(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 984 T2** 2006.04.27

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 757 557 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 984.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/04832**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 917 593.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/028957**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.04.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.02.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.02.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.04.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 39/00*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
234987 **25.04.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The Trustees of Dartmouth College, Hanover, N.H., US; University of Massachusetts Medical Center, Worcester, Mass., US

(74) Vertreter:
Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(72) Erfinder:
NOELLE, Randolph J., Cornish, US; DURIE, Fiona H., Seattle, US; PARKER, David C., Portland, US; APPEL, Michael C., Golden, US; PHILIPS, Nancy E., Shrewsbury, US; MORDES, John P., Newton, US; GRENIER, Dale L., Hubbardston, US; ROSSINI, Aldo A., Sudbury, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ANREGUNG VON T-ZELLTOLERANZ GEGEN EIN GEWEBE- ODER ORGAN-TRANSPLANTAT**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Um eine Antigen-spezifische T-Zellaktivierung und klonale Vermehrung zu induzieren, müssen zwei, durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) bereitgestellte Signale an die Oberfläche von ruhenden T-Lymphozyten abgegeben werden (Jenkins, M., und Schwartz, R. (1987) J. Exp. Med. 165, 302–319; Mueller, D. L., et al. (1990) J. Immunol. 144, 3701–3709; Williams, LR., und Unanue, E. R. (1990) J. Immunol. 145, 85–93). Das erste Signal, welches der Immunantwort Spezifität verleiht, wird über den T-Zellrezeptor (TCR) vermittelt nach einer Erkennung eines fremden antigenen Peptids, welches im Kontext des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert wird. Das zweite Signal, welches als Costimulation bezeichnet wird, induziert T-Zellen, so dass sie proliferieren und funktional werden (Schwartz, R. H. (1990) Science 248, 1349–1356). Die Costimulation ist weder Antigen-spezifisch, noch unterliegt sie der MHC-Restriktion und es wird angenommen, dass sie durch ein oder mehrere unterschiedliche Zelloberflächenmoleküle, die durch APCs exprimiert werden, bereitgestellt wird (Jenkins, M. K., et al. (1988) J. Immunol. 140, 3324–3330; Linsley, P. S., et al. (1991) J. Exp. Med. 173, 721–730; Gimmi, C. D., et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6575–6579; Young, J. W., et al. (1992) J. Clin. Invest. 90, 229–237; Koulova, L., et al. (1991) J. Exp. Med. 173, 759–762; Reiser, H., et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 271–275; van-Seventer, G. A., et al. (1990) J. Immunol. 144, 4579–4586; La Salle, J. M., et al., (1991) J. Immunol. 147, 774–80; Dustin, M. I., et al. (1989) J. Exp. Med. 169, 503; Armitage, R. J., et al. (1992) Nature 357, 80–82; Liu, Y., et al. (1992) J. Exp. Med. 175, 437–445). An einem an der T-Zellaktivierung beteiligten Costimulationsweg ist das CD28-Molekül an der Oberfläche von T-Zellen beteiligt. Dieses Molekül kann ein costimulatorisches Signal, welches von einem Liganden an B-Zellen oder anderen APCs abgegeben wird, empfangen. Liganden für CD28 umfassen Mitglieder aus der B7-Familie von B-Lymphozytenaktivierungsantigenen, wie B7-1 und/oder B7-2 (Freedman, A. S., et al. (1987) J. Immunol. 137, 3260–3267; Freeman, G. J., et al. (1989) J. Immunol. 143, 2714–2722; Freeman, G. J., et al. (1991) J. Exp. Med. 174, 625–631; Freeman, G. J., et al. (1993) Science 262, 909–911; Azuma, M. et al., (1993) Nature 366, 76–79; Freeman, G. J., et al. (1993) J. Exp. Med. 178, 2185–2192). B7-1 und B7-2 sind auch Liganden für ein anderes Molekül, CTLA4, welches an der Oberfläche von aktivierten T-Zellen vorhanden ist, obwohl die Rolle von CTLA4 bei der Costimulation unklar ist.

[0002] Die Abgabe eines Antigen-spezifischen Signals mit einem costimulatorischen Signal an eine T-Zelle führt zu einer T-Zellaktivierung, die sowohl T-Zellproliferation als auch Zytokinsekretion umfassen kann. Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass eine Abgabe eines Antigen-spezifischen Signals in Abwesenheit eines costimulatorischen Signals an eine T-Zelle einen Zustand von Unresponsivität oder Anergie bei der T-Zelle induziert, wodurch Antigenspezifische Toleranz bei der T-Zelle induziert wird.

