



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 13 499 T3 2010.05.06

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) EP 0 892 643 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 13 499.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/04248

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 916 037.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/034633

(86) PCT-Anmeldetag: 20.03.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 25.09.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 27.01.1999

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 19.06.2002

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: 02.09.2009

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 06.05.2010

(51) Int Cl.⁸: A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

13751 P 20.03.1996 US

(73) Patentinhaber:

Bristol-Myers Squibb Co., Seattle, Wash., US;
Emory University, Atlanta, Ga., US

(74) Vertreter:

Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679
München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

LARSEN, P., Christian, Atlanta, US; ARUFFO, A.,
Alejandro, Edmonds, US; HOLLENBAUGH, L.,
Diane, Seattle, US; LINSLEY, S., Peter, Seattle, US;
LEDBETTER, A., Jeffrey, Seattle, US; PEARSON,
C., Thomas, Atlanta, US

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR INHIBIERUNG DER IMMUNREAKTION DURCH BLOCKIERUNG DER
GP39/CD40 UND CTLA4/CD28/B7 ROUTEN UND ZUSAMMENSETZUNG ZU DEREN VERWENDUNG

Beschreibung

[0001] CD28 wird von den meisten T-Zellen und Plasmazellen exprimiert (June, C. H. et al., *Immunol. Today* 11, 211–16 (1990); Damle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 5096–6001 (1981)). Der Ligand von CD28 ist 67, der auf aktivierten B-Zellen exprimiert wird (Linsley, P. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5031–35 (1990); Linsley, P. S. et al., *J. Exp. Med.* 173, 721–730 (1991)).

[0002] CD40 ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptor(TNFR)-Familie membrangebundener Signalisierrungsrezeptoren vom Typ I. Obwohl ursprünglich als ein B-Zell-Antigen entdeckt, wird CD40 von allen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), einschließlich dendritischer Zellen, Monocyten und B-Zellen exprimiert.

[0003] Der Ligand von CD40 ist gp39, welches an CD40 bindet und damit B-Zellen aktivieren kann. Gp39 ist auch als CD40L, TRAP und T-BAM bekannt. Gp39 ist ein Zelloberflächenprotein vom Typ II mit signifikanter Homologie zu TNF und wird vorübergehend durch aktivierte T-Zellen exprimiert. Neben den T-Zellen wird gp39 von Basophilen, Mastzellen und Eosinophilen exprimiert.

[0004] Die CD28- und CD40-Signalwege spielen eine wesentliche Rolle bei der Initiierung und Amplifikation von T-abhängigen Immunantworten (Bluestone, J. A. *Immunity* 2, 555–9 (1995); Banchereau J., et al., *Own. Rev. Immunol.* 12, 881–922 (1994); Durie, F. H. et al., *Science* 261, 1328–30 (1993); Foy, T. M., et al., *J. Exp. Med.* 178, 1567–75 (1993); Van den Eertwegh, A. J. M., et al., *J. Exp. Med.* 178, 1555–65 (1993)).

[0005] CD28/B7-Wechselwirkungen liefern ein kritisches "zweites Signal", das für eine bestmögliche T-Zell-Aktivierung und IL-2-Produktion erforderlich ist (Jenkins M. K. et al., *J. Immunol.* 147, 2461–6 (1991); Schwartz, R. H., *Cell* 71, 1065–8 (1992); Boussiotis, V. A., et al., *J. Exp. Med.* 178, 1753–1763 (1993)), wohingegen CD40/gp39-Signale eine Costimulierung der B-Zell-, Macrophagen-, Endothelzell- und T-Zell-Aktivierung bewirken (Grewal, I. S., et al., *Nature* 378, 617–620 (1995); van Essen, D., et al., *Nature* 378, 620–623 (1995); Hollenbaugh, D., et al., *J. Exp. Med.* 182, 33–40 (1995); Armitage, R. J., et al., *Nature* 357, 80–2 (1992); Cayabyab, M., et al., *J. Immunol.* 152, 1523–31 (1994); Noelle, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6550–6554 (1992); Alderson, M. et al., *J. Exp. Med.* 178, 669–674 (1993); Kennedy, M. K., et al., *Eur. J. Immunol.* 24, 116–23 (1994)).

[0006] Antikörper, die das Protein CD40 binden, sollen zur Hemmung des Wachstums oder der Differenzierung von B-Zellen nützlich sein (WO 94/01547). In der WO 95/06481 ist die Herstellung und Charakterisierung einer Anzahl Antikörper gegen humanes gp39 und Maus-gp39 offenbart. Ein anschauliches Beispiel ist der monoklonale Anti-Maus-gp39-Antikörper MR1, welcher bei der American Type Culture Collection unter der Hinterlegungsnummer HB 11048 hinterlegt worden ist. Dieser Antikörper und andere lösliche Moleküle, welche an das Protein gp39 binden, z. B. das CD40Ig-Fusionsprotein, sollen zur Induzierung einer Toleranz bei Knochenmarktransplantationen und anderen Organtransplantationen sowie zur Inhibierung von Transplantat-Wirt-Reaktionen geeignet sein. Gemäß der WO 95/28957 kann dieses Verfahren zur Induzierung einer T-Zell-Toleranz gegenüber Transplantaten, wie Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, Neuralgewebe, Magen und Darm, verwendet werden. Weiterhin wird ein Verfahren zur Behandlung von Diabetes vorgeschlagen.

[0007] Die WO 94/01547 schlägt auch vor, dass man Moleküle, welche an das B7-Antigen binden, zur Erzeugung einer T-Zellen-Anergie, Behandlung einer Allotransplantatabstoßung, Behandlung einer Transplantat-Wirt-Reaktion und zur Vorbeugung oder Behandlung von rheumatoider Arthritis verwendet.

[0008] In Griggs et al., *Journal of Cellular Biochemistry*, Zusatzband 0, Nr. 21, Teil A, Seite 141, Abstract Nr. C2-427 (1995) wird erwähnt, dass die Verabreichung eines Anti-gp39-Antikörpers und von CTLA4-Ig bei gemeinsamer Gabe in einem Tierversuch zu der variablen Blockierung der ZP3-spezifischen T-Zell-Aktivierung führten, was anhand der T-Zell-Proliferation und Analyse der ZP3-spezifischen T-Zellen bestimmt wurde.

[0009] Gemäß der WO 96/39514 wird das Enhancement der Genexpression beeinflusst, indem man einem Individuum lösliches CTLA4 in einer Menge verabreicht, so dass es eine Immunantwort hemmt und man dadurch eine anhaltende virale Genexpression ohne Langzeitimmunsuppression erreicht. Zudem verlängert die Kombination aus löslichem CTLA4-Molekül und Anti-CD40-Ligand (MR1) die Genexpression und ermöglicht einen sekundären Gentransfer. Ein Anti-CD40-Ligand ist jedes Molekül, welches den CD40-Ligand erkennt und bindet, z. B. ein Antikörper (monoklonaler Antikörper, polyklonaler Antikörper, chimärer Antikörper, humanisierter Antikörper oder Fragmente davon) oder ein rekombinantes Bindungsprotein, z. B. ein Fusionsprotein.

[0010] Immunantworten des Wirts verursachen häufig die Abstoßung von transplantiertem Gewebe oder Or-

ganen. Die Inhibierung solcher Immunantworten ist daher entscheidend für den Erfolg von Gewebetransplantationen. Es gab Studien, die auf das Blockieren entweder des CD28- oder CD40-Signalwegs ausgerichtet waren; das Blockieren einer dieser Wege alleine reichte jedoch nicht dafür aus, dass hoch immunogene Allotransplantate angenommen wurden (Turka, L. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11102–11105 (1992); Parker, D. C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9560–9564 (1995); Larsen, C. P. et al., Transplantation 61, 4–9 (1996)). Einzeltherapien, die entweder den CD28- oder den CD40-Signalweg blockierten, führten bestenfalls nur zu vorübergehenden und manchmal längeren Überlebensabschnitten des transplantierten Gewebes. Keine der Blockierungen alleine förderte das Transplantatüberleben in gleichförmiger Weise.

[0011] Die heftige Immunantwort auf xenogene Organtransplantate bot ein starkes Hindernis für die Anwendung dieses Verfahrens bei klinischen Transplantationen (Platt J. L., Curr. Opin. Imm. 8, 721–728 (1996)). Bei vorherigen experimentellen Versuchen, das Überleben xenogener Hauttransplantate zu verlängern, war entweder eine Bestrahlung des gesamten Körpers und anschließend eine gemischte xeno/syngene Rekonstitution (Ildstad S. T., Sachs D. H., Nature, 307: 168–170 (1984)) oder die rigorose Vorbehandlung durch Entfernen des Thymus, kombiniert mit dem Entzug von Anti-T-Zell-Antikörpern (Pierson III R. N., Winn H. J., Russell P. S., Auchincloss Jr. H., J. Exp. Med., 170: 991–996 (1989); und Sharabi Y., Aksentijevich I., Sundt III T. M., Sachs D. H., Sykes M., J. Exp. Med., 172: 195–202 (1990) erforderlich. Diese Strategien wurden kürzlich angewendet, um die Akzeptanz von Hauttransplantaten über eine diskordante xenogene Grenze zu fördern (Zhao Y., Swenson K., Sergio J., Arn J. S., Sachs D. H., Sykes M., Nat. Med., 2(11): 1211–1216 (1996)). Die potentielle Erkrankungsrate, die mit den cytoablativen Behandlungsmaßnahmen verbunden sind, stellt jedoch ein wesentliches Hindernis für die Einführung dieser Strategien in die klinische Transplantation solider Organe dar. Die Entwicklung von nicht-cytoablativen Strategien zur Verlängerung des Überlebens von Xenotransplantaten würde die klinische Anwendung dieser Verfahren stark vereinfachen.

[0012] Derzeit besteht ein Bedarf an Wegen, die Langzeittoleranz von transplantiertem Gewebe durch den Wirt zu erreichen und damit die Überlebensrate der Transplantation zu erhöhen. Um dies zu erreichen, ist es notwendig, eine ausreichende immunologische Reaktionsunfähigkeit im Empfänger des Transplantats sicherzustellen.

[0013] Es wurde gefunden, dass die Inhibierung der T-abhängigen Immunantworten, die aus einer Blockierung entweder der CD28- oder CD40-Signale erfolgt, wirksam, aber unvollständig ist. Die hierin enthaltenen Daten zeigen, dass die gleichzeitige Blockierung dieser Wege unerwarteterweise die akute und chronische Abstoßung von transplantiertem Gewebes *in vivo* hemmt. Durch die unabhängige Blockierung dieser Wege mit einem löslichen CTLA4-Molekül oder Antikörpern, welche gp39 erkennen und binden, konnte man das Überleben von primärem transplantierten Hautgewebe nicht einmal minimal verlängern.

[0014] Die vorliegende Erfindung beruht auf der Lehre, dass die gleichzeitige Blockierung der CD28- und CD40-Signale das Langzeitüberleben von vollständig allogenen sowie xenogenen Hauttransplantaten fördert. Die Verlängerung des Überlebens von Haut-Allotransplantaten wurde durch Cyclosporin A (CyA) aufgehoben, was darauf hinweist, dass es sich hier um einen aktiven Prozess handelt, der eine intakte Signalweiterleitung über den TcR/CD3-Komplex und/oder andere CyA-empfindliche Signalwege erfordert.

[0015] Ferner förderte CTLA4Ig/MR1 die Langzeitannahme von primär vaskularisiertem Herztransplantatgewebe und hemmte die Entwicklung chronischer Gefäßabstoßung.

[0016] Die hier in den zwei Transplantationsmodellen gezeigte Wirkung weist darauf hin, dass CD28 und CD40 zwar untereinander in Beziehung stehende, aber unabhängige Signalwege bereitstellen, die zur Erzeugung einer wirksamen T-Zell-Antwort erforderlich sind. Mit dieser Lehre werden Verfahren bereitgestellt, die neue und wirksamere Strategien zur Manipulation der Immunantwort, einschließlich der Unterdrückung der Transplantatabstoßung, bieten.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft die Hemmung der Abstoßung eines primär vaskularisierten Transplantats. Dies beinhaltet, dass ein aus gp39 und CD40 ausgewähltes endogenes Molekül (z. B. Antigen) auf einer Zelle gehindert wird, seinen endogenen Liganden zu binden, und ein aus CTLA4, CD28 und B7 ausgewähltes endogenes Molekül auf einer Zelle gehindert wird, seinen endogenen Liganden zu binden. Dadurch, dass die Bindung solcher Moleküle an ihre Liganden unterbunden wird, werden zwei unabhängige Signalwege blockiert und die für die Abstoßung verantwortliche Immunantwort gehemmt.

[0018] Ferner betrifft die Erfindung die Hemmung einer Immunantwort, die mit der Abstoßung zusammenhängt, wobei man eine B7-positive Zelle mit einem ersten löslichen Liganden, welcher das B7-Antigen erkennt

und bindet, zusammenbringt und eine gp39-positive Zelle mit einem zweiten löslichen Ligand, welcher das gp39-Antigen erkennt und bindet, zusammenbringt. Das Binden der B7-positiven Zelle an den ersten löslichen Liganden blockiert die Reaktion des B7-Antigens mit endogenem CTLA4 oder CD28. Zudem blockiert das Binden des gp39-Antigens an den zweiten löslichen Liganden die Reaktion des gp39-Antigens mit endogenem CD40. Dieses Blockieren sowohl des gp39- als auch B7-Signalwegs hemmt die Transplantatabstoßung.

[0019] Zur erfindungsgemäßen Lehre gehört ein Verfahren zur Hemmung der Transplantatabstoßung, die durch die gp39- und B7-Signalwege in einem Individuum vermittelt werden. Dieses Verfahren umfasst das Verabreichen eines ersten löslichen Liganden, welcher das B7-Antigen erkennt und bindet, und eines zweiten löslichen Liganden, welcher das gp39-Antigen erkennt und bindet, an ein Individuum.

[0020] Das Binden sowohl des ersten als auch des zweiten löslichen Liganden an ihre Rezeptoren hemmt die durch die gp39- und B7-Signalwege vermittelte Transplantatabstoßung, indem die Bindung eines auf einer Zelle vorkommenden aus gp39- und CD40-Antigenen ausgewählten endogenen Moleküls an seinen endogenen Liganden unterbunden wird und die Bindung eines auf einer Zelle vorkommenden aus CTLA4, CD28 oder B7 ausgewählten endogenen Moleküls an seinen endogenen Liganden unterbunden wird.

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft die Hemmung der Abstoßung eines primär vaskularisierten Transplantats in einem Individuum. Dies beinhaltet, dass man einem Individuum eine wirksame Menge einer Kombination aus einem ersten löslichen Liganden, welcher das B7-Antigen auf B7-positiven Zellen erkennt und bindet, und einem zweiten löslichen Liganden, welcher das gp39-Antigen auf gp39-positiven Zellen erkennt und bindet, verabreicht.

[0022] Das Binden von B7-positiven Zellen an den ersten löslichen Liganden und gp39-positiver Zellen an den zweiten löslichen Liganden stört die endogenen Wechselwirkungen von CTLA4-, CD28- und gp39-positiven Zellen mit B7-positiven Zellen und gp39-positiven Zellen, so dass die Transplantatabstoßung gehemmt wird.

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft die Hemmung der Abstoßung eines primär vaskularisierten Transplantats, wobei man:

- a) die Bindung eines auf einer Zelle vorkommenden aus gp39 und CD40 ausgewählten endogenen Antigens an seinen endogenen Liganden unterbindet; und
- b) die Bindung eines auf einer Zelle vorkommenden aus CTLA4, CD28 und B7 ausgewählten endogenen Antigens an seinen endogenen Liganden unterbindet,

wobei durch das Unterbinden der Bindung solcher Antigene an ihre Liganden zwei unabhängige Zellsignale blockiert werden und die Transplantatabstoßung gehemmt wird.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0024] [Fig. 1](#) ist ein Balkendiagramm, welches zeigt, dass die gleichzeitige Blockierung der CD28- und CD40-Signale in vivo zum Verlust von Alloimmunantworten in den Kniekehlenlymphknoten führt.

[0025] [Fig. 2A](#) ist ein Liniendiagramm, welches zeigt, dass die CTLA4Ig/MR1-Behandlung, im Vergleich zu einer Behandlung mit CTLA4Ig oder MR1 alleine, das Überleben von Herzallotransplantaten verlängert.

[0026] [Fig. 2B](#) zeigt ein Foto von einem histologischen Schnitt eines mit CTLA4Ig behandelten Herzallotransplantats an Tag 62, bei dem eine starke Lymphozyteneinwanderung, interstitielle Fibrose und schwere Intima-Verdickung und Fibrose der Koronararterien vorliegt, was einer chronischen Abstoßung entspricht (linke Seite 100-fache Vergrößerung; rechte Seite 400-fache Vergrößerung).

[0027] [Fig. 2C](#) zeigt ein Foto von einem histologischen Schnitt eines mit MR1 behandelten Herzallotransplantats an Tag 62, bei dem weniger Lymphozyteneinwanderung und interstitielle Fibrose, jedoch eine schwere Vaskulopathie der Koronararterien zu sehen ist, was ein Charakteristikum der chronischen Abstoßung ist (linke Seite 100-fache Vergrößerung; rechte Seite 400-fache Vergrößerung).

[0028] [Fig. 2D](#) zeigt ein Foto eines histologischen Schnitts von mit CTLA4Ig/MR1 behandelten Herzallotransplantaten an Tag 58, welche keine Lymphozyteneinwanderung, Fibrose und Intima-Läsionen der Koronararterien zeigen (linke Seite 100-fache Vergrößerung; rechte Seite 400-fache Vergrößerung).

[0029] [Fig. 2E](#) zeigt ein Foto eines histologischen Schnitts von normalen nicht-transplantierten BALB/c-Herzen (linke Seite 100-fache Vergrößerung; rechte Seite 400-fache Vergrößerung).

[0030] [Fig. 3A](#) ist ein Foto von mit Ethidiumbromid gefärbten Gelstreifen, worin mittels RT-PCR die Expression von Immunmediatortranskripten in den Transplantaten gezeigt ist, und zwar in unbehandelten, mit MR1, CTLA4Ig und MR1/CTLA4Ig behandelten Herzallotransplantaten.

[0031] [Fig. 3B](#) zeigt eine Reihe Balkendiagramme, welche die durchschnittlichen Bandenintensitäten der PCR-Produkte \pm Standardabweichung darstellen.

[0032] [Fig. 4A](#) ist ein Liniendiagramm, das die Daten von Mäusen zeigt, welche mit MR1 alleine, CTLA4Ig alleine und einer Kombination aus MR1 und CTLA4Ig behandelt worden waren.

[0033] [Fig. 4B](#) ist ein Liniendiagramm, das die Daten von Mäusen zeigt, welche mit CyA, CyA und CTLA4Ig sowie CyA und MR1 behandelt worden waren.

[0034] [Fig. 4C](#) ist ein Liniendiagramm, welches die Wirkungen einer perioperativen Behandlung mit YTS191 und MR1 alleine, MR1 und CTLA4Ig und YTS191 und CTLA4Ig auf primäre Hautallotransplantate zeigt.

[0035] [Fig. 4D](#) ist ein Foto von einen gesund aussehenden BALB/c-Hauttransplantats auf einem mit CTLA4Ig/MR1 behandelten Empfänger.

[0036] [Fig. 4E](#) ist ein Foto von einem Kontroll-Allotransplantat, das abgestoßen wird.

[0037] [Fig. 4F](#) ist ein Foto von einem histologischen Schnitt eines Hauttransplantats, worauf ein gesund aussehendes, angenommenes Transplantat, 100 Tage nach der Transplantation, mit den gut erhaltenen epidermalen Haarfollikeln und Adnexstrukturen zu sehen ist.

[0038] [Fig. 4G](#) ist ein Foto von einem BALB/c-Hauttransplantat auf einem nicht-behandelten Empfänger, 8 Tage nach der Transplantation. Das Transplantat zeigt ausgedehnte Lymphozyteneinwanderung.

