird systemisch oder lokal verabreicht, z.B. an eine Stelle in der Nähe der Implantationsstelle des Insulin-exprimierenden Gewebes.

[0038] Alternativ dazu wird der Vektor oder das genetische Material, das für den Unterbrecher kodiert, in eine geeignete Population von isolierten Zellen eingebracht, um Wirtszellen zu erzeugen, die den Unterbrecher produzieren. Die Wirtszellen werden anschließend in den Wirt implantiert oder durch Infusion eingebracht, entweder lokal oder systemisch, wobei eine *in situ*-Produktion des Unterbrechers der CD40:CD154-Bindung bereitgestellt wird. Geeignete Wirtszellen umfassen kultivierte Zellen, wie beispielsweise immortalisierte Zellen, sowie Zellen, die von dem Empfänger erhalten wurden (beispielsweise periphere Blutzellen oder Zellen des Lymphknotens, wie beispielsweise natürliche Killerzellen (NK-Zellen)).

[0039] Im Allgemeinen werden die erfindungsgemäßen Verbindungen an den Empfänger-Wirt verabreicht. Die Verbindungen können jedoch auch an den Spender oder an das Spendergewebe verabreicht werden. Beispielsweise kann eine erfindungsgemäße Verbindung in eine Perfusionsflüssigkeit oder in eine Konservierungsflüssigkeit eingebracht werden, in der das Spendergewebe vor der Integration in den Empfänger-Wirt gelagert oder transportiert wird.

Formulierung

[0040] Im Allgemeinen sind die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Verbindungen in einem akzeptablen Träger oder Hilfsstoff suspendiert, gelöst oder dispergiert. Die resultierende therapeutische Zusammensetzung beeinträchtigt die Homöostase des Empfängers (und insbesondere die elektrolytische Balance) nicht. Ein beispielhafter Träger umfasst daher eine normale physiologische Salzlösung (0,15 M NaCl, pH 7,0 bis 7,4). Andere akzeptable Träger sind im Stand der Technik hinreichend bekannt und werden beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Hrsg., Mack Publishing Co., 1990, beschrieben. Ge-

eignete Träger können biokompatible, inerte oder bioadsorbierbare Salze, Puffermittel, Oligo- oder Polysaccharide, Polymere, viskositätsverbessernde Mittel und Konservierungsstoffe umfassen.

[0041] Jeder beliebige Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung, wie beispielsweise ein CD154-blockierendes Mittel, das im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist formuliert, um eine pharmazeutisch wirksame oder eine therapeutisch wirksame Menge oder Dosis bereitzustellen, wobei dies eine Menge ist, die ausreicht, um eine nachweisbare, vorzugsweise medizinisch vorteilhafte Wirkung auf den Empfänger auszuüben. Eine medizinisch vorteilhafte Wirkung würde die Verhinderung, Verzögerung oder die Abschwächung einer Verschlechterung oder eine nachweisbare Verbesserung des medizinischen Zustands des Empfängers umfassen. Die Nierenfunktion und die Gesundheit eines Nieren-Allotransplantats oder -Xenotransplantats kann beispielsweise durch routinemäßiges Messen der Konzentration des Harnstoff-Stickstoffs oder des Kreatinins im Blut, oder des Volumens oder des Gehalts an gelösten Stoffen im Urin, oder der Beseitigungsrate von relevanten gelösten Verbindungen aus dem Blut in den Urin, überwacht werden. Auf ähnliche Weise kann eine glucoregulatorische Funktion und die Gesundheit eines Insulin-produzierenden Allotransplantats oder -Xenotransplantats durch routinemäßiges Messen der Konzentration von Glucose im Blut oder im Urin, von Glucosemetaboliten oder von Insulin überwacht werden, oder durch Messen der Insulin-Antwort auf eine Glucose-Challenge, z.B. in einem herkömmlichen Glucosetoleranztest. Eine wirksame Menge einer erfindungsgemäßen therapeutischen Verbindung, wie beispielsweise eines CD154-blockierenden Mittels, ist jede beliebige Menge, die nachweisbar die Abhängigkeit des Empfängers von einer Insulin-Ersatztherapie verringert. Eine optimal wirksame Menge ist eine solche, die den Empfänger im Wesentlichen von der Abhängigkeit von exogenem Insulin befreit. Eine wirksame Menge ist insbesondere eine solche, die eine partielle oder im Wesentlichen vollständige Transplantation (Akzeptanz und Funktion) eines Insulin-produzierenden Gewebes eines Spenders bewirkt.

Dosierung und Behandlungshäufigkeit

[0042] Die Menge und Häufigkeit der Dosierung für jede bestimmte Verbindung, die bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung verwendet wird, liegt im Bereich des Könnens und des klinischen Ermessens eines normalen Arztes auf dem Gebiet der Gewebe-Transplantation, wie beispielsweise eines Transplantations-Chirurgen. Das allgemeine Dosierungs- und Verabreichungsregime wird durch präklinische und klinische Versuche etabliert, die intensive aber routinemäßig erfolgende Untersuchungen umfassen, um wirksame, z.B. optimale, Verabreichungsparameter für die gewünschte Verbindung zu bestimmen. Selbst nachdem solche Empfehlungen gemacht wurden, wird der Arzt diese Dosierungen oftmals bei bestimmten Empfänger-Wirten basierend auf einer Vielzahl von Überlegungen, wie beispielsweise Alter, medizinischer Status, Gewicht, Geschlecht und gleichzeitige Behandlung mit anderen Pharmazeutika, verändern. Die Bestimmung eines wirksamen Dosierungs- und Verabreichungsregimes für jeden Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung, der zur Inhibierung der Transplantat-Abstoßung verwendet wird, ist für den auf dem Gebiet der Pharmazie und Medizin tätigen Fachmann eine Routineangelegenheit. Die Dosierungsmenge und der Zeitverlauf sollten ausreichend sein, um eine klinisch vorteilhafte Änderung in einem oder in mehreren Parametern des Gesundheitszustands des Empfängers zu erzeugen. Beispielhafte Regime des Zeitverlaufs und der Dosierung werden in den vorliegend gezeigten Untersuchungen zur praktischen Realisierbarkeit (proof-of-principle) bereitgestellt. Die Erfindung betrifft im Wesentlichen die Verabreichung eines Unterbrechers der CD40:CD154-Bindung (beispielhaft veranschaulicht durch einen humanisierten MAbs 5c8, hu5c8) in einem Akzeptanz-induzierenden Regime, gefolgt von einem Akzeptanz-erhaltenden Regime, sofern dies angemessen erscheint.