[0003] Interaktionen zwischen T-Zellen und B-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei Immunantworten. Die Induktion von humoraler Immunität gegen Thymus-abhängige Antigene erfordert „Unterstützung", die durch T-Helfer-(im Folgenden Th-)-Zellen bereitgestellt wird. Obwohl ein gewisses Ausmaß an Unterstützung, welches B-Lymphozyten bereitgestellt wird, durch durch Th-Zellen freigesetzte lösliche Moleküle (beispielsweise Lymphokine, wie IL-4 und IL-5) vermittelt wird, erfordert die Aktivierung von B-Zellen auch eine kontaktabhängige Interaktion zwischen B-Zellen und Th-Zellen. Hirohata et al., J. Immunol. 140: 3736–3744 (1988); Bartlett et al., J. Immunol. 143: 1745–1754 (1989). Dies weist darauf hin, dass eine B-Zellaktivierung eine obligatorische Interaktion zwischen Zelloberflächenmolekülen auf B-Zellen und Th-Zellen mit umfasst. Das oder die Moleküle) an der T-Zelle vermittelt bzw. vermitteln dementsprechend kontaktabhängige Helfer-Effektorfunktionen der T-Zelle. Eine kontaktabhängige Interaktion zwischen Molekülen an B-Zellen und T-Zellen wird weiter gestützt durch die Beobachtung, dass isolierte Plasmamembranen von aktivierten T-Zellen für eine B-Zellaktivierung erforderliche Helferfunktionen bereitstellen können. Brian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 564–568 (1988); Hodgkin et al., J. Immunol., 145: 2025–2034 (1990); Noelle et al., J. Immunol., 146: 1118–1124 (1991).

[0004] Ein Molekül, CD40, ist an der Oberfläche von unreifen und reifen B-Lymphozyten identifiziert worden, welches, wenn es durch Antikörper vernetzt wird, eine B-Zellproliferation induziert. Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463–1467 (1989); Gordon et al., J. Immunol., 140: 1425–1430 (1988); Gruber et al., J. Immunol. 142: 4144–4152 (1989). CD40 ist molekular kloniert und charakterisiert worden. Stamenkovic et al., EMBO J., 8: 1403–1410 (1989). Ein Ligand für CD40, gp39 (welches auch als CD40-Ligand oder CD40L bezeichnet wird) ist ebenfalls molekular kloniert und charakterisiert worden, Armitage et al., Nature, 357: 80–82 (1992); Lederman et al., J. Exp. Med. 175: 1091–1101 (1992); Hollenbaugh et al., EMBO J 11: 4313–4319 (1992). Das gp39-Protein wird an aktivierten, nicht aber ruhenden $CD4^+$-Th-Zellen exprimiert. Spriggs et al., J. Exp. Med., 176: 1543–1550 (1992); Lane et al., Eur. J. Immunol., 22: 2573–2578 (1992); Roy et al., J. Immunol., 151: 1–14 (1993): Mit dem gp39-Gen transfizierte und das gp39-Protein an ihrer Oberfläche exprimierende Zellen können

eine B-Zellproliferation auslösen und können zusammen mit anderen stimulatorischen Signalen die Antikörperproduktion induzieren. Armitage et al., Nature, 357: 80–82 (1992); Hollenbaugh et al., EMBO J., 11: 4313–4319 (1992).

[0005] WO 95/06481 bildet einen Teil des Standes der Technik aufgrund von Artikel 54(3) und (4) EPÜ. Dieses Dokument offenbart allgemein eine gemeinsame Verabreichung von Zellen und gp39-Antagonisten für die Induktion von T-Zelltoleranz gegen Knochenmarkszellen für eine Behandlung von Graft-versus-Host-Reaktionen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Zelloberflächenmoleküle, die kontaktabhängige Helfer-Effektorfunktionen von T-Zellen vermitteln, sind wichtig, um Immunantworten zu induzieren, die T-Zell-Unterstützung erfordern. Beispielsweise spielt die Interaktion von gp39 an T-Zellen mit CD40 an B-Zellen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von B-Zellreaktionen auf ein Antigen. Die vorliegende Erfindung beruht wenigstens teilweise auf der Entdeckung, dass Zelloberflächenmoleküle, die kontaktabhängige Helfer-Effektorfunktionen von T-Zellen vermitteln, auch eine kritische Rolle bei der Reaktion von T-Zellen auf Alloantigene spielen. Es ist insbesondere entdeckt worden, dass unter geeigneten Bedingungen eine Interferenz mit einer Interaktion von gp39 mit einem Liganden an einer allogenen Zelle, die der T-Zelle Alloantigene präsentiert, bei der T-Zelle eine Toleranz induzieren kann. Vorzugsweise benötigt die allogene Zelle, die der T-Zelle Alloantigene präsentiert, eine Interaktion zwischen einem gp39-Liganden an der Zelle und gp39 an der T-Zelle, um in der Lage zu sein, Signale bereitzustellen, die für eine Aktivierung der T-Zelle erforderlich sind. Das Hemmen der Interaktion des gp39-Liganden an der allogenen Zelle mit gp39 an der T-Zelle verhindert eine T-Zellaktivierung und induziert vielmehr Alloantigen-spezifische T-Zelltoleranz. Eine Induktion von T-Zelltoleranz gegen Alloantigene, wie hier beschrieben, kann als ein vorbereitendes Behandlungsschema für Gewebe- oder Organtransplantationen verwendet werden.