[0039] [Fig. 5A](#) ist eine Reihe von Liniendiagrammen, welche die in vitro-Wirkungen auf drei verschiedenen Zellpopulationen zeigen, wenn MR1 alleine, CTLA4Ig alleine oder eine Kombination aus MR1/CTLA4Ig verwendet wird.

[0040] [Fig. 5B](#) ist eine Reihe Balkendiagramme, welche die in vivo-Wirkungen zeigen, wenn MR1 alleine, CTLA4Ig alleine oder eine Kombination aus MR1/CTLA4Ig verwendet wird.

[0041] [Fig. 6A](#) ist ein Balkendiagramm, welches das Gewicht des immunisierten Kniekehlenlymphknotens im Vergleich zu dem kontralateralen Knoten in C3H-Mäusen als Antwort auf die Fußflächenimmunisierung mit bestrahlten (2000 RADS) Rattensplenozyten (Sprague-Dawley) zeigt. Human-IgG (gepunktet), CTLA4-Ig (grau), MR1 (weiß), CTLA4-Ig/MR1 (schwarz), normaler nicht-immunisierter Knoten (gestreift).

[0042] [Fig. 6B](#) ist ein Liniendiagramm, das die in vitro-Proliferation von Lymphknotenzellen nach der Gewinnung der Kniekehlenlymphe, 4 Tage nach der Immunisierung, zeigt. Human-IgG (gepunktet), CTLA4-Ig (grau), MR1 (weiß), CTLA4-Ig/MR1 (schwarz), normaler nicht-immunisierter Knoten (gestreift).

[0043] [Fig. 6C](#) ist ein Balkendiagramm, welches zeigt, dass das gleichzeitige Blockieren der CD40- und CD28-Signalwege die Cytokinproduktion von IL-2 deutlich hemmt. Human-IgG (gepunktet), CTLA4-Ig (grau), MR1 (weiß), CTLA4-Ig/MR1 (schwarz), normaler, nicht-immunisierter Knoten (gestreift).

[0044] [Fig. 6D](#) ist ein Balkendiagramm, welches zeigt, dass die gleichzeitige Blockierung der CD40- und CD28-Signalwege die Cytokinproduktion von INF γ deutlich hemmt. Human-IgG (gepunktet), CTLA4-Ig (grau), MR1 (weiß), CTLA4-Ig/MR1 (schwarz), normaler, nicht-immunisierter Knoten (gestreift).

[0045] [Fig. 7A](#) ist ein Liniendiagramm, welches zeigt, dass C3H-Empfänger, welche an Tag 0, 2, 4 und 6 mit CTLA4-Ig (500 μ g) in Kombination mit MR1 (500 μ g) an Tag 0, 2, 4 und 6 behandelt worden waren, ein längeres Überleben der Herzallotransplantate aus Sprague-Dawley-Ratten aufwiesen.

[0046] [Fig. 7B](#) ist ein Foto von einem unbehandelten Herzxenotransplantat an Tag 6 mit einer weitgehenden

Gewebezerstörung (400-fach).

[0047] [Fig. 7C](#) ist ein Foto von einem mit CTLA4-Ig behandelten Herzxenotransplantat an Tag 20, welches die Einwanderung von Lymphozyten, Zerstörung von Myocyten und eine Koronarvaskulopathie zeigt (400-fach).

[0048] [Fig. 7D](#) ist ein Foto eines mit MR1 behandelten Herzxenotransplantats an Tag 20, das eine Lymphozyteninfiltration, Myocytenzerstörung und Koronarvaskulopathie zeigt (400-fach).

[0049] [Fig. 7E](#) ist ein Foto eines normalen, nicht-transplantierten Herzens einer Sprague-Dawley-Ratte (400-fach).

[0050] [Fig. 7F](#) ist das Foto von einem mit CTLA4-Ig/MR1 behandelten Herztransplantat an Tag 20, das im Wesentlichen keine Lymphozyteneinwanderung und Fibrose zeigt (400-fach).

[0051] [Fig. 7G](#) ist das Foto von einem mit CTLA4-Ig/MR1 behandelten Herzxenotransplantat an Tag 122, welches eine ausgezeichnete Erhaltung der Muskelzell- und Gefäßstrukturen zeigt (400-fach).

[0052] [Fig. 8A](#) ist eine Reihe Liniendiagramme, die zeigen, wie sich das Überleben von Hauttransplantaten von Sprague-Dawley-Ratten in C3H-Mäusen, denen man in der perioperativen Periode MR1 und CTLA4-Ig zusammen verabreicht hat, im Vergleich zu Transplantatempfängern, die mit entweder MR1 alleine oder CTLA4-Ig alleine behandelt worden waren, sowie unbehandelten Kontrollen, verlängert.

[0053] [Fig. 8B](#) ist eine Reihe Liniendiagramme, welche keine wesentliche Veränderung des Transplantatüberlebens nach der chronischen Behandlung (die nach der üblichen 4-Dosis-Verabreichung erfolgt) mit entweder der CTLA4-Ig/MR1-Kombination oder MR1 zeigt.

[0054] [Fig. 8C](#) ist ein Foto von einem gesund aussehenden Hauttransplantat einer Sprague-Dawley-Ratte auf einem mit CTLA4-Ig/MR1 behandelten C3H-Empfänger, 100 Tage nach der Transplantation.

[0055] [Fig. 8D](#) zeigt ein Foto von einem Kontroll-Hautxenotransplantat, das 10 Tage nach der Transplantation abgestoßen wird.

[0056] [Fig. 8E](#) ist ein Foto von einem mit Hematoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnitt eines angenommenen, mit CTLA4-Ig/MR1 behandelten Transplantats, 50 Tage nach der Transplantation, das einen gut erhaltenen histologischen Aufbau zeigt (400-fach).

[0057] [Fig. 8F](#) ist ein Foto von einem mit Hematoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnitt eines Hauttransplantats einer Sprague-Dawley-Ratte auf einem unbehandelten C3H-Empfänger, 8 Tage nach der Transplantation, das eine ausgedehnte Lymphozyteneinwanderung zeigt (400-fach).

[0058] [Fig. 9A](#) ist ein Streudiagramm, welches das Ausbleiben einer hervorgerufenen Xenoantikörperantwort in Serum zeigt, das von C3H-Empfängern, 55 Tage nach der Transplantation von Haut aus Sprague-Dawley-Spendern, gewonnen wurde. Kontrollmäuse, die keine Behandlung erhalten hatten, hatten gut nachweisbare IgG-Xenoantikörper. Sowohl CTLA4-Ig als auch MR1 alleine blockierten die Xenoantikörperantwort teilweise. Durch eine Kombination aus CTLA4-Ig und MR1 blieb die hervorgerufene Xenoantikörperantwort im Wesentlichen aus. Jeder Datenpunkt steht für die Untersuchung eines einzelnen Empfängers.

[0059] [Fig. 9B](#) ist ein Streudiagramm, das das Ausbleiben der hervorgerufenen Xenoantikörperantwort in Serum, welches aus C3H-Empfängern, 20 Tage nach dem Erhalt von Herz-Xenotransplantaten aus Sprague-Dawley-Spendern, gewonnen wurde, zeigt.

Definitionen

[0060] Sämtliche in dieser Anmeldung verwendeten wissenschaftlichen und technischen Begriffe haben die im Stand der Technik allgemein verwendete Bedeutung, es sei denn, es ist etwas anderes erwähnt. In dieser Anmeldung haben nachstehende Wörter oder Sätze die angegebene Bedeutung.

[0061] Wie hier verwendet, umfasst „monoklonale Antikörper gegen gp39“ oder „Anti-gp39“ MR1. Anti-gp39 ist in der Literatur auch als ein Anti-CD40-Ligand bekannt. Beispiele von MR1 umfassen, ohne jedoch darauf

beschränkt zu sein, monoklonale Antikörper, die gegen gp39 aus Maus gerichtet sind; Antikörper, die gegen gp39 aus anderen Arten, wie Affe, Schaf, Mensch, gerichtet sind, sind umfasst. Zudem umfasst der Begriff „monoklonale Antikörper, die gegen gp39 gerichtet sind“ oder „Anti-gp39“ alle Antikörpermoleküle, Fragmente davon oder rekombinante Bindungsproteine, welche gp39 erkennen und binden.

[0062] Wie hier verwendet, steht „verabreichen“ für die orale Verabreichung, die Verabreichung in Form von Zäpfchen, den topischen Kontakt, die intravenöse, intraperitoneale, intramuskuläre oder subkutane Verabreichung oder die Implantation einer Vorrichtung mit langsamer Wirkstofffreigabe, wie einer miniosmotischen Pumpe, an das Individuum.

[0063] Wie hier verwendet, umfasst „pharmazeutisch annehmbarer Träger“ jedes Material, das in Kombination mit dem Antikörper die Immunogenität des Antikörpers erhält und nicht mit dem Immunsystem des Individuums reagiert. Beispiele umfassen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, alle üblichen pharmazeutischen Träger, wie eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Wasser, Emulsionen, wie Öl-/Wasseremulsionen, und zahlreiche Benetzungsmittelarten. Andere Träger können auch sterile Lösungen, Tabletten, auch beschichtete Tabletten, sowie Kapseln umfassen.

[0064] Üblicherweise enthalten solche Träger Trägersubstanzen wie Stärke, Milch, Zucker, bestimmte Tonarten, Gelatine, Stearinsäure oder Salze davon, Magnesium- oder Calciumstearat, Talk, Pflanzenfette oder -öle, Gummi, Glycole oder andere bekannte Trägersubstanzen. Solche Träger können auch Geschmacksstoffe und Farbstoffzusätze oder andere Inhaltsstoffe enthalten. Zusammensetzungen mit solchen Trägern werden nach gut bekannten herkömmlichen Verfahren formuliert.

[0065] Wie hier verwendet, umfasst „transplantiertes Gewebe“ Autotransplantate, Isotransplantate, Allotransplantate und Xenotransplantate. Beispiele von transplantiertem Gewebe umfassen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, feste Organtransplantate, wie Herz, Leber oder Nieren.

[0066] Wie hier verwendet, umfasst „B7“ B7-1 (auch als CD80 bezeichnet), B7-2 (auch als CD86 bezeichnet), B7-3 und die B7-Familie, z. B. eine Kombination aus B7-1, B7-2 und/oder B7-3.

[0067] Zum besseren Verständnis der hierin beschriebenen Erfindung folgt nachstehende Beschreibung.

[0068] Die hier gegebene Lehre betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Abstoßung eines primär vaskularisierten Transplantats. In einer Ausführungsform wird bei dem Verfahren die Bindung eines auf einer Zelle vorkommenden endogenen Moleküls, ausgewählt aus der Gruppe aus gp39 und CD40, an seinen endogenen Liganden unterbunden. Bei dem Verfahren wird die Bindung eines endogenen auf einer Zelle vorkommenden Moleküls, ausgewählt aus der Gruppe aus CTLA4, CD28 und B7, an seinen endogenen Liganden unterbunden. Das Unterbinden der Bindung dieser Moleküle an ihre endogenen Liganden blockiert zwei unabhängige Signalwege. Das Blockieren der zwei unabhängigen Signalwege hemmt die Immunantworten, welche zu der Abstoßung führen.

[0069] In einem erfindungsgemäßen Beispiel wird die Bindung von endogenem gp39-Antigen an seinen endogenen Liganden unterbunden. Dieses Beispiel beinhaltet den Schritt, dass man eine gp39-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, der das gp39-Antigen erkennt und bindet, zusammenbringt (z. B. durch Verwenden von löslichen Liganden, wie MR1, oder anderer Antikörper, welche gp39 binden, und löslicher CD40-Moleküle).

[0070] In einem zusätzlichen Schritt beinhaltet dieses Beispiel, dass man die Bindung des endogenen CTLA4-Antigens an seinen endogenen Liganden unterbindet. Dies beinhaltet den Schritt, dass man eine B7-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, welcher das B7-Antigen erkennt und bindet, wie CTLA4-Ig (U.S.-Patent Nr. 5,434,131, erteilt am 18. Juli 1995), dem monoklonalen Antikörper BB-1 oder anderen gegen B7 gerichteten Antikörpern, zusammenbringt.

[0071] Das Binden der gp39-positiven Zelle an ihren löslichen Liganden blockiert die Reaktion des endogenen gp39-Antigens mit endogenem CD40. Das Binden der B7-positiven Zelle an seinen löslichen Liganden blockiert die Reaktion des endogenen B7-Antigens mit endogenem CTLA4 und CD28. Diese kombinierte Blockierung hemmt die Transplantatabstoßung.

[0072] In einem weiteren Beispiel wird die Bindung von endogenem CD40-Antigen an seinen endogenen Liganden unterbunden. Dieses Beispiel beinhaltet den Schritt, dass man eine CD40-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, welcher das CD40-Antigen erkennt und bindet, zusammenbringt. Geeignete Liganden umfas-

sen Antikörper, welche gegen CD40 oder lösliches gp39 (sgp39) gerichtet sind.

[0073] In einem zusätzlichen Schritt beinhaltet dieses Beispiel, dass man das Binden von endogenem CTLA4-Antigen an seinen endogenen Liganden unterbindet. Bei diesem Schritt bringt man eine B7-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, welcher das B7-Antigen erkennt und bindet, zusammen. Zu Beispielen für diesen löslichen Liganden gehören CTLA4Ig, lösliche CD28-Moleküle und gegen B7 gerichtete Antikörper.

[0074] Die Bindung der CD40-positiven Zelle an ihren löslichen Liganden blockiert die Reaktion des endogenen CD40-Antigens mit endogenem gp39. Die Bindung der B7-positiven Zelle an ihren löslichen Liganden blockiert die Reaktion des B7-Antigens mit endogenem CTLA4. Die kombinierte Blockierung hemmt die Transplantatabstoßung.

[0075] In noch einem weiteren Beispiel, wird die Bindung von endogenem gp39-Antigen an seinen endogenen Liganden, wie oben beschrieben, unterbunden. Dieses Beispiel umfasst den zusätzlichen Schritt, dass man das endogene CD28-Antigen daran hindert, seinen endogenen Liganden zu binden. Dieser Schritt beinhaltet, dass man eine B7-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, welcher das B7-Antigen erkennt und bindet, zusammenbringt. Zu den Beispielen gehören CTLA4Ig, lösliche CD28-Moleküle und gegen B7 gerichtete Antikörper, wie BB-1.

[0076] Die Bindung der gp39-positiven Zelle an ihren löslichen Liganden blockiert die Reaktion des gp39-Antigens mit endogenem CD40. Die Bindung der B7-positiven Zelle an ihren löslichen Liganden blockiert die Reaktion des B7-Antigens mit endogenem CD28. Diese kombinierte Blockierung hemmt die Transplantatabstoßung.

[0077] In einem weiteren Beispiel wird, wie oben beschrieben, endogenes CD40-Antigen gehindert, seinen endogenen Liganden zu binden. In einem zusätzlichen Schritt beinhaltet das Beispiel dass die Bindung des endogenen B7-Antigens an seinen endogenen Liganden unterbunden wird. Dies umfasst, dass man eine CD28-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, welcher das CD28-Antigen erkennt und bindet, zusammenbringt. Zu Beispielen für solche lösliche Liganden gehören lösliche B7-Moleküle und gegen CD28 gerichtete Antikörper.

[0078] Die Bindung der CD40-positiven Zelle an den löslichen Liganden blockiert die Reaktion des CD40-Antigens mit endogenem gp39. Die Bindung der CD28-positiven Zelle an den löslichen Liganden blockiert die Reaktion des B7-Antigens mit endogenem CD28. Diese kombinierte Blockierung hemmt die Transplantatabstoßung.

[0079] In einem weiteren Beispiel wird, wie oben beschrieben, endogenes CD40-Antigen an der Bindung seines Liganden gehindert. In einem zusätzlichen Schritt beinhaltet dieses Beispiel, dass die Bindung des endogenen B7-Antigens an seinen endogenen Liganden unterbunden wird, wobei eine CTLA4-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, welcher das CTLA4-Antigen erkennt und bindet, zusammengebracht wird. Zu Beispielen für solche lösliche Liganden gehören lösliche B7-Moleküle und gegen CTLA4 gerichtete Antikörper.

[0080] Die Bindung der CD40-positiven Zelle an den löslichen Liganden blockiert die Reaktion des CD40-Antigens mit endogenem gp39. Zusätzlich blockiert die Bindung der CTLA4- oder CD28-positiven Zelle an den löslichen Liganden die Reaktion des CTLA4-Antigens mit endogenem B7. Diese kombinierte Blockierung hemmt die Transplantatabstoßung.

[0081] In einem weiteren Beispiel wird die Bindung von endogenem CD40-Antigen an seinen Liganden, wie oben beschrieben, unterbunden. In einem zusätzlichen Schritt beinhaltet dieses Beispiel, dass die Bindung des endogenen B7-Antigens an seinen endogenen Liganden unterbunden wird, wobei eine CD28-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, welcher das CD28-Antigen erkennt und bindet, zusammengebracht wird. Zu Beispielen für solche lösliche Liganden gehören lösliche B7-Moleküle und gegen CD28 gerichtete Antikörper.

[0082] Die Bindung der CD40-positiven Zelle an den löslichen Liganden blockiert die Reaktion des gp39-Antigens mit endogenem CD40. Ferner blockiert die Bindung der CD28-positiven Zelle an den löslichen Liganden die Reaktion des CD28-Antigens mit endogenem B7. Diese kombinierte Blockierung hemmt die Transplantatabstoßung.

[0083] Auch wird in einem weiteren Beispiel, wie oben beschrieben, verhindert, dass endogenes CD40-Antigen seinen Liganden bindet. In einem zusätzlichen Schritt beinhaltet dieses Beispiel, dass die Bindung von

endogenem B7-Antigen an seinen endogenen Liganden unterbunden wird, wobei eine CTLA4-positive Zelle mit einem löslichen Liganden, welcher das CTLA4-Antigen erkennt und bindet, zusammengebracht wird.

[0084] Die Bindung der CD40-positiven Zelle an den löslichen Liganden blockiert die Reaktion des gp39-Antigens mit endogenem CD40. Zusätzlich hemmt die Bindung der CTLA4-positiven Zelle an den löslichen Liganden die Reaktion des CTLA4-Antigens mit endogenem B7. Diese kombinierte Blockierung hemmt die Transplantatabstoßung.

[0085] Zudem betrifft die vorliegende Erfindung eine weitere Ausführungsform zur Inhibierung der Transplantatabstoßung. Bei dieser Ausführungsform wird eine B7-positive Zelle mit einem ersten löslichen Liganden, welcher das B7-Antigen erkennt und bindet und eine gp39-positive Zelle mit einem zweiten löslichen Liganden, welcher das gp39-Antigen erkennt und bindet, zusammengebracht.

[0086] Die Bindung der B7-positiven Zelle an den ersten löslichen Liganden blockiert die Reaktion des B7-Antigens mit endogenem CTLA4 oder CD28. Weiter hemmt die Bindung des gp39-Antigens an den zweiten löslichen Liganden die Reaktion des gp39-Antigens mit endogenem CD40. Die Kombination dieser Blockierung hemmt die Transplantatabstoßung.

[0087] Zudem dient die Erfindung der Hemmung der durch den CTLA4/CD28/B7- und gp39/CD40-Signalweg vermittelten Abstoßung eines primär vaskularisierten Transplantats in einem Individuum. Bei der Ausführung der Erfindung kann das Individuum ein Lebewesen sein, wie ein Mensch, ein Hund, eine Katze, ein Schaf, ein Pferd, eine Maus, ein Schwein oder eine Kuh.

[0088] Bei dem Verfahren werden dem Individuum ein erster löslicher Ligand, welcher das B7-Antigen erkennt und bindet (z. B. lösliche CTLA4- oder CD28-Moleküle), und ein zweiter löslicher Ligand, welcher das gp39-Antigen erkennt und bindet (z. B. gegen gp39 gerichtete monoklonale Antikörper (MR1) oder lösliche CD40-Moleküle) verabreicht. Die Bindung der ersten und zweiten Liganden an ihre Rezeptoren hemmt die Transplantatabstoßung, die durch die Wechselwirkung von CTLA4-, CD28- und gp39-Zellen mit B7- und CD40-positiven Zellen vermittelt wird.

[0089] Die Erfindung betrifft die Hemmung der Transplantatabstoßung in einem Individuum, wobei das Transplantat ein primär vaskularisiertes Transplantat ist. Bei diesem Verfahren wird dem Individuum eine wirksame Menge einer Kombination aus einem ersten löslichen Liganden, welcher das B7-Antigen auf B7-positiven Zellen erkennt und bindet, und einem zweiten löslichen Liganden, welcher das gp39-Antigen auf gp39-positiven Zellen erkennt und bindet, verabreicht. Die Bindung von B7-positiven Zellen an den ersten löslichen Liganden und von gp39-positiven Zellen an den zweiten löslichen Liganden stört die endogenen Wechselwirkungen der CTLA4-, CD28- und gp39-Zellen mit B7-positiven Zellen und gp39-positiven Zellen, so dass die Abstoßung der Transplantate gehemmt wird.

[0090] Erfindungsgemäß kann der erste lösliche Ligand ein rekombinantes Bindungsmolekül mit wenigstens einem Anteil der extrazellulären Domäne von CTLA4 sein. Erfindungsgemäß kann der extrazelluläre Teil von CTLA4 mit einer nicht-CTLA4-Proteinsequenz verbunden sein. Bei der nicht-CTLA4-Proteinsequenz kann es sich um wenigstens einen Teil eines Immunglobulinmoleküls handeln.

[0091] In einem spezifischen Beispiel der Erfindung ist der Ligand ein CTLA4Ig-Fusionsprotein, z. B. das CTLA4Ig-Fusionsprotein, das am 31. Mai 1991 bei der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, Maryland, nach den Vorschriften des Budapester Vertrags unter der ATCC-Hinterlegungsnummer 68629 hinterlegt worden ist. Wahlweise kann der Ligand ein CD28Ig/CTLA4Ig-Fusionsproteinhybrid sein (U.S.-Patent Nr. 5,434,131, erteilt am 18. Juli 1995).

[0092] In einer alternativen Ausführungsform kann der erste lösliche Ligand ein mit dem B7-Antigen reaktiver monoklonaler Antikörper sein, beispielsweise kann der Antikörper der monoklonale Antikörper Anti-BB1 sein (Clark et al., Human Immunol. 16: 100–113 (1986); Yokochi et al., J. Immunol. 128: 823 (1981)); Freeman et al. (J. Immunol. 143(8): 2714–2722 (1989); und Freedman et al., J. Immunol. 139: 3260 (1987)).

[0093] In einer weiteren Ausführungsform kann der Ligand ein CD28Ig/CTLA4Ig-Fusionsproteinhybrid sein mit einer ersten Aminosäuresequenz, die einem Teil der extrazellulären Domäne des CD28-Rezeptors entspricht, fusioniert mit einer zweiten Aminosäuresequenz, die einem Teil der extrazellulären Domäne des CTLA4-Rezeptors entspricht, und einer dritten Aminosäuresequenz, die den Hinge-, CH2- und CH3-Bereichen von humanem Immunglobulin Cg1 entspricht.

[0094] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform kann der zweite lösliche Ligand für das gp39-Antigen ein monoklonaler Antikörper sein, der mit dem gp39-Antigen reaktiv ist, z. B. der gegen murines gp39 gerichtete monoklonale Antikörper MR1 oder der gegen humanes gp39 gerichtete Antikörper (U.S.-Patent Nr. 5,474,771, erteilt am 12. Dezember 1995).

[0095] In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform beinhaltet das Verfahren, dass man dem Individuum ein lösliches Fusionsprotein verabreicht, wobei das lösliche Fusionsprotein eine erste und eine zweite Bindungsdomäne umfasst.

[0096] In einem Beispiel ist die erste Bindungsdomäne ein Ligand, welcher das gp39-Antigen erkennt und bindet. Zu Beispielen gehören CD40 und gegen gp39 gerichtete monoklonale Antikörper. In einem weiteren Beispiel ist die erste Bindungsdomäne ein Ligand, welcher das CD40-Antigen erkennt und bindet. Zu Beispielen gehören gp39 und gegen CD40 gerichtete monoklonale Antikörper.

[0097] In einem Beispiel ist die zweite Bindungsdomäne ein Ligand, welcher CTLA4 erkennt und bindet. Zu Beispielen gehören B7 und gegen CTLA4 gerichtete monoklonale Antikörper. In einem weiteren Beispiel ist die zweite Bindungsdomäne ein Ligand, welcher das CD28-Antigen erkennt und bindet. Zu Beispielen gehören B7 und gegen CD28 gerichtete monoklonale Antikörper. In einem weiteren Beispiel ist die zweite Bindungsdomäne ein Ligand, welcher das B7-Antigen erkennt und bindet. Zu Beispielen gehören CTLA4, CD28 und gegen B7 gerichtete monoklonale Antikörper.

[0098] Lösliche Liganden können während der Transplantation, vor der Transplantation oder nach der Transplantation verabreicht werden. Lösliche Liganden können durch orale Mittel, transdermale Mittel, intravenöse Mittel, intramuskuläre Mittel, intraperitoneal oder durch subkutane Verabreichung verabreicht werden.

[0099] Der wirksamste Verabreichungsweg und das wirksamste Dosierungsschema für die erfindungsgemäßen Moleküle hängt von der Lage des zu behandelnden Gewebes oder der Erkrankung, der Schwere und des Verlaufs der Erkrankung, dem Gesundheitszustand des Individuums und der Reaktion auf die Behandlung sowie der Beurteilung des behandelnden Arztes ab. Demnach sollte die Dosierung der Moleküle im Einzelfall für das Individuum bestimmt werden.

[0100] Beispielhaft wird die Wechselbeziehung der Dosierung für Tiere verschiedener Größen und Arten sowie für den Menschen, bezogen auf mg/m^2 Oberfläche, von Freireich, E. J. et al., in Cancer Chemother., Rep. 50(4): 219–244 (1966) beschrieben. Anpassungen des Dosierungsschemas können vorgenommen werden, um die Unterdrückung der zur Abstoßung des Transplantats führenden Immunantwort zu optimieren, beispielsweise können die Dosen geteilt und auf einer täglichen Basis verabreicht werden oder die Dosen können proportional je nach Situation verringert werden (z. B. können mehrere Teildosen täglich verabreicht oder proportional verringert werden, je nach spezifischer therapeutischer Situation).

[0101] Es versteht sich, dass die Dosis der erfindungsgemäßen Zusammensetzung, die zur Erzielung eines angemessenen klinischen Ergebnisses erforderlich ist, durch die Optimierung des Schemas weiter verringert werden kann.

[0102] Die vorliegende Erfindung stellt auch pharmazeutische Zusammensetzungen zur Hemmung der Transplantatabstoßung bereit. In einer Ausführungsform umfassen diese Zusammensetzungen eine wirksame Menge einer Kombination aus (a) löslichen Liganden, welche eines der CTLA4-, CD28- und B7-Antigene erkennen und binden, zusammen mit (b) löslichen Liganden, welche eines der gp39- und CD40-Antigene binden, und einem verträglichen Träger. In einer weiteren Ausführungsform umfassen diese Zusammensetzungen eine wirksame Menge eines löslichen Fusionsproteins, welches eine erste und eine zweite Bindungsdomäne aufweist, worin die erste Bindungsdomäne ein Ligand ist, welcher eines der gp39- oder CD40-Antigene erkennt und bindet, und die zweite Bindungsdomäne ein Ligand ist, welcher eines der CTLA4-, CD28- und B7-Antigene erkennt und bindet.

[0103] Zu pharmazeutischen Zusammensetzungen, die zur Hemmung der Transplantatabstoßung geeignet sind, gehören Zusammensetzungen, welche eine pharmazeutisch wirksame Menge eines löslichen Liganden, der ein B7-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten; eine pharmazeutisch wirksame Menge eines löslichen Liganden, der ein CD28-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten; eine pharmazeutisch wirksame Menge eines löslichen Trägers, welcher ein CTLA4-Antigen erkennt und bin-

det, und einen verträglichen Träger enthalten;
eine pharmazeutisch wirksame Menge eines löslichen Liganden, welcher ein gp39-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten;
eine pharmazeutisch wirksame Menge eines löslichen Liganden, welcher ein – CD40-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten;
eine pharmazeutisch wirksame Menge einer Kombination aus einem löslichen Liganden, welcher ein B7-Antigen erkennt und bindet, und einem löslichen Liganden, welcher ein gp39-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten;
eine pharmazeutisch wirksame Menge einer Kombination aus einem löslichen Liganden, welcher ein CD28-Antigen erkennt und bindet, und einem löslichen Liganden, welcher ein CD40-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten;
eine pharmazeutisch wirksame Menge einer Kombination aus einem löslichen Liganden, welcher ein CTLA4-Antigen erkennt und bindet, und einem löslichen Liganden, welcher ein CD40-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten;
eine pharmazeutisch wirksame Menge einer Kombination aus einem löslichen Liganden, welcher ein gp39-Antigen erkennt und bindet, und einem löslichen Liganden, welcher ein CD28-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten;
eine pharmazeutisch wirksame Menge einer Kombination aus einem löslichen Liganden, welcher ein gp39-Antigen erkennt und bindet, und einem löslichen Liganden, welcher ein CTLA4-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten;
eine pharmazeutisch wirksame Menge einer Kombination aus einem löslichen Liganden, welcher ein B7-Antigen erkennt und bindet, und einem löslichen Liganden, welcher ein CD40-Antigen erkennt und bindet, und einen verträglichen Träger enthalten.

Vorteile der Erfindung

[0104] Trotz der vielen Vorteile bei der klinischen Immunsuppression bleibt die chronische Gefäßabstoßung eine Hauptursache für das Versagen von Transplantaten, gegen die es keine wirksame Therapie gibt. Die hier in beschriebenen Experimente zeigen, dass das Blockieren der CD28/CTLA4/B7- und gp39/CD40-Signalwege die Entstehung chronischer Transplantatvasculopathie in transplantiertem Gewebe hemmt. Diese Daten zeigen, dass die Immunantworten auf allogene und xenogene Transplantate ohne Cytoablation gehemmt werden können. Im Vergleich zur Verwendung von löslichen CTLA4-Molekülen allein verlängert die Verwendung von löslichen CTLA4-Molekülen zusammen mit einem löslichen Liganden, welcher gp39 erkennt und bindet, die Immunsuppression auf dramatische Weise.

[0105] Nachstehende Beispiele werden gegeben, um die vorliegende Erfindung zu verdeutlichen und den Durchschnittsfachmann bei der Herstellung derselben zu unterstützen. Die Beispiele beschränken den Umfang der Erfindung in keiner Weise.

Referenzbeispiel 1

[0106] Die Daten in diesem Beispiel zeigen, dass bei gleichzeitiger Blockierung der CD28- und CD40-Signale Alloimmunantworten der Kniekehlenlymphknoten *in vivo* unterbleiben.

Verfahren

[0107] Männliche C3H/HeJ-Mäuse (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) wurden an Tag 0 subkutan mit 2 × 10⁶ BALB/c-Splenozyten in 50 ml steriler normaler Kochsalzlösung in die linke Pfotenfläche und 50 ml steriler normaler Kochsalzlösung in die rechte Pfotenfläche immunisiert und dann intraperitoneal mit MR1 (250 mg), CTLA4Ig (250 mg) oder beiden Reagenzien an Tag 0, 2 und 4 behandelt.

[0108] Die Mäuse wurden an Tag 5 getötet, die Kniekehlenlymphknoten mit Hilfe eines Sezermikroskops (20-fache Vergrößerung) entnommen und das Frischgewicht jedes Knotens mit Hilfe einer Analysenwaage (Model A-160, Denver Instrument Company, Arvada, CO) auf die nächstliegenden 0,1 mg genau bestimmt.

Diskussion

[0109] Fünf Tage nach der subkutanen Immunisierung mit allogenen Splenozyten stieg das Gewicht der drainierenden Kniekehlenlymphknoten auf der Seite der Antigen-Reizung im Vergleich zu den kollateralen Knoten in unbehandelten Kontrollmäusen um mehr als das 5-fache an. Die Behandlung mit entweder CTLA4Ig oder

MR1 führte zu einer 50 bis 60%-igen Inhibierung der Antwort, wohingegen bei gleichzeitiger Verabreichung von CTLA4Ig und MR1 die Expansion des Lymphknotens als Antwort auf die Antigenstimulierung ausblieb. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung für drei einzelne Mäuse in jeder Gruppe. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchen erhalten.

[0110] Kontrollmäuse zeigten eine 4- bis 6-fache Gewichtszunahme des in dem immunisierten Fuß drainierenden Lymphknotens, im Vergleich zu dem mit steriler Kochsalzlösung injizierten drainierenden Knoten am kontralateralen Fuß ([Fig. 1](#)). Dieser Gewichtsanstieg ging mit einer dramatischen Expansion der Lymphozyten-reichen parakortikalen (T-Zell-) und kortikalen (B-Zell-) Bereiche einher. Bei alleiniger Verabreichung erzeugten CTLA4Ig und MR1 jeweils eine Teilhemmung dieser Antwort (57% beziehungsweise 56 Hemmung). Bei der Kombination aus CTLA4Ig/MR1 erfolgte keine Lymphknotenexpansion (98% Hemmung, [Fig. 1](#)) und die Ausdehnung der parakortikalen und lymphoiden Follikel blieb aus.

Beispiel 1

[0111] Dieses Beispiel zeigt die Verlängerung des Überlebens von Herzallotransplantaten und die Inhibierung der mit der chronischen Abstoßung verbundenen Vasculopathie.

Verfahren

[0112] Männliche, 8–12 Wochen alte C3H/HeJ-Mäuse wurden mit primär vaskularisierten BALB/c-Herzallotransplantaten mit Hilfe eines mikrooperativen Verfahrens transplantiert (Corry, R. J., Winn, H. J. & Russell, P. S. *Transplantation* 16, 343–350 (1973)).

[0113] Die Abstoßung wurde durch den Verlust fühlbarer Herzkontraktionen definiert und unter Laparotomie durch direkte Visualisierung bestätigt. Zu bestimmten Zeiten nach der Transplantation wurden die transplantierten Herzen herausgenommen, mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Gewebeschnitte (5 mm) wurden mit Masson's Trichrome oder Hematoxylin-Eosin gefärbt. Jeder histologische Schnitt wurde von einem Herztransplantatpathologen (KJW) ohne Kenntnis der Behandlungsmodalität untersucht.

Diskussion

[0114] In [Fig. 2A](#) wurden C3H/HeJ-Empfänger mit CTLA4Ig (200 mg/Dosis) an den Tagen 0, 2, 4 und 6 zusammen mit MR1 (250 mg/Dosis) an Tag 0, 2 und 4 behandelt; diese zeigten Langzeitüberleben von BALB/c-Herzallotransplantaten (mittlere Überlebenszeit (MÜZ) > 70 Tage, n = 7). Die Kontrollgruppen umfassten Empfänger, welche behandelt worden waren mit: CTLA4Ig alleine (MÜZ = 50 Tage, n = 12); MR1 alleine (MÜZ = 70 Tage, n = 12); und keiner Behandlung (MÜZ = 12 Tage, n = 7).

[0115] Alle Empfänger wurden 70 Tage lang beobachtet, mit Ausnahme von drei Mäusen mit überlebenden Transplantaten in jeder Versuchsgruppe, die zur histologischen Untersuchung an Tag 58 bis 63 nach der Transplantation getötet wurden.

[0116] In [Fig. 2B](#) zeigt das CTLA4Ig-behandelte Herzallotransplantat an Tag 62 eine ausgedehnte Lymphozyteneinwanderung, interstitielle Fibrose und eine schwere Intima-Verdickung und Fibrose der Koronararterien, was einer chronischen Abstoßung entspricht.

[0117] In [Fig. 2C](#) zeigt das MR1-behandelte Herzallotransplantat an Tag 62 weniger Lymphozyteneinwanderung und interstitielle Fibrose, jedoch die schweren Koronarvasculopathie-Charakteristika einer chronischen Abstoßung.

[0118] In [Fig. 2D](#) war das mit CTLA4Ig/MR1 behandelte Herzallotransplantat an Tag 58 im starken Gegensatz dazu deutlich frei von Lymphozyteneinwanderung, Fibrose und, besonders signifikant, Intima-Läsionen der Koronararterien. Das Parenchym und die Blutgefäße dieser Transplantate waren praktisch nicht von den normalen, nicht-transplantierten BALB/c-Herzen zu unterscheiden.

[0119] In [Fig. 2E](#) sind normale, nicht-transplantierte BALB/c-Herzen gezeigt.

[0120] Ähnliche histologische Ergebnisse erhielt man aus drei Allotransplantaten in jeder Versuchsgruppe. C3H/HeJ-(H-2k-)Empfänger, die mit CTLA4Ig alleine, MR1 alleine oder CTLA4Ig/MR1 behandelt worden waren, zeigten alle ein verlängertes Überleben von BALB/c-(H-2d-)Herzallotransplantaten im Vergleich zu unbe-

handelten Kontrollen ([Fig. 2A](#)). Wurden sie jedoch an Tag 58 bis 62 nach der Transplantation histologisch untersucht, zeigten sich deutliche Unterschiede.

[0121] Allotransplantate aus den mit CTLA4Ig behandelten Empfängern zeigten eine ausgedehnte Lymphozyteneinwanderung, interstitielle Fibrose und schwere Intima-Verdickung und Fibrose der Koronararterien, was einer chronischen Abstoßung entspricht ([Fig. 2B](#)). Während die mit MR1 behandelten Allotransplantate weniger Lymphozyteneinwanderung und interstitielle Fibrose zeigten, wiesen diese Transplantate auch starke Koronarvasculopathie-Charakteristika einer chronischen Abstoßung auf ([Fig. 2C](#)).

[0122] Im deutlichen Gegensatz dazu waren die Allotransplantate aus mit CTLA4Ig/MR1 behandelten Empfängern deutlich frei von Lymphozyteneinwanderung, Fibrose und, am signifikantesten, Intima-Läsionen der Koronararterien ([Fig. 2D](#)). Tatsächlich waren das Parenchym und die Blutgefäße dieser Transplantate praktisch nicht von denen normaler BALB/c-Herzen zu unterscheiden ([Fig. 2E](#)).

Referenzbeispiel 2

[0123] Dieses Beispiel zeigt die Hemmung der Transkriptionsexpression von T-Zell-Cytokinen und costimulatorischen Molekülen.

Verfahren

[0124] An Tag 8 nach der Transplantation wurden die Herztransplantate entfernt und die Gesamt-RNA aus dem Gewebe mit TRIzol-Reagens (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) präpariert. cDNA wurde mit 5 mg Gesamt-RNA-Templat mit einem Superscript-Voramplifikationssystem (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) in einem Endvolumen von 20 ml synthetisiert. PCR-Reaktionen wurden durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf mit Ethidiumbromid gefärbten 1%-igen Agarose-(BIO-RAD, Hercules, CA), 2%-igen NuSieve GTG-Agarose-(FMC BioProducts, Rockland, ME)Gelen sichtbar gemacht. Die Gelbilder wurden mit einem UVP-Geldokumentationssystem 5000 gespeichert. Die Bandenintensität wurden mit der Gelreader Analysis Software (National Center for Supercomputing Applications, Urbana, IL) quantifiziert.

[0125] In [Fig. 3A](#) wurde die Expression von Immunmediatortranskripten im Transplantat mit Hilfe der RT-PCR in unbehandelten, mit MR1 behandelten, mit CTLA4Ig behandelten und mit MR1/CTLA4Ig behandelten Herz-allotransplantaten bestimmt.

[0126] Drei Allotransplantate aus jeder Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe wurden an Tag 8 nach der Transplantation untersucht. Normales Herzgewebe (N) und ein synergisches Herztransplantat (S) von Tag 8 nach der Transplantation wurden als Vergleich dazugenommen.

[0127] In [Fig. 3B](#) ist die graphische Darstellung der mittleren Bandenintensitäten des PCR-Produkts \pm Standardabweichung gezeigt.

Diskussion

[0128] Keine einheitlichen Unterschiede in der Expression der T-Zell-Cytokintranskripte für IL-2, IL-4, IL-10 und IFNg oder der costimulatorischen Molekültranskripte (B7-1 und B7-2) konnten zwischen den Kontrollallo-transplantaten ([Fig. 3A](#), unbehandelt) und den MR1-behandelten Allotransplantaten ([Fig. 3A](#)) nachgewiesen werden, wohingegen CTLA4Ig die Expression des IL-4-Transkripts teilweise hemmte.

[0129] Allotransplantate aus mit CTLA4Ig/MR1 behandelten Empfängern zeigten eine auffallende Verringerung der Expression sowohl der Th1-Cytokin-(IL-2- und IFNg-) als auch der Th2-Cytokin-(IL-4- und IL-10-)Transkripte. Die Transkripte der costimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 im Transplantat waren in Empfängern, die mit CTLA4Ig/MR1 behandelt worden waren, jedoch nur mäßig reduziert.

[0130] PCR-Reaktionen, worin Templat ohne Reverse Transkriptase eingesetzt wurde, lieferten keine Produkte, selbst nicht für das Intron-freie GADPH-Gen ([Fig. 3A](#), GADPH, keine RT), was bestätigt, dass keine kontaminierende genomische DNA vorlag.

[0131] Transkripte der costimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 im Transplantat in Empfängern, welche mit CTLA4/MR1 behandelt worden waren, waren nur mäßig reduziert ([Fig. 3](#)), was vermuten lässt, dass CD28/B7-unabhängige oder CD40/gp39-unabhängige Faktoren, wie GMCSF (Larsen, C. P., et al., J. Immunol.

152, 5208–5219 (1994)) wichtige Regulatoren für die Expression von B7 innerhalb von Transplantaten sein könnten. Die durch MR1 vermittelte Blockierung des CD40-Signalwegs hemmt daher nicht nur die T-Zell-verwandte Unterstützung für Effektor-APCs, sondern fördert die Fähigkeit von CTLA4Ig, die Expression von T-Zellaktivierungstranskripten in Allotransplantaten zu hemmen. Diese Daten stimmen mit denen aus unseren in vitro Studien überein, welche zeigen, dass MR1 die hemmenden Wirkungen von suboptimalen CTLA4Ig-Konzentrationen potenziert, wohingegen es alleine nur eine mäßige negative Wirkung auf die zelluläre Proliferation in gemischten allogenen Leukozytenreaktionen ausübt.

Referenzbeispiel 3

[0132] Dieses Beispiel zeigt die Verlängerung des Überlebens von murinen Hautallotransplantaten bei C3H/HeJ-Mäusen, welche Haut-Allotransplantate in voller Dicke von BALB/c-Mäusen erhielten.

Verfahren

[0133] Segmente entweder der Schwanz- oder Ohrhaut, jeweils in der vollen Dicke, von etwa 1 cm^2 wurden auf die posterior-laterale Thorakalwand von Empfängermäusen transplantiert und mit einem umlaufenden Bandaid® in Position gehalten. Die Transplantate wurden anschließend täglich durch Inaugenscheinnahme untersucht. Die Abstoßung wurde definiert als vollständiger Verlust des sichtbaren epidermalen Transplantatgewebes. Die Behandlungsprotokolle für MR1 und CTLA4Ig waren so, wie in [Fig. 1](#) für die Herztransplantatempfänger beschrieben. CyA (Sandoz, East Hanover, NJ) wurde 14 Tage lang in einer Konzentration von 50 mg/ml mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/Std. (~20 mg/kg/Tag) mittels einer osmotischen Pumpe (Alzet Model Nr. 2002, Alza, Palo Alto, CA), welche während der Hauttransplantation subkutan im Rückenbereich des Empfängers implantiert worden war und an Tag 21 nach der Transplantation entfernt wurde, verabreicht (Pereira, G. M., Miller, J. F. & Shevach, E. M., *J. Immunol.* 144, 2109–2116 (1990)). Nach dem Töten der Tiere wurden die Hauttransplantate ausgeschnitten, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Gewebeschnitte (5 mm) wurden mit Hematoxylin-Eosin gefärbt.

[0134] [Fig. 4A](#) zeigt, dass C3H/HeJ-Empfänger, welche entweder mit MR1 alleine (MÜZ = 13 Tage, n = 5) oder CTLA4Ig alleine (MÜZ = 12 Tage, n = 7) behandelt worden waren, BALB/c-Hauttransplantate bei vollständig unterschiedlichen MHCs mit der gleichen Rate abstoßen wie eine unbehandelte Kontrollgruppe (MÜZ = 13 Tage, n = 5). Wurden hingegen MR1 und CTLA4Ig zusammen in dem perioperativen Zeitraum verabreicht, zeigten die Allotransplantate ein deutlich verlängertes Überleben (MÜZ > 50, n = 15).

[0135] Wie in [Fig. 4B](#) gezeigt, wurde bei Mäusen, welche mit CyA alleine (MÜZ = 30 Tage, n = 4), CyA plus CTLA4Ig (MÜZ = 30 Tage, n = 5) oder CyA und MR1 (MÜZ = 32 Tage, n = 4) eine ähnlich gemäßigte Verlängerung des Überlebens des Hauttransplantats beobachtet. Überraschenderweise wurde die heilsame Wirkung von CTLA4Ig MR1 auf das Überleben des Hauttransplantats durch eine gleichzeitige Cyclosporin-Verabreichung (MÜZ = 34 Tage, n = 4) aufgehoben.

[0136] In [Fig. 4C](#) waren die C3H-Empfänger der BALB/c-Hauttransplantate nicht behandelt (MÜZ = 10 Tage, n = 3) oder mit MR1 (MÜZ = 13 Tage, n = 3), YTS191.1 (MÜZ = 14 Tage, n = 6), YTS191.1 und MR1 (MÜZ = 16 Tage, n = 6), YTS191.1 und CTLA4Ig (MÜZ = 19 Tage, n = 5) oder CTLA4Ig und MR1 (MÜZ > 50 Tage, n = 22) behandelt worden. Somit wurden mehr als 53 Mäuse mit CTLA4Ig/MR1 behandelt. Davon starben zwei, an Tag 13 und 21. Alle anderen blieben während der Versuche gesund, ohne ein Zeichen von Gewichtsverlust, Infektion oder Krankheit.

[0137] Das gesunde Aussehen eines BALB/c-Hauttransplantats auf einem CTLA4Ig/MR1-behandelten C3H/HeJ-Empfänger an Tag 50 nach der Transplantation ([Fig. 4D](#)) steht im starken Gegensatz zu einem Kontroll-Allotransplantat, das abgestoßen wird ([Fig. 4E](#)). Auf mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten zeigte das angenommene Transplantat 100 Tage nach der Transplantation eine gut erhaltene Epidermis, Haarfollikel und Adnexstrukturen ([Fig. 4F](#)), was im Gegensatz zu einem BALB/c-Hauttransplantat auf einem unbehandelten C3H/HeJ-Empfänger, 8 Tage nach der Transplantation steht, welches eine ausgedehnte Lymphozyteneinwanderung zeigte ([Fig. 4G](#)).

Diskussion

[0138] Die Wirkungen von CTLA4Ig und MR1, alleine und in Kombination, auf das Überleben von primären Hautallotransplantaten in Mäusen wurde untersucht ([Fig. 4](#)). Als Vergleich wurden Empfänger auch mit CyA alleine oder CyA in Kombination mit entweder CTLA4Ig oder MR1 behandelt. C3H/HeJ-Empfänger, welche

entweder mit MR1 alleine oder mit CTLA4Ig alleine behandelt worden waren, stießen die BALB/c-Hauttransplantate mit grundverschiedenen MHCs genauso schnell ab wie unbehandelte Kontrollen ([Fig. 4A](#)).

[0139] Mäuse, die mit CyA alleine, CyA plus CTLA4Ig oder CyA und MR1 behandelt worden waren, zeigten alle ein mäßig verlängertes Überleben des Hauttransplantats ([Fig. 4B](#)). All diese Allotransplantate wurden jedoch letztlich ohne sichtbare Wirkung zwischen einem der Wirkstoffe und CyA abgestoßen.

[0140] Um die Fähigkeit der CD40/CD28-Blockierung zur Unterbrechung der Alloimmunantworten gründlich zu testen, wurden die Wirkungen einer perioperativen Behandlung mit CTLA4Ig und MR1, alleine oder in Kombination, auf das Überleben von primären Hauttransplantaten in Mäusen untersucht. Zum Vergleich wurden die Empfänger auch mit CyA, einem Anti-CD4 mAb YTS191.1 oder einem dieser Mittel kombiniert mit CTLA4Ig oder MR1, behandelt ([Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#)). C3H/HeJ-Empfänger, welche entweder mit MR1, CTLA4Ig oder YTS191.1 alleine behandelt worden waren, stießen vollständig MHC-disparate BALB/c-Hauttransplantate mit im Wesentlichen der gleichen Geschwindigkeit ab wie unbehandelte Kontrollen ([Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#)). Mäuse, die mit YTS191.1 und MR1, YTS191.1 und CTLA4Ig, CyA alleine, CyA plus CTLA4Ig oder CyA und MR1 behandelt worden waren, zeigten ein gemäßigt verlängertes Überleben des Hauttransplantats ([Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#)). All diese Allotransplantate wurden jedoch letztlich abgestoßen.

[0141] Im Gegensatz dazu zeigten Hautallotransplantate auf Empfängern, welche im perioperativen Zeitraum sowohl mit MR1 als auch CTLA4Ig behandelt worden waren, ein deutlich verlängertes Überleben. Die visuelle Untersuchung dieser Allotransplantate an Tag 50 nach der Transplantation ergab, dass die Transplantate ein gesundes Aussehen hatten, gut vaskularisiert waren, weich waren und kurze weiße Haare aufwiesen ([Fig. 4D](#)). In der histologischen Untersuchung zeigten die angenommenen Transplantate eine gut erhaltene Epidermis, Haarfollikel und Adnexstrukturen ([Fig. 4F](#)). Überraschenderweise wurde die heilsame Wirkung von CTLA4Ig/MR1 auf das Überleben von Hauttransplantaten durch die gleichzeitige Verabreichung von Cyclosporin aufgehoben ([Fig. 4B](#)).

[0142] Die bemerkenswerte Stärke dieser Wirkung war am deutlichsten in dem Modell des primären Haut-Allotransplantats erkennbar. Weder CTLA4Ig noch MR1 alleine oder zusammen mit CyA verlängerten das Überleben von Hautallotransplantaten wesentlich. Nur die Kombination aus CTLA4Ig und MR1 führte zu einem 50 Tage übersteigenden Überleben von Hautallotransplantaten mit vollständig zueinander inkompatiblen MHCs. Eine ähnliche Verlängerung in diesem stringenten Test zur Hemmung der Alloimmunantwort wurde zuvor nur mit Methoden beobachtet, die auf einem weitgehenden cytoablativen und/oder hämatopoetischen Chimärismus beruhen. (Mayumi, H. & Good, R. A., *J. Exp. Med.* 169, 213–238 (1990); Ilstad, S. T. & Sachs, D. H., *Nature* 307, 168–170 (1984); Ilstad, S. T., et al., *J. Exp. Med.* 162, 231–44 (1985); Cobbold, S. P., Martin, G., et al., *Nature* 323, 164–166 (1986); Qin, S., et al., *Science* 259, 974–977 (1993)).

Referenzbeispiel 4

[0143] Um die Wirkung der Blockierung der CD28- und CD40-Signalwege auf die T-Zell-Proliferation zu erforschen, wurde die Reaktion von primären allogen gemischten Leukozyten mit T-Zellen sowohl von lek-beschränkten Tauben-Cytochrom C-reaktiven (pcc-TCRTg) und Ld-alloreaktiven (2C) T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen (REF HED und LOH) untersucht. CTLA4Ig, ein Fusionsprotein, welches an die Liganden für CD28 bindet, und sein Homolog CTLA4 hemmten wirksam die Proliferation aller drei T-Zell-Populationen ([Fig. 5A](#)).

[0144] Im Gegensatz dazu wurde durch die Blockierung des CD40-Signalwegs mit dem anti-gp39-Hamster-mAb, MR1, die Proliferation von C3H/HeJ-T-Zellen, welche auf BALB/c-Dendritenzellen reagieren, mäßig (~50%) und die Reaktion von pcc-TCRTg-T-Zellen mit Cytochrom C stark inhibiert (~85%); es wurden jedoch vernachlässigbare Wirkungen auf die Proliferation von 2C-T-Zellen, welche auf Ld-haltige BALB/c-Dendritenzellen reagieren, beobachtet ([Fig. 5A](#)).

[0145] Ferner hemmte das gleichzeitige Blockieren mit diesen Mitteln die T-Zell-Proliferation in kooperativer Weise in allogenen gemischten Leukozytenreaktionen und pcc-TCRTg-T-Zellen, wohingegen MR1 keine Wirkung oder einen leichten Anstieg der Proliferation auf 2C-T-Zellen zeigte, wenn es mit CTLA4Ig kombiniert wurde ([Fig. 5A](#)). Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht alle T-Zellen von dem CD40-Signal für die klonale Expansion abhängen, und können eine Erklärung dafür sein, warum die CD40-Blockierung nicht fähig ist, die Allotransplantatabstoßung vollständig zu hemmen.

[0146] Die Wirkung der CD28- und CD40-Blockierung auf die T-Zell-Antwort in vivo wurde anhand von C3H/HeJ (H-2K, MMTV-7-) Mäusen ermittelt, welche mit DBA/2 (H-2d, MMTV-7+) Splenozyten in ihre Fußflä-

chen immunisiert worden waren. Fünf Tage nach der Immunisierung zeigten die drainierenden Kniekehlenlymphknoten in Kontrollmäusen, welche mit humanem IgG behandelt worden waren, eine 4–6-fache Gewichtszunahme ([Fig. 5B](#)). Diese wurde von einer 30-fachen Expansion der Anzahl von MMTV-7 Superantigen-reaktiver Vb + CD + 4 T-Zellen und einem > 90-fachen Anstieg der Anzahl von Vb + CD + T-Zell-Blastozyten in den Kniekehlenlymphknoten begleitet. Alleine hemmten CTLA4Ig oder MR1 diese Antworten teilweise. Hingegen blieb durch die Kombination aus CTLA4Ig/MR1 im Wesentlichen der Anstieg der Lymphknotengröße und die Expansion der Blastogenese von Vb + CD4 + T-Zellen aus ([Fig. 56](#)).

[0147] Diese Daten zeigen, dass die gleichzeitige Blockierung der CD28- und CD40-Signalwege die komplexen T-abhängigen Immunantworten in vitro und in vivo hemmen.

Referenzbeispiel 5 (aber Erfindungsbeispiel, insoweit es Herztransplantate betrifft)

[0148] Dieses Beispiel zeigt, dass die gleichzeitige Blockierung der CD28- und CD40-Wege eine deutliche Hemmung sowohl der zellulären als auch der Antikörperantwort auf ein Xenoantigen und eine Langzeitannahme von xenogenen (Ratte zu Maus) Herz- und Hauttransplantaten bewirkt, ohne dass eine cytoablativen konditionierende Therapie erforderlich wäre.

Verfahren

Lymphknotenassay

[0149] Männliche C3H-Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) wurde mit 2×10^6 bestrahlten Splenozyten (2000 RADS) männlicher Sprague-Dawley-(Harlan, Indianapolis, IN)Ratten in 50 µl steriler normaler Kochsalzlösung in die linke Pfotenfläche und 50 µl einer sterilen normalen Kochsalzlösung in die rechte Pfotenfläche immunisiert und dann intraperitoneal (i. p.) mit MR1 (500 µg), CTLA4Ig (500 µg) oder beiden Reagenzien (jeweils 500 µg) an den Tagen 0, 2 und 4 behandelt. An Tag 5 wurden die Kniekehlenlymphknoten entfernt, ausgewogen und dann auseinandergezogen und gewaschen, bevor sie wieder in 600 µl RPMI 1640 mit 10% FBS (Mediatech, Herndon, VA) suspendiert wurden. Jeder resuspendierte Knoten wurde dann in vier gleiche Aliquote (jeweils 150 µl) geteilt. Drei dieser Aliquote wurden in eine 96-Well-Platte ausplattiert. Die Inkorporation von ^3H -Thymidin (1 µCi/well) (Amersham, Arlington Heights, IL) wurde 24 Stunden nach der Inkubation bei 37°C gemessen. Die Ergebnisse für jedes einzelne Tier ergaben den Durchschnitt der drei Wells pro Knoten. Das vierte Aliquot wurde 24 Stunden bei 37°C inkubiert und diente als Ausgangsmaterial für den Überstand für die Cytokinanalyse durch ELISA. Jeder Punkt auf den Kurven stellt den Mittelwert ± Standardabweichung von 5 Mäusen pro Gruppe dar. Die Versuche wurden mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Cytokin-ELISA

[0150] Es wurden Sandwich-ELISAs mit Antikörperpaaren durchgeführt {Anti-IL-2, Anti-IFN-Gamma, Anti-IL-2-Biotin, Anti-IL-4-Biotin, Anti-IFN-Gamma-Biotin (Pharmingen, San Diego, CA), Anti-IL4 (freundlicherweise ein Geschenk von Peter Jensen)} und Streptavidin-HRP (Pierce, Rockford, IL). Die colorimetrische Bestimmung wurde mit TMB-Substrat (Pierce) durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe eines SpectraMax-Plattenlesegeräts gesammelt und als Absorption (370 nm) +/- sem. aufgezeichnet. Standardkurven für jedes Cytosin wurden mit Hilfe rekombinanter Cytosine (rIL2, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; rIL4, R & D Systems, Minneapolis, MN; und rIFN-Gamma, Biosource International, Camarillo, CA) erzeugt.

Mäuse

[0151] Männliche C3H/HeJ-(H-2k-) und DBA/2-(H-2d-)Mäuse und Sprague-Dawley-Ratten wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) gekauft und im Alter von 8 bis 12 Wochen eingesetzt.

Herztransplantation

[0152] C3H/HeJ- oder DBA-Mäuse wurden mit primär vaskularisierten Herzenotransplantaten aus Sprague-Dawley-Ratten transplantiert und hinsichtlich einer Abstoßung beobachtet, wie beschrieben in Larsen C. P., Alexander D. Z., Hollenbaugh D., et al., *Transplantation*, 61(1): 4–9 (1996) und Corry R. J., Winn H. J., Russell P. S., *Transplantation*, 16(4): 343–350 (1973). Empfänger wurden mit 500 mg CTLA4Ig zusammen mit 500 mg MR1 an Tag 0, 2, 4 und 6 behandelt. Die Kontrollgruppen enthielten Empfänger, welche mit CTLA4Ig alleine, MR1 alleine oder humanem Ig behandelt worden waren. In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte (5 µm) wurden mit Masson's Trichrome oder Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die histologischen Schnitte wurden von

einem Herztransplantationspathologen (KJW) im Blindtest, d. h. ohne Kenntnis der Behandlung, untersucht.

Hauttransplantation

[0153] Hauttransplantate in voller Dicke ($\sim 1 \text{ cm}^2$) aus Sprague-Dawley-Ratten wurden auf den dorsalen Thorax von C3H-Empfängermausen transplantiert und das Überleben anschließend durch tägliche visuelle Untersuchung beobachtet. Die Abstoßung war definiert als vollständiger Verlust des sichtbaren epidermalen transplantierten Gewebes. Kontrollgruppen enthielten Empfänger, welche behandelt waren mit: CTLA4Ig alleine, MR1 alleine und humanem Ig. Zwei zusätzliche Mäuse in jeder Versuchsgruppe wurden an Tag 20 nach der Transplantation zur histologischen Untersuchung getötet.

Xenoantikörper-Assay

[0154] Serum wurde durch eine Blutentnahme am Schwanz von betäubten Tieren gewonnen. Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten von Sprague-Dawley-Ratten wurden als Zielzellen verwendet und mit dem Serum von Empfängermausen 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und die IgG-Xenoantikörper mit Esel-anti-Maus-IgG-Biotin (Jackson, ImmunoResearch, West Grove, PA) und anschließend mit Streptavidin-PE (Southern Biotech, Birmingham, AL) nachgewiesen. Die Zellen wurden auf einem Becton-Dickinson-FACscan mit Hilfe der Cellquest-Software analysiert.

Ergebnisse

[0155] Als ersten Ansatz zur Bestimmung der Wirkung der CD28- und CD40-Blockierung auf Antworten auf eine xenoantigene Reizung *in vivo* wurde Kniekehlenlymphknoten-Assay verwendet, wie beschrieben in Larsen C. P., Elwood E. T., Alexander D. Z., et al., *Nature*, 381: 434–438 (1996). C3H/HeJ-(H-2k)-Mäusen wurden bestrahlte Splenozyten aus Sprague-Dawley(SD)-Ratten injiziert. Fünf Tage nach der Pfotenflächenimmunisierung zeigten die drainierenden Kniekehlenlymphknoten von Kontrollmäusen, welche mit humanem IgG behandelt worden waren, eine 5,2-fache Gewichtszunahme im Vergleich zu dem kontralateralen Knoten, welcher mit steriler Kochsalzlösung beimpft worden war ([Fig. 6A](#)). CTLA4Ig hemmte die Ausdehnung des Knoten teilweise. In ähnlicher Weise hemmte MR1 diese Antwort teilweise. Im Gegensatz dazu blieb bei Verwenden der Kombination aus CTLA4Ig/MR1 die Xenoantigen-induzierte Lymphknotenausdehnung im Wesentlichen aus ([Fig. 6A](#)).

[0156] Es wurde dann die *ex vivo* Proliferation von Lymphknotenzellen aus verschiedenen Gruppen Xenoantigen-gepräpter Mäuse verglichen. Während jede Behandlung für sich allein nur zu einer teilweisen Blockierung der Proliferation führte ([Fig. 6B](#)), blieb bei der Kombination aus CTLA4Ig/MR1 die proliferative Antwort im Wesentlichen aus (302 \pm 235 CPM für die Kombination gegenüber 143 \pm 145 für normale, nicht-stimulierte Knoten). Ferner unterdrückte die Kombinationstherapie die Th1-Cytokine (IL-2 und IFNg) deutlich auf den Wert der normalen, nicht-stimulierten Zellen ([Fig. 6C](#) und [Fig. 6D](#)). Der Spiegel des Th2-Cytokins IL-4 lag in allen Proben unter dem Nachweispiegel.

[0157] Es ist wichtig festzuhalten, dass diese starke Immunmodulation nicht auf den Verlust von Zellen zurückgeht. Eine flusszytometrische Untersuchung des peripheren Bluts von behandelten Mäusen zeigte keinen Verlust von CD4+- oder CD8+-T-Zellen, B-Zellen oder NK-Zellen. Diese Daten sind das Ergebnis einer Einzeluntersuchung von drei Mäusen pro Gruppe, die entweder mit CTLA4Ig oder MR1 alleine oder der Kombination dieser Mittel an Tag 0, 2, 4 und 6, wie in dem Verfahrensabschnitt beschrieben, behandelt worden waren. Das periphere Blut wurde durch Blutentnahme am Schwanz an Tag 6 und 20 gewonnen.

[0158] Die Ergebnisse der Lymphknoten-Assays sprechen dafür, dass die gleichzeitige Blockierung der B7/CD28- und CD40/gp39-Signalwege die Xenotransplantabstoßung hemmt. Um diese Hypothese zu untersuchen, haben wir ein Modell eines vaskularisierten Herzxenotransplantats mit Sprague-Dawley-Ratten als Spender und C3H/HeJ-Mäusen als Empfänger untersucht. Die Behandlung mit entweder CTLA4Ig (MÜZ = 33 Tage) oder MR1 (MÜZ = 51 Tage) alleine verlängerte das Xenotransplantatüberleben im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (MÜZ = 6 Tage) ([Fig. 7A](#)). Die Kombination von CTLA4Ig/MR1 verlängerte das Überleben jedoch deutlich (MÜZ = 104,5 Tage).

[0159] In der histologischen Untersuchung an Tag 20 nach der Transplantation zeigten die Xenotransplantate, welche mit entweder CTLA4Ig alleine ([Fig. 7C](#)) oder MR1 alleine ([Fig. 7D](#)) behandelt worden waren, eine starke Lymphozyteninwanderung mit Anzeichen von Myozytenzerstörung und Vasculopathie, was einer gemäßigt bis schweren Zellabstoßung entspricht. Im scharfen Gegensatz dazu zeigten die Xenotransplantate von

Empfängern, die mit CTLA4Ig/MR1 behandelt worden waren, im Wesentlichen keine Lymphozyteneinwanderung, interstitielle Fibrose und Intima-Läsionen der Koronararterien ([Fig. 7F](#)). Die CTLA4Ig/MR1-behandelten Herz xenotransplantate zeigten an Tag 122 eine ausgezeichnete Erhaltung sowohl der Muskelzell- als auch Gefäßstrukturen ([Fig. 7G](#)). Unbehandelte Xenotransplantate zeigten an Tag 6 eine weit verbreitete Gewebezerstörung ([Fig. 7E](#)). Ein normales nichttransplantiertes Herz einer Sprague-Dawley-Ratte ist in [Fig. 7E](#) gezeigt.

[0160] Als stringenter Test für die Fähigkeit der CD40/CD28-Blockierung, die xenogenen Immunantworten zu hemmen, wurde die Wirkung einer Kurzzeitblockierung von CD28 und/oder CD40 auf das Überleben von primären Haut xenotransplantaten in Mäusen untersucht.

[0161] C3H-Empfänger, die entweder mit MR1 (MÜZ = 11,5 Tage, n = 4) oder CTLA4Ig (MÜZ = 12 Tage, n = 4) alleine behandelt worden waren, stießen Hauttransplantate aus Sprague-Dawley-Ratten, die über die gesamte Dicke der Haut reichten, genauso schnell ab wie unbehandelte Kontrollen (unbehandelte Kontrollen: MÜZ = 11,5 Tage, n = 8) ([Fig. 8A](#)). Im Gegensatz dazu zeigten die Haut xenotransplantate auf Empfängern, welche gleichzeitig mit MR1 und CTLA4Ig im perioperativen Zeitraum behandelt worden waren, ein deutlich längeres Überleben (MÜZ = 53 Tage, n = 25) ([Fig. 8A](#)). Insgesamt 25 Mäuse erhielten Xenotransplantate und eine Behandlung mit CTLA4Ig/MR1. Mit Ausnahme einer Maus, welche an Tag 4 starb, blieben alle anderen während des gesamten Experiments gesund, ohne Anzeichen von Gewichtsverlust, Infektionen oder Krankheiten.

[0162] Die chronische Behandlung (mit der nach dem üblichen 4-Dosis-Schema begonnen wurde) mit entweder der CTLA4Ig/MR1-Kombination (500 µg beider Mittel wöchentlich bis zu Tag 100 oder bis zur Abstoßung, je nachdem, was zuerst eintrat) oder MR1 (500 µg MR1 wöchentlich bis zu Tag 100 oder bis zur Abstoßung) führte zu keiner wesentlichen Veränderung des Xenotransplantatüberlebens ([Fig. 8B](#)).

[0163] Das Xenotransplantatüberleben nach der gleichzeitigen MR1/CTLA4Ig-Therapie betrug 52% beziehungsweise 21% an Tag 50 beziehungsweise 100. Die an Tag 50 ([Fig. 8E](#)) und 100 ([Fig. 8C](#)) nach der Transplantation überlebenden Xenotransplantate hatten ein gesundes Aussehen und zeigten eine gut erhaltene histologische Struktur. In unbehandelten Kontrollen ohne die Kombinationstherapie trat die Abstoßung sofort ein und diese Xenotransplantate zeigten deutliche entzündliche Infiltrate ([Fig. 8D](#) und [Fig. 8F](#)).

[0164] Ein ähnlich verlängertes Überleben von Sprague-Dawley-Haut xenotransplantaten wurde auch bei DBA[H-2d] Empfängern (unbehandelte Kontrollen MÜZ = 14 Tage (n = 5) gegenüber CTLA4Ig/MR1: MÜZ = 86 Tage, n = 5) beobachtet, was dafür spricht, dass die starke Wirkung der Kombinationsbehandlung nicht auf einen einzigen Empfängermausstamm beschränkt ist.

[0165] Der fortschreitende Verlust von Haut xenotransplantaten zwischen Tag 25 und Tag 75 nach der Transplantation lässt vermuten, dass das späte Versagen des Transplantats auf die subtherapeutischen Konzentrationen von CTLA4Ig und/oder MR1 zurückzuführen sein könnte. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Mäuse 100 Tage, oder bis das Transplantat versagte, nach dem üblichen 4-Dosis-Kombinationsschema wöchentlich entweder mit der CTLA4Ig/MR1-Kombination oder mit MR1 alleine behandelt. Keine dieser chronischen Therapiestrategien verbesserte das Überleben der Haut xenotransplantate merklich, was dafür spricht, dass das Versagen des Transplantats bei CTLA4Ig/MR1-behandelten Mäusen auf andere Faktoren zurückzuführen ist als die unpassenden Wirkstofffilter und dass alternative Signalwege, die nicht vollständig durch CTLA4Ig/MR1 gehemmt werden, für den subakuten Xenotransplantatverlust wichtig sein können.

[0166] Zusätzlich zu zell-vermittelten Effektormechanismen können hervorgerufene Xenoantikörperantworten eine wichtige Rolle bei der beschleunigten vaskulären Abstoßung konkordanter Xenotransplantate spielen; Aksentijevich I., Sachs D. H., Sykes M., Transplantation, 53(5): 1108–14 (1992). Um die Wirkung der gleichzeitigen Blockierung auf die hervorgerufene Xenoantikörperantwort zu untersuchen, wurden Serumproben aus C3H/HeJ-Mäusen 55 Tage nach Erhalten eines Hauttransplantats von einer Sprague-Dawley-Ratte ([Fig. 9A](#)) und 20 Tage nach Erhalten eines Herztransplantats von einer Sprague-Dawley-Ratte ([Fig. 9B](#)) auf Anti-Ratten-Antikörper untersucht. Die Behandlung mit entweder CTLA4Ig oder MR1 alleine verringerte die IgG-Antikörperantwort, wohingegen durch die gleichzeitige kombinierte CD28/CD40-Blockierung die hervorgerufene Antikörperantwort gegen Rattenxenoantigene im Wesentlichen nicht auftrat. Daher könnte die Inhibierung sowohl der T-Zell-Aktivierung als auch der Antikörperproduktion funktional wichtig für das Überleben von Xenotransplantaten nach der gleichzeitigen Blockierung der B7/CD28- und CD40/gp39-Signalwege sein.

Diskussion

[0167] Die kombinierte Blockierung der CD28- und CD40-Signalwege hemmt deutlich die Immunantwort auf das Xenoantigen. Die Stärke dieser Kombinationstherapie wurde insbesondere deutlich an dem Modell des primären Hautxenotransplantats gezeigt. Keines der Mittel alleine verlängerte das Überleben des Hautxenotransplantats, während im Gegensatz dazu die gleichzeitige Kombination aus CTLA4Ig und MR1 in kooperativer Weise die Xenotransplantatabstoßung hemmte. Die Einzigartigkeit dieser Beobachtung liegt in der Stringenz des Hauttransplantatmodells, da zuvor gezeigt worden ist, dass CTLA4Ig alleine das Überleben von xenogenen Pankreasinseln in einem Mausmodell verlängert; Lenschow D., Zeng Y., Thistlethwaite J., et al., *Science*, 257: 789–792 (1992). Ein Langzeitüberleben von xenogenen Hauttransplantaten wurde zuvor nur bei Methoden beobachtet, die auf einem drastischen cytoablativen und/oder hämatopoetischen Chimärismus beruhen; Ildstad S. T., Sachs D. H., *Nature*, 307: 168–170 (1984), Zhao Y., Swenson K., Sergio J., Arn J. S., Sachs D. H., Sykes M., *Nat. Med.*, 2(11): 1211–1216 (1996), Mayumi H., Good R. A., *J. Exp. Med.*, 169(1): 213–238 (1990), Cobbold S. P., Martin G., Zin S., Waldmann H., *Nature*, 323: 164–166 (1986), Qin S., Cobbold S., Benjamin R., Waldmann H., *J. Exp. Med.*, 169: 779–794 (1989).

[0168] Die Beobachtung, dass die gleichzeitige CD28/CD40-Blockierung das Überleben von Transplantaten deutlich verlängern kann, lässt vermuten, dass sowohl der Antikörper- als auch der Zell-vermittelte Mechanismus für die Zerstörung des Xenotransplantats wirksam durch diese Strategie gehemmt werden kann. Während die Ätiologie der akuten vaskulären Xenotransplantatabstoßung noch vollständig aufgeklärt werden muss, gibt es Belege dafür, dass sie zumindest teilweise durch die Entwicklung xenoreaktiver Antikörper verursacht wird (Cotterell A. H., Collins B. H., Parker W., Harland R. C., Platt J. L., *Transplantation*, 60(8): 861–868 (1995)). Die schnelle Zerstörung von unbehandelten Kontroll-Herz-xenotransplantaten in unserem Modell, bei Fehlen eines zellulären Infiltrats, weist auf eine Rolle der Antikörper-vermittelten Abstoßung hin. Diese Beobachtung und die anderer (Aksentijevich I., Sachs D. H., Sykes M., *Transplantation*, 53(5): 1108–14 (1992)), zusammen mit der dokumentierten dramatischen Hemmung der hervorgerufenen Xenoantikörperantwort nach der Blockade der CD28- und CD40-Signalwege ([Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#)) unterstützt die Hypothese, dass Xenoantworten ausreichend durch eine Hemmung dieser Signalwege kontrolliert werden können, so dass man nicht-cytoablativen Strategien zur Xenotransplantation in diskordanten Spezieskombinationen entwickeln kann.

[0169] Während das kombinierte Blockieren der CD28- und CD40-Signalwege die Xenotransplantatabstoßungsantwort deutlich hemmt, führte diese Blockierung in unserem Versuchssystem nicht zu einem einheitlichen unbegrenzten Überleben der Herz- oder Hauttransplantate. Die Beobachtung, dass eine längere Behandlung das Überleben des Transplantats nicht verbesserte, war überraschend. Dies weist darauf hin, dass eine ungenügende Blockierung dieser Wege nicht die Ursache für ein „spätes“ Transplantatversagen ist, und eröffnet die Möglichkeit, dass alternative Wege, wie NK-Zellen oder andere Zellen, die keine CD28/CD40-Co-stimulation benötigen, die späte Abstoßung des Xenotransplantats fördern können. Vermutungen über eine Beteiligung von NK-Zellen an der Xenotransplantatabstoßung unterstützen diese Möglichkeit; Zhao Y., Swenson K., Sergio J., Am J. S., Sachs D. H., Sykes M., *Nat. Med.*, 2(11): 1211–1216 (1996), Malyguine A. m., Saadi S., Platt J. L., Dawson J. R., *Transplantation*, 61(1): 161–164 (1996). Zudem wurde gezeigt, dass die Hemmung der Abstoßung konkordanter Herz- und Hautxenotransplantate durch die gleichzeitige Blockierung der CD40- und CD28-Signalwege mit der Vorbeugung der „späten“ Entwicklung von hervorgerufenen xenoreaktiven Antikörperreaktionen ([Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#)) assoziiert ist; die Möglichkeit, dass die Entwicklung einer Antikörperantwort mit einem verzögerten Transplantatverlust verbunden sein kann, ist nicht auszuschließen.

[0170] Die Fähigkeit einer kombinierten CTLA4Ig/MR1-Behandlung zur Blockierung der Entstehung von Transplantatvasculopathie in Herz-xenotransplantaten und zur Verlängerung des Überlebens von Hautxenotransplantaten ist von wesentlicher klinischer Relevanz. Die Verfeinerung der Techniken zur Hemmung der Wirkung von natürlichen vorgebildeten xenoreaktiven Antikörpern, in Kombination mit weiterem Studium der Blockierung der CD28- und CD40-Signalwege, verspricht die Möglichkeit wirksamer neuer Strategien zur Erleichterung der klinischen Xenotransplantation.

ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS

(PCT Regel 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben betreffen den Mikroorganismus, der in der Beschreibung auf Seite_, Zeile_ unter Bezug genommen ist.

B. ANGABEN ZUR HINTERLEGUNG

Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt angegeben

Name des Hinterlegungsinstituts:

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION

Adresse des Hinterlegungsinstituts (einschließlich Postleitzahl und Land):

12301 Parklawn Drive
Rockville, Maryland 20852
Vereinigte Staaten von Amerika

[0171]

Hinterlegungsdatum: 31. Mai 1991 Hinterlegungsnummer: 68629

B. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (falls unzutreffend, bitte frei lassen)
Fortsetzung auf einem zusätzlichen Blatt

D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für sämtliche Bestimmungsstaaten sind)

E. GESONDERTE ANGABEN (falls unzutreffend, bitte frei lassen)
Die unten gemachten Angaben werden später dem Internationalen Büro zugeleitet

Nur für das Anmeldeamt
Dieses Blatt wurde mit der internationalen Anmeldung erhalten

Bevollmächtigter Beamter: Naty Walie, Internationale Abteilung RO/US 7030305-3682

Nur für das Internationale Büro
Dieses Blatt wurde vom Internationale Büro entgegen genommen

Patentansprüche

1. Verwendung einer wirksamen Menge einer Kombination aus einem ersten löslichen Liganden, welcher die Bindung eines CTLA4-Antigens auf einer CTLA4-positiven Zelle und/oder eines CD28-Antigens auf einer CD28-positiven Zelle an ein B7-Antigen unterbindet, und einem zweiten löslichen Liganden, welcher die Bindung eines gp39-Antigens auf einer gp39-positiven Zelle an ein CD40-Antigen unterbindet, zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Hemmung einer Transplantatabstoßung, die durch CTLA4-positive, CD28-positive und gp39-positive Zellwechselwirkungen mit B7-positiven und CD40-positiven Zellen vermittelt wird, wobei das Transplantat ein primär vaskularisiertes Transplantat ist.

2. Verwendung einer wirksamen Menge einer Kombination aus einem ersten löslichen Liganden, welcher die Bindung eines CTLA4-Antigens auf einer CTLA4-positiven Zelle und/oder eines CD28-Antigens auf einer CD28-positiven Zelle an ein B7-Antigen unterbindet, und einem zweiten löslichen Liganden, welcher die Bindung eines CD40-Antigens auf einer CD40-positiven Zelle an ein gp39-Antigen unterbindet, zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Hemmung einer Transplantatabstoßung, die durch CTLA4-positive, CD28-positive und gp39-positive Zellwechselwirkungen mit B7-positiven und CD40-positiven Zellen vermittelt wird, wobei das Transplantat ein primär vaskularisiertes Transplantat ist.

3. Verwendung einer wirksamen Menge einer Kombination aus einem ersten löslichen Liganden, welcher die Bindung eines B7-Antigens auf einer B7-positiven Zelle an ein CTLA4-Antigen auf einer CTLA4-positiven Zelle und/oder ein CD28-Antigen auf einer CD28-positiven Zelle unterbindet, und einem zweiten löslichen Liganden, welcher die Bindung eines gp39-Antigens auf einer gp39-positiven Zelle an ein CD40-Antigen unterbindet, zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Hemmung einer Transplantatabstoßung, die durch CTLA4-positive, CD28-positive und gp39-positive Zellwechselwirkungen mit B7-positiven und CD40-positiven Zellen vermittelt wird, wobei das Transplantat ein primär vaskularisiertes Transplantat ist.

4. Verwendung einer wirksamen Menge einer Kombination aus einem ersten löslichen Liganden, welcher die Bindung eines B7-Antigens auf einer B7-positiven Zelle an ein CTLA4-Antigen auf einer CTLA4-positiven Zelle und/oder ein CD28-Antigen auf einer CD28-positiven Zelle unterbindet, und einem zweiten löslichen Liganden, welcher die Bindung eines CD40-Antigens auf einer CD40-positiven Zelle an ein gp39-Antigen unterbindet, zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Hemmung einer Transplantatabstoßung, die durch CTLA4-positive, CD28-positive und gp39-positive Zellwechselwirkungen mit B7-positiven und CD40-positiven Zellen vermittelt wird, wobei das Transplantat ein primär vaskularisiertes Transplantat ist.

5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei der erste lösliche Ligand, der die Bindung des CTLA4-Antigens auf der CTLA4-positiven Zelle und/oder des CD28-Antigens auf der CD28-positiven Zelle an das B7-Antigen unterbindet, ein mit CTLA4 reaktiver Antikörper, ein mit CD28 reaktiver Antikörper oder lösliches B7 ist.

6. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, wobei der erste lösliche Ligand, der die Bindung des B7-Antigens auf der B7-positiven Zelle an das CD28-Antigen auf der CD28-positiven Zelle und/oder das CTLA4-Antigen auf der CTLA4-positiven Zelle ein mit B7 reaktiver Antikörper, ein lösliches CTLA4 oder ein lösliches CD28 ist.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das lösliche CTLA4 ein rekombinantes Bindungsmolekül ist, das wenigstens einen Teil der extrazellulären Domäne von CTLA4 aufweist.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei die extrazelluläre Domäne von CTLA4 an eine nicht-CTLA4-Proteinsequenz geknüpft ist.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die nicht-CTLA4-Proteinsequenz wenigstens ein Teil eines Immunglobulinmoleküls ist.

10. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das lösliche CTLA4 ein CTLA4Ig-Fusionsprotein ist.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das CTLA4Ig-Fusionsprotein das mit ATCC 68629 bezeichnete CTLA4Ig ist.

12. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das lösliche CTLA4 ein CD28Ig/CTLA4Ig-Fusionsproteinhybrid ist.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das CD28Ig/CTLA4Ig-Fusionsproteinhybrid eine erste Aminosäuresequenz umfasst, die einem Teil der extrazellulären Domäne des CD28-Rezeptors entspricht und an eine zweite Aminosäuresequenz, die einem Teil der extrazellulären Domäne des CTLA4-Rezeptors entspricht, sowie an eine dritte Aminosäuresequenz, die den Hinge-, CH2- und CH3-Regionen von humanem Immunglobulin Cy1 entspricht, fusioniert ist.

14. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das lösliche CD28 ein rekombinantes Bindungsmolekül ist, das wenigstens einen Teil der extrazellulären Domäne von CD28 aufweist.

15. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das lösliche CD28 ein CD28Ig/CTLA4Ig-Fusionsproteinhybrid ist.

16. Verwendung nach Anspruch 1 oder 3, wobei der zweite lösliche Ligand, der die Bindung des gp39-Antigens auf der gp39-positiven Zelle an das CD40-Antigen unterbindet, ein mit gp39 reaktiver Antikörper oder lösliches CD40 ist.

17. Verwendung nach Anspruch 2 oder 4, wobei der zweite lösliche Ligand, der die Bindung des CD40-Antigens auf der CD40-positiven Zelle an das gp39-Antigen unterbindet, ein mit CD40 reaktiver Antikörper oder lösliches gp39 ist.

18. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der mit gp39 reaktive Antikörper ein monoklonaler Antikörper MR1 ist.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 18 zur Hemmung der Abstoßung von Autotransplantaten, Isotransplantaten, Allotransplantaten und Xenotransplantaten.

20. Verwendung nach Anspruch 19 zur Hemmung der chronischen Transplantatvaskulopathie.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

FIG. I

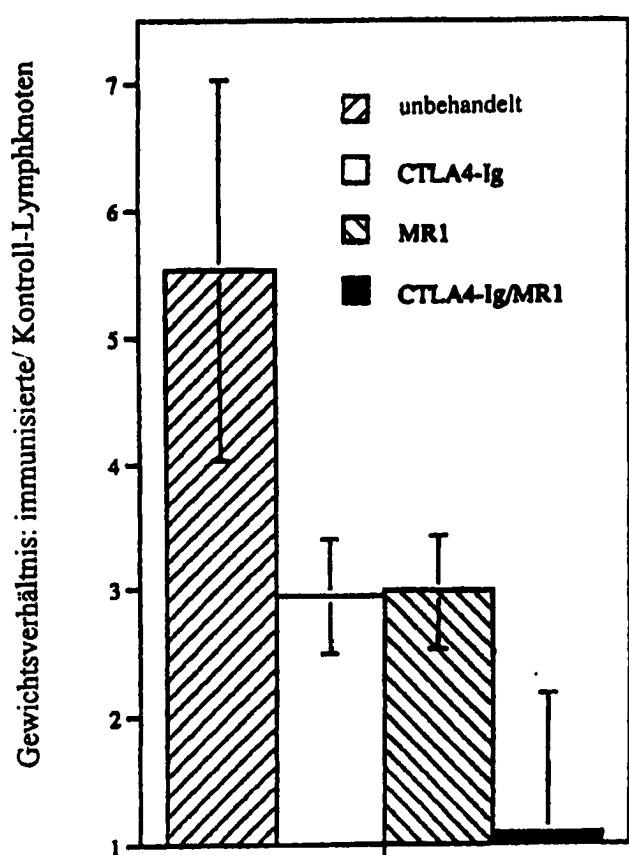


FIG. 2 A

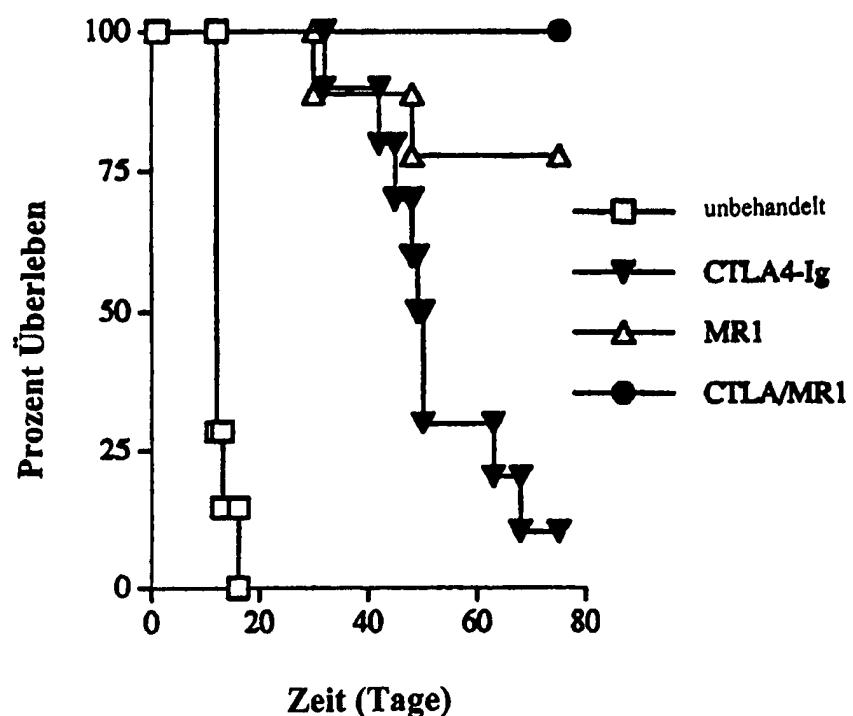
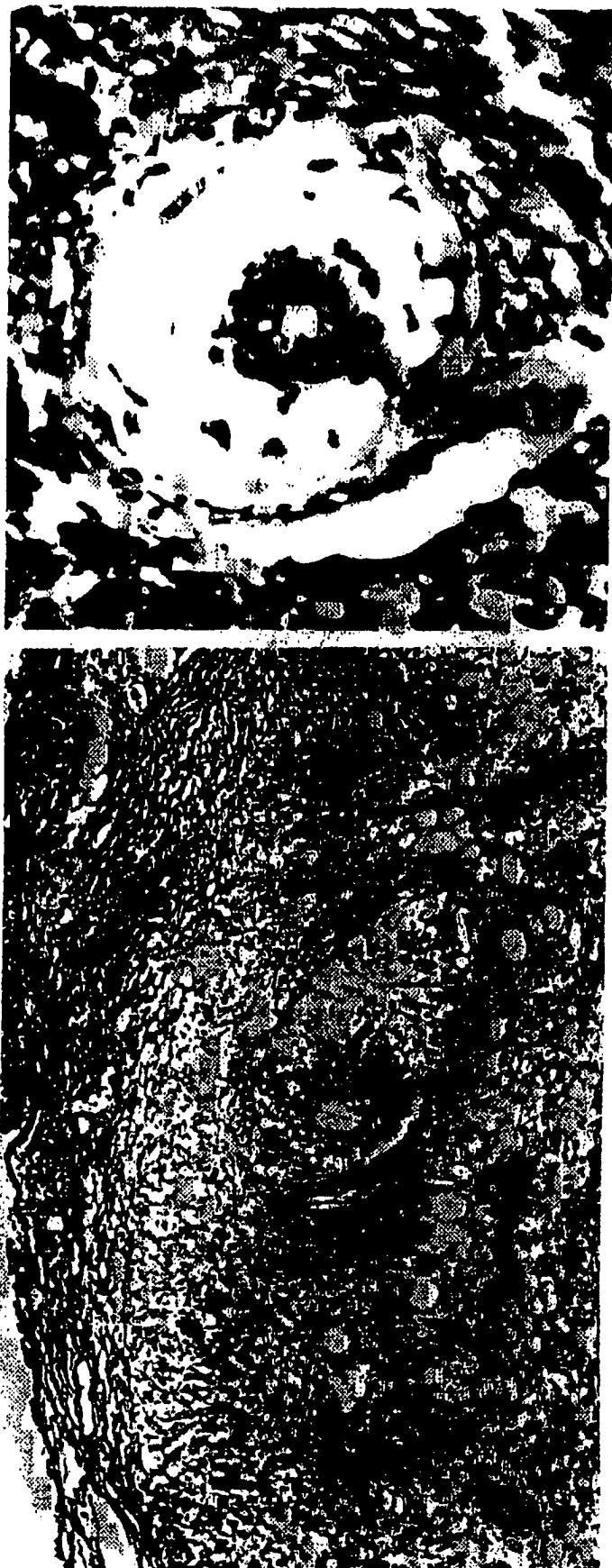


FIG. 2B



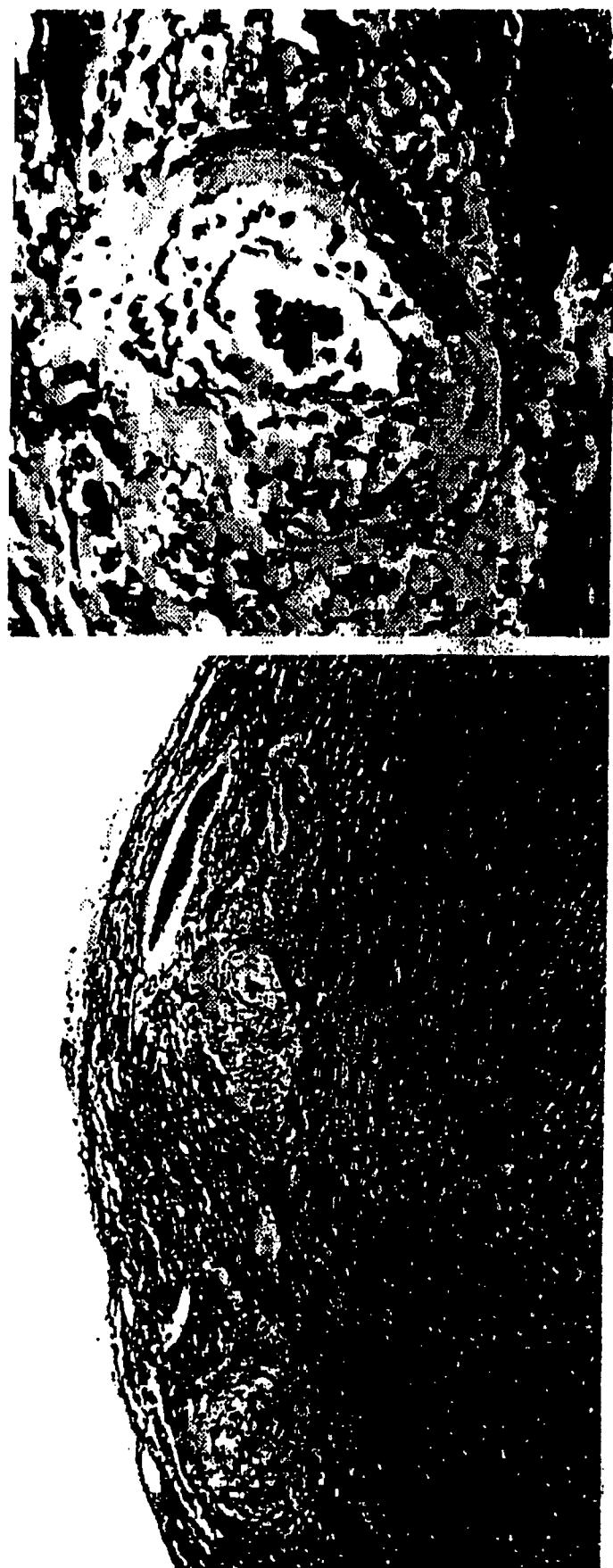
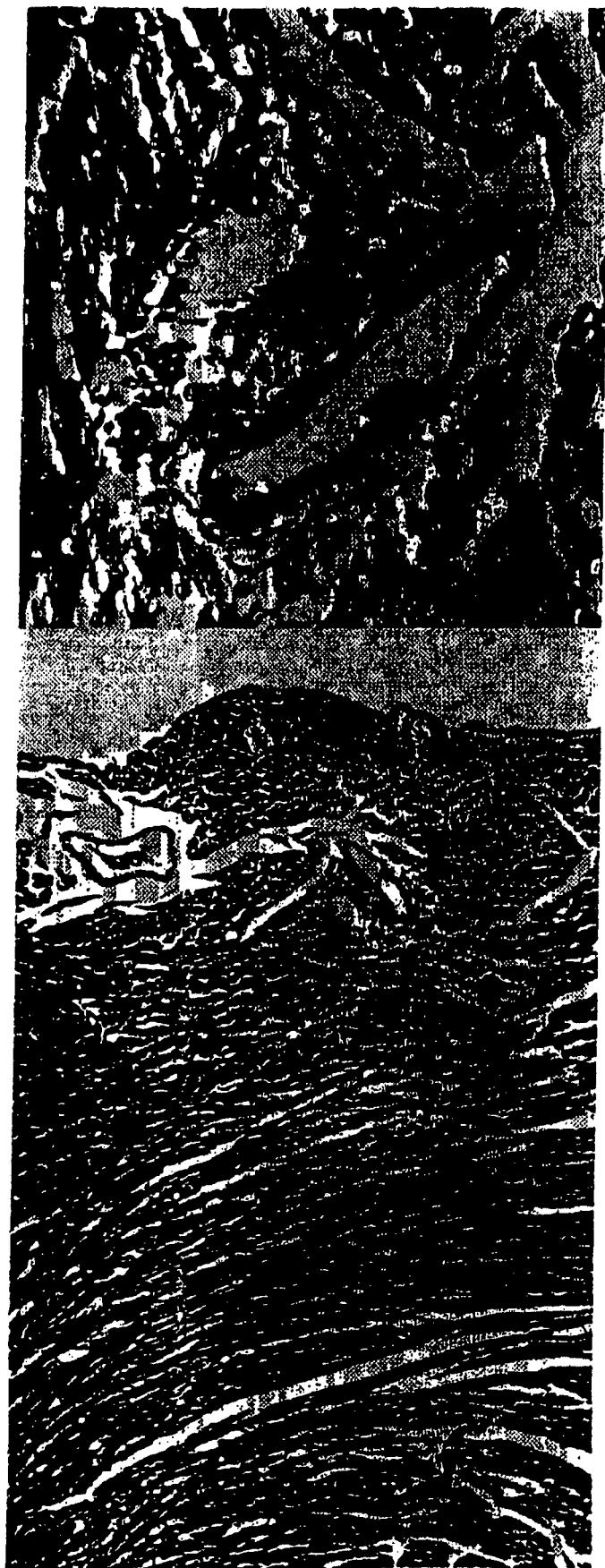


FIG. 2C

FIG. 2D



FIG. 2E



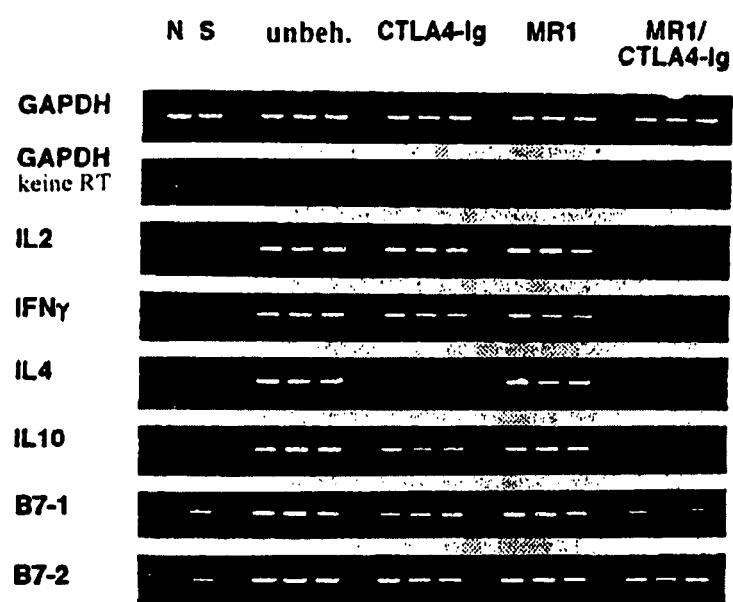


FIG. 3A

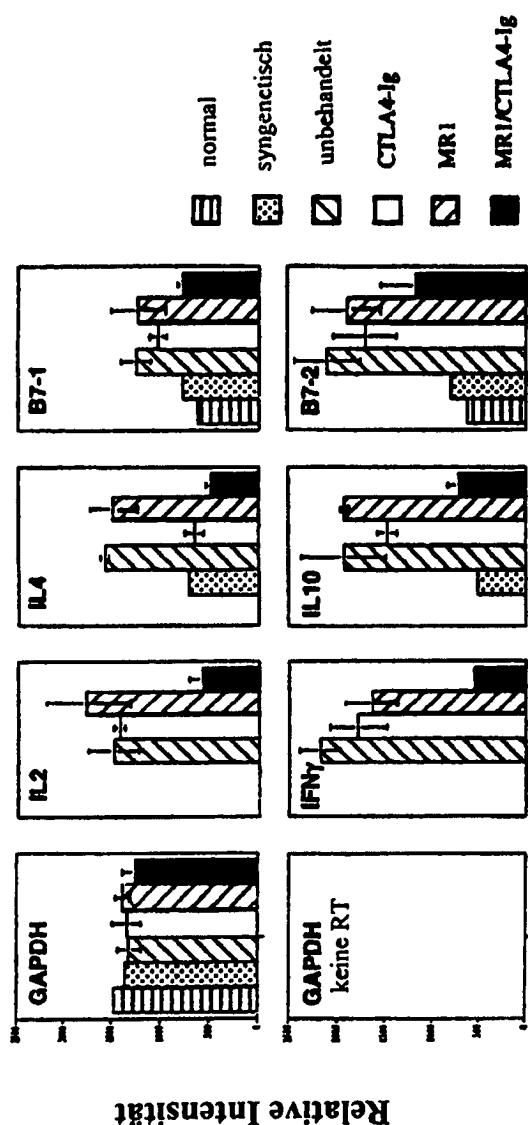


FIG. 3B

FIG. 4 A

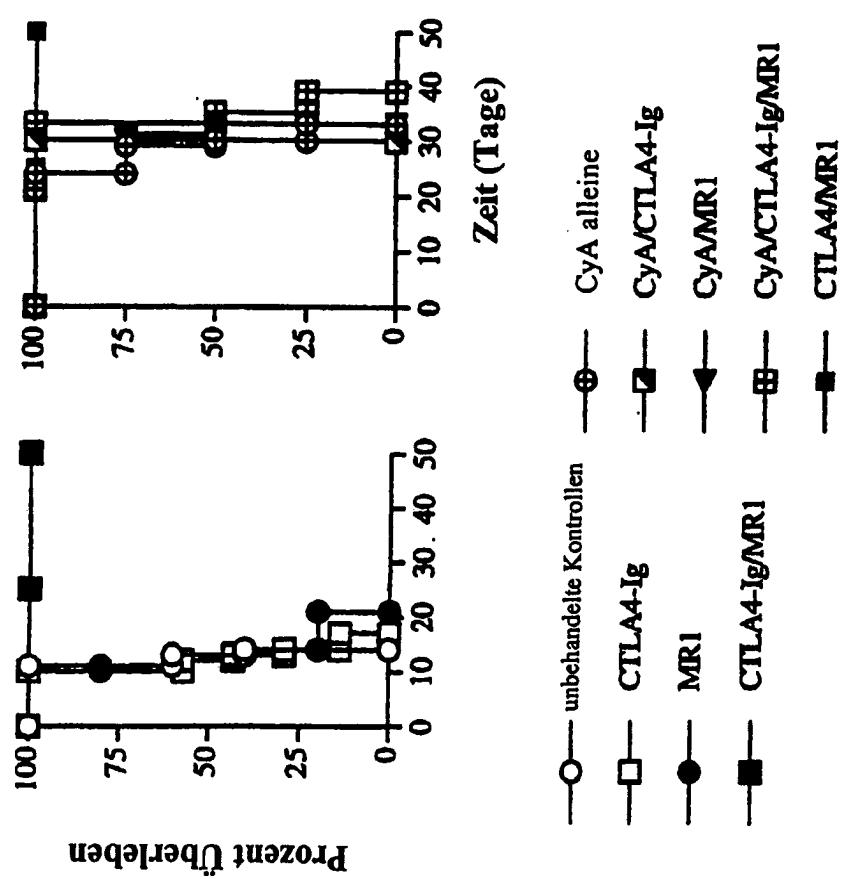


FIG. 4 B

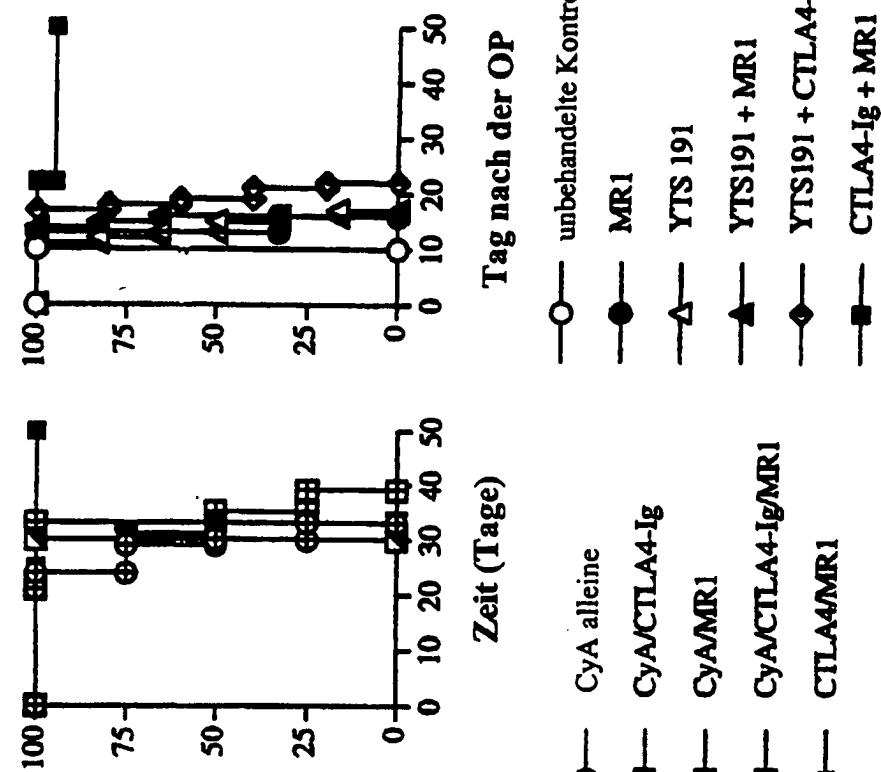
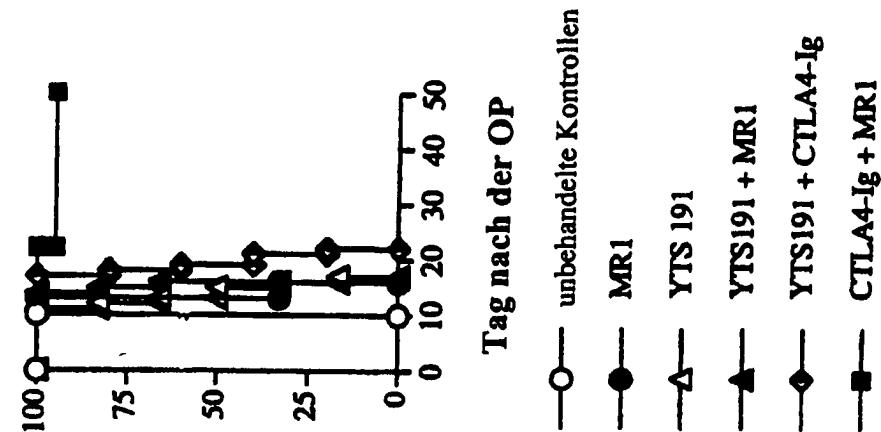


FIG. 4 C



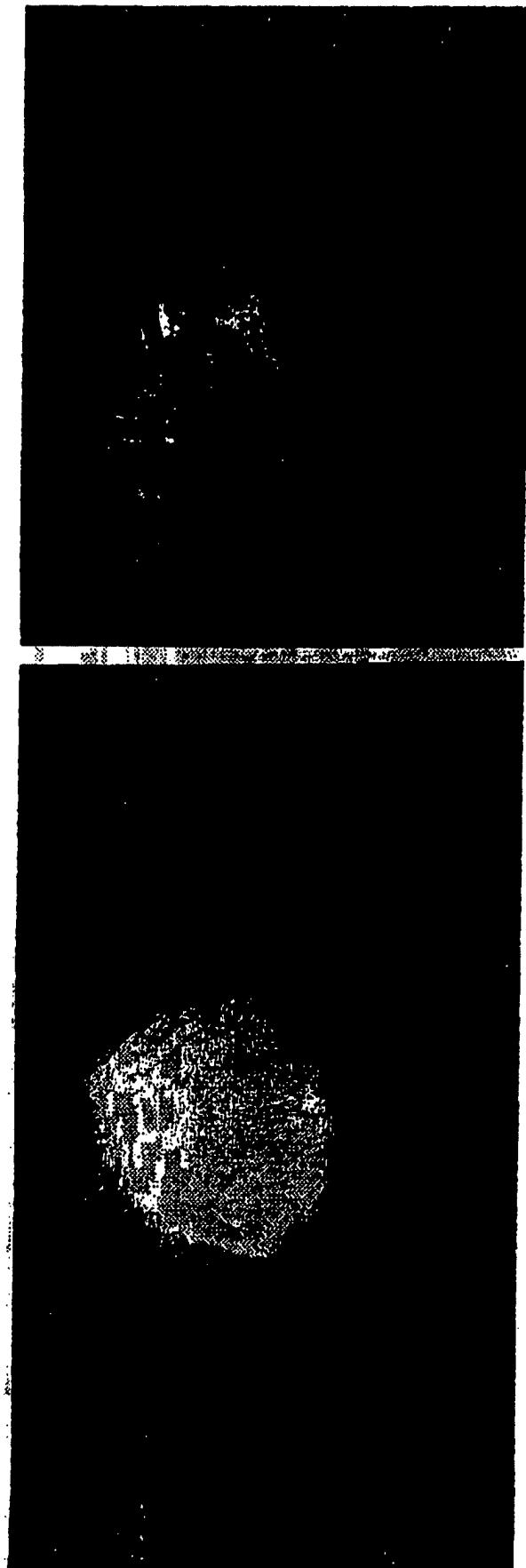


FIG. 4E
FIG. 4D

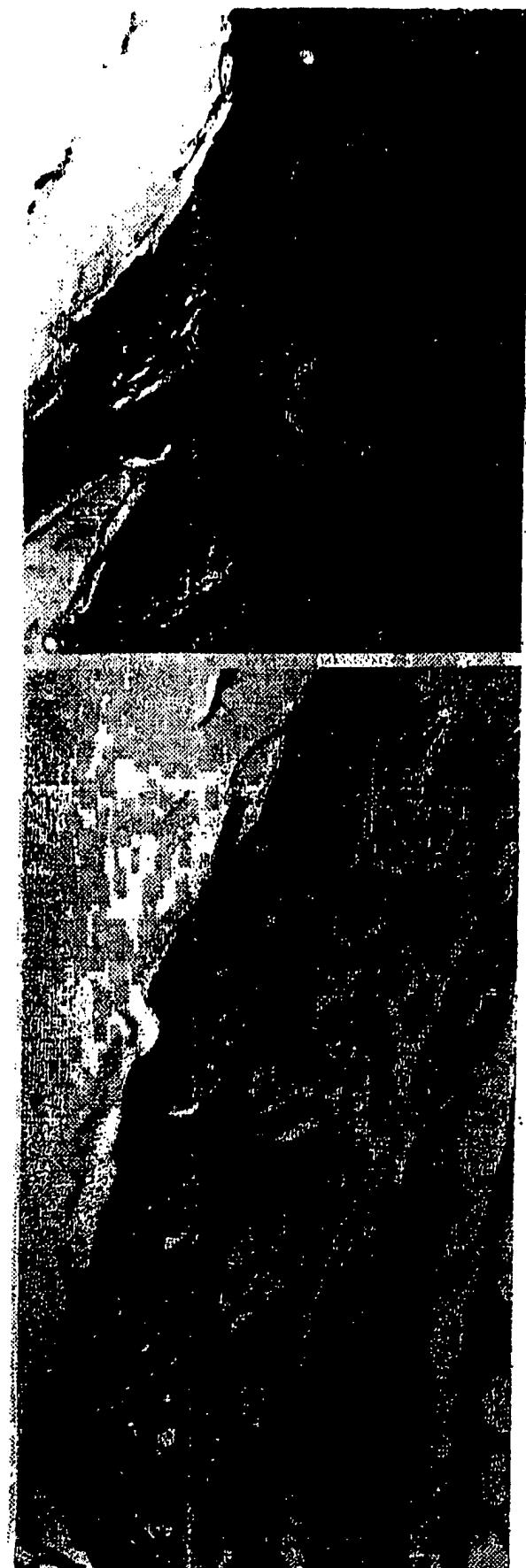


FIG. 4F
FIG. 4G

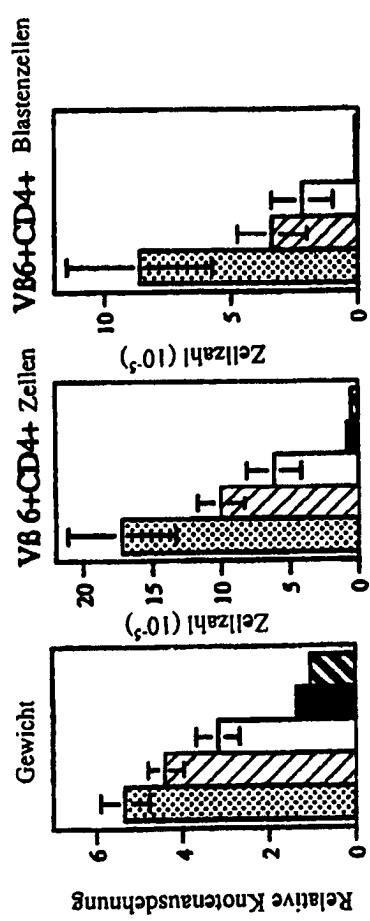
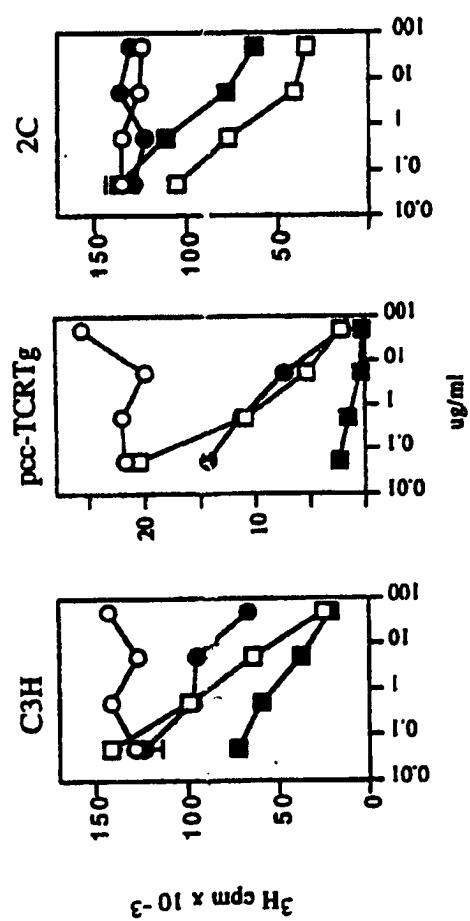
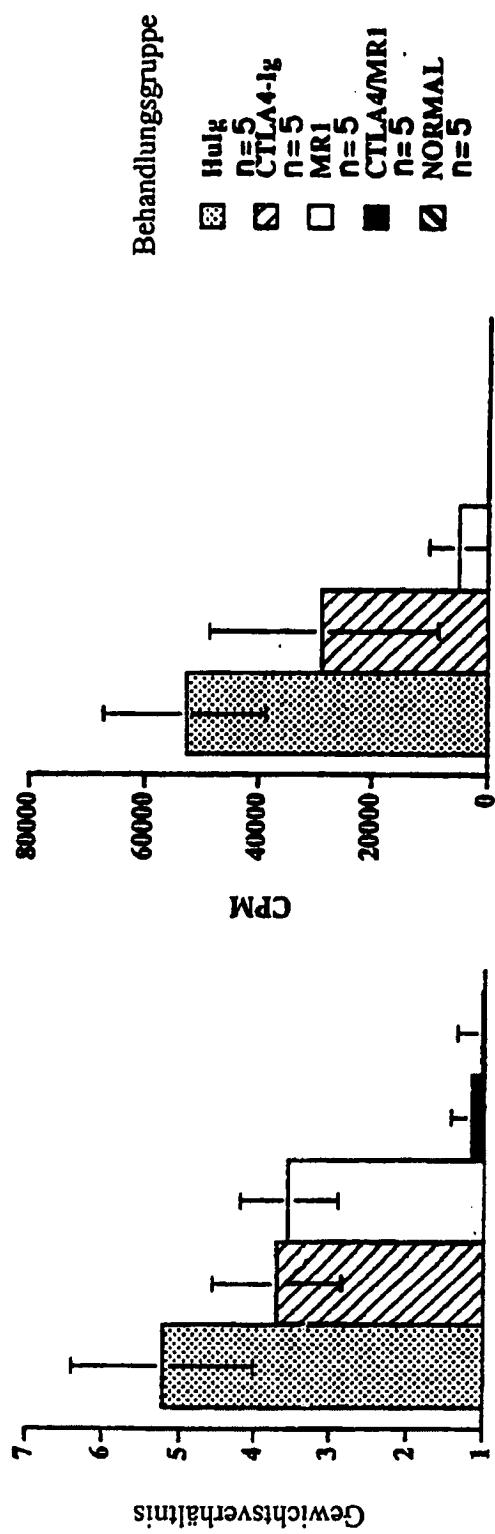
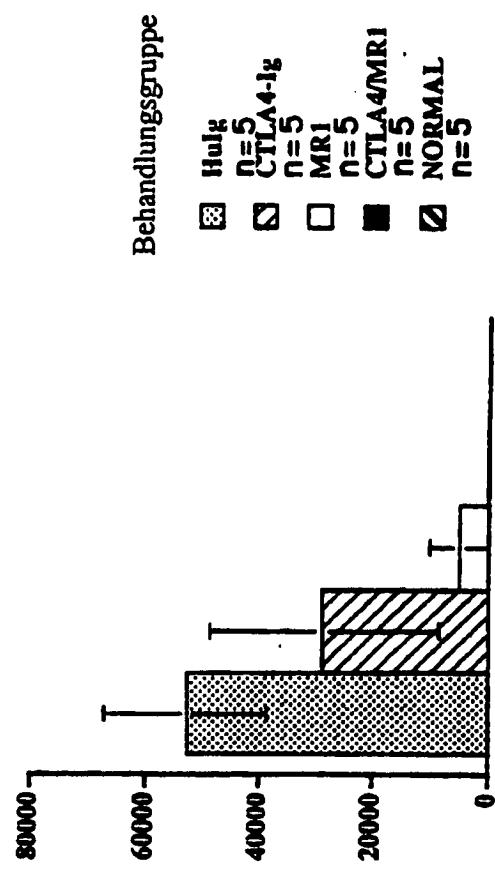
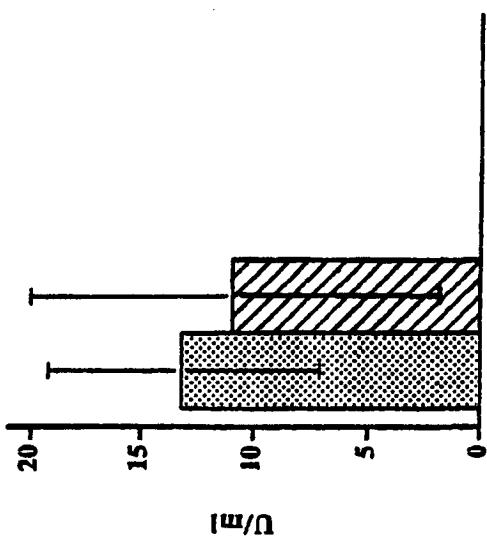
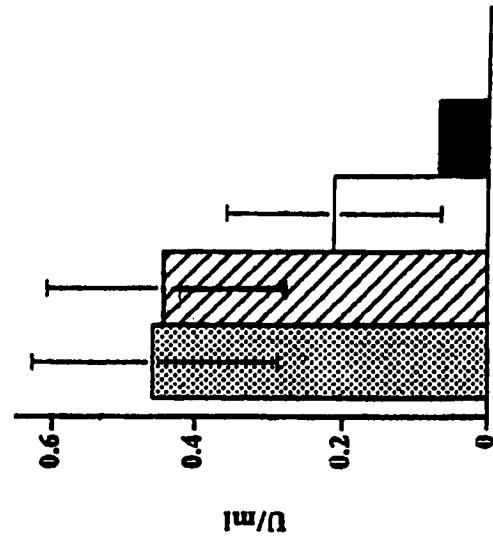


FIG. 6A Gewichtsverhältnis**FIG. 6B** H^3 -Proliferation**FIG. 6C** IFN γ -Produktion**FIG. 6D** IL2-Produktion

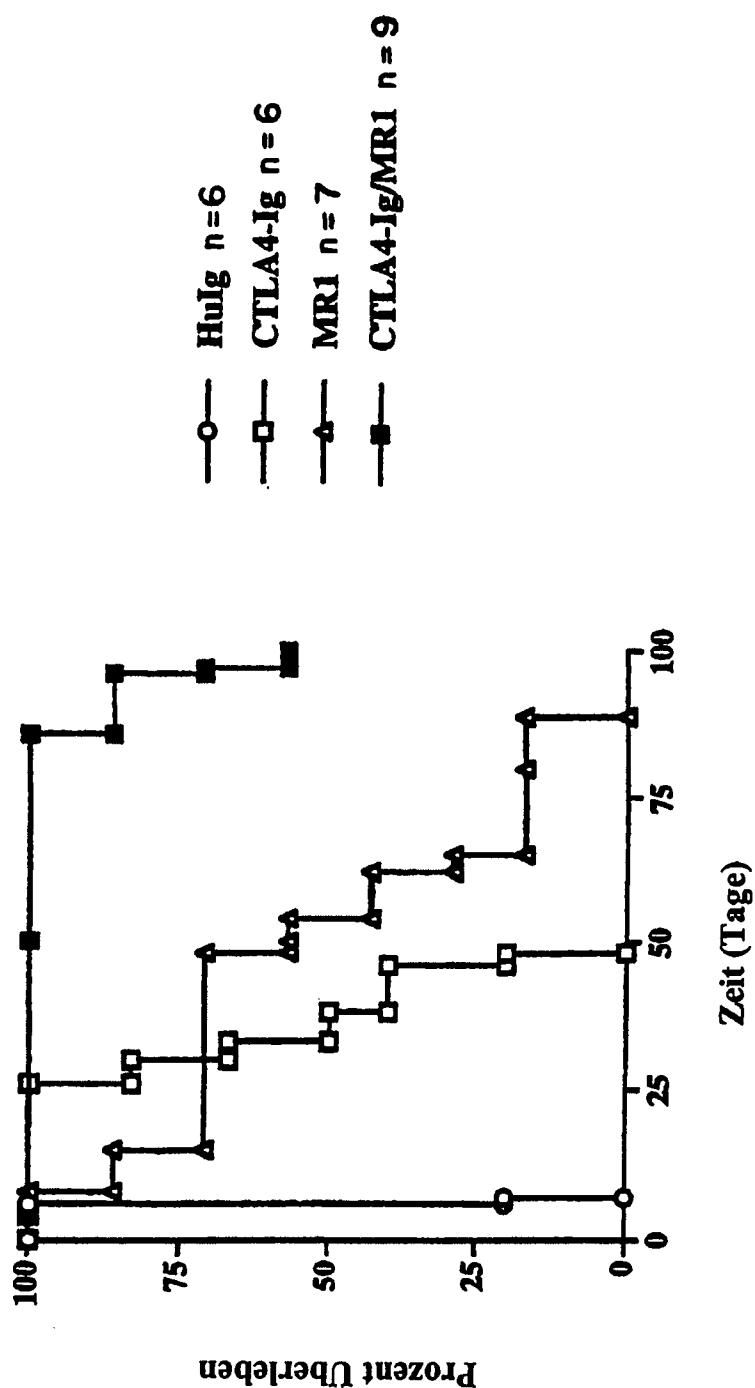


FIG. 7A



FIG. 7C

FIG. 7D

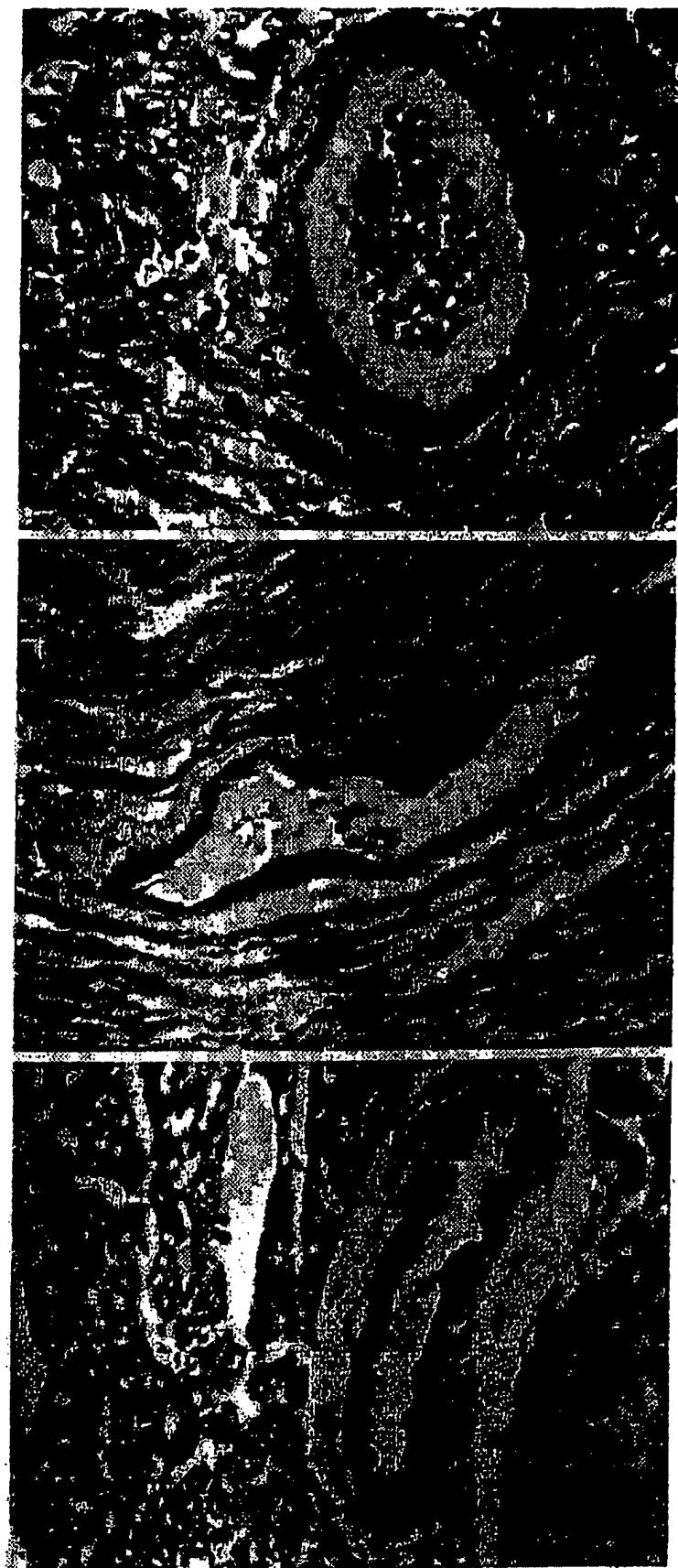


FIG. 7E FIG. 7F

FIG. 7G

FIG. 8A

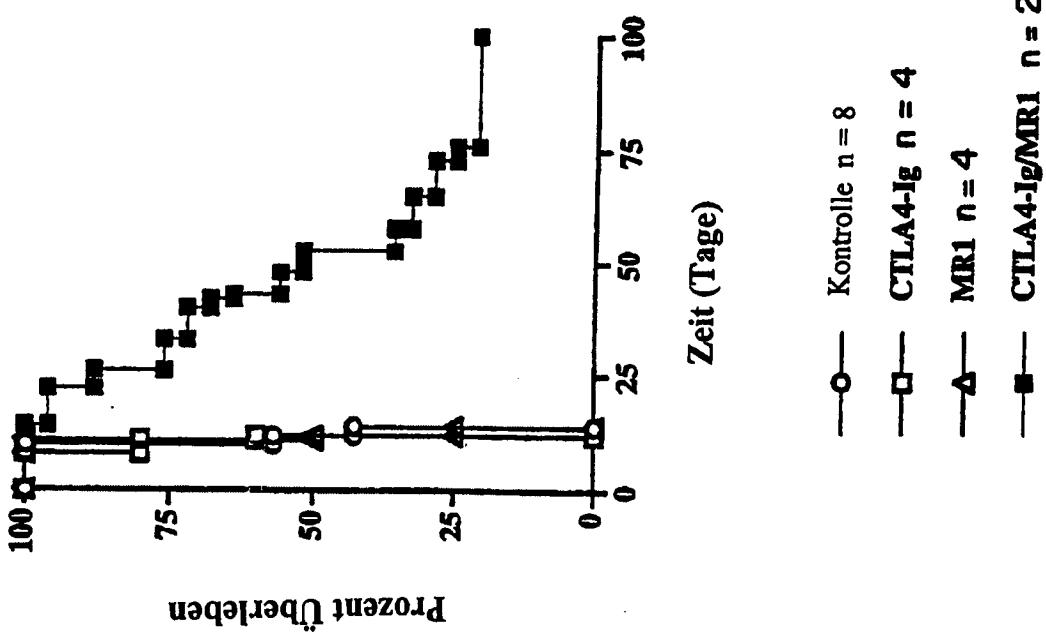
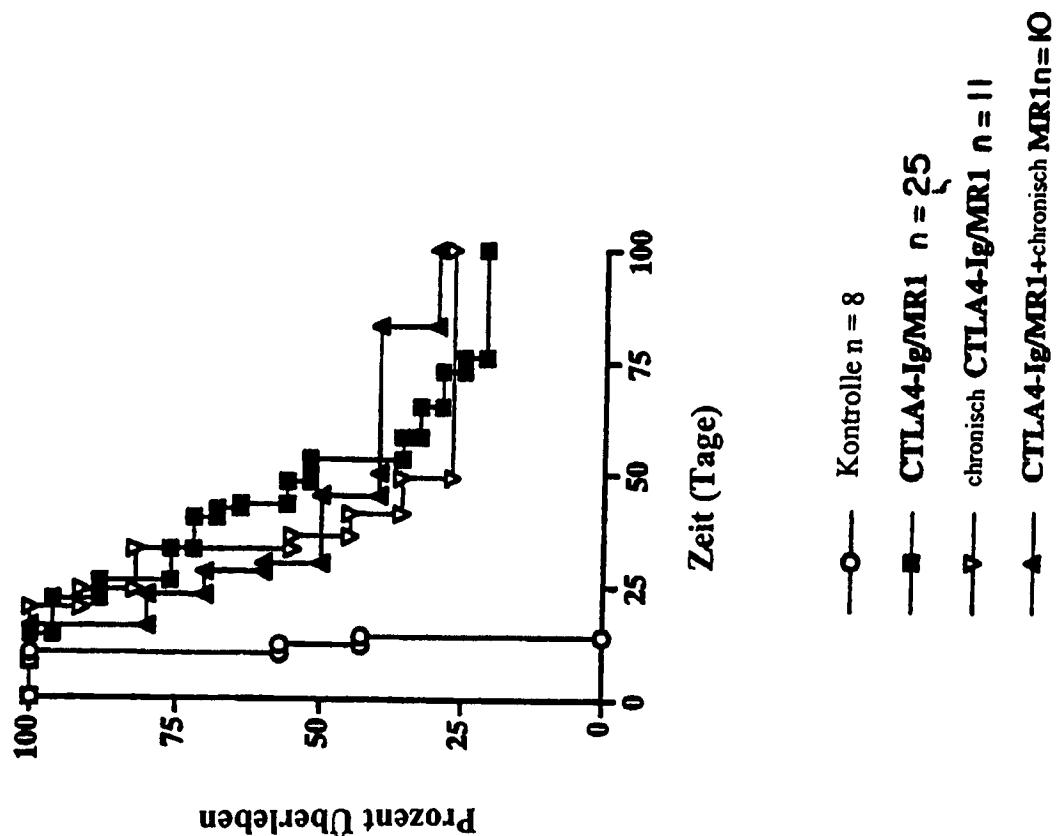


FIG. 8B



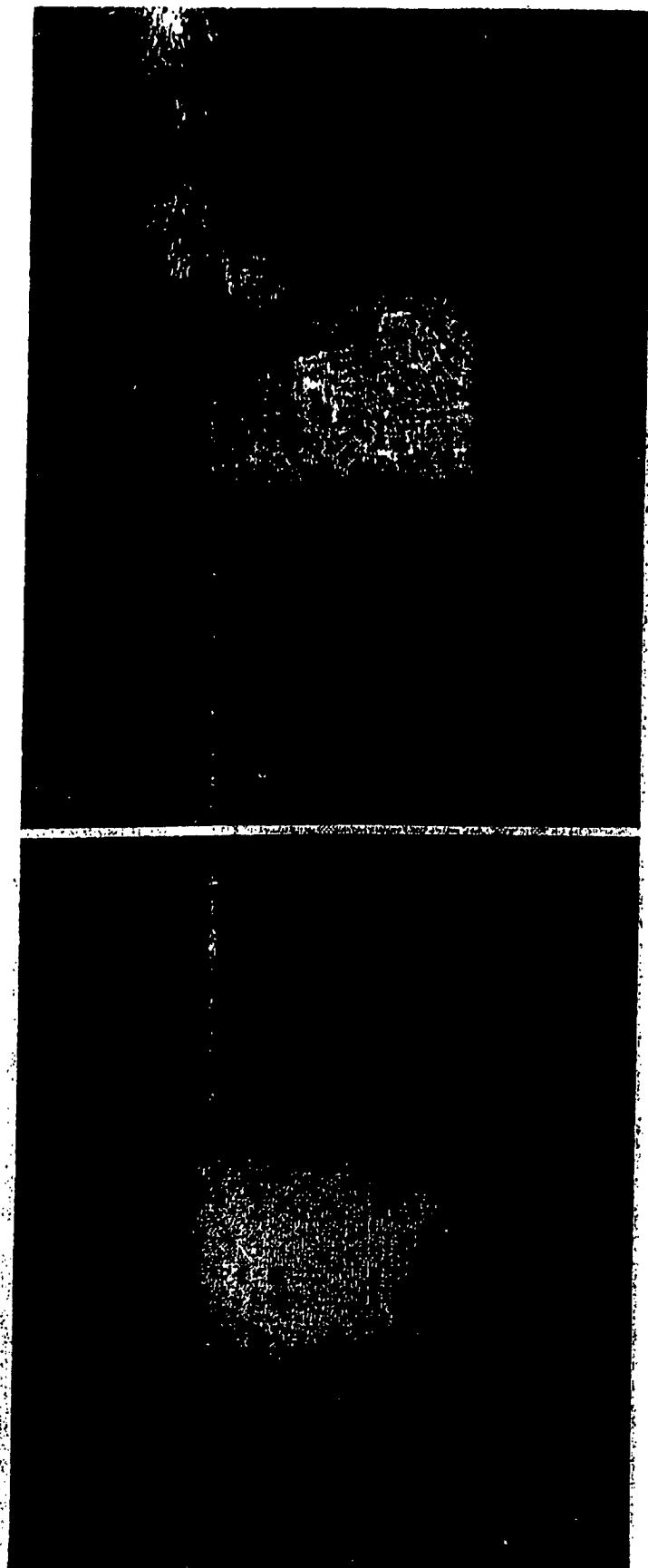


FIG. 8C

FIG. 8D

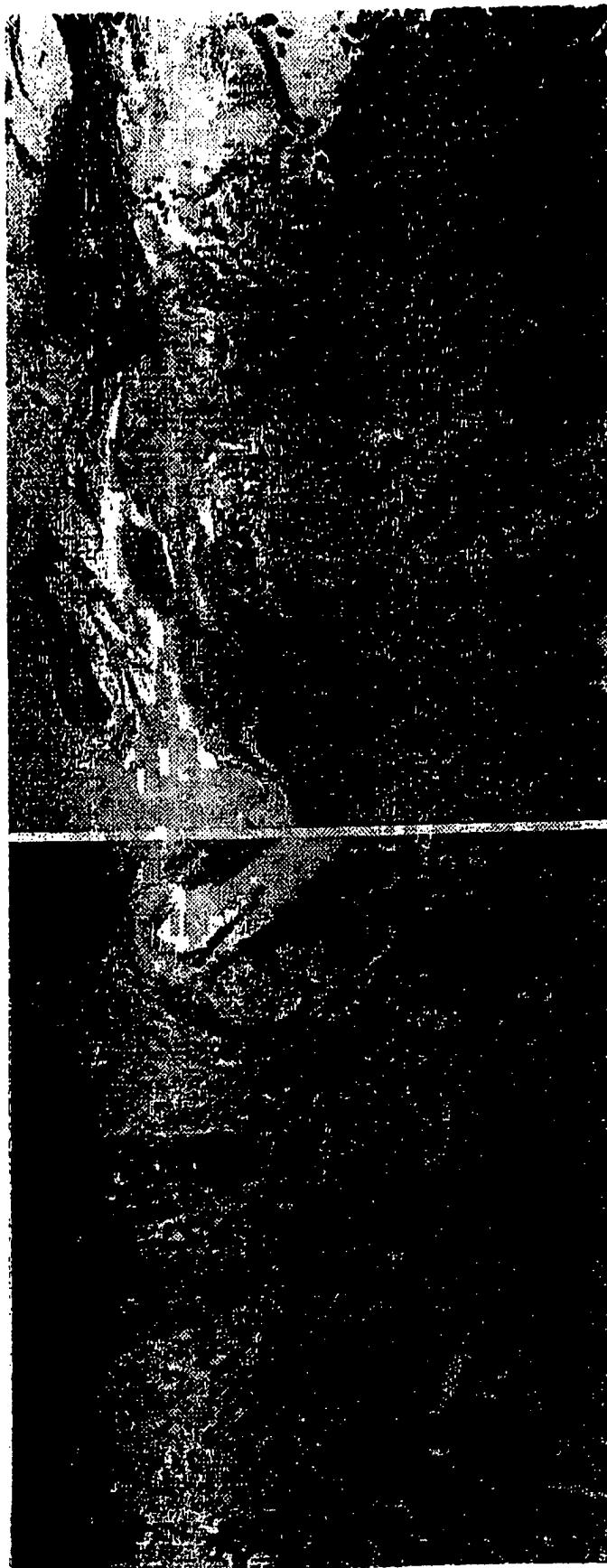
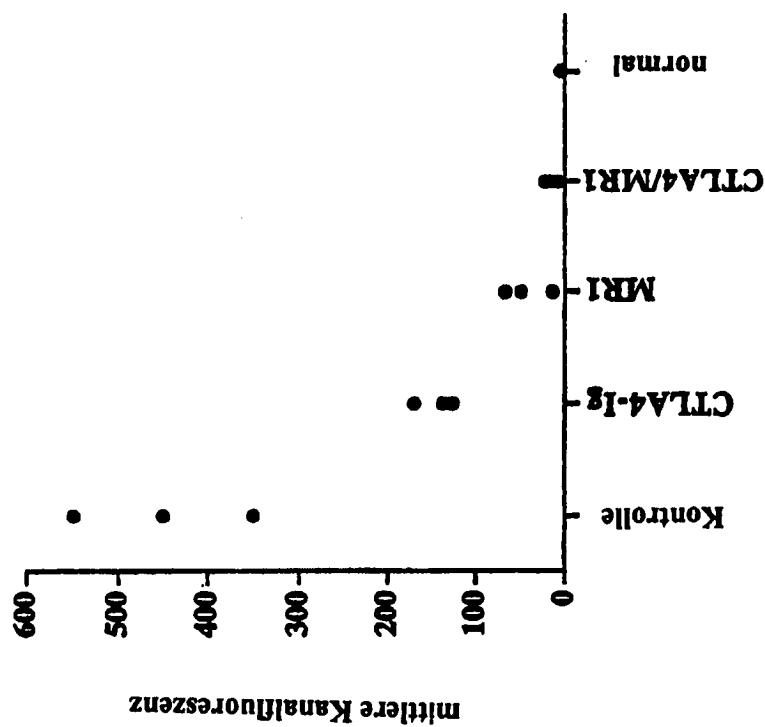


FIG. 8E
FIG. 8F

HERZTRANSPLANT-EMPFÄNGER

FIG. 9B



HAUTTRANSPLANT-EMPFÄNGER

FIG. 9A