[0043] Um die Überlegungen zur Dosierung für eine Anti-CD40L-Verbindung beispielhaft darzustellen, werden die nachfolgenden Beispiele für Verabreichungsstrategien für einen Anti-CD40L-mAb angegeben. Die Dosismengen können problemlos für andere Arten von Anti-CD40L-Verbindungen angepasst werden. Im Allgemeinen werden Einzeldosen von zwischen etwa 0,05 und etwa 50 mg/kg Körpergewicht des Patienten vorgeschlagen, wobei die Dosen am häufigsten in einem Bereich von 1–20 mg/kg liegen. Bei der akuten Behandlung, wie beispielsweise vor oder zur Zeit der Transplantation, oder in Reaktion auf ein beliebiges Zeichen, dass die Abstoßung des Transplantats beginnt, liegt die wirksame Dosis eines Antikörpers im Bereich von etwa 1 mg/kg Körpergewicht bis etwa 20 mg/kg Körpergewicht, wobei diese täglich für einen Zeitraum von etwa 1 bis 5 Tagen verabreicht wird, vorzugsweise als Bolus durch intravenöse Verabreichung. Dasselbe Dosierungs- und Dosisprotokoll kann in der Belastungsphase eines Belastungs-/Erhaltungs-Regime (load-maintenance regimen) verwendet werden, wobei die Erhaltungsphase eine intravenöse oder intramuskuläre Verabreichung von Antikörpern in einem Bereich von etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht bis etwa 20 mg/kg Körpergewicht für einen beliebigen Behandlungszeitraum von einmal wöchentlich bis zu Intervallen von 3 Monaten umfasst. Die chronische Behandlung kann ferner durch ein Erhaltungsregime durchgeführt werden, bei dem Antikörper intravenös oder intramuskulär in einem Bereich von etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht bis etwa 20 mg/kg Körper-

gewicht verabreicht werden, wobei die Intervalle zwischen den Losen von 1 Woche bis zu etwa 3 Monaten reichen. Darüber hinaus kann die chronische Behandlung durch ein intravenöses Regime mit periodischem Bolus ausgeführt werden, bei dem Antikörper in einer Menge von zwischen etwa 1,0 mg/kg Körpergewicht und etwa 100 mg/kg Körpergewicht verabreicht werden, wobei die Intervalle zwischen den aufeinanderfolgenden Behandlungen etwa 1 bis 6 Monate betragen. Für alle außer dem Regime mit periodischem Bolus kann die Verabreichung auch oral, pulmonal, nasal oder subkutan erfolgen.

[0044] Die Wirksamkeit der Antikörper kann, sofern dies gewünscht ist, durch eine nacheinander erfolgende Verabreichung oder durch eine Verabreichung in Kombination mit herkömmlichen therapeutischen Mitteln oder Wirkstoffen gegen die Abstoßung, wie beispielsweise mit Kortikosteroiden oder Immunsuppressiva, erhöht werden. Alternativ dazu können die Antikörper an ein herkömmliches Mittel konjugiert werden. Dies erlaubt in vorteilhafter Weise die Verabreichung des herkömmlichen Mittels in einer Menge, die geringer ist als die herkömmliche Dosis, beispielsweise weniger als etwa 50 % der herkömmlichen Dosis, wenn das Mittel als Monotherapie verabreicht wird. Das Auftreten von zahlreichen Nebenwirkungen, die mit dem Mittel assoziiert sind, sollte damit vermieden werden.

[0045] Die erfindungsgemäßen Kombinations-Therapien zur Behandlung der Transplantat-Abstoßung umfassen die Verwendung von Anti-CD40L-Antikörpern zusammen mit Mitteln, die auf B-Zellen abzielen, wie beispielsweise Anti-CD19-, Anti-CD28- oder Anti-CD20-Antikörper (unkonjugiert oder radiomarkiert), IL-14-Antagonisten, LJP394 (Rezeptor-Blocker von LaJolla Pharmaceuticals), IR-1116 (kleines Molekül von Takeda) und Anti-Igidiotypische monoklonale Antikörper. Alternativ dazu können die Kombinationen auf T-Zellen/B-Zellen gerichtete Mittel sein, wie beispielsweise CTLA4Ig, IL-2-Antagonisten, IL-4-Antagonisten, IL-6-Antagonisten, Rezeptor-Antagonisten, monoklonale Anti-CD80/CD86-Antikörper, TNF, LFA1/ICAM-Antagonisten, VLA4-VCAM-Antagonisten, Brequinar- und IL-2-Toxinkonjugate (z.B. DAB), Prednison, Anti-CD3 MAb (OKT3), Mycophenolatmofetil (MMF), Cyclophosphamid und andere Immunsuppressiva, wie beispielsweise Calcineurin-Signalblocker, einschließlich (und ohne Einschränkung) Takrolismus (FK506). Die Kombinationen können auch auf T-Zellen gerichtete Mittel umfassen, wie beispielsweise CD4-Antagonisten, CD2-Antagonisten und IL-12.

[0046] Für die Erhaltung der Integration des Transplantats oder in einem Zeitraum nach der Suppression eines akuten Abstoßungsvorfalls des Transplantats, wird eine Erhaltungsdosis eines Anti-CD40L-Antikörpers allein oder in Kombination mit einem herkömmlichen Mittel gegen die Abstoßung verabreicht, sofern dies erforderlich ist. Anschließend kann die Dosierung oder die Häufigkeit der Verabreichung oder beides verringert werden. Wenn kein Zeichen einer Abstoßung des Transplantats erkennbar ist, kann die Behandlung abgebrochen werden, wobei die Anzeichen einer Transplantat-Abstoßung sorgsam überwacht werden. In anderen Fällen, die für den Fachmann ersichtlich sind, kann eine anfängliche Behandlung verabreicht werden, beispielsweise in Intervallen von 4 Wochen oder mehr. Die Empfänger-Wirte können jedoch eine periodisch erfolgende langfristige Behandlung benötigen, sofern ein Wiederauftreten von Krankheitssymptomen erfolgt.

Präklinische Modellsysteme zur Bewertung der Behandlungsregime mit CD40:CD154-Unterbrechern

[0047] Bevorzugte beispielhafte Modellsysteme zur Untersuchung der Wirksamkeit einer CD40:CD154-unterbrechenden Verbindung (z.B. einer Anti-CD40L-Verbindung oder eines CD154-blockierenden Mittels, wie beispielsweise eines MAb mit der Spezifität des MAb 5c8) sind die Insel-Allotransplantatmodelle in Primaten (Paviane und/oder Rhesus-Affen). Es wurde gezeigt, dass solche Primatenmodelle strenge Untersuchungen der Immunmanipulation darstellen: sie sind höchst sensitiv, selbst gegenüber geringfügigen Änderungen der Funktion des Allotransplantats oder gegenüber nachteiligen Wirkungen auf die Wundheilung und die Funktion des Immunsystems des Empfängers. Darüber hinaus weisen die Modelle eine offensichtliche biologische Ähnlichkeit zur Nierentransplantation beim Menschen auf. Insbesondere Gene, die für MHC-Proteine kodieren, sind zwischen Menschen und Primaten gut konserviert und werden als Basis für diese Modelle verwendet, und die Abstoßung von vaskularisierten Organen bei den Primaten ähnelt stark denjenigen Abstoßungen, die unter klinischen Bedingungen beobachtet werden.

Pavian-Modell einer ICT bei einer durch Pankreatektomie induzierten Diabetes

[0048] Identifizierung von Spender-Empfänger-Paaren. Periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) von 10 potentiellen Empfängern (Paviane, Papio hamadryas, männlich und weiblich, 1 bis 2 Jahre alt, ungefähr 4 kg) von der Mannheimer-Einrichtung (Homestead, FL) wurden in einer einseitig gemischten Leukozytenkultur (leukocyte culture, MLC) als Responder gegen PBMC aus 10 männlichen Spendern (über 2 Jahre alt, erworben von der Southwest Foundation in Texas) verwendet. Die Pavian-MLC

wurde mittels standardisierter Verfahren für eine menschliche MLC durchgeführt. Die Verwendung von Medium, das mit humanem Serum supplementiert war, ergab im Hinblick auf den geringen Hintergrund und die hohe spezifische Reaktivität bessere Ergebnisse als die Verwendung von Medien mit Pavianserum oder fetalem Kälberserum. Die Spender waren von einer ausreichenden Größe, sodass genügend Inseln und Knochenmark von einem Spender erhalten wurden, um eine Transplantation in zwei Empfänger zu ermöglichen. Im Gegensatz zu den verhältnismäßig geringen MLC-Antworten, die beobachtet wurden, wenn PBMC aus Tieren von Mannheimer als MLC-Responder und Stimulatoren verwendet wurden, war die MLC-Reaktivität zwischen diesen Tieren exzellent; alle potentiellen Empfänger erreichten Stimulationsindices (S.I.) von $\geq 10,0$ gegenüber den Stimulatoren (Spender, Hintergrund < 200 bis 300 Zählungen pro Minute, cpm). Es wurde der Versuch gemacht, zwei Empfänger mit ähnlicher MLC-Reaktivität gegen den vorgesehenen Spender auszuwählen und es wurden Spender-Empfänger-Paare mit einem unterschiedlichen Grad an Alloreakтивität ausgewählt. Ein MLC S.I. von > 10 wurde als sehr reaktiv angesehen und wurde als minimal akzeptable Disparität ausgewählt; zum Vergleich: wenn Tiere von Mannheimer als Spender und Empfänger verwendet wurden, betrug der MLC S.I. üblicherweise weniger als 5.

[0049] Insel-/Knochenmark-Präparation und Verabreichung. Inseln wurden einen Tag vor der ICT (d.h. am Untersuchungstag – 1) durch das geringfügig modifizierte automatisierte Verfahren für die Isolierung von humanen Inseln (Recordi et al., Diabetes 37:413–420, 1988; Selvaggi et al., Transplant. Proc. 29: 1967–1968, 1997) unter Verwendung von Liberase® (0,47 mg/ml Kollagenaselösung, erhalten von Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) von der Pankreas getrennt. Die Dauer der kalten Ischämie bei den Pankreas lag im Durchschnitt bei $0,5 \pm 0,1$ Stunden. Die Inseln wurden in einem dreischichtigen diskontinuierlichen Euroficol-Gradienten (1.108, 1.096, 1.037) angereichert, in dem das verdaute Pankreasgewebe am Boden in der 1.108-Schicht geladen wurde. Es wurde ein Zellseparator (COBE 299 1, COBE, Lakewood, CO) für die Zentrifugation der Gradienten verwendet (Robertson, Chadwick, Contractor, James, London Acta Diabetologica 30: 93–98, 1993). Die Anzahl, das Volumen und die Reinheit der erhaltenen Inseln wurde wie folgt bestimmt: die endgültige Insel-Präparation wurde in 250 ml RPMI 1640-Lösung suspendiert, und drei Proben von 100 µl wurden mit Dithizon gefärbt (Latif et al., Transplantation 45: 827–830, 1988) und ausgezählt, um die Gesamtausbeute an Inseln zu erfassen, und die Daten wurden mathematisch umgewandelt, um die Gesamtanzahl der Inseln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 150 pm (Insel-Äquivalent; IEQ) (Ricordi et al., Acta Diabetol. Lat. 27: 195–195, 1990) zu bestimmen.

[0050] Für die Untersuchungen in Bezug auf die Erhöhung der Toleranz wurden dem Pankreas-Spender Wirbelkörper entnommen und so verarbeitet, dass Spender-Knochenmarkszellen (donor bone marrow cells, DBMC) erhalten wurden, wobei üblicherweise routinemäßige Modifikationen der Verfahren zur Verarbeitung von humanen Wirbelkörpern verwendet wurden. Den Empfängern des Spender-Knochenmarks wurde an den Tagen 5 und 11 nach der ICT Infusionen verabreicht. Es wurde eine Gesamtdosis von 10^9 kernhaltigen Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers verabreicht.

[0051] Beruhigung der Tiere. Für die chemische Beruhigung wurde Ketaminhydrochlorid in den Gluteusmuskel injiziert (10 mg/kg Körpergewicht). Die Verlängerung der Beruhigung wurde durch intramuskuläre Verabreichung von Ketamin-HCl in einer Dosis von 5 mg/kg erreicht. Zusätzliches Ketamin wurde verabreicht, sobald ein Tier auf den Stimulus eines Kniffs in den Zeh ansprach. Da frühere Untersuchungen gezeigt haben, dass Ketamin die erste Phase der Insulin-Antwort auf Glucose (first phase insulin response, FPIR) verringert, wurde die Ketamin-Dosis in allen metabolischen Untersuchungen so gering wie möglich gehalten (Lehmann et al., J. Med. Primatol. 26: 312–321, 1997). Die Gesamtdosis an Ketamin die erforderlich war, um eine zufriedenstellende Beruhigung über einen Zeitraum von 30 Minuten beizubehalten betrug 35 ± 2 mg/kg. Die Tiere wurden physikalisch eingeschränkt, während sie mit Ketamin beruhigt waren. Chirurgische und vaskuläre Penetrationsstellen wurden unter Verwendung von abwechselnden Säuberungen mit Betadin und Alkohol vorbereitet. Dauerkatheter wurden intravenös eingebracht und gesichert.

[0052] Pankreatektomie und ICT. Am Tag der ICT (Untersuchungstag 0) wurde die Insel-Präparation zentrifugiert und das Pellet wurde in supplementiertem CMRL 1066 resuspendiert, gefolgt von einer Übernachtkultur bei 22°C. Vor der Transplantation wurde die Zubereitung zentrifugiert und das Pellet wurde in 20 ml RPMI 1640-Lösung suspendiert, die 2,5 % Spenderserum und 200 IU Heparin enthielt. Die Anzahl der IEQ wurde unmittelbar vor der Transplantation bestimmt. Die totale Pankreatektomie wurde nach etablierten chirurgischen Verfahren durchgeführt. Nach Abschluss der totalen Pankreatektomie wurde ein 20G-Angiokatheter in eines der mesenterialen Nebengefäße der Portalvene eingebracht, und die ICT wurde durch Gravitationsinfusion der Insel-Zubereitung über einen Zeitraum von 10 Minuten vollzogen.

[0053] Immunsuppression und postoperative Nachsorge. FK506 (Takrolimus) wurde als Immunsuppressi-

vum ausgewählt, da dieser Wirkstoff gegenwärtig bei der Humanen ICT verwendet wird. Die Verabreichung von FK506 begann 5 Tage vor der ICT. Eine Dosierung von 0,1 mg/kg/Tag wurde intramuskulär an Empfänger-Paviane verabreicht. Die Wirkstoffspiegel wurden täglich überwacht und die Dosierung wurde angepasst, um Spiegel von ungefähr 15 ng/ml durchgängig auf recht zu erhalten. Humanisierter Anti-CD154 (erhalten von MRb 5c8, Lederman et al., J. Exp. Med. 175: 1091–1101, 1992) wurde an den Untersuchungstagen –1, 3, und 10 intravenös in einer Dosierung von 10 oder 20 mg/kg verabreicht, und die Serumspiegel von 5c8 und Anti-5c8 wurden durch ELISA festgestellt.

[0054] Am ersten postoperativen Tag (Untersuchungstag 1 oder POD 1) wurde den Pavianen intravenöse Flüssigkeit verabreicht. Die Tiere wurden anschließend mit einer Diät gefüttert, die 60 g Kohlenhydrate pro Tag sowie 45 g Affen-Biskuit (supplementiert mit Viokase) und 15 g Frucht enthielt. Basierend auf den Experimenten mit den ersten zwei Tieren, die mit Anti-CD154 behandelt worden waren, wurden nachfolgende Paviane mit kleinen subkutanen Insulindosen (ungefähr 0,5 U/kg/Körpergewicht/Tag) für einen Zeitraum von 14 bis 20 Tagen nach der Insel-Transplantation behandelt, um eine "Erschöpfung" der Inseln zu vermeiden, wodurch die Bedingungen, die für eine erfolgreiche Transplantation erforderlich sind, optimiert wurden.

[0055] Überwachung. Die Nüchtern-Blutglucose und die postprandiale Blutglucose (FG bzw. PPG) wurden über Fersenstäbchen (heel stick) und eine Blutuntersuchung mit einem Elite Glucometer überwacht, und mindestens einmal wöchentlich wurde eine Blutprobe entnommen, um Plasma für die Untersuchung der FG-Spiegel mit einem Beckman-Glucose-Analysiergerät zu erhalten. Im Allgemeinen wurde auch eine Blutprobe entnommen, um ungewöhnlich hohe Messergebnisse zu bestätigen. Es wurde allen Tieren in der Anti-CD154-Untersuchung vor jeder Dosis MAb (vor Tag –1 und unmittelbar vor der Antikörperverabreichung an den Tagen 3 und 10) und wöchentlich danach Blutproben entnommen. Ungefähr 3 Monate nach der Transplantation wurde die Untersuchung auf einmal pro Woche verringert. Die Blutproben wurden für die Phänotypisierung von peripherem Blut verwendet, um Leukozyten-Untergruppen zu erfassen, und um das Blutbild (CBC) sowie chemische Reaktionen, die Spiegel von 5c8 und Anti-5c8, die Spiegel von Insulin und c-Peptid und Chimerismen zu bestimmen. Blut wurde in regelmäßigen Abständen für erneute Untersuchungen der MLC-Reaktivität gegen Antigene des Spenders und Antigene einer dritten Partei entnommen.

[0056] Assays. Das Plasma-Insulin wurde durch ein Doppelantikörperv erfahren (Linco Research, Inv., St. Charles, MO) untersucht. Die untere Grenze der Detektion betrug 20 pmol/l und der durchschnittliche Intraassaykoeffizient der Varianz betrug 6 %. Das c-Peptid wurde im Plasma mit einer geringeren Nachweisgrenze von 6 % und einem Intraassaykoeffizienten der Variation von 6 % nachgewiesen. Die Plasmaglucose wurde unter Verwendung eines Glucose-Analysiergerätes (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) gemessen. Die Kapparglucosemengen von Vollblut wurden mit einem Elite Glucometer (Bayer, Elkhart, IN) gemessen. Die Gültigkeit des Insulin-Assays für Paviane wurde durch die Parallelität der Insulinkonzentrationen in Verdünnungen von Serum mit der Insulin-Standardkurve gezeigt. Glucagon wurde unter Verwendung eines Doppelantikörper-Assays (DPC, Los Angeles, CA) gemessen. Diese kommerziellen Kits sind zuvor durch serielle Verdünnungen validiert worden (Goodner et al., Diabetes 38: 925–931, 1989).

[0057] Intravenöser Glucosetoleranz-Test (intravenous glucose tolerance testing, IVGTT). Es wurde zuvor gezeigt, dass *in vivo* durchgeführte Funktionsuntersuchungen mit Insel-Zellen eine genaue Wiedergabe der Veränderung bezüglich der β-Zellmasse zeigen (McCulloch et al., Diabetes 40: 673–679, 1991). Die intravenösen Glucosetoleranz-Tests wurden nach einem 17- bis 18-stündigen Fasten über Nacht durchgeführt, wie es zuvor beschrieben wurde (Lehmann et al., J. Med. Primatol. 26: 312–321, 1997). Die Blutproben wurden bei –10, –5 und 0 Minuten gesammelt. Anschließend wurden 0,5 g Glucose/kg Körpergewicht in einer 50%igen Glucoselösung über 20 Sekunden in die Vena saphena injiziert. Es wurden bei 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 Minuten nach der Injektion Proben von 1,5 ml aus der kontralateralen Femoralarterie gesammelt. Somit wurden insgesamt 12 Blutproben über einen Zeitraum von 40 Minuten entnommen. Die Proben wurden in Glasröhrchen eingebracht, die 0,05 ml 15 % flüssiges EDTA und 0,2 ml Trasylol (500 K.I.U. Aprotinin/ml Blut) enthielten, auf Eis gestellt und innerhalb von 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend bei –80°C eingefroren und anschließend auf Glucose, immunreaktives Insulin und Glucagon getestet.

[0058] Statistische Analysen und Berechnungen. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte ± SEM gezeigt. Die Glucose-Abbaukonstante (glucose disappearance constant, Kg) wurde ausgehend von der IVGTT als Steigung der Abnahme des \log_e (ln) der Plasmaglucose zwischen 10 und 30 Minuten nach der Glucoseinjektion multipliziert mit 100 berechnet. Die akute Insulin-Antwort auf Glucose (acute insulin response to glucose; AIRG) wurde als die inkrementale Fläche unter der Insulinkurve (area under the curve; AUC) zwischen 1 und 10 Minuten nach der intravenösen Injektion von Glucose berechnet. Die inkrementalen Antworten (AUC-Glucose, AUC-Insulin) wurden durch die Mittelwerte der trapezoidalen Regel mit Subtraktion der basalen Werte

von 1 bis 30 Minuten berechnet. Die Daten wurden mit der Statistica für Windows-Software (Version 5.0, 1997, Statsoft, Inc. Tulsa, OK, USA) analysiert.

Ergebnisse.

[0059] Die CD154-Blockadetherapie verlängert das Überleben und das Funktionieren von Insel-Allotransplantaten. Alle Paviane wurden unmittelbar nach der Transplantation normalglykämisch. Wie in der nachfolgenden Tabelle 1 gezeigt, führte die ICT von allogenen Inseln in Abwesenheit eines Immunsuppressivums oder einer CD154-Blockadetherapie zu einer Abstoßung am Tag 8. Eine herkömmliche Immunsuppression mit FK506 (allein oder in Kombination mit Gesamtknochenmark oder Stammzellen-selektiertem Mark) konnte das Insel-Überleben nicht verbessern, wobei die Tiere an den Tagen 10, 8 bzw. 10 eine Abstoßungsreaktion zeigten. Im deutlichen Gegensatz dazu führte die Behandlung von vier von fünf Pavianen mit dem Anti-CD154 (5c8) MAb zu einem verlängerten Überleben von Insel-Allotransplantaten, das deutlich über dem der Kontrollen oder dem der mit FK506 behandelten Tiere lag. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden auch in dem Liniendiagramm in [Fig. 1](#) gezeigt, in der die Nüchtern-Blutglucose (FG) als Funktion der POD aufgetragen ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zum ersten Mal das die CD154-Blockadetherapie die Akzeptanz von Insel-Allotransplantaten in einem nicht-humanen Primaten-Modell der durch eine Pankreatektomie induzierten Diabetes verringert. Diese Ergebnisse zeigen die Fähigkeit der Anti-CD154-Therapie, eine akute Abstoßung umzukehren.

[0060] Die CD154-Blockadetherapie kann in Verbindung mit einer Übertragung von Knochenmarkszellen verwendet werden. Drei Paviane erhielten zeitversetzte Infusionen des gesamten Knochenmarks ($n = 2$) oder von Stammzell-selektiertem Mark (selektiert mit einer Ceprat®-Säule, CellPro, Bothell, WA) ($n = 1$) an den PODs 5 und 11. Diesen Pavianen wurde eine 5c8-Induktionstherapie verabreicht (20 mg/kg Tage -1, 3 und 10), und sie wurden einer monatlichen Erhaltungstherapie unterzogen, die am POD 28 begann. Einem Tier erging es extrem gut, und es zeigte bis zum POD 241 keine Abstoßung. Ein zweites Tier zeigte eine Abstoßung am POD 112, wurde wegen der Abstoßung behandelt und hielt bis zum POD 162 durch. Das dritte Tier wurde wegen einer Abstoßung am Tag 70 behandelt und hielt bis zum POD 124 durch.

[0061] Die Wirkung der CD154-Blockadetherapie auf die Transplantatfunktion, einschließlich der Kontrolle des Glucosestoffwechsels. Wiederholte IVGTTs in den Kontrolltieren zeigten eine exzellente Reproduzierbarkeit der ersten Phase der Insulinsekretion (first phase insulin secretion, FPIS). Ein Glucose-Toleranztest (IPGTT) und Immunhistochemie, die an einem Tier vorgenommen wurden, das am Tag 79 getötet worden war, zeigten ein funktionierendes Transplantatgewebe in der Leber, ohne irgendeine verbleibende Produktion von Insulin an Orten außerhalb der Leber. Bei anderen Tieren der Untersuchung wurde gezeigt, dass diese funktionierende Insel-Allotransplantate aufwiesen, wobei das Überleben der Transplantate zwischen > 125 und > 220 Tagen betrug. Wiederholte IVGTTs 4 bis 16 Wochen nach der Pankreatektomie und der Insel-Transplantation zeigten nahezu identische Kg-Werte in allen Tieren bis zu 8 Wochen nach der Operation. Die Kg-Werte fielen anschließend in Pavianen, die zum Zeitpunkt der Abstoßung mit hu5c8 behandelt worden waren, ab. Stabile Werte wurden in Pavianen beobachtet, die mit Erhaltungsdosen von hu5c8 behandelt worden waren. Die Insel-Masse (wie anhand der FPIS geschätzt) wurde mit jedem Abstoßungsvorfall über die Zeit geringer. Im Gegensatz dazu wurde die FPIS (follow-up 16 Wochen) nach der Insel-Transplantation bei Tieren mit einer Erhaltungstherapie mit hu5c8 gut beibehalten. Zwei Kontrolltiere wurden ebenfalls untersucht. In einigen der IVGTT veranlassten technische Probleme die Verabreichung von mehr Ketamin als in der vorhergehenden Untersuchung, was zu einem verringerten Kg-Wert und zu einem verringerten FPIR führte. Bei der Nachbehandlung mit der Standarddosis von Ketamin waren diese Werte jedoch wieder normal.

[0062] Während des Verlaufs der vorliegenden Untersuchungen wurde entdeckt, dass die Transplantat-Abstoßung vor der Bewertung der FG nachgewiesen werden konnte, indem man den 2 Stunden-PPG erfasst. Die Inseltransplantat-Abstoßung ist ursprünglich als zwei aufeinanderfolgende FGs von mehr als 250 mg/dl definiert worden. Es wurde jedoch nunmehr herausgefunden, dass zwei aufeinanderfolgende 2 Stunden-PPG von mehr als 150 mg/dl einen sensitiven Index für die frühen Phasen der Transplantat-Abstoßung darstellen. Die Anwendung einer gegen die Abstoßung gerichteten Therapie (entweder mit einem CD154-Blocker oder einem herkömmlichen Mittel gegen die Abstoßung) kann daher ausreichend früh im Abstoßungsprozess verabreicht werden, um die Erhaltung des metabolisch lebensfähigen Transplantatgewebes zu ermöglichen. Für die Erhaltung von abgestoßenen Transplantaten durch hu5c8 wurde dasselbe Dosierungsregime wiederholt, das bei der Induzierung der Transplantatakzeptanz verwendet wurde.

[0063] Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen mit Pavianen. Die oben genannten Untersuchungen zeigen, dass hu5c8 die Insel-Transplantation fördert, ein langfristiges Überleben von allogenen Inseln erlaubt

und weder auf die Insulin-Sekretion noch auf die Gesamt-Insulinsensitivität eine nachteilige Wirkung ausübt. Ferner zeigen diese Untersuchungen zum ersten Mal, dass ein Transplantat erhalten werden kann, und dass eine Umkehrung von Insel-Abstoßungsvorfällen in einem Primaten-Modell mittels der CD154-Blockadetherapie möglich ist. Die vorliegend beschriebenen Therapien können in Primaten zur Erhaltung der Insulinsekretion und der Gesamt-Insulinsensitivität in einem prä-ICT-Ausmaß führen.

Tabelle 1. Verlängerung des Überlebens eines Allotransplantats aus einem nicht-humanen Primaten mit Anti-CD154

Gruppe	N	Spezies	Dauer (in PODs) der Insulin-Unabhängigkeit
Kontrolle	1	Pavian	8
FK506	3	Pavian	8, 10, 10
Anti-CD154 Induktion + Anti-Abstoßung	5	Pavian	^a 8, ^b 59, ^c 229, ^d 264, ^e 284
Anti-CD154 Induktion + Erhaltung	2	Pavian	^f 113, ^g 238
Anti-CD154 Induktion + Anti-Abstoßung	4	^h Rhesus	ⁱ 16, >80, >94, >166

- a) Erhielt eine reduzierte Dosis 5c8
- b) Tier 34R; getötet am POD 79 mit partieller Funktion, erfuhr ein Abstoßungsvorfall am POD 58, der erfolgreich umgekehrt wurde
- c) Tier 12R; getötet am POD 302 mit partieller Funktion, erfuhr sechs erfolgreich behandelte Abstoßungsvorfälle, beginnend am POD 59
- d) Tier 29R; getötet am POD 300, vollständige Abstoßung, erfuhr einen Abstoßungsvorfall
- e) Tier 14R; getötet am POD 301 mit partieller Funktion, erfuhr vier erfolgreich behandelte Abstoßungsvorfälle, beginnend am POD 31
- f) getötet am POD 130, vollständige Abstoßung
- g) getötet am POD 235 mit partieller Funktion
- h) nachfolgend besprochen
- i) starb von Insulin unabhängig am POD 16 aufgrund einer partiellen intestinalen Obstruktion

[0064] Rhesus-Affen-Modell der ICT für Pankreatektomie-induzierte Diabetes. Sofern nicht genauer angegeben entsprachen alle Verfahren im Allgemeinen den obigen, bei den Untersuchungen im Pavian-Modell angewandten Verfahren.

[0065] Tier-Verfahren. SPF-Rhesus-Affen, 2 bis 7 Jahre alt, sind problemlos von COVANCE (Alice, TX) oder von der Mannheimer-Foundation, Inc. (Homestead, FL) oder von ähnlichen Anbietern erhältlich. Bei Erhalt werden alle Affen untersucht, um ihre allgemeine Gesundheit, ihren physikalischen Zustand und ihren physiologischen Status zu untersuchen. Alle chirurgischen Verfahren werden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Tiere werden 12 bis 18 Stunden vor der Operation einem Fasten unterworfen und werden durch intramuskuläre Verabreichung von Ketamin (10 mg/kg) und Atropin (0,04 mg/kg) prä-anästhesiert. Sobald das Tier beruhigt ist, werden umgehend ein Endotrachealtubus und ein intravenöser Katheter angebracht. Der Endotrachealtubus wird verwendet, um die Atemwege zu schützen und einen einfachen Zugang für Notfallwirkstoffe bereitzustellen. Die Tiere werden mit einer Kombination aus Isofluran und Sauerstoff anästhesiert. Eine normale Salzlösung für die Injektion wird während des gesamten ICT-Verfahrens mit einer Rate von 10 ml/kg/Stunde durch den Katheter geleitet.

[0066] Es wird ein mittiger Einschnitt durchgeführt, um Zugang zu den abdominalen Organen zu erhalten. Sowohl beim Spendertier als auch beim Empfänger-Tier wird eine totale Pankreatektomie unter Erhaltung des Duodenums durchgeführt. Die Inseln werden für die nachfolgende Transplantation in diabetischen Affen, bei denen eine Pankreatektomie durchgeführt wurde, durch herkömmliche Verfahren aus den Pakreas der Spender isoliert. Nach dem Ausbluten des Spenders unter Betäubung werden die Wirbelkörper durch einen abdominalen Einschnitt mit Hilfe einer Striker-Säge entfernt. Die Knochen werden umgehend weiterbearbeitet, um

das Mark zu entfernen. In einigen Empfängern werden Knochenmarkszellen unter Verwendung eines Blutsets vom Y-Typ mit Filter durch die Kopfvene in den Empfänger eingeleitet.

[0067] Nach der Pankreatektomie der Empfänger-Tiere wird ein Nebengefäß der Vena mesenterica inferior oder der Vena mesenterica superior mit einem Katheter versehen, und die Inseln werden über Gravitationsfluss in die Leber eingeleitet. Anschließend werden die chirurgischen Einschnitte nach herkömmlichen chirurgischen Verfahren verschlossen. Am Ende dieses Vorgangs werden die Tiere ausschließlich unter Sauerstoff gehalten, und der Endotrachealtubus wird entfernt, sobald das Tier ausreichend zu sich gekommen ist, um die Kontrolle der Atemwege wiederzuerlangen. Nach der ICT werden die Empfänger in einem ICU-Käfig gebracht und beobachtet, bis sie klinisch stabil sind. Antibiotika (Baytril) werden post-operativ (5 mg/kg intramuskulär, q 24 Stunden für 5 Tage) verabreicht. Sofern ein Analgetikum benötigt wird, wird Bupomorphin (0,05 mg/kg, intramuskulär) verwendet.

[0068] Die Affen werden nach der Operation einem Fasten unterworfen, und es wird ihnen Gatorade p.o. am POD 1 verabreicht. Am POD 2 wird mit einer zweimal täglich verabreichten Soft-Diät begonnen, die aus Bananen und (mit Wasser) eingeweichtem, stark proteinhaltigem Affenfutter besteht, welches Viokase enthält (eine Banane plus vier Biskuits). Die normale Ernährung wird am POD 3 wieder aufgenommen (6 bis 8 Biskuits plus Früchte, mit Viokase, zweimal täglich). Jedes Tier wird einzeln gefüttert, um einen Konkurrenzkampf während der Fütterung zu vermeiden. Kranke Affen werden mit der Hand gefüttert, um die allgemeine Gesundheit und die Ernährung zu verbessern. Kritisch kranke Tiere werden in Isolation behandelt, bis es ihnen wieder besser geht. Affen bei denen festgestellt wird, dass sie sterben oder unbehandelbar sind, werden durch eine schnelle intravenöse Injektion Kaliumchlorid durch einen intravenösen Katheter getötet.

[0069] Überwachung. Die Entnahme von Blutproben für die Überwachung von Glucose und Insulin, für die Immun-Überwachung etc., überschreiten nicht 1 % des Körpergewichts an einem bestimmten Zeitpunkt oder 7 % des Körpergewichts über einen Zeitraum von 1 Monat. Die Spiegel von Nüchtern-Blutglucose (FG) werden unter Verwendung einer Lanzette zum Anstechen der Ferse bestimmt, wobei ein kleiner Blutstropfen zum Aufbringen auf einen Glucometerstreifen erhalten wird. In bestimmten Situationen, z.B. wenn die Glucose hoch zu sein scheint ($> 200 \text{ mg/dl}$) wird eine Venenpunktion durchgeführt, um eine Plasmaprobe für die Analyse auf einem Beckman-Glucose-Analysiergerät zu erhalten. Blutproben werden ferner vor und in Intervallen nach der Transplantation erhalten, um die Immunaktivität des Empfängers gegen den Spender zu erfassen. Intravenöse Glucose-Toleranz-Tests (IVGTT) werden wie oben beschrieben vor der Transplantation und in Intervallen von 4 bis 6 Wochen danach durchgeführt.

Ergebnisse.

[0070] Die CD154-Blockadetherapie verlängert das Überleben und die Funktion von Insel-Allotransplantaten in diabetischen Rhesus-Affen sowie auch in Pavianen. Wie oben in Tabelle 1 gezeigt ist, zeigt die vorliegende Untersuchung, dass die Monotherapie mit hu5c8 die Akzeptanz von Insel-Allotransplantaten in einer zweiten, nicht-menschlichen Primatspezies verlängert. Diese Untersuchung verwendete das Akzeptanz-induzierende Regime der hu5c8-Verabreichung an den Untersuchungstagen -1, 0, 3 und 10. Ein monatliches Akzeptanz-Erhaltungsregime wurde ebenfalls befolgt, um die Serumspiegel von hu5c8 zu erhalten. Die Ergebnisse, die auch in [Fig. 2](#) gezeigt sind, sind bemerkenswert: funktionelle Insel-Allotransplantate werden beibehalten, ohne dass Abstoßungsvorfälle auftreten. Die Bedeutung dieses Ergebnisses wird durch den vergleichenden Datensatz in [Fig. 3](#) unterstützt, der zusätzlich zu den Rhesus-Untersuchungstieren die FG-Plots eines Menschen (LAURA genannt) zeigt, der an DM leidet und gegenwärtig eine Intensiv-Insulin-Ersatztherapie erhält. Bei LAURA wurde im Alter von 14 Monaten DM diagnostiziert, und zum Zeitpunkt der Untersuchung war sie 6 Jahre alt und erhielt zwei- bis dreimal täglich Insulin-Injektionen.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Unterbrechers der CD40:CD154-Bindung bei der Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung der Abstoßung, zur Verlängerung des Überlebens, zur Umkehrung der Abstoßung oder zur Erhaltung der Funktion eines Insulin-produzierenden Gewebetransplantats in einem menschlichen Transplantatempfänger, oder zur Wiederherstellung der metabolischen Kontrolle des Glucosestoffwechsels in einem menschlichen Transplantatempfänger eines Insulin-produzierenden Gewebetransplantats, wobei eine wirksame Menge des Unterbrechers der CD40:CD154-Bindung dem Transplantatempfänger verabreicht wird, und wobei der Unterbrecher der CD40:CD154-Bindung ein monoklonaler Anti-CD40L (Anti-CD154)-Antikörper, ein Fab-Fragment eines monoklonalen Anti-CD40L (Anti-CD154)-Antikörpers, ein $F(ab')_2$ -Fragment eines monoklonalen Anti-CD40L (Anti-CD154)-Antikörpers oder ein monoklonaler Anti-CD40L (Anti-CD154)-Einzelket-

ten-Antikörper ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, bei der der monoklonale Anti-CD40L (Anti-CD154)-Antikörper
(a) ein monoklonaler Antikörper mit den Antigenspezifischen Bindungseigenschaften des Antikörpers 5c8 ist, der von dem Hybridom produziert wird, welches unter der ATCC-Zugangsnummer HB 10916 hinterlegt ist; oder
(b) der monoklonale Antikörper 5c8 ist, der von dem Hybridom produziert wird, welches unter der ATCC-Zugangsnummer HB 10916 hinterlegt ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1, bei der der monoklonale Anti-CD40L (Anti-CD154)-Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus chimären Antikörpern, humanisierten Antikörpern und primatisierten Antikörpern.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei der das Insulin-produzierende Gewebe
(a) Gesamt-Pankreasgewebe; oder
(b) isolierte Pankreas-Inseln; oder
(c) eine Zellpopulation, die isolierte adulte Beta-Inselzellen umfasst; oder
(d) eine Zellpopulation, die isolierte fetale Beta-Inselzellen umfasst; oder
(e) eine Zellpopulation, die kultivierte Beta-Inselzellen umfasst; oder
(f) eine Zellpopulation, die immortalisierte Beta-Inselzellen umfasst; oder
(g) eine Zellpopulation, die Wirtzellen umfasst, welche ein Insulin-Gen stabil exprimieren; oder
(h) eine Zellpopulation, die Wirtzellen umfasst, welche ein Insulin-Gen induzierbar exprimieren ist.

5. Verwendung nach einem der Ansprüchen 1 bis 4, bei der das Insulin-produzierende Gewebe allogen oder xenogen in Bezug auf den Transplantatempfänger ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei der der Transplantatempfänger an einer Störung der metabolischen Kontrolle des Glucosestoffwechsels leidet.

7. Verwendung nach Anspruch 6, bei der der Transplantatempfänger an Diabetes mellitus leidet.

8. Verwendung nach Anspruch 1, bei der das Medikament für die Wiederherstellung der metabolischen Kontrolle des Glucosestoffwechsels bei einem menschlichen Transplantatempfänger eines Insulin-produzierenden Gewebetransplantats ist, und der Transplantatempfänger ferner ein Empfänger einer wirksamen Menge eines tolerisierenden Mittels ist.

9. Verwendung nach Anspruch 8, bei der das tolerisierende Mittel Knochenmarkgewebe ist, das zu dem Insulin-produzierenden Gewebe MHC-kompatibel ist.

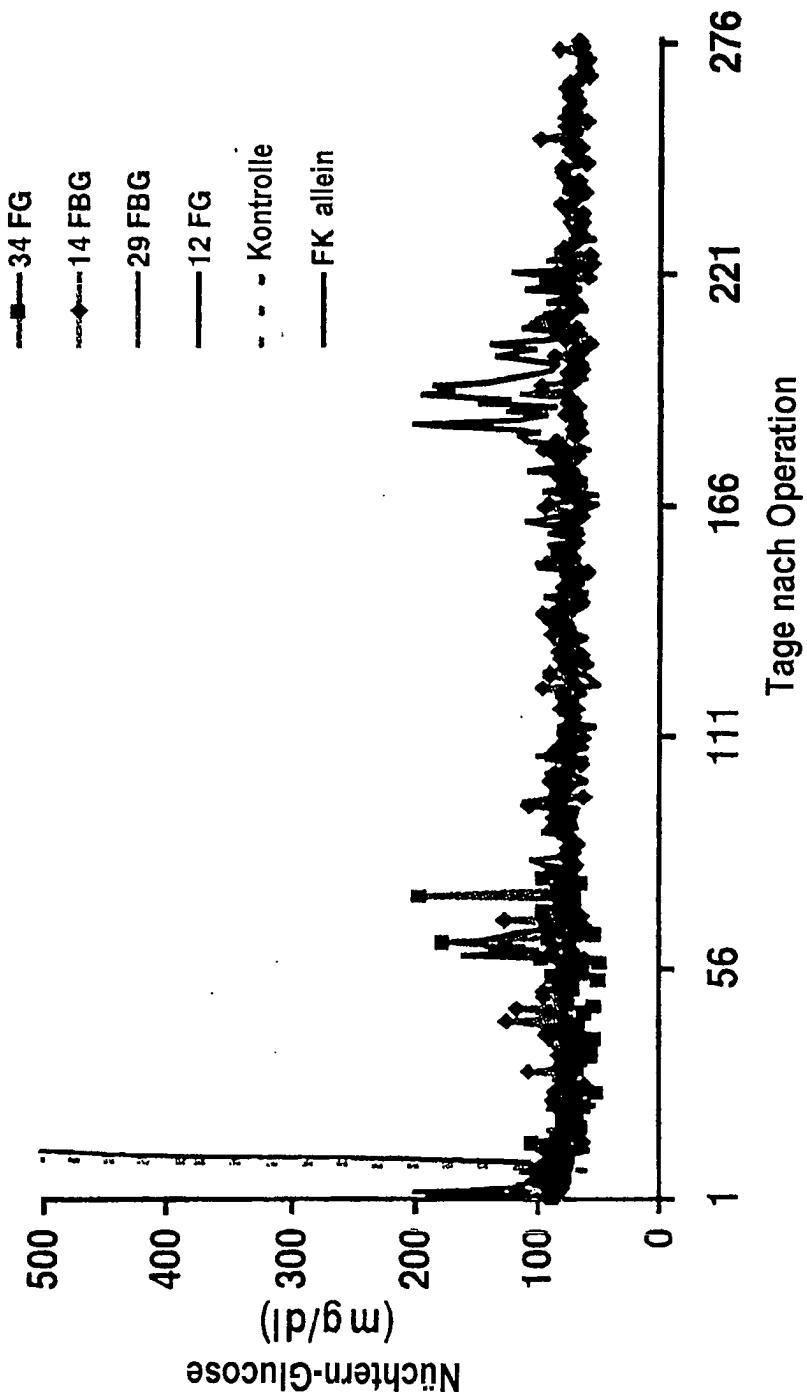
10. Verwendung nach Anspruch 8, bei der das tolerisierende Mittel
(a) Knochenmarkgewebe, das in Bezug auf das Insulin-produzierenden Gewebe syngen ist; oder
(b) Gesamt-Knochenmark; oder
(c) eine Population von hämatopoetischen CD34(+) Zellen; oder
(d) eine Population von hämatopoetischen CD34(+) Zellen, die CD40(–) sind, ist.

11. Verwendung nach Anspruch 1, bei der das Insulin-produzierende Gewebe in dem Transplantatempfänger von den Geweben des Empfängers physikalisch durch eine Immunisolierungsvorrichtung getrennt ist.

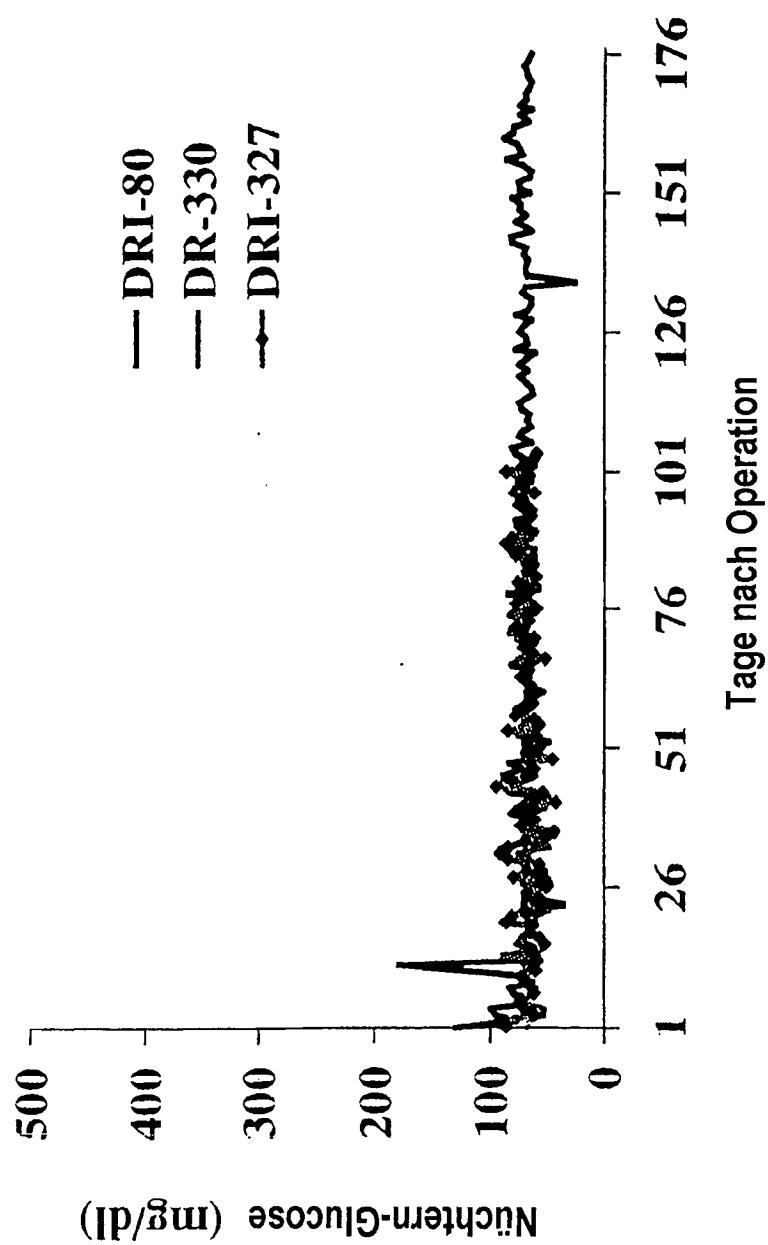
12. Verwendung nach Anspruch 11, bei der die Immunisolierungsvorrichtung
(a) eine semipermeable Barriere umfasst, die eine isolierte Kammer definiert, in der das Insulin-produzierende Gewebe verteilt ist; oder
(b) eine Kapsel ist; oder
(c) eine Mikrokapsel ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Figur 1: Verlängerung des Überlebens eines
Pavian-Insel-Allotransplantats mit Anti-CD154



Figur 2: Kontrolle der Blut-Glucose in Rhesusaffen mit funktionstüchtigem Insel-Allotransplantat



**Figur 3: Kontrolle der Blut-Glucose mit funktionstüchtigem
Insel-Allotransplantat vs. Intensiv-Insulintherapie**