[0007] Dementsprechend stellt die Erfindung die Verwendung (a) einer allogenen oder xenogenen Zelle, die zumindest ein Spender-Antigen exprimiert und an einer Oberfläche von dieser einen Liganden aufweist, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert; und

(b) eines gp39-Antagonisten

zur Herstellung einer kombinierten Zubereitung für die gleichzeitige, separate oder aufeinanderfolgende Verwendung beim Hervorrufen einer T-Zelltoleranz gegenüber einem Spendergewebe oder -organ bei einem Empfänger des Gewebes oder Organs, bereit mit der Maßgabe, dass das Spendergewebe oder -organ Langerhans-Inseln, Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen oder Darm umfasst, wenn die allogene oder xenogene Zelle eine allogene Zelle ist. Der Antagonist hemmt eine Interaktion zwischen dem Molekül an der T-Zelle und dessen Ligand an der allogenen oder xenogenen Zelle.

[0008] Bei dieser Ausführungsform ist der Antagonist ein Molekül, das die Interaktion von gp39 an einer T-Zelle mit einem gp39-Liganden an einer allogenen oder xenogenen Zelle hemmt. Ein besonders bevorzugter gp39-Antagonist ist ein anti-gp39-Antikörper. In einer anderen Ausführungsform ist der gp39-Antagonist eine lösliche Form eines gp39-Liganden, beispielsweise lösliches CD40. Die allogene oder xenogene Zelle, die dem Empfänger zu verabreichen ist, ist vorzugsweise eine lymphoide Zelle, beispielsweise ein B-Zelle. Alternativ ist die allogene oder xenogene Zelle eine kleine ruhende B-Zelle. Die allogene oder xenogene Zelle und der Antagonist (z.B. anti-gp39-Antikörper) werden einem Empfängerindividuum typischerweise vor der Transplantation des Gewebes oder Organs in das Individuum verabreicht. Beispielsweise sind lymphoide Zellen (z.B. B-Zellen) aus dem Spender des Gewebes oder Organs an den Empfänger zusammen mit dem Antagonisten vor der Transplantation des Gewebes oder Organs in den Empfänger zu verabreichen.

[0009] Die Verfahren der Erfindung können beispielsweise verwendet werden, um T-Zelltoleranz gegen transplantiertes Gewebe oder Organe, wie Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen und Darm, hervorzurufen. In einer Ausführungsform umfasst das transplantierte Gewebe Langerhans-Inseln. Dementsprechend stellt die Erfindung die Verwendung (a) einer allogenen oder xenogenen Zelle, welche zumindest ein Spender-Antigen exprimiert und an einer Oberfläche von dieser einen Liganden aufweist, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert;

(b) eines gp39-Antagonisten; und

(c) von Langerhans-Inselzellen eines Spenders

für die Herstellung einer kombinierten Zubereitung für die gleichzeitige, separate oder aufeinanderfolgende Verwendung bei der Behandlung von Diabetes bereit.

[0010] Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt eine Verwendung (a) einer allogenen Spender-Zelle, die zumindest ein Spenderantigen exprimiert und an einer Oberfläche von dieser einen Liganden aufweist, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert; und

(b) eines anti-gp39-Antikörpers,

zur Herstellung einer kombinierten Zubereitung für die gleichzeitige, separate oder aufeinanderfolgende Verwendung beim Hervorrufen einer T-Zelltoleranz gegenüber einem Spendergewebe oder -organ bei einem Empfänger des Gewebes oder Organs bereit, wobei die allogene Spenderzelle und der anti-gp39-Antikörper dem Empfänger vor der Transplantation des Gewebes oder Organs zu verabreichen sind, wobei das Spendergewebe oder -organ Langerhans-Inseln, Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen oder Darm umfasst.

[0011] Unter einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung eines gp39-Antagonisten zur Herstellung einer Zubereitung zur Verwendung beim Hervorrufen einer T-Zelltoleranz gegenüber einem Spendergewebe oder -organ bei einem Empfänger bereit, welcher Empfänger allogenen oder xenogenen Zellen auszusetzen ist, die zumindest das Spenderantigen exprimieren und an einer Oberfläche von diesen einen Liganden aufweisen, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert, mit der Maßgabe, dass das Spendergewebe oder -organ Langerhans-Inseln, Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen oder Darm umfasst, wenn die allogenen oder xenogenen Zellen allogene Zellen sind.

[0012] Die Erfindung stellt des weiteren die Verwendung eines gp39-Antagonisten zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung von Diabetes bei einem Individuum, welches Langerhans-Inselzellen eines Spenders und allogenen oder xenogenen Zellen, die zumindest ein Spenderantigen exprimieren und die an einer Oberfläche von diesen einen Liganden aufweisen, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert, auszusetzen ist, bereit.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0013] Fig. 1 ist eine graphische Darstellung des Überlebens von transplantierten Langerhans-Insel-Allotransplantaten bei Mäusen mit chemisch induziertem Diabetes, die mit anti-gp39-Antikörper allein vorbehandelt worden sind oder mit unfraktionierten oder fraktionierten allogenen Milzzellen allein vorbehandelt worden sind.

[0014] Die Fig. 2A und Fig. 2B sind graphische Darstellungen des Überlebens von transplantierten Langerhans-Insel-Allotransplantaten, wie anhand einer Abnahme der Plasma-Glucosekonzentration gemessen, bei Mäusen mit chemisch induziertem Diabetes, die mit einer einzelnen Dosis von fraktionierten allogenen Milzzellen zusammen mit einer anti-gp39-Antikörper (MR1)-Behandlung für entweder 2 Wochen (Feld A) oder 7 Wochen (Feld B) vorbehandelt worden sind. Jede Kurve repräsentiert die Daten von einer individuellen Maus. Leere Symbole identifizieren Empfänger, bei denen das Insel-Allotransplantat spontan versagte. Ausgefüllte Symbole geben Mäuse an, deren Insel-Transplantate bei Beendigung des Experiments funktionsfähig waren.

[0015] Die Fig. 3A, B und C sind durchflusszytometrische Profile, welche die Anfärbung von 6 Stunden lang aktivierten humanen Lymphozyten des peripheren Bluts mit entweder CD40Ig (FeldA), mAb 4D9-8 (Feld B) oder mAb 4D9-9 (Feld C) zeigen.

[0016] Die Fig. 4A, B und C sind durchflusszytometrische Profile, die die Anfärbung von 6 Stunden lang aktivierten, in Gegenwart von Cycloporin A kultivierten humanen Lymphozyten des peripheren Bluts, angefärbt mit entweder mAb 4D9-8 (Feld A), mAb 4D9-9 (Feld B) oder CD40Ig (Feld C), zeigen.

[0017] Die Fig. 5A und B sind durchflusszytometrische Profile, welche die Anfärbung von 6 Stunden lang aktivierten humanen Lymphozyten des peripheren Bluts mit CD40Ig in Gegenwart von unmarkiertem mAb 4D9-8 (Feld A) oder unmarkiertem mAb 4D9-9 (Feld B) zeigen.

[0018] Die Fig. 6 ist eine graphische Darstellung der Hemmung der Proliferation von humanen B-Zellen, induziert durch lösliches gp39 und IL-4, wenn die Zellen in Gegenwart der antihumanes gp39-mAbs 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 oder 89-79 kultiviert werden.

[0019] Die Fig. 7 ist eine graphische Darstellung der Hemmung einer allo-spezifischen gemischten Lymphozyten-Antwort, wenn die Zellen in Gegenwart der anti-humanes gp39-mAbs 24-31 oder 89-79 kultiviert werden.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0020] Diese Erfindung ist gekennzeichnet durch Verfahren zum Hervorrufen von T-Zelltoleranz in vivo gegenüber einem Spendergewebe- oder -organtransplantat bei einem Transplantatempfänger. Die Verfahren umfassen, dem Empfänger 1) eine allogene oder xenogene Zelle, die Spender-Antigene exprimiert und die an einer Zelloberfläche einen Liganden aufweist, der mit einem Rezeptor an der Oberfläche einer Empfänger-T-Zelle, welcher kontaktabhängige Helfer-Effektorfunktionen vermittelt, interagiert, und 2) einen Antagonisten des Rezeptors an der Oberfläche der T-Zelle, der die Interaktion des Liganden und des Rezeptors hemmt, zu verabreichen. Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff „Empfänger" auf ein Individuum, in welches ein Gewebe- oder Organtransplantat transplantiert werden soll, transplantiert wird oder transplantiert worden ist. Wie hier definiert, wird eine „allogene" Zelle von einem unterschiedlichen Individuum der gleichen Spezies wie der Empfänger erhalten und exprimiert „Alloantigene", die sich von Antigenen, die durch Zellen des Empfängers exprimiert werden, unterscheiden. Eine „xenogene" Zelle wird von einer unterschiedlichen Spezies als dem Empfänger erhalten und exprimiert „Xenoantigene", die sich von Antigenen, die durch Zellen des Empfängers exprimiert werden, unterscheiden. Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff „Spender-Antigene" auf Antigene, die durch das in den Empfänger zu transplantierende Spendergewebe- oder -organtransplantat exprimiert werden. Die Spender-Antigene können Alloantigene oder Xenoantigene abhängig von der Herkunft des Transplantats sein. Die allogene oder xenogene Zelle, die dem Empfänger als Teil des Toleranzinduktionsbehandlungsplans verabreicht wird, exprimiert Spender-Antigene, d.h. exprimiert einige oder die Gesamtheit eben jener Antigene, die an dem zu transplantierenden Spendergewebe oder -organ vorhanden sind. Die allogene oder xenogene Zelle wird vorzugsweise von dem Spender des Gewebe- oder Organtransplantats erhalten, kann aber von einer oder mehreren Quellen, die gemeinsame antigene Determinanten mit dem Spender aufweist bzw. aufweisen, erhalten werden.

[0021] Zusätzlich zu der allogenen oder xenogenen Zelle wird ein Antagonist eines Moleküls an T-Zellen, welches kontaktabhängige Helfer-Effektorfunktionen vermittelt, dem Empfänger als Teil des Toleranzinduktionsbehandlungsplans verabreicht. Wie hier definiert, ist ein Molekül oder Rezeptor, das bzw. der kontaktabhängige Helfer-Effektorfunktionen vermittelt, eines bzw. einer, das bzw. der auf einer Th-Zelle exprimiert wird und mit einem Liganden an einer Effektorzelle (z.B. einer B-Zelle) interagiert, wobei die Interaktion des Moleküls mit dessen Ligand für die Erzeugung einer Effektorzellreaktion (z.B. B-Zellaktivierung) erforderlich ist. Zusätzlich zu dessen Beteiligung an Effektorzellreaktionen ist jetzt festgestellt worden, dass ein solches Molekül oder ein solcher Rezeptor an der Reaktion der T-Zelle auf Antigene beteiligt ist. Das Molekül an einer T-Zelle, welches kontaktabhängige Helfer-Effektorfunktionen vermittelt, ist vorzugsweise gp39. Dementsprechend umfassen in bevorzugten Ausführungsformen die Verfahren der Erfindung, an einen Transplantatempfänger eine allogene oder xenogene Zelle und einen gp39-Antagonisten zu verabreichen. Die Aktivierung von Empfänger-T-Zellen durch die allogene oder xenogene Zelle involviert eine Interaktion zwischen gp39 an Empfänger-T-Zellen und einem gp39-Liganden an der allogenen oder xenogenen Zelle. Durch Hemmung dieser Wechselwirkung mit einem gp39-Antagonisten werden die T-Zellen des Empfängers durch die Spender-Antigene, die durch die allogene oder xenogene Zelle exprimiert werden, nicht aktiviert, sondern es wird bei diesen vielmehr eine Toleranz gegenüber den Spender-Antigenen induziert. Die Induktion von Toleranz gegenüber Spender-Antigenen bei dem Empfänger ermöglicht folglich eine erfolgreiche Transplantation des Spendergewebes oder -organs ohne Immun-vermittelte Abstoßung des Spendertransplantats.

[0022] Verschiedene Aspekte der Erfindung werden in den folgenden Unterabschnitten detaillierter beschrieben.

I. gp39-Antagonisten

[0023] Gemäß den Verfahren der Erfindung wird ein gp39-Antagonist an einen Empfänger verabreicht, damit er mit der Interaktion von gp39 an Empfänger-T-Zellen mit einem gp39-Ligand an einer allogenen oder xenogenen Zelle, wie einer B-Zelle, die dem Empfänger verabreicht wird, interferiert. Ein gp39-Antagonist ist definiert als ein Molekül, welches mit dieser Interaktion oder Wechselwirkung interferiert. Der gp39-Antagonist kann ein Antikörper, der gegen gp39 gerichtet ist (z.B. ein monoklonaler Antikörper gegen gp39), ein Fragment oder Derivat eines gegen gp39 gerichteten Antikörpers (z.B. Fab- oder F(ab)'2-Fragmente, chimäre Antikörper oder humanisierte Antikörper), lösliche Formen eines gp39-Liganden (z.B. lösliches CD40), lösliche Formen eines Fusionsproteins eines gp39-Liganden (z.B. lösliches CD40Ig) oder pharmazeutische Mittel, die die gp39-CD40-Interaktion aufheben oder damit interferieren, sein.

A. Antikörper

[0024] Ein Säugetier (z.B. eine Maus, ein Hamster oder Kaninchen) können mit einer immunogenen Form des gp39-Proteins oder einem Proteinfragment (z.B. Peptidfragment), welche bzw. welches bei dem Säugetier eine Antikörperantwort auslöst, immunisiert werden. Eine Zelle, die gp39 an ihrer Oberfläche exprimiert, kann auch als Immunogen verwendet werden. Alternative Immunogene umfassen gereinigtes gp39-Protein oder gereinigte gp39-Proteinfragmente.

[0025] gp39 kann ausgehend von einer gp39-exprimierenden Zelle durch Standard-Reinigungstechniken gereinigt werden. Zusätzlich kann gp39-cDNA (Armitage et al., Nature, 357: 80–82 (1992); Lederman et al., J. Exp. Med., 175: 1091–1101 (1992); Hollenbaugh et al., EMBO J., 11: 4313–4319 (1992)) in einer Wirtszelle, z.B. Bakterien oder einer Säugetierzelllinie, exprimiert werden und gp39-Protein ausgehend von Zellkulturen durch Standardtechniken gereinigt werden. Alternativ können gp39-Peptide basierend auf der Aminosäuresequenz von gp39 (offenbart in Armitage et al., Nature, 357: 80–82 (1992); Lederman et al., J. Exp. Med., 175: 1091–1101 (1992); Hollenbaugh et al., EMBO J., 11: 4313–4319 (1992)) unter Verwendung von bekannten Techniken (z.B. chemische F-moc- oder T-boc-Synthese) synthetisiert werden. Techniken, um einem Protein Immunogenität zu verleihen, umfassen eine Konjugation an Träger oder andere Techniken, die in diesem Fachgebiet wohlbekannt sind. Das Protein kann beispielsweise in Gegenwart eines Adjuvans verabreicht werden. Das Fortschreiten der Immunisierung kann durch Detektion von Antikörpertitern in Plasma oder Serum überwacht werden. Es kann ein Standard-ELISA oder ein andersartiger Immunoassay mit dem Immunogen als Antigen verwendet werden, um Antikörperspiegel zu bestimmen.

[0026] Nach der Immunisierung können Antiseren erhalten und, sofern gewünscht, polyklonale Antikörper aus den Seren isoliert werden. Um monoklonale Antikörper herzustellen, können Antikörper-produzierende Zellen (Lymphozyten) aus einem immunisierten Tier gewonnen und mit Myelomzellen durch somatische Standard-Zellfusionsprozeduren fusioniert werden, wodurch diese Zellen immortalisiert werden und Hybridomzellen erhalten werden. Solche Techniken sind in diesem Fachgebiet wohlbekannt. Beispielsweise die ursprünglich von Kohler und Milstein (Nature (1975) 256: 495–497) entwickelte Hybridom-Technik wie auch andere Techniken, wie die humane B-Zell-Hybridom-Technik (Kozbar et al., Immunol. Today (1983) 4: 72), die EBV-Hybridom-Technik, um humane monoklonale Antikörper herzustellen (Cole et al., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) (Allen R. Bliss, Inc., Seiten 77–96) und Screenen von kombinatorischen Antikörperbibliotheken (Huse et al., Science (1989) 246: 1275). Hybridomzellen können immunchemisch auf die Produktion von Antikörpern, die spezifisch mit dem Protein oder Peptid reagieren, gescreent und monoklonale Antikörper isoliert werden.

[0027] Der Begriff Antikörper, wie er hier verwendet wird, soll Fragmente davon, die spezifisch mit einem gp39-Protein oder einem Peptid davon oder einem gp39-Fusionsprotein reagieren, umfassen. Antikörper können unter Verwendung von herkömmlichen Techniken fragmentiert werden und die Fragmente auf Nützlichkeit auf die gleiche Weise, wie oben für ganze Antikörper beschrieben, gescreent werden. Es können beispielsweise $F(ab')_2$-Fragmente erzeugt werden, indem Antikörper mit Pepsin behandelt werden. Das resultierende $F(ab')_2$-Fragment kann behandelt werden, um Disulfidbrücken zu reduzieren, um Fab'-Fragmente herzustellen. Der Antikörper der Erfindung soll des Weiteren bispezifische und chimäre Moleküle mit einem anti-gp39-Abschnitt umfassen.

[0028] Wenn in nicht-humanen Individuen produzierte Antikörper beim Menschen im Rahmen einer Therapie verwendet werden, werden sie in unterschiedlichem Ausmaß als fremd erkannt und es kann bei dem Patienten eine Immunantwort erzeugt werden. Ein Ansatz, um dieses Problem zu minimieren oder zu beseitigen, welcher gegenüber einer allgemeinen Immunsuppression zu bevorzugen ist, besteht darin, chimäre Antikörperderivate herzustellen, d.h. Antikörpermoleküle, die eine nicht-humane, tierische variable Region und eine humane konstante Region kombinieren. Chimäre Antikörpermoleküle können beispielsweise die Antigenbindende Domäne aus einem Antikörper einer Maus, einer Ratte oder einer andersartigen Spezies mit humanen konstanten Regionen umfassen. Es sind verschiedene Ansätze für die Herstellung von chimären Antikörpern beschrieben worden und können verwendet werden, um chimäre Antikörper, die die variable Immunglobulinreagion, die gp39 erkennt, enthalten, herzustellen. Siehe beispielsweise Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851 (1985); Takeda et al., Nature 314: 452 (1985); Cabilly et al., U.S.-Patent Nr. 4,816,567; Boss et al., U.S.-Patent Nr. 4,816,397; Tanaguchi et al., Europäische Patentveröffentlichung EP 171496; Europäische Patentveröffentlichung 0173494, Patent des Vereinigten Königreichs GB 2177096B. Es wird erwartet, dass solche chimären Antikörper bei einem humanen Individuum weniger immunogen als der entsprechende nicht-chimäre Antikörper sein werden.

[0029] Für die Zwecke einer Therapie beim Menschen können die mit einem gp39-Protein oder -Peptid spezifisch reagierenden monoklonalen oder chimären Antikörper weiter humanisiert werden, indem Chimäre mit humanen variablen Regionen hergestellt werden, in denen Teile der variablen Regionen, insbesondere die konservierten Gerüstregionen der Antigenbindenden Domäne, von humanem Ursprung sind und nur die hypervariablen Regionen von nicht-humanem Ursprung sind. Solche veränderten Immunglobulin-Moleküle können durch eine jegliche von mehreren Techniken, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, hergestellt werden (z.B. Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308–7312 (1983); Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279 (1983); Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3–16 (1982)) und werden vorzugsweise gemäß den Lehren der PCT-Veröffentlichung WO 92/06193 oder EP 0239400 hergestellt. Humanisierte Antikörper können kommerziell beispielsweise durch Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Großbritannien, hergestellt werden.

[0030] Ein anderes Verfahren, um spezifische Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit einem gp39-Protein oder -Peptid reagieren, zu erzeugen, besteht darin, Expressionsbibliotheken, die Immunglobulingene oder Abschnitte davon kodieren, die in Bakterien exprimiert werden, mit einem gp39-Protein oder -Peptid zu screenen. Beispielsweise können vollständige Fab-Fragmente, VH-Regionen und FV-Regionen in Bakterien unter Verwendung von Phagenexpressionsbibliotheken exprimiert werden. Siehe beispielsweise Ward et al., Nature, 341: 544–546 (1989); Huse et al., Science, 246: 1275–1281 (1989); und McCafferty et al., Nature, 348: 552–554 (1990). Das Screenen von solchen Bibliotheken mit beispielsweise einem gp39-Peptid kann Immunglobulinfragmente, die mit gp39 reagieren, identifizieren. Alternativ kann SCID-hu mouse (erhältlich von Genpharm) verwendet werden, um Antikörper oder Fragmente davon herzustellen.

[0031] Methodiken für die Herstellung von gegen gp39, einschließlich humanes gp39 und Mäuse-gp39, gerichteten monoklonalen Antikörpern und geeigneten monoklonalen Antikörpern für eine Verwendung in den Verfahren der Erfindung werden detaillierter in Beispiel 2 beschrieben.

[0032] Monoklonale anti-humanes gp39-Antikörper der Erfindung werden für eine Verwendung bei der Induktion von Antigen-spezifischer 7-Zelltoleranz bevorzugt. Bevorzugte Antikörper umfassen die monoklonalen Antikörper 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 und 89-79, die in Beispiel 2 beschrieben werden. Besonders bevorzugte Antikörper sind die monoklonalen Antikörper 89-76 und 24-31. Die 89-76- und 24-31-Hybridome, die die Antikörper 89-76 bzw. 24-31 produzieren, wurden nach den Maßgaben des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, MD, am 02. September 1994 hinterlegt. Dem 89-76-Hybridom wurde die ATCC Accession Number HB11713 zugewiesen und dem 24-31-Hybridom wurde die ATCC Accession Number HB11712 zugewiesen. Die Antikörper 24-31 und 89-76 sind vom IgG1-Isotyp.

[0033] In einer anderen Ausführungsform bindet der anti-humane gp39-mAb für eine Verwendung in den Verfahren der Erfindung ein Epitop, welches durch einen monoklonalen Antikörper, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 und 89-79, erkannt wird. Mehr bevorzugt bindet der anti-humanes gp39-mAb ein Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper 24-31 oder den monoklonalen Antikörper 89-76 erkannt wird. Die Fähigkeit eines mAb, ein Epitop zu binden, welches durch einen beliebigen der vorerwähnten Antikörper erkannt wird, kann durch Standard-Kreuzkompetitionsassays bestimmt werden. Beispielsweise wird ein Antikörper, der eben jenes Epitop, das durch den mAb 24-31 erkannt wird, bindet, hinsichtlich der Bindung von markiertem 24-31 an aktivierte T-Zellen kompetitieren, wohingegen ein Antikörper, der ein unterschiedliches Epitop bindet als jenes, das durch den mAb 24-31 erkannt wird, hinsichtlich der Bindung von markiertem 24-31 an aktivierte T-Zellen nicht kompetitieren wird.

B. Lösliche Liganden für gp39

[0034] Andere gp39-Antagonisten, die verabreicht werden können, um T-Zelltoleranz hervorzurufen, umfassen lösliche Formen eines gp39-Liganden. Ein monovalenter löslicher Ligand von gp39, wie lösliches CD40, kann an gp39 binden, wodurch die Interaktion von gp39 mit CD40 an B-Zellen gehemmt wird. Der Begriff „löslich" gibt an, dass der Ligand nicht permanent mit einer Zellmembran assoziiert ist. Ein löslicher gp39-Ligand kann durch chemische Synthese oder vorzugsweise durch Techniken der in vitro-DNA-Rekombination hergestellt werden, beispielsweise indem nur die extrazelluläre Domäne des Liganden (in Abwesenheit der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne) exprimiert wird. Ein bevorzugter löslicher gp39-Ligand ist lösliches CD40. Alternativ kann ein löslicher gp39-Ligand in Form eines Fusionsproteins vorliegen. Ein solches Fusionsprotein umfasst wenigstens einen Abschnitt des gp39-Liganden gebunden an ein zweites Molekül. Beispielsweise kann CD40 als ein Fusionsprotein mit einem Immunglobulin exprimiert werden (d.h. ein CD40Ig-Fusionsprotein). In einer Ausführungsform wird ein Fusionsprotein hergestellt, umfassend Aminosäu-

rereste eines Abschnitts der extrazellulären Domäne von CD40 verknüpft mit Aminosäureresten einer Sequenz, welche den CH2- und CH3-Gelenkregionen einer schweren Kette eines Immunglobulins entspricht, z.B. Cγ1, unter Bildung eines CD40Ig-Fusionsproteins (siehe z.B. Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 1783: 721–730; Capon et al. (1989) Nature 337, 525–531; und Capon U.S. 5,116,964). Das Fusionsprotein kann durch chemische Synthese oder vorzugsweise durch Techniken der in vitro-DNA-Rekombination basierend auf der cDNA von CD40 (Stamenkovic et al., EMBO J., 8: 1403–1410 (1989)) hergestellt werden.

II. Zellen für das Hervorrufen einer Antigen-spezifischen Toleranz

[0035] Die Erfindung beruht zumindest teilweise auf der Entdeckung, dass eine Präsentation von Alloantigenen gegenüber T-Zellen durch allogene Zellen in Anwesenheit eines gp39-Antagonisten zu einer T-Zelltoleranz gegenüber den Alloantigenen führt. Zellen, die in der Lage sind, Toleranz durch diesen Mechanismus hervorzurufen, umfassen jene, die Antigene präsentieren und T-Zellen durch Interaktion mit gp39 aktivieren (d.h. es ist eine Interaktion zwischen gp39 an T-Zellen und einem gp39-Ligand an der Antigen-präsentierenden Zelle erforderlich, um die geeigneten Signale für eine T-Zellaktivierung an die T-Zelle abzugeben). Eine Hemmung der Interaktion des Liganden an der allogenen oder xenogenen Zelle mit gp39 an Empfänger-T-Zellen verhindert die T-Zellaktivierung durch Allo- oder Xenoantigene und ruft vielmehr T-Zelltoleranz gegenüber den Antigenen hervor. Ein Interferieren mit der Aktivierung der T-Zelle über gp39 könnte die Induktion von costimulatorischen Molekülen an der allogenen oder xenogenen Zelle verhindern (z.B. Moleküle aus der B7-Familie an einer B-Zelle), so dass die Zelle nur ein Antigen-Signal an die T-Zelle in Abwesenheit eines costimulatorischen Signals abgibt, wodurch Toleranz hervorgerufen wird.

[0036] Dementsprechend wird bei den Verfahren der Erfindung eine allogene oder xenogene Zelle an ein Empfängerindividuum verabreicht. Die allogene oder xenogene Zelle ist in der Lage, T-Zellen des Empfängers Antigene zu präsentieren und ist beispielsweise ein B-Lymphozyt, eine „professionelle" Antigen-präsentierende Zelle (z.B. ein Monozyt, eine dendritische Zelle, eine Langerhans-Zelle) oder eine andersartige Zelle, die Antigene gegenüber Immunzellen präsentiert (z.B. ein Keratinozyt, eine Endothelzelle, ein Astrozyt, ein Fibroblast, ein Oligodendrozyt). Darüber hinaus ist es bevorzugt, dass die allogene oder xenogene Zelle ein verringertes Vermögen, ein costimulatorisches Signal bei Empfänger-T-Zellen hervorzurufen, aufweist. Beispielsweise könnte die allogene oder xenogene Zelle keinerlei Expression von costimulatorischen Molekülen, wie der B7-Familie von Proteinen (z.B. B7-1 und B7-2), zeigen oder nur geringe Konzentration von solchen costimulatorischen Molekülen exprimieren. Eine Expression von costimulatorischen Molekülen auf potentiellen allogenen oder xenogenen Zellen, die im Verfahren der Erfindung verwendet werden sollen, kann durch Standardtechniken, beispielsweise durch Durchflusszytometrie unter Verwendung von gegