

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(19) BG

(11) 64976 B1

(51) Int.Cl.

A 61 K 39/395 (2006.01)

A 61 K 38/00 (2006.01)

G 01 N 33/48 (2006.01)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 104091

(22) Заявено на 18.01.2000

(24) Начало на действие
на патента от: 19.06.1998

Приоритетни данни

(31) 60/050,267 (32) 20.06.1997 (33) US
60/077,265 09.03.1998 US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 10 на 31.10.2000

(45) Отпечатано на 30.11.2006

(46) Публикувано в бюлетин № 11
на 30.11.2006

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

BIOGEN IDEC MA INC., 02142 CAMBRIDGE,
14 CAMBRIDGE CENTER, MASSACHUSETTS;
UNIVERSITY OF MIAMI, 33136 MIAMI, 1600
NORTHWEST AVENUE, FLORIDA (US)

(72) Изобретател(и):

Norma S. Kenyon

Miami, Florida

Camillo Ricordi

Miami Beach, Florida

David W. Thomas

Wellesley, Massachusetts

Linda Burkly

West Newton, Massachusetts (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Румяна Стефанова Слабова, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:

PCT/US1998/012892, 19.06.1998

(87) № и дата на PCT публикация:

WO1998/058669, 30.12.1998

(54) CD154 БЛОКАДНА ТЕРАПИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА ТЪКАН ОТ ПАНКРЕАТИЧНИ
ОСТРОВИ

(57) Изобретението се отнася до методи и лекарствени препарати за инхибиране отхвърлянето на инсулинпродуцираща тъкан от трансплантиран реципиент, както и до методи и препарати за удължаване преживяването или функцията на присадката, за обратимост на нейното отхвърляне или възстановяване функцията на увредена присадка и за индуциране на имунен толеранс спрямо трансплантирана, инсулинпродуцираща тъкан. Посочените методи и препарати са подходящи за лечение или профилактика на дефекти в метаболитния контрол на глюкозната хомеостаза в кръвта, включително на дефекти, проявени като захарен диабет.

21 претенции, 3 фигури

BG 64976 B1

(54) CD154 БЛОКАДНА ТЕРАПИЯ ПРИ ТРАНС- ПЛАНТАЦИЯ НА ТЪКАН ОТ ПАНКРЕА- ТИЧНИ ОСТРОВИ

Настоящото е отчасти продължение на предишна U.S. Provisional S.N. 60/050,267, представена на 20 юни 1997, и предишна U.S. Provisional S.N. 60/077,265, представена на 9 март 1998. Изводите от двете предишни представени Provisional patent заявки са включени тук чрез цитат.

Област на техниката

Изобретението се отнася главно до потискане на нежелани имунни отговори, по-специално на придобити Т-лимфоцит медиран имунни отговори. В частност, изобретението се отнася до предотвратяване, лечение, потискане или обратимост на определящо се от имунната система отхвърляне на трансплантирана тъкан или трансплантиран орган у реципиент.

Предшестващо състояние на техниката

Органна трансплантация между генетично неидентични индивиди неизменно води до имунно отхвърляне на органа по Т-клетъчно зависим механизъм, освен ако процесът на отхвърляне е възпрепятстван чрез въвеждане на препарати, които потискат Т-клетъчната функция. Няколко US патента разкриват приложението на такива имunosупресивни препарати за инхибиране отхвърлянето на присадката, включително US 5,104,858; 5,008,246; и 5,068,323. Други конвенционални агенти са описани в Suthanthiran et al. (1994), 331 New Eng. Med. J. 365-376. Двата калцинеурин фосфатазни инхибитори и глюкокортикостероиди са използвани клинично, и двата предотвратяват медираното с Т-клетки освобождаване на активирани цитокини, по-специално IL-2. Обаче терапията с тези конвенционални агенти остава несъвършена. Двата типа действат чрез разединяване на сигналното предаване чрез Т-клетъчния антигенен рецептор (TCR), единственият медиатор на Т-клетъчната антигенна специфичност, и действуват на всички Т-клетки като не дискриминират. В допълнение, ефектът на тези препарати не е продължителен така, че пре-

късването на лечението води общо до загуба на присадката. Така, за да се поддържа жизнеспособно, функционално интегриране на присадката, трансплантираните реципиенти ще страдат от последиците на продължителната, неспецифична имunosупресия. Тези последици включват повишен риск от инфекции и малигнитет, както и токсичност, по-специално на чувствителните органи и тъкани, като бъбреци, черен дроб и панкреас. Трансплантацията на клетки от острови (ICT) може да доведе до обратимост на хипергликемията и нормализиране на метаболитния контрол на кръвната глюкоза (Ricordi, Diabetes Reviews 4:356-369, 1996; Scharp et al., Diabetes 39:515-518, 1990; Socci et al., Acta Diabetot. 28:151-157, 1991; Wamock 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 46:1893-1899, 1997; у индивиди страдащи от захарен диабет- diabetes mellitus (DM). Дори и при отсъствие на инсулинова независимост, въвеждането на намалени дози екзогенен инсулин у трансплантирани пациенти с функциониращи алографти от острови (базална с-пептидна продукция > 1.0 ng/ml) води до превъзходен метаболитен контрол и нормализация на хемоглобин Ale (HbA1c) (Ricordi. Diabetes Reviews 4:356-369, 1996; Scharp et al., Diabetes 39:515-518, 1990; Socci et al., Acta Diabetot 28:151-157, 1991; Wamock 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 46:1893-1899, 1997). Не е наблюдавана хипогликемия и понастоящем са документирани функциониращи островни алографти у реципиенти с автоимунен диабет за повече от 6 години пост-трансплантиране (Alejandro et al., Diabetes 46: 1893-1899, 1997). Независимо от този значителен прогрес, широкото приложение на трансплантацията на клетки от острови за контрол на DM е значително ограничено поради изискването за хронична, генерализирана имunosупресия на реципиента. Това ограничение се отнася не само до рисковете, свързани с хронична имunosупресия, но също и до диабетогенните ефекти на имunosупресивните препарати, които се използват понастоящем.

Тези ограничения на съвременното лече-

ние за контрол на DM са стимулирали широк интерес за развитие на терапии за индуциране на донор-специфичен имунен толеранс, с което става очевидна нуждата от доживотна имunosупресия на трансплантираните реципиенти. Получени са обещаващи начални резултати от няколко изследователи, като са използвани различни моделни системи от гризачи за алотрансплантация. При тестиране на преклинични модели от големи животни (напр. кучета, нечовешки примати) обаче, е установено, че данните от гризачи са слабо предсказуеми за резултатите от ICT на модели, които по-близко наподобяват човешки ICT.

Това е в съответствие с нуждата от подобро или по-ефективно имunosупресивно или имуномодулаторно лечение на реципиенти с присадки, включително човешки индивиди. По-специално, има нужда от терапии, които не изискват пан-Т клетъчна супресия, т.е. лечения, които не правят реципиента податлив на малигнитет или възможни инфекции. Налице е по-точно необходимост от лечения, които са по-малко токсични от лекарствените препарати, с които разполагаме понастоящем. Подобно на това, има нужда от лечения, които улесняват продължителността на функционалната интеграция на присадката, т.е. интеграция, която продължава да съществува след спиране курса на третиране.

Техническа същност на изобретението

Една от целите на настоящето изобретение е да се предостави имуномодулаторен агент, който отслабва придобитите Т-клетъчни отговори, без да е необходима пан-Т клетъчна имunosупресия. Друга цел е да се предостави имуномодулаторен агент, който стимулира функционалната интеграция на тъканата присадка, по-специално на тъкана присадка, произхождаща от панкреатичен остров у реципиент, и по-специално у човек приемник. Друга цел е да се предостави имуномодулаторен агент, който инхибира имунното отхвърляне на присадената тъкан, по-специално на присадените панкреатични острови или друга инсулин-продуцираща тъкан. Една следваща цел е да се предостави имуномодулаторен агент, който прекъсва притока на костимулаторен сигнал към активирани Т-клетки. Специален предмет на изобретението

е да предостави блокатор на CD40:CD154 свързването, като CD154 блокиращ агент, за приложение с цел отслабване, забавяне или обратимост на имунното отхвърляне на присадената тъкан. Един по-общ предмет на изобретението е да подобри достъпността за тъкани присадки, по-специално инсулин-продуциращи тъкани присадки, като предоставя имуномодулаторни препарати, които позволяват функционална интеграция на неавтоложна тъкан (напр. алогенна или ксеногенна тъкан) у реципиент. Следващ общ предмет е да предотвратява, облекчава, отслабва или лекува захарен диабет (DM).

Настоящото изобретение се основава на откритието, че прилагането на блокатор на CD40:CD154 свързването, като CD154 блокиращ агент, сам или в комбинация с друго лекарствено средство, като имуномодулаторен агент или толериращ агент, отслабва, потиска, предотвратява, забавя или прави обратимо придобитото отхвърляне от имунната система на присадената инсулин-продуцираща тъкан у реципиент, без да е необходима пан-супресия на имунната система на реципиента.

Съответно, изобретението се отнася за приложение при третиране на реципиенти с присадена, инсулин-продуцираща тъкан. В един аспект се инхибира отхвърлянето на присадка от инсулин-продуцираща тъкан от трансплантирания реципиент. В друг аспект се удължава преживяването на присадената тъкан. Трети подход прави обратимо отхвърлянето на тъканната присадка. Четвърти подход запазва функцията на тъканната присадка. Използва се също за възстановяване функцията на увредена присадка, както и за индуциране имунен толеранс срещу тъканната присадка. Всички от горните подходи включват третиране на трансплантирания реципиент с блокатор на CD40:CD154 свързването (т. е. CD40L, известен също като CD154 или 5c8 антиген, понякога определян в тази специалност като gp39) със съответния му рецептор (тук, CD40). За предпочитане, блокаторът на свързването е анти-CD40L (анти-CD154), което се отнася за всеки агент, който се свързва с CD154 и предотвратява или интерферира с тяхното свързване със съответни рецептори (напр. CD40). Един примерен CD154 блокиращ агент е моноклонално антитяло (MAb), по-специално такова, което притежава антиген-специфичните свързва-

щи характеристики на 5c8 MAб, представено в U.S. Patent 5,474,771, изводите от които са включени тук чрез цитат.

Горните приложения могат да бъдат използвани с всички типове присадки на инсулин-продуцираща тъкан, като цяла панкреатична тъкан или панкреатични острови, изолирани с конвенционални техники. Така, изобретението е подходящо за приложение при реципиент на присадката (гостоприемник) бозайник, за предпочитане примат, най-предпочитано е човек. В частност, изобретението е подходящо за приложение при реципиент на присадката страдащ от, или рисков за увреждане на метаболитния контрол на глюкозния метаболизъм, като DM. Донорът на присадката може да бъде несингенен член на същите филогенетични видове както реципиента на присадката (т.е. един алогенен донор, предоставящ алогографна тъкан) или член на определен филогенетичен вид (т.е. един ксеногенен донор, предоставящ ксенографна тъкан). Ако е използван ксеногенен донор като източник за тъканна присадка, предпочита се донорът да е относително МНС-съвместим с реципиента; например, бабун или шимпанзе биха били предпочетени като донори за тъканна присадка у човек. Изобретението може да бъде използвано за подпомагане трансплантацията на други типове инсулин-продуцираща тъкан, включително клетъчни популации, изолирани от зрели или фетални островни бета клетки или култивирани островни бета клетки (произхождащи от първична клетъчна култура или от обезсмъртена клетъчна линия). Изобретението може да бъде прилагано за подпомагане трансплантирането на всяка клетка, експресираща индуцируемо или стабилно един инсулинов ген, като такъв получен с генно инженерство или клетка-приемник получена с конвенционалните техники на генното инженерство. По избор, инсулин-продуциращата тъкан може да бъде физически отделена от тъканите на реципиента с едно имуноизолационно устройство.

С оглед на гореказаното, трябва да бъде ясно, че изобретението предоставя приложение за възстановяване метаболитния контрол на глюкозния метаболизъм у бозайници, които се нуждаят от него. Това приложение включва имплантирана инсулин-продуцираща тъкан у бозайник и третиране на бозайника с блокатор на CD40:

CD 154 свързването, за предпочитане с един CD 154 блокиращ агент. В предпочитани изпълнения, CD154 блокиращият агент е едно моноклонално анти тяло, притежаващо антиген-специфичните свързващи свойства на MAб 5c8. В един примерен протокол, който е валидиран чрез тестиране на подходящи преклинични модели на човешки DM у съответни големи животни, присадката е индуцирана чрез въвеждане на MAб преди ICT, последвано (за предпочитане) от поне две въвеждания на MAб в продължение на един период от две седмици след ICT (т.е. след имплантацията на инсулин-продуциращата тъкан). След това, ако е желателно, присадката да се поддържа чрез въвеждане на MAб в продължение на един месец (определено като четири седмици) след ICT. Поддръжката може да бъде повторена ако е необходимо или ако се счита че е уместно.

По избор, присадката може да бъде подсилена чрез конкурентно третиране на бозайника с един толериращ агент, който предпазва присадката след преустановяване на имуномодулаторно или имunosупресивното третиране. Един примерен толериращ агент включва тъкан от костен мозък, или популация от костномозъчни клетки, които са МНС-съвместими с тъканната присадка (в случая тук, с инсулин-продуцираща тъкан). За предпочитане е костният мозък или клетки да са сингенни с донора или източника на инсулин-продуциращата тъкан. Продължително преживяване на толериращия агент у реципиента на присадката, съответно прави реципиента имунно химерен, едно състояние манифестирано чрез донор-специфичен имунен толеранс. Популации, произхождащи от костен мозък, CD34(+) хематопоеични клетки (стволови клетки) са особено предпочитани като толериращи агенти. Специално предпочитани са популации от стволови клетки притежаващи CD40(-) клетъчно повърхностен фенотип.

В друг аспект, изобретението предлага приложение за откриване на нарушение в метаболитния контрол на глюкозния метаболизъм у бозайник. Определянето е достатъчно чувствително, за да открие субклинично (напр. скрито или асимптоматично) нарушение в метаболизма на кръвната глюкоза, например когато бозайникът е рисков за развитие на DM, или рисков, или е в ранен стадий на отхвърляне на присадката

инсулин-продуцираща тъкан. Определя се глюкозното съдържание на проба от кръв, взета от бозайник най-малко един час и по-малко от шест часа (за предпочитане около два часа) след като бозайникът е приел храна. Счита се, че бозайникът има нарушен глюкозен метаболизъм ако е установено глюкозно съдържание в пробата след нахранване (PPD) 150 mg/dl или по-високо (напр. да превишава с около 150 mg/dl). По-добра реализация на това приложение се постига ако са взети две такива проби на последователни дни и определенията на двете проби показват глюкозно съдържание от 150 mg/dl или по-високо.

Кратко описание на фигурите

Горните и други цели, особености и предимства на настоящето изобретение, както и самото изобретение, биха били по-пълно разбрани от следното описание на предпочитани изпълнения, когато се разглеждат заедно с придружаващи фигури, в които:

Фигура 1 е графика, която представя нивата на кръвната глюкоза на гладно (FG) от реципиенти бабуни, третирани с CD154 блокиращ агент за ICT като функция от постоперативен ден (POD).

Фигура 2 е графика, представяща FG нивата на резус маймуни като реципиенти, третирани с CD 154 блокиращ агент за ICT като функция от постоперативен ден (POD).

Фигура 3 е графика сравняваща FG нивата на резус маймуните от ФИГУРА 2 с FG нивата на човек страдащ от DM и получаващ конвенционална инсулинова заместителна терапия.

Подробно описание на изобретението

Т-клетъчно активиране и имунологичните процеси, зависими от него, изискват медиации с Т-клетъчен рецептор (TCR) сигнали и симултанно предадени костимулаторни сигнали. Важен костимулаторен сигнал се предава от лигирането на CD40 върху една антиген-представяща клетка, като В-клетка, чрез CD40L (CD154) на една Т-клетка. Човешкият CD40 е един 50kD белтък по клетъчната повърхност, експресиран върху зрели В-клетки, както и по макрофаги и активирани ендотелни клетки. CD40 принадлежи към един клас рецептори участву-

ващи в програмираната клетъчна смърт, включващи Fas/CD95 и тумор некрозис фактор (TNF) алфа рецептор. Човешкият CD154 (CD40L) е 32kD тип II мембранен гликопротеин с хомология спрямо TNF алфа, който е преходно експресируем, преходно първично върху активирани Т-клетки. Показано е, че CD40:CD154 свързване е необходимо за всички Т-клетъчно-зависими антитяло отговори. В частност, CD40:CD154 свързването предоставя антиапоптотични и/или лимфокин стимулаторни сигнали.

Значението на CD40:CD154 свързването за усилване Т-клетъчно зависимите биологични отговори е по-пълно оценено когато е открито, че X-свързаният хипер-IgM синдром (X-HIGM) у човека е фенотипът който е резултат от генетична липса на функционален CD154. Засегнатите индивиди имат нормални или високи нива на IgM, но не продуцират IgG, IgA или IgE антитела и страдат от повтарящи се, понякога тежки бактериални или паразитни инфекции, както и от повишена честота на лимфоми и коремни ракови заболявания. Подобен фенотип е наблюдаван у животни, които са станали нулизиготни за гена, кодиращ CD154 (Knockout животни). В-клетките на CD154 нулизиготни могат да продуцират IgM в отсъствие на CD40LCD154 свързване, но не са способни да претърпяват изотипно превключване, или да преживяват нормално след афинитетна зрелост. Хистологично, герминативните центрове на лимфните възли не се развиват правилно и В-клетките на имунологичната памет отсъстват или са слабо развити. Функционално, тези дефекти допринасят за тежко намаление или отсъствие на вторичен (зрял) антитяло отговор. Наблюдавани са също дефекти в клетъчния имунитет, манифестирани с повишена честота на бактериални и паразитни инфекции. Много от тези клетъчно-медиации дефекти са обратими след въвеждане на IL-2 или IFN-гама. Тези наблюдения подкрепят схващането, че нормалното CD40:CD154 свързване усилва развитието на Тип I Т-хелперно клетъчни имунни отговори.

Известен брой преклинични проучвания са установили, че агенти, способни да прекъсват CD40:CD154 свързването са обещаващи като имуномодулаторни агенти. В частност, проучвания включващи орган от малки животни или модели на тъканна трансплантация са показали,

че CD40:CD154 блокатори подобряват преживяването на алогенни присадки. В избрани модели, преходно въвеждане на агенти, които интерферира с Т-клетъчната костимулация е довело до индукция на неопределено приемане на присадка. Прекъсването на CD40:CD154 свързването е дало обещаващи резултати, тъй като изглежда че ангажирането на тази рецепторна двойка предшества други костимулаторни сигнали в хронологията и йерархията (Renheim 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). Блокада на CD40:CD154 свързването води до удължаване на сърдечни (Larsen et al., Transplantation 61:4-9, 1996; Larsen et al., Nature 381:434-438, 1996) кожни, (Larsen et al., Nature 381:434-438, 1996; Markees et al., Transplantation 64:329-335, 1997) и островни алографти (Parker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9560-9564, 1995; Rossini et al., Cell Transplant 5:49-52) у гризачи и на алогенни бъбреци у примати (Krik et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8789-8794, 1997). Показано е също, че се забавя началото на автоимунен диабет в незатлъстели диабетични (NOD) мишки (Balasa et al., J. Immunol. 159:4620-4627, 1997). Накрая, съобщено е, че интерферирането с CD40:CD154 свързването предотвратява продукцията на възпалителни цитокини (Dechanet et al., J. Immunol. 159:5640-5647, 1997; Kiener et al., J. Immunol. 155:4917-4925, 1995).

Така CD40:CD154 блокадата може да осигури потенциално мощни терапии за предотвратяване неуспеха на алографт от острови или ксенографт у индивиди с дефектен метаболизъм на глюкоза, като Тип I диабет. Обаче, както е отбелязано по-горе, изследвания върху моделни системи с гризачи корелират слабо с резултата от тестване или лечение на големи животни, включително човек.

Тук са представени проучвания, определящи ефектите на един предпочитан CD154 блокиращ агент, едно хуманизирано МАb притежаващо антиген-специфичните свързващи свойства на МАb 5с8 (Lederman et al. J. Exp. Med. 175:1091-1101, 1992) при преклинични модели

на островна алотрансплантация у големи животни. По-специално, представените модели включват CD154 блокадна монотерапия при бабуни (*Papio hamadryas*) и други нечовешки примати. Получените резултати от тези изследвания силно насочват, че CD154 блокадната монотерапия би подсилила продължителното прихващане на присадката от инсулин-продуцираща тъкан у човека, и по-специално у хора страдащи от DM или подобен дефект на глюкозната хомеостаза.

Следната дискусия илюстрира и дава като пример различни случаи и условия, при които може да бъде прилагано изобретението, както и предоставя основни доказателствени проучвания, включващи специфични изпълнения на изобретението.

Реципиенти гостоприемници

Изобретението може да се прилага за лечение или профилактика на всеки бозайник реципиент на инсулин-продуцираща тъканна присадка, или на всеки бозайник нуждаещ се от инсулин-продуцираща тъканна присадка. Реципиентите (определени също като реципиенти или като приемници) съответно са страдащи от, или са рискови за дефект на метаболитния контрол на кръвната глюкоза (глюкозна хомеостаза). Например, реципиентът може да бъде хипер- или хипогликемичен. Изобретението е особено подходящо за приложение при диабетични реципиенти, по-специално реципиенти страдащи от захарен диабет (DM). Предпочита се реципиентът да е примат, по-предпочитано висш примат и най-предпочитано е да е човек. В други изпълнения, реципиентът може да бъде друг бозайник, който се нуждае от тъканна присадка, по-специално бозайник от търговски интерес или животно домашен любимец или животно, което има стойност, напр. като членове на застрашени видове. Така реципиентите включват още, но не се ограничават до, овца, коне, говеда, кози, прасета, кучета, котки, зайци, морски свинчета, хамстери, скачащи мишки, плъхове и мишки.

Донор или тъкан за присадка

Изобретението може да се прилага при всякакъв тип инсулин-продуциращ тъканен трансплант или процедура за присадка, по-специално процедури, където донорната (присадъчната) тъкан е засегната от, или е рис-

кова за неуспех или отхвърляне от имунната система на реципиента. По-специално изобретението може да бъде прилагано във всякакъв контекст, където донорната тъкан не е хистосъвместима (МНС-съвместима) с реципиента. Така в допълнение към автоложна или сингенна донорна тъкан, изобретението може да бъде прилагано с алогенна или дори ксеногенна донорна тъкан. Донорната тъкан може да бъде взета, с конвенционални средства, от доброволец или друг жив донор, или от трупен донор. Предпочита се донорът да е толкова хистосъвместим колкото и да е приложим за реципиента. Така, там където реципиентът е човек се предпочита автоложна или алогенна донорна тъкан. Обаче донорна тъкан може да бъде получена от хетероложен вид (в който случай се определя като хетерографт), като нечовешки примат (напр. шимпанзе или бабун), или друг относително съвместим бозайник (напр. свиня).

В някои изпълнения, донорната тъкан включва интактен панкреас. В други изпълнения, донорната тъкан включва една част, парче или биопсия от донорен панкреас. Донорният панкреас може да бъде получен от жив донор или може да бъде възстановен от подходящ труп. Ако се използва трупен донор, предпочита се панкреасът да се постави на студено в исхемични условия за не повече от около осем часа. В други изпълнения, донорната тъкан съдържа инсулин-продуциращи клетки, по-специално изолирани или суспендирани острови или островни клетки, включително клетки взети или изрязани от фетален или възрастен донор, клетки поддържани в първична култура или обезсмъртена клетъчна линия. Добре известни са подходящи способности за изготвяне на донорни острови или клетъчни суспенсии от острови от цели панкреаси (вж. напр. Ricordi et al. (1988), 37 *Diabetes* 413-420; Tzakis et al. (1990), 336 *Lancet* 402-405; Linetsky et al. (1997), 46 *Diabetes* 1120-1123). Подходящи панкреаси са получени от донори, които нямат увреждания на хомеостазата на кръвната глюкоза. Други източници на инсулин продуциращи клетки включват фетални клетки предшественици на островните клетки, по избор развити като първични култури. Може да бъде използван всякакъв подходящ клетъчен тип, включително клетки, съдържащи екзогенен генетичен материал кодиращ един експресируем инсулинов

ген. Така, изобретението обхваща приложението на трансфектирани или трансформирани клетки-приемници, които са били (или произхождат от клетки предшественици, които са били) генно инженерно манипулирани да експресират инсулин, конститутивно или индуцируемо (напр. под контрола на глюкозо-отговарящ промотор или усилвател). В други изпълнения, изобретението обхваща използването на панкреатични или други донорни клетъчни типове произхождащи от тарнсгенен бозайник, който е манипулиран с генно инженерство да включва материал, необходим за получаване на инсулин в някои или всички тъкани на неговото тяло.

Инсулин продуциращата тъкан (донорната тъкан) се въвежда системно или локално у реципиента. Например, изолирани, суспендирани или разпръснати инсулин продуциращи клетки могат да бъдат въведени вътресъдово или имплантирани на желано място, като кухината на костния мозък, черния дроб, в бъбречната капсула, интрамускулно или интраперитонеално. В някои изпълнения, клетките са митотично компетентни и продуцират нова тъкан произхождаща от донорната. В други изпълнения, клетките не са митотично компетентни, но са запазени жизнеспособни у донора и продуцират или експресират инсулин. Във всеки случай се имплантира ефективно количество инсулин-продуциращи клетки или тъкан, което означава количество достатъчно да отслаби (забележимо да облекчи) дефекта в глюкозния метаболизъм на реципиента (напр. хипогликемия или хипергликемия). Оптимално е, количеството да е достатъчно, за да възстанови способността на реципиента да поддържа глюкозната хомеостаза - това означава да освободи реципиента от зависимостта на конвенционалната (напр. инжектирана или инхалирана) инсулинова заместваща терапия.

В някои изпълнения, инсулин продуциращата тъкан е физически отделена (изолирана) от заобикалящите тъкани на пациента чрез имуноизолиращо устройство. Подходящи устройства предпазват инсулин-продуциращата тъкан от повечето ефектори на клетъчния и хуморалния имунитет, включително но не ограничаващо се до, левкоцити, имуноглобулин и комплемент. Така, имуноизолационното устройство предоставя главно една полупропусклива бариера, като мембрана, с големина на порите достатъчна

да предотвратява дифузията през нея на молекули по-големи от около 50 до 100 kD. Барьерата отделя една изолационна камера, в която е разположена инсулин-продуциращата тъкан и е свободна от всички страни, от които инсулин-продуциращата тъкан може физически да контактува с клетки или тъкани от външната среда на барьерата. Може да бъде използвано всяко конвенционално устройство, плик, капсула или микрокапсула, включително микрокапсули с единични или двойно балансирани стени (напр. както е описано в US 5,227,298, изводите от който са включени тук чрез цитат). Други конвенционални капсули включват балансирани полилизинови микрокапсули, химически кръстосано-свързани, балансирани микрокапсули и капсули, образувани от други биосъвместими полимери, формирани в структурно здраво, имуноизолирано устройство във всякаква желана форма и големина (вж. напр. Jaink et al. (1996), 61 Transplantation 4 изводите от който са включени тук като цитат).

В следващи изпълнения толериращ агент като костен мозък или клетки от костен мозък също се имплантират в реципиента. Всяка толерираща тъкан или клетъчен вид могат да бъдат използвани като толериращ агент, включително панкреатични стволни клетки както и костномозъчни клетки. Толерогенните клетки са МНС-съвместими с инсулин-продуциращата тъкан и предпочитателно са получени от донор, който предоставя инсулин-продуцираща тъкан или са сингенни на нея. Добре известни са подходящи способности за изготвяне на костен мозък или клетъчни популации от него (вж., напр. Sharp et al. (1984), 69 J. Immunol. Meth. 187-195, Fontes et al. (1995) in Methods in Celi Transplantation. Ricordi. ed., R. G. Landes Co., pub., pp.619-628). Предпочитано, костният мозък се обработва, както се използва Ceprate[®] SCStem Cell Concentration System (CellPro, Inc., Bothell, WA; вж. CellPro Investigator Brochure, rev. 06.01.97), или негов еквивалент, за да се осигури произхождаща от костен мозък клетъчна популация обогатена на CD34(+) хематопоеични клетки. Стандартно сортиране на флуоресцентно-активирани клетки (FACS) анализ или имунофлуоресцентно оцветяване разкриват, че тази популация от CD34(+) клетки е по същество свободна от CD40(+) клетки, обаче известно слабо оцветя-

ване за CD40 може да се наблюдава. Тъй като CD34(+) клетъчната популация е динамична стволово-клетъчна популация, счита се, че наличието на ниско ниво CD40(+) клетки съответствува на честотата, с която стволовите клетки започват диференцировка като един В-клетъчен клон. Наистина, предварителни FACS проучвания са установили, че единствените CD40(+) клетки (които представят типично не повече от 0.7% от общия брой) в CD34(+) стволната клетъчна популация също са CD19(+). CD19 е най-ранният известен понастоящем В-клетъчен маркер за родословие. Съответно, за да се осигури една истинска стволово-клетъчна популация като толериращ агент, CD34(+) клетките могат след това да са изпразнени от CD40(+) клетки чрез конвенционални негативни селекционни способности (напр. селективна цитоллиза, клетъчно сортиране, panning ? или подобни).

Примерни блокатори на CD40:CD154 свързването

Терапевтични съединения приложими в практиката на изобретението включват всяко съединение, което блокира взаимодействието на CD40 от клетъчната повърхност (напр. върху В-клетки) с експресирани CD40L (CD 154), напр. по повърхността на активирани Т-клетки. Анти-CD40L (анти-CD154) анти тяло или анти- тяло производно е: едно анти-CD40L (анти-CD154) моноклонално анти тяло; едно хуманизирано анти-CD40L (анти-CD154) анти тяло; едно моноклонално анти тяло, което има антиген-специфичните свързващи характеристики на 5с8 анти тялото, произведено от ATCC Ключов No. HB 10916; моноклонално анти тяло 5с8 анти тяло, произведено от ATCC Ключов No. HB 10916; или едно анти-CD40L (анти-CD40L) анти тяло производно както е описано в US 5,474,771, което откритие е включено тук чрез цитат. В едно понастоящем силно предпочитано изпълнение, анти тялото е хуманизирано 5с8. Други известни анти телата срещу CD 154 включват анти телата ImxM90, ImxM91 и ImxM92 (получени от Immunex), едно анти-CD40L mAb, търговски достъпно от Ancell (клон 24-31, catalog#353-020, Bayport, MN), и анти-CD40L mAb, търговски достъпно от Genzyme (Cambridge, MA, catalog# 80-3703-01). Също търговски достъпно е анти-CD40L mAb от

PharMingen (San Diego, catalog# 33580D). Многобройни допълнителни анти-CD40L антители са получени и характеризирани (вж. напр. WO 1996/023071 of Bristol-Myers Squibb, спецификацията, на която е включена тук чрез цитат). Изобретението включва също приложение на анти-CD40L (анти-CD154) антители или антители производно, което е едно анти-CD40L (анти-CD154) моноклонално антители; едно хуманизирано анти-CD40L (анти-CD154) антители; едно моноклонално антители притежаващо антиген-специфичните свързващи характеристики на 5с8 антителя, произведено от ATCC ключов No. HB 10916; моноклонално антители 5с8 антители, произведено от ATCC ключов No. HB 10916; или едно анти-CD40L (анти-CD154) антители производно, избрано от: Fab фрагменти, F(ab')₂ фрагменти, V_H области, и еднотелни антители (вж. напр. WO 1996/023071), (в Hollenbaugh et al., J. Immunol. Meth. 188: 1-7, 1995, което е включено тук чрез цитат), и нискомолекулни съединения като нискомолекулни полипептидни съединения или непептидни съединения, всичките способни да блокират или прекъсват CD40:CD154 свързването. Процедурите за планиране, скриниране и оптимизиране на малки молекули са предоставени в PCT/US1996/010664, представена на 21 юни 1996, спецификацията на която е включена тук чрез цитат).

Могат да бъдат получени различни форми на антителя като се използват стандартни рекомбинантни ДНК техники (Winter and Milstein, Nature 349: 293-99, 1991). Например, могат да бъдат конструирани "химерни" антители, в които антиген-свързващият домен от едно животинско антители е свързан с човешки константен домен (антители първично произхождащо от нечовешки бозайник, при което е приложена рекомбинантна ДНК технология за да замести изцяло или част от прикачените и константни области на тежката верига и/или константната област на леката верига, със съответни области от леката или тежката верига на човешки имуноглобулин) (вж. напр. Cabilly et al., United States Pat. No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55, 1984). Химерни антители редуцират имунните отговори предизвикани от животински антители, когато са използвани за терапия или профилактика при човека.

В допълнение, могат да бъдат синтезирани рекомбинантни "хуманизирани" антители. Хуманизирани антители са антители, произхождащи начално от нечовешки бозайник, при които е използвана рекомбинантна ДНК технология, за да замести някои или всички аминокиселини, които не се изискват за антигенното свързване, с аминокиселини от съответни области на леката или тежката верига на човешки имуноглобулин. Те са химери, включващи предимно човешки имуноглобулинови последователности, в които са въведени чрез инсерция области отговарящи за специфично антигенно свързване (вж., напр. PCT patent application WO 1994/004679). Животни са имунизирани със желан антиген, съответните антители са изолирани и е отстранена част от последователностите на променливата област отговорна за специфично антигенно свързване. След това произхождащите от животни антиген-свързващи области са клонирани в подходящи позиции на човешки антители гени, в които са премахнати антиген-свързващите области. Хуманизирани антители минимализират приложението на хетероложни (междувидови) последователности в антителя за използване при човешки терапии и по-малко е възможно предизвикването на нежелани имунни отговори. Приматизирани антители могат да бъдат получени по подобен начин.

Друго изпълнение на изобретението включва използването на човешки антители, които могат да бъдат получени у животни, като трансгенни животни, съдържащи един или повече имуноглобулинови трансгени. Такива животни могат да бъдат използвани като източник на спленоцити за продуциране на хибриди, както е описано в US 5,569,825.

Антители фрагменти и моновалентни антители могат да бъдат използвани в приложението на това изобретение. Моновалентни антители включват един тежка верига/лека верига димер, свързан с Fc (или стволната) област на една втора тежка верига. "Fab областта" се отнася до тези части на веригите, които са грубо еквивалентни, или аналогични на последователностите, които съдържат части от Y клона на тежката верига и за леката верига в нейната цялост и за които колективно (в агрегати) е показано, че проявяват антители активност.

Един Fab белтък включва агрегати от една тежка и една лека верига (обикновено известни като Fab'), както и тетрамери, съответстващи на двата сегмента на клона на антитяло Y (обикновено известно като F(ab)₂). В зависимост от това доколко някои от горните са ковалентно или нековалентно агрегирани, дотолкова агрегацията е способна на селективно реагиране със определен антиген или антигенна фамилия.

В допълнение, стандартни рекомбинантни ДНК техники могат да бъдат прилагани за да променят свързващите активности на рекомбинантни антитела с техните антигени, като се променят аминокиселинните остатъци в близост до антиген свързващите места. Антиген-свързващата активност на хуманизирано антитяло може да бъде повишена чрез мутагенеза на базата на молекулно моделиране (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:10029-33; PCT patent application WO 1994/004679). Би било желателно да се повиши или намали афинитета на антителата срещу CD40L, в зависимост от типа на прицелната тъкан или специалната схема на третиране, която е предвидена. Това може да бъде направено като се използва фагов дисплей (phage display technology) (вж. напр. Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12:433-455, 1994; и Schier et al., J. Mol. Biol. 255:28-43, 1996, които тук са включени чрез цитат). Например, би било благоприятно да се лекува пациент с постоянни нива на антитела с редуциран афинитет срещу CD40L за семипрофилактично лечение. Подобно на това, антитела с повишен афинитет срещу CD40L могат да бъдат подходящи за краткотрайни третираня.

Начини на въвеждане

Блокаторите на CD40:CD154 свързването, включително CD 154 блокиращи агенти, прилагани в изобретението, могат да бъдат въведени по всякакъв медицински приемлив начин. В зависимост от специфичните условия, може да бъде желателно локално или системно въвеждане. Предпочитано, агентът се въвежда парентерално, като интравенозно, интраартериално, подкожно, интрамускулно, интраорбитално, интравентрикулно, интраперитонеално, субскапуларно, интракраниално, интраспинално или интраназално инжектиране, инфузия или инхалация. Агентът може също да бъде введен чрез имплантация на една инфузионна помпа или на биосъвместим или би-

оразрушаващ се, поддържащ освобождаването имплант в реципиента, преди или след имплантацията на донорна тъкан. Алтернативно, някои съединения на изобретението, или негови препарати, могат да бъдат подходящи за орално или ентéralно въвеждане. Други съединения на изобретението могат да бъдат подходящи за топично приложение.

В други изпълнения, блокаторът на CD40:CD154 свързването се предоставя индиректно на реципиента, чрез въвеждане на вектор или друг експресируем материал кодиращ блокатора. Генетичният материал се интернализира и експресира в клетки или тъкани на реципиента, при което продуцира блокатора *in situ*. Например, един подходящ конструкт от нуклеинова киселина може да включва последователност кодираща една или повече от MAб 5с8 имуноглобулиновите (Ig) вериги, както е представено в US 5,474, 771. Други подходящи конструкти могат да включват последователности, кодиращи химерни или хума низи рани версии на MAб 5с8 Ig вериги или негови антиген-свързващи фрагменти. Други подходящи конструкти могат да съдържат последователности кодиращи част или цели други CD154-специфични MAbs. Конструктът се предоставя системно или локално, напр. на място в съседство с мястото на имплантация на инсулин-експресираща тъкан.

Алтернативно, векторът или друг генетичен материал, кодиращ блокатора, се интернализира в подходяща популация от изолирани клетки, за да се получат блокатор-продуциращи клетки-приемници. След това тези клетки-приемници се имплантират или въвеждат у пациента, локално или системно, за да се осигури *in situ* продукция на блокатор на CD40:CD154 свързването. Подходящи клетки-приемници включват култивирани клетки, като обезсмъртени клетки, както и клетки, получени от реципиента (напр. периферна кръв, клетки от лимфен възел, както и естествени клетки убийци (NK)).

Общо, съединения на изобретението са въведени на реципиента. Обаче, съединенията могат също да бъдат въведени на донора, или на донорната тъкан. Например, едно съединение на изобретението може да бъде включено в перфузионна или предпазваща течност, в която

донорната тъкан се съхранява или транспортира преди интегрирането ѝ в реципиента.

Лекарствени форми

Общо, съединението(та), използвани в практиката на изобретението са суспендирани, разтворени или диспергирани във фармацевтично приемлив носител или ексципиент. Получената лекарствена комбинация не повлиява вредно хомеостазата на реципиента, по-специално електролитния баланс. Така, един приемлив носител включва нормален физиологичен разтвор (0.15 M NaCl, pH 7.0 до 7.4). Други приемливи носители известни в тази област са описани, например в Remington's Pharmaceutical Sciences. Gennaro. ed. Mack Publishing Co., 1990. Приемливи носители могат да включват биосъвместими, инертни или биоабсорбируеми соли, буферизиращи агенти, олиго- или полизахариди, полимери, подобряващи вискозитетата агенти, косерванти и подобни.

Всеки блокатор на CD40:CD154 свързването, като CD154 блокиращ агент, който се използва в практиката на изобретението е комбиниран така, че да осигурява фармацевтично ефективно или терапевтично активно количество или доза, което е количеството достатъчно да продуцира откриваем, за предпочитане медицински подобряващ ефект върху реципиента. Медицински подобряващите ефекти могат да включват предотвратяване, забавяне или отслабване нарушението на, или забележимо подобрене на медицинското състояние на реципиента. Като един пример, бъбречна функция и жизнеспособност на бъбречен алографт или ксенографт могат да бъдат контролирани чрез рутинно измерване концентрациите на уреинния азот в кръвта или на креатинин, или обема, или солевото съдържание в урината, или нивото на клирънса на съответни разтворени вещества от кръвта в урината. Подобно на това, глюкорегулаторната функция и жизнеспособността на инсулин-продуциращия алографт или ксенографт могат да бъдат контролирани рутинно чрез измерване концентрациите на глюкозата в кръвта и урината, глюкозните метаболити или инсулин, или чрез измерване инсулиновия отговор на глюкозно обременяване, напр. в един конвенционален тест за глюкозен толеранс. Така, ефективното количество на лечебно съединение на изобретението, като един CD154 блокиращ

агент, е всяко количество, което забележимо намалява зависимостта от инсулин заместваща терапия у реципиента. Оптимално ефективно количество е това, което значително освобождава реципиента от зависимостта от екзогенен инсулин. По-специално, ефективно количество е това, което индуцира частично или значително пълно прихващане присадката (приемане и функция) на донорна инсулин-предуцираща тъкан.

Дозировки и честота на третиране

Количеството и честотата на дозировката за всяко отделно съединение, използвано в практиката на изобретението е в обсега на опита и клиничната преценка на специалистите по тъканна трансплантация, като хирурзи извършващи трансплантации. Общата дозировка и начин на въвеждане са определени с преклинични и клинични изпитвания, които включват обширни рутинни изследвания за определяне ефективни, напр. оптимални параметри за въвеждане на желано съединение. Дори след като са направени такива препоръки, практикуващият лекар често може да варира тези дозировки за различни реципиенти, на базата на различни съображения, като възраст на реципиента, медицински статус, тегло, пол, и паралелно лечение с други медикаменти. Определянето ефективната дозировка и начина на въвеждане за всеки един блокатор на CD40:CD154 свързването, използван да инхибира отхвърлянето на присадката, е рутинна работа за специалиста в областта на фармацевтичната и медицинската практика. Количеството на дозировката и времето за приложение трябва да бъдат достатъчни за да предизвикат клинична проява на подобрене по един или повече показатели в статуса на реципиента. Примерен курс и начини на дозировка са представени в основни доказателствени изследвания включени тук. По същество, изобретението включва въвеждане на блокатор на CD40:CD154 свързването (илилстриран с едно хуманизирано MAб 5с8, hu5с8) по приемно-индуциращ режим, последван ако е уместно от един приемно-поддържащ режим.

За илюстриране съображенията при дозировката на едно анти-CD40L съединение, са дадени следните примери за стратегии при въвеждане на едно анти-CD40L MAб. Количествата на дозировката лесно могат да бъдат уточнени

за други типове анти-CD40L съединения. Общо, предвидени са единични дозировки от около 0.05 и около 60 mg/kg телесно тегло на пациента, с най-чести дозировки в обсега на 1-20 mg/kg. За остро третиране, като такова преди или по време на трансплантация, или в отговор на някакви данни за начало на отхвърляне на присадката, ефективната доза от антитела е в границите от около 1 mg/kg телесно тегло до около 20 mg/kg телесно тегло, въвеждани ежедневно за период от около 1 - до 5 дни, за предпочитане чрез болус венозно въвеждане. Същите дози и схема на дозировка могат да бъдат използвани във фазата на натоварване при един натоварено-поддържащ режим, в поддържащата фаза, включваща интравенозно или интрамускулно въвеждане на антитела в границите от около 0.1 mg/kg телесно тегло до около 20 mg/kg телесно тегло, за период на третиране с всякакви интервали - от седмични до 3-месечни. Може да бъде също проведено хронично третиране при даден поддържащ режим, при който антителата са въвеждани интравенозно или интрамускулно, в обхвата около 0.1 mg/kg телесно тегло до около 20 mg/kg телесно тегло, с интервали между дозировката от около 1 до около 3 месеца. В допълнение, хроничното третиране може да бъде изпълнено при един периодичен болус интравенозен режим, при който се въвеждат между 1.0mg/kg телесно тегло и около 100 mg/kg телесно тегло антитела, с интервал между последващите третираня от 1 до 6 месеца. За всички, с изключение на периодичния болус режим, въвеждането може да бъде орално, белодробно, назално или подкожно.

По желание ефективността на антителата може да бъде повишена чрез серийно въвеждане или в комбинация с конвенционални антиотхвърлящи терапевтични агенти или лекарства, като например, кортикостероиди или имунодепресанти. Алтернативно, антителата могат да бъдат конюгирани с един конвенционален агент. Това благоприятства въвеждането на конвенционалния агент в количество по-малко от конвенционалната дозировка, например, по-малко от около 50% от конвенционалната дозировка, когато агентът се въвежда като монотерапия. Съответно, трябва да бъде избягвана появата на много странични ефекти, свързани с този агент.

Съгласно това изобретение, комбинирани терапии за лечение отхвърлянето на присадката

включват приложението на анти-CD40L антитела заедно с агенти прицелни за В-клетки, като анти-CD19, анти-CD28 или анти-CD20 антители (неконюгирано или радиоактивно белязано), IL-14 антагонисти, LJP394 (LaJolla Pharmaceuticals receptor blocker), IR-1116 (Takeda small molecule) и анти-Ig идиотипни моноклонални антитела. Алтернативно, комбинациите могат да включват Т-клетъчни/В-клетъчни прицелни агенти, като CTLA4lg, IL-2 антагонисти, IL-4 антагонисти, IL-6 антагонисти, анти-CD80/CD86 моноклонални антитела, TNF, LFA1/ICAM антагонисти, VLA4/VCAM антагонисти, brequinar и IL-2 токсин конюгати (напр. DAB), преднизон, анти-CD3 MAб (ОКТ3), микофенолат мофетил (MMF), циклофосфамид и други имунодепресанти като калцинеурин сигнални блокери, включително без ограничение, tacrolimus (FK506). Комбинации могат също да включват Т-клетъчни прицелни агенти, като CD4 антагонисти, CD2 антагонисти и IL-12.

За подържане интегрирането на присадката или в период след супресия на остър период на отхвърляне на присадката, поддържащата доза анти-CD40L антитела, се въвежда самостоятелно или в комбинация с конвенционален анти-отхвърлящ агент, ако е необходимо. След това, дозировката или честотата на въвеждане, или и двете могат да бъдат намалени. Там където не се откриват признаци на отхвърляне на присадката, лечението може да се прекъсне, при внимателно контролиране за признаци на отхвърляне на транспланта. В други случаи, които могат да бъдат определени от практикуващия специалист, може да бъде приложено според случая нередовно третиране, например на интервали от 4 седмици или повече. Раципиентите могат обаче да се нуждаят от периодично продължително лечение, поради поява на някакви болестни симптоми.

Преклинични моделни системи за оценка режимите на CD40:CD154 блокиращото лечение

Предпочитани, примерни моделни системи за тестиране ефикасността на едно CD40:CD154 блокиращо съединение (напр. анти-CD40L съединение или CD154 блокиращ агент, като едно MAб притежаващо специфичната на MAб 5c8) са приматните (baboon и/или

rhesus маймуна) островни алогографтни модели, представени в предишна родствена заявка U.S. Provisional S.N. 60/050,267 (06/20/97) изводите, от която са включени тук чрез цитат. Такива приматни модели е показано, че са прецизни модели за имунна манипулация: те са изключително чувствителни за най-малки промени в алогографтната функция или странични ефекти при заздравяване раната на реципиента и функцията на имунната система. В допълнение, моделите имат видимо биологично сходство с човешката бъбречна трансплантация. Поспециално, гените, кодиращи МНС-белтъци са добре консервирани между човешки индивиди и примати, използвани като база за тези модели и отхвърлянето от приматите на васкуларизирани органи тясно съответствува на тези наблюдавани в клинични условия.

Baboon модел на ICT за индуциран с панкреатектомия диабет.

Идентификация на донор-реципиент двойките. Мононуклеарни клетки от перифарна кръв (PBMC) от 10 потенциални реципиенти (Baboons, Papio hamadryas, мъжки и женски, на възраст 1-2 години, приблизително 4 kg) от Mannheim facility (Homestead, FL) са използвани като реагиращи срещу PBMC от 11 мъжки донори (на възраст над 2 години, закупени от Southwest Foundation in Texas) в еднопосочно смесена левкоцитна култура (MLC). MLC от бабуни е проведена със стандартни методи за човешки MLC. Поради ниския фон и високата специфична реактивност, използването на среда допълнена с човешки серум дава по-добри резултати, в сравнение със среда включваща серум от бабун или фетален телешки серум. Донорите са достатъчно големи, така че да се получат достатъчно острови и костен мозък от един донор за да може да се трансплантират на два реципиента. За разлика от умерените MLC отговори наблюдавани когато PBMC на животни от Mannheim са използвани като MLC реагиращи и стимулатори, MLC реактивността между тези животни е превъзходна, като всички потенциални реципиенти показват стимулационни показатели (S.I.) от > 10.0 срещу стимулаторите (донори, фон $< 200-300$ импулса на минута, cpm). Направен е опит за подбор на двама реципиенти с подобна MLC реактивност към определения донор и са избрани донор-реципиент

двойки с променливи степени на алореактивност. MLC S.I. от > 10 е разглеждана като много реактивна и е приета като минимално допустимо несъответствие; за сравнение, когато са използвани животни от Mannheim като донори и реципиенти, MLC S.I. обикновено са били по-малки от 5.

Островно/костно-мозъчен препарат и въвеждане. Острови от панкреаса са отделяни един ден преди ICT (т. е. на -1 ден от изследването) с малки модификации на автоматизирания метод за изолиране на човешки острови (Ricordi et al., Diabetes 37-413420, 1988; Selvaggi et al., Transplant. Proc. 29:1967-1968, 1997) като е използвана Liberase^R (0.47 mg/ml разтвор на колагеназа, получен от Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). Времето на студена исхемия на панкреасите беше около 0.5 ± 0.1 h. Островите са обогатявани в трислоен прекъснат Euroficoll градиент (1.108, 1.096, 1.037), в който хидролизираната панкреатична тъкан е нанасяна на дъното с 1.108 слоя. Използван е клетъчен сепаратор (COBE 299 1, COBE, Lakewood, CO) за центрофугиране на градиентите (Robertson, Chadwick, Contractor, James, London. Acta Diabetologica 30: 93-98, 1993). Броят, обемът и чистотата на получените острови са определяни както следва: крайният препарат от острови е суспендиран в 250 ml RPMI 1640 разтвор, три проби от 100 l са оцветявани с дитизон (Latif et al., Transplantation 45: 827-830, 1988) и са изброявани за определяне общия добив от острови, и данните са превръщани математически за определяне общия брой острови със среден диаметър от 150 μ m (островен еквивалент; IEQ) (Ricordi et al., Acta Diabetol. Lat. 27:185-195, 1990).

За проучвания върху повишение на толеранса, е взимано тяло на прешлен от донора на панкреас и е обработвано за получаване на донорни костномозъчни клетки (DBMC), основно по рутинни модификации на методи за обработване на човешки тела от прешлени. За реципиенти на донорен костен мозък, са въвеждани инфузии на 5-ия ден и II пост ICT. Давана е обща доза от 10^9 ядрени клетки на kg телесно тегло на реципиента.

Обездвижване на животни. За химично обездвижване, е инжектиран кетамин хидрохлорид в глутеалния мускул (10 mg/kg телесно

тегло). Удължаване на седирането е постигнато чрез въвеждане на кетамин хидрохлорид, i.m. в доза 5 mg/kg. Допълнително кетамин е даван когато животното отговаря на стимул от опипване на пръста. Тъй като в предишни изследвания е показано, че кетамин редуцира първата фаза на инсулиновия отговор на глюкоза (FPIR), кетаминовата доза е поддържана възможно най-ниска при всички метаболитни тестирания (Lehmann et al., J. Med. Primatol. 26: 312-321, 1997). Общата доза кетамин за поддържане на задоволително седиране за период от 30 min е 35 + 2 mg/kg. Животните са физически обездвижени докато са седиращи с кетамин. Места за хирургично и съдово проникване са подготвяни като са използвани betadine и alcohol alternating scrubs. Indwelling катетри са поставяни интравенозно и са фиксирани.

Панкреатектомия и ICT. В деня на ICT (0 ден от изследването), островният препарат е центрофугиран, утайката е ресуспендирана и е добавян CMRL 1066, последвано от култивиране на 22°C за една нощ. Преди трансплантация, препаратът е центрофугиран и утайката е ресуспендирана в 20 ml RPMI 1640 разтвор съдържащ 2,5% донорен серум и 200 IU хепарин. Броят на IEQ е определян непосредствено преди трансплантацията. Тотална панкреатектомия е извършвана съгласно установените хирургични техники. След завършване на тоталната панкреатектомия, е въвеждана канюла с размер 20G в един от мезентериалните съдове вливащи се в порталната вена и ICT е осъществявана чрез гравитационна инфузия на островния препарат за период от около 10 min.

Иминосупресия и постоперативни грижи. FK506 (Tacrolimus) е избран като имунодепресант, тъй като този препарат се използва понастоящем при човешката ICT. Въвеждането на FK506 започва на 5-ия ден преди ICT. На реципиенти бабуни е въведена дозировка от 0.1 mg/kg/дневно, i.m. Нивата на препарата са контролирани ежедневно и дозировката е нагласявана да поддържа нива от около 15 ng/ml. Хуманизирано анти-CD154, (производно на MAб 5c8, Lederman et al., J. Exp. Med. 175: 1091-1101, 1992) е въведено i.v. на 1, 3 и 10-ия ден от изследването при дозировка 10 или 20 mg/kg, и серумните нива на 5c8 и анти-5c8 са определяни с ELISA.

За първия постоперативен ден (1-ви ден от

изследването или POD 1) на бабуните са давани интравенозно течности. Впоследствие животните са хранени с диета съдържаща 60 g въглехидрати дневно, с 45 g бисквити за маймуни (с добавка виоказа) и 15 g плод. Въз основа на опита с първите две животни третирани с анти-CD154, следващите бабуни са третирани с малки дози инсулин подкожно (приблизително 0.5 U/kg телесно тегло дневно), за един период от 14-20 дни след островна трансплантация, за да се избегне "изтощение" на островите, като по този начин се оптимизират условията необходими за успешна трансплантация.

Мониториране. Кръвна глюкоза на гладно и след обяд (FG и PPG, респективно) са контролирани след убождане на пръста и тестване на кръвта с Glucometer Elite, и най-малко един път седмично е взимана кръвна проба за получаване на плазма за тестване на FG нивата с Beckman glucose analyzer. Обикновено кръвна проба е взимана също за да се потвърдят необичайно високи стойности. Кръвни проби са взимани от всички животни при анти-CD154 изследването преди всяка доза от MAб (преди -1 ден и непосредствено преди въвеждане на анти тяло на 3-ия и 10-ия ден) и след това един път седмично. На около 3 месеца след трансплантацията, тестването е ограничавано до всяка втора седмица. Кръвните проби са използвани за фенотипизиране на периферна кръв за определяне на левкоцитни подгрупи и отчитане на CBC и химични показатели, 5c8 и анти-5c8 нива, инсулинови и С-пептидни нива и химеризъм. Кръв е взимана периодично за повторно тестване на MLC реактивност спрямо донор и трета група антигени.

Определения. Плазменият инсулин е анализиран

Inc., St. Charles, MO) Долната граница на определението е 20 pmol/l и средният вътретестов коефициент на вариацията е 6%. С-пептид е определян в плазма с долна граница на откриване 6% и вътретестов коефициент на вариацията 6%. Плазмената глюкоза е определяна с глюкозен анализатор (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Глюкозните нива в капилярна кръв са определяни с Elite Glucometer (Bayer, Elkhart, IN). Достоверността на инсулиновото определяне при бабуни е демонстрирана с паралелизъм на инсулиновите концентрации в разреждания от

серум и инсулинова стандартна крива. Глюкагон е определен като е използван двоен антиглюкоза тест (DPC, Los Angeles, CA). Тези търговски китове предварително са валидирани със серийни разреджания (Goodner et al., Diabetes 38:9925-931, 1989).

Тестиране на интравенозен глюкозен толеранс (IVGTT). Предварително е показано, че *in vivo* тестове за функцията на островни клетки отразяват точно промените в масата на бета клетките. (McCulloch et al., Diabetes 40:673-679, 1991). Тестовите за интравенозен глюкозен толеранс са проведени след 16 до 18-часов ношен глад, както е описано по-рано (Lehmann et al., J. Med. Primatol. 26: 312-321, 1997). Накратко, взимани са кръвни проби на -10, -5 и 0 min. След това е инжектирана глюкоза 0.5 g на kg телесно тегло като 50% глюкозен разтвор в продължение на 20 s във v. saphena. Взимани са проби от 1.5 ml от контралатералната феморална артерия на 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 min след инжектирането. Взимани са общо 12 кръвни проби за период от 40 min. Пробите са събирани в стъклени епруветки, съдържащи 0.05 ml 15% EDTA и 0.2 ml trasylol (500 K.I.U. аprotinin/ml кръв), поставяни са върху лед и са центрофугирани за 10 min. След това плазмата е замразявана при -80°C и по-късно е тестирана за глюкоза, имунореактивен инсулин и глюкагон.

Статистически анализ и изчисления. Резултатите са представени като средни + SEM. Константата за глюкозно изчезване (Kg) е изчислявана от IVGTT като наклон на намалението на кривата $\log_e$ (In) плазмена глюкоза между 10 и 30 min след глюкозна инжекция, умножен по 100. Острият инсулинов отговор спрямо глюкоза (AIRG) е изчислен като нарастване площта под инсулиновата крива (AUC) между 1-10 min след *i.v.* глюкозна инжекция. Увеличените отговори (AUCGlucose, AUCInsulin) са изчислявани с помощта на трапецоидното правило като са изваждани базовите стойности от 1 до 30 min. Данните са анализирани с програмата "Статистика" за Windows (Version 5.0. 1997. Statsoft. Inc. Tulsa. OK. USA).

Резултати.

CD154 блокадната терапия удължава преживяването и функцията на островни алографти. Всички бабуни стават нормогликемични веднага след трансплантацията. Както е

показано на Таблица 1, ICT от алогенни острови, в отсъствие на имunosупресивна или CD154 блокадна терапия, води до отхвърляне на 8-ия ден. Конвенционална имunosупресия с FK506 (самостоятелно или в комбинация с цял костен мозък или подбрани стволови клетки от костен мозък) не успява да подобри преживяването на островите у животни, отхвърлящи на 10, 8 и 10 ден съответно. В рязък контраст, третирането на 4 от 5 бабуни с анти-CD154 (5C8) MAb води до удължено преживяване на островния алографт, над това на контролните или третирани с FK506 животни. Резултатите от това проучване са представени също във вид на линейна графика на фигура 1, която представя кръвната глюкоза при гладуване (FG) като функция от POD. Представените резултати демонстрират за пръв път, че CD154 блокадна терапия удължава приемането на островни алографти у нечовешки приматен модел на индуциран с панкреатектомия диабет. Значимо, тези резултати демонстрират също способността на анти-CD154 терапия да прави обратимо остро отхвърляне.

CD154 блокадна терапия може да бъде приложена свързано с пренос на костно-мозъчни клетки. Три бабуни са получили забавени инфузии на цял костен мозък (n=2) или на подбрани стволови клетки от костен мозък (подбрани върху Ceprate^R колона, CellPro, Bothell, WA) (n=1) на PODs 5 и 11. На тези бабуни е прилагана 5C8 индукционна терапия (20 mg/kg на ден - 1, 3 и 10) и след това са поставяни на едномесечна поддържаща терапия, като се започва от POD 28. Друго животно, проявило отхвърляне на POD 112, е третирано за отхвърлянето и е поддържано до POD 162. Трето животно е третирано за отхвърляне на 70-ия ден и е поддържано до POD 124.

Ефект на CD154 блокадна терапия върху функцията на присадката, включително контрол на глюкозния метаболизъм. Повтарящи се IVGTTs у контролни животни показват отлична репродукцируемост на първата фаза на инсулинова секреция (FPIS). По-специално, глюкозен толеранс тест (IPGTT) и имунохистохимията проведена на животни, евтаназиран на 79-ия ден, разкриват функционираща присадена тъкан в черния дроб, без остатъчна инсулинова продукция от екстрахепатални места. При други жи-

вотни от изследването е установено, че имат функциониращи островни алогرافти, с преживяване на присадката между > 125 и >220 дни. Повторни IVGTTs 4 до 16 седмици след панкреатектомията и островната трансплантация показват почти идентични Kg стойности у всички животни, до 8 постоперативни седмици. Kg стойностите намаляват след това при бабуни третиран с hu5c8 по време на отхвърлянето. Стабилни стойности са наблюдавани при бабуни, третиран с поддържащи дози от hu5c8. Островната маса, както е определено с FPIS, намалява с всеки епизод на отхвърляне. За разлика от това, FIPS (проследена 16 седмици) след островна трансплантация при животни на hu5c8 поддържаща терапия е добре запазена. Изследвани са също две контролни животни. При някои от IVGTT, технически проблеми подтикват към въвеждане на повече кетамин отколкото в предишното изследване, което води до редуцирана Kg стойност и FPIR. Обаче, при проследяване със стандартната доза кетамин, тези показатели бяха върнати към нормалните.

По време на настоящите проучвания, беше установено, че отхвърлянето на присадката може да бъде открито преди повишението на FG чрез определяне на 2-часов PPG. Отхвърлянето на островна присадка е определяно след два последователни FGs по-високи от 250 mg/dl.

Понастоящем е открито, обаче, че две последователни 2-часови PPG по-високи от 150 mg/dl предоставят един чувствителен тест за ранните стадии на отхвърляне на присадката.

- 5 Приложението на анти-отхвърляща терапия, с CD154 блокатор или с конвенционален агент против отхвърляне, може да бъде започнато достатъчно рано в процеса на отхвърляне, за да позволи спасяването на метаболитно жизнена тъкан на присадката. За спасяване на отхвърлени присадки с hu5c8, е повторена същата схема на дозировка прилагана за индуциране приемане на присадката.

Заклучения от проучвания върху бабуни.

- 15 Горните изследвания демонстрират, че hu5c8 улеснява островната присадка, позволява продължително преживяване на алогенни острови и няма нежелан ефект върху инсулиновата секреция или общо върху инсулиновата чувствителност. По-нататък, тези проучвания установяват за пръв път, че трансплантът може да бъде поддържан, и че е възможна обрати мост на епизодите на отхвърляне на островите у големи животни, с CD154 блокадна терапия.
- 20 Описаните тук терапии могат да доведат до запазване на инсулиновата секреция и общата инсулинова чувствителност на пре-ICT нива у големи животни.

Таблица 1. Удължаване преживяването на нечовешки приматен алографт с анти-CD154

Група	N	Вид	Продължителност (в PODs) на инсулинова независимост
Контрола	1	Бабун	8
FK506	3	Бабун	8, 10, 10
Анти-CD154			
Индукция+анти-отхвърляне	5	Бабун	^a 8, ^b 59, ^c 229, ^d 264, ^e 284
Анти-CD154			
индукция+подържане 2	2	Бабун	^f 113, ^g 238
Анти-CD154			
индукция+подържане 4	4	^h Резус	ⁱ 16, >80, >94, >166

a) получило редуцирана доза 5с8

b) Животно 34R; убито на POD 79 с частична функция, претърпяло един епизод на отхвърляне на POD 58, който успешно е направен обратим

c) Животно 12R; убито на POD 302 с частична функция, претърпяло шест успешно третирани епизоди на отхвърляне, започвайки от POD 59

d) Животно 29R; убито на POD 300, напълно отхвърлена, претърпял един епизод на отхвърляне

e) Животно 14R; убито на POD 301 с частична функция, претърпяло четири успешно третирани епизоди на отхвърляне, започвайки от POD 31

f) убито на POD 130, напълно отхвърлена

g) убито на POD 253 с частична функция

h) обсъдено по-долу

i) умряло инсулин-независимо на POD 16 от частично чревно запушване.

Резус маймуни модел на ICT за индуциран с панкреатектомия диабет

Ако не е специално отбелязано, общо всички процедури са както е описано по-горе при изследвания с модели на бабуни.

Процедури с животни. SPF резус маймуни, на възраст 2-7 години, са доставени от COVANCE (Alice, TX) или the Mannheim Foundation, Inc. (Homestead, FL) или подобни доставчици. При приемането, всички маймуни са изследвани за определяне на общото им здравословно състояние, физическо състояние и психологичен статус. Всички хирургични процедури са изпълнени при асептични условия. Животните са гладували 12-18 h преди операцията и са преанестезирани с i.m. кетамин (10 mg/kg) и атропин (0.04 mg/kg). След като животното е седирано, веднага е поставена ендотрахеална тръба и i.v. канюла. Ендотрахеалната тръба е използвана за осигуряване достъпа на въздух и за осигуряване на лесен достъп при спешно въвеждане на лекарства. Животните са анестезирани с комбинация от изофлуран и кислород. Нормален физиологичен разтвор за инжектиране е въвеждан през канюла по време на цялата ICT процедура при 10 ml/kg/h.

Направен е разрез по срединната линия, за да се получи достъп до коремните органи. За

двете животни - донор и реципиент, е направена тотална панкреатектомия, като е запазен дуоденума. Изолирани са острови от донорния панкреас с конвенционални способи за последваща трансплантация у панкреатектомирани, диабетични маймуни. След обезкървяване на донора под анестезия, телата на прешлените са отстранявани през корема с помощта на Striker Saw. Костите незабавно са обработени за изваждане на костния мозък. При някои реципиенти костно-мозъчни клетки са въведени у реципиента през мозъчна вена, като е използван у-тип кръвен комплект с филтър.

След панкреатектомия на животните реципиенти, една вена, вливаща се в горната или долната мезентериална вена е катетеризирана и островите са инфузирани чрез гравитетен дренаж в черния дроб. След това хирургичните разрези са затворени съответно на конвенционалната хирургична техника. Накрая на процедурата, животното е поставяно само на кислород и ендотрахеалната тръба е отстранявана, след като животното е достатъчно възстановено за да контролира достъпа на въздух. Пост-ICT, реципиентите са поставяни в ICU клетка и са наблюдавани докато станат клинично стабилни. Постоперативно са давани антибиотици (Baytril) (5 mg/kg i.m., на 24 h в продължение на 5 дни). Бупоморфин (0.05 mg/kg i.m.) е прилаган когато е имало нужда от аналгетик.

Маймуните са поставяни на глад след операцията и им е даван gatorade p.o. на POD 1. На POD 2, те започват два пъти дневно лека диета, състояща се от банан и размекната (с вода) високо белтъчна храна за маймуни, съдържаща viokase (1 банан плюс 4 бисквити). Нормалната диета е възстановявана на POD 3 (6-8 бисквити плюс плод, с viokase, два пъти дневно). Всяко животно е хранено индивидуално, за да се избегне конкуренция по време на храненето. Болните маймуни са хранени от ръка, за да се подобри общото здравословно състояние и храненето. Критично болните животни са лекувани в изолатори докато те се почувствуват добре. Маймуните, които са в терминално състояние или не могат да бъдат третирани са убивани с бърза i.v. инжекция с калиев хлорид през интравенозна канюла.

Мониториране. Кръвните проби за контрол на глюкоза и инсулин, имуноен контрол и др.

не превишават 1% от телесното тегло по всяко време или 7% от телесното тегло за период от един месец. Нивата на кръвната глюкоза на гладно (FG) са определяни като е използвана ланцета за убождане на задния крак, за получаване на малка капка кръв, която се нанася на глюкоизмерваща лента. В някои условия, например когато глюкозата изглежда висока (>200 mg/dl), е правена венепункция за получаване проба от плазма за анализ на Beckman glucose analyzer. Кръвни проби са взимани също преди и на интервали след трансплантацията за определяне антидонорната имунореактивност на реципиента. Тестирането на интравенозни глюкозен толеранс (IVGTT) е провеждано както е описано по-горе, преди трансплантирането и на интервали от 4-6 седмици след това.

Резултати.

CD154 блокадната терапия удължава преживяването и функцията на островни алографти у диабетични резус маймуни, както и у бабуни. Както е показано на Таблица 1, настоящото проучване демонстрира, че hu5c8 монотерапията удължава приемането на островен алографт във втори нечовешки приматен вид. Това изследване използва индуциращ-приемането режим на hu5c8-въвеждане на -1, 0, 3 и 10 ден от изследването. Проследен е едномесечен режим поддържащ-приемането, за да се поддържат серумните нива на hu5c8. Резултатите, представени във Фигура 2, са учудващи: функционални островни алографти са поддържани без появата на епизоди на отхвърляне. Значението на това откритие е подчертано от сравнителни данни представени във Фигура 3, които в допълнение на проучването с резус животни, показва FG графика на човек (означен LAURA) страдащ от DM и понастоящем получаващ интензивна инсулинова заместваща терапия. LAURA е диагностицирана като DM на 14-месечна възраст, по време на изследването е 6 годишна и получава инсулинови инжекции два до три пъти дневно.

Еквиваленти

Изобретението може да бъде изпълнено в други специфични форми, без да се отдалечават от духа и неговите съществени характеристики. Гореспоменатите изпълнения трябва следователно да бъдат разглеждани във всеки случай като илюстративни, а не като ограничаващи на тук представеното изобретение. Обхватът на изобретението е показан от приложените претенции и от предшестващото описание и всички промени, които се появяват в смисъла и обхвата на еквивалентност на претенциите се предвижда да бъдат възприети.

Патентни претенции

1. Използване на анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно за получаване лекарствено средство, инхибиращо отхвърлянето на присадка от инсулин-продуцираща тъкан у примат като реципиент на присадката, където лекарственото средство е предвидено за реципиент на присадката, в количество предоставящо ефективно количество от анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно.

2. Използване на анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно за получаване лекарствено средство, което удължава преживяването на присадена инсулин-продуцираща тъкан у примат като реципиент на присадката, където лекарственото средство е предвидено за реципиент на присадката, в количество предоставящо ефективно количество от анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно.

3. Използване на анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно за получаване на лекарствено средство за обратимост при отхвърлянето на присадката, на инсулин-продуцираща тъкан у примат като реципиент на присадката, където лекарственото средство е предвидено за реципиент на присадката в количество, предоставящо ефективно количество от анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно.

4. Използване на анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло, производно за получаване на лекарствено средство за запазване функцията на присадена инсулин-продуцираща тъкан у примат като реципиент на присадката, където лекарственото средство е предвидено за реципиент на присадката в количество, предоставящо ефективно количество от анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно.

5. Използване на анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно за

получаване на лекарствено средство за възстановяване функцията на присадена инсулин-продуцираща тъкан у примат като реципиент на присадката, където лекарственото средство е предвидено за реципиент на присадката в количество, предоставящо ефективно количество от анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно.

6. Използване съгласно претенция 1,2,3,4 или 5, където анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно е:

a) едно анти-CD40L (анти-CD154) моноклонално антитяло; или

b) едно хуманизирано анти-CD40L (анти-CD154) антитяло; или

c) едно моноклонално антитяло, притежаващо антиген-специфични свързващи характеристики на 5с8 антитяло, произведено от ATCC ключов No. HB 10916;

или

d) моноклонално антитяло 5с8 произведено от ATCC ключов No. HB 10916; или

e) едно анти-CD40L (анти-CD154) антитяло производно, подбрано от: Fab фрагменти; F(ab')₂ фрагменти, V_H области на едноверижни антители.

7. Използване съгласно претенция 1,2,3,4 и 5, където инсулин-продуциращата тъкан е:

a) цяла панкреатична тъкан; или

b) изолирани панкреатични острови; или

c) популация, съдържаща изолирани зрели островни бета клетки;

d) клетъчна популация, съдържаща изолирани фетални островни бета клетки;

или

e) клетъчна популация, съдържаща култивирани островни бета клетки; или

f) клетъчна популация, съдържаща обезсмъртени островни бета клетки;

или

g) клетъчна популация, съдържаща клетки-приемници, стабилно експресиращи един инсулинов ген; или

h) клетъчна популация, съдържаща клетки-приемници, индуцируемо експресиращи един инсулинов ген.

8. Използване съгласно претенция 1, 2, 3, 4 и 5, където инсулин-продуциращата тъкан е физически отделена от тъканите на реципиента чрез имуноизолиращо устройство.

9. Използване съгласно претенция 1, 2, 3, 4 и 5, където инсулин-продуциращата тъкан е алогенна или ксеногенна на реципиента на присадката.

10. Използване съгласно претенция 1, 2, 3, 4 и 5, където реципиентът на присадката е човек.

11. Използване съгласно претенция 10, където реципиентът на присадката е страдащ от уреждане метаболитния контрол на глюкозния метаболизъм.

12. Използване съгласно претенция 10, където реципиентът на присадката страда от захарен диабет.

13. Използване на анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно за получаване на лекарствено средство за възстановяване метаболитния контрол на глюкозния метаболизъм у примат, нуждаещ се от него, където:

a) ефективно количество от инсулин-продуцираща тъкан е имплантирано у примат; и

b) ефективно количество от споменатото анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно е въведено у примат.

14. Използване съгласно претенция 13, където анти-CD40L (анти-CD154) антитялото или антитяло производното е:

a) едно анти-CD40L (анти-CD154) моноклонално антитяло; или

b) едно хуманизирано анти-CD40L (анти-CD154) антитяло; или

c) моноклонално антитяло, притежаващо антиген-специфичните свързващи характеристики на 5с8 антитяло, произведено от ATCC ключов No. HB 10916;

или

d) моноклонално антитяло 5с8 произведено от ATCC ключов No. HB 10916; или

e) едно анти-CD40L (анти-CD154) антитяло производно, подбрано от: Fab фрагменти, F(ab')₂ фрагменти, V_H области на едноверижни антители.

15. Използване съгласно претенция 14, където анти-CD40L (анти-CD154) антитяло или антитяло производно е въведено преди тъкан на имплантация.

16. Използване съгласно претенция 14, където въвеждане на анти-CD40L (анти-CD154) антитялото или антитяло производно е повтаря-

но най-малко два пъти в рамките на двуседмичен период след тъканна имплантация.

17. Използване съгласно претенция 16, където въвеждане на анти-CD40L (анти-CD154) антитялото или антитяло производно е повторено 5
най-малко един месец след тъканна имплантация.

18. Използване съгласно претенция 17, включващо още следващ допълнителен етап на повторно въвеждане на анти-CD40L(анти-CD154) антитялото или антитяло, производно на месечна база, започвайки най-малко два месеца след тъканна имплантация.

19. Използване съгласно претенция 13, където по-нататък:

с) ефективно количество от толериращ агент е имплантирано у примат.

20. Използване съгласно претенция 19, където толериращият агент е костно-мозъчна тъкан, която е МНС-съвместима с инсулин-продуциращата тъкан.

21. Използване съгласно претенция 20, където толериращият агент е:

а) костно-мозъчна тъкан, която е сингенна с инсулин-продуциращата тъкан; или

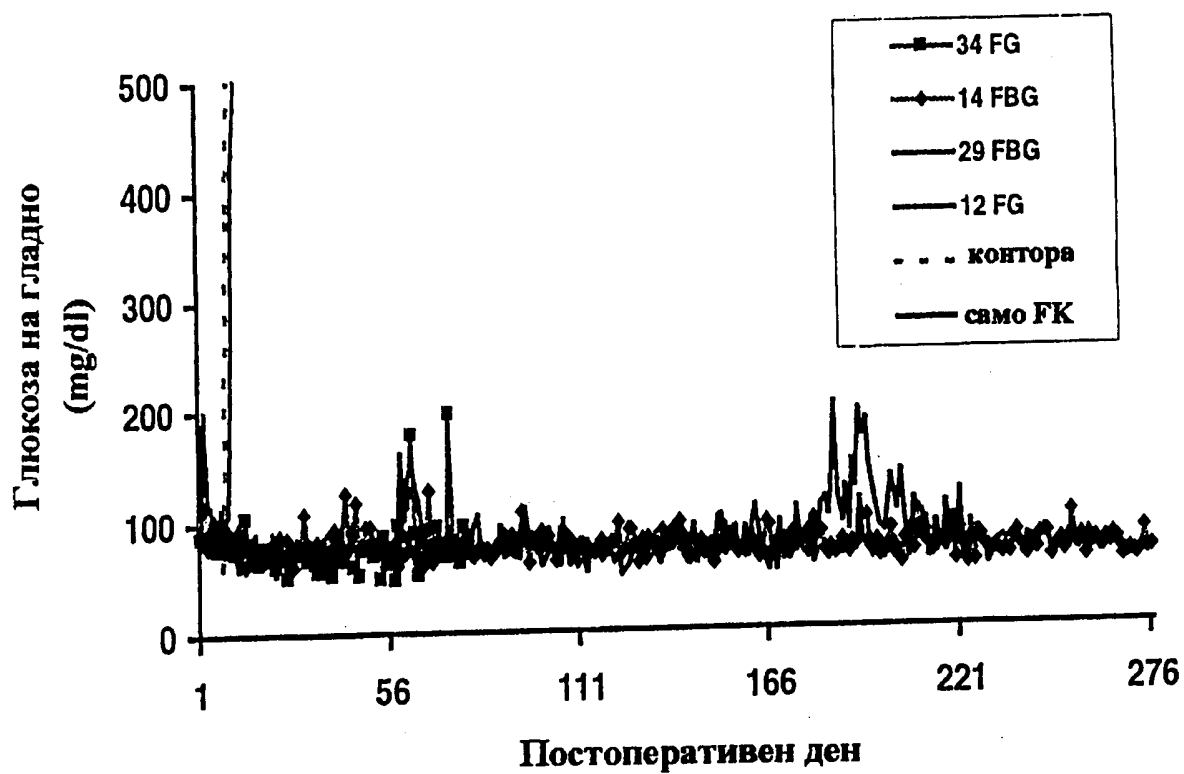
б) цял костен мозък; или

с) популация от CD34(+)хематопоеични клетки; или

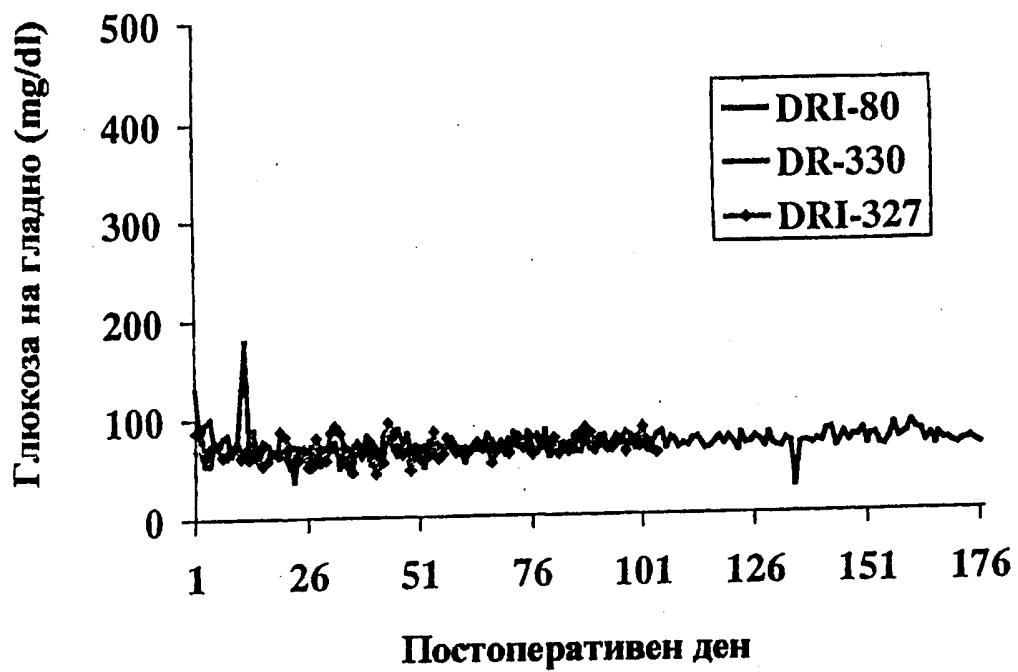
д) популация от CD34(+)хематопоеични клетки, които са CD40(-).

Приложение: 3 фигури

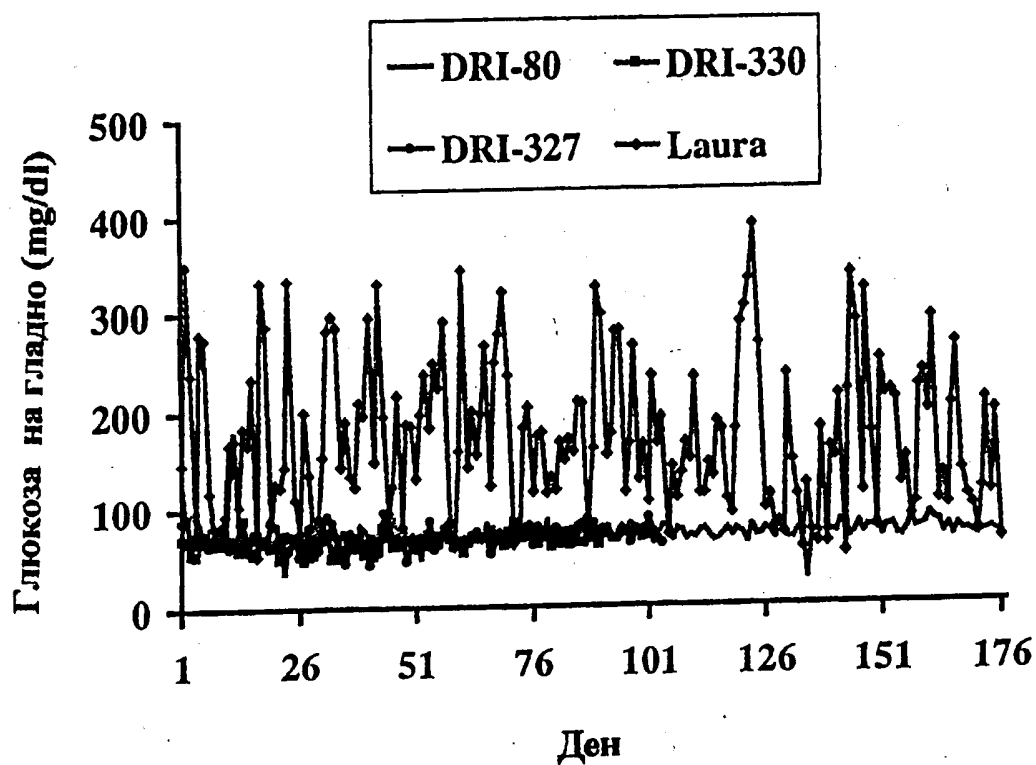
ФИГУРА 1: Удължаване преживяването на островен алографт с анти-CD40L при Baboon маймуни



ФИГУРА 2: Контрол на кръвна глюкоза при Rhesus маймуни с функциониращ островен алографт



ФИГУРА 3: Контрол на кръвна глюкоза при функциониращ островен алографт съпоставен с интензивна инсулинова терапия



Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д.Кацарова

Редактор: Р.Георгиева

Пор. № 43394

Тираж: 40 СР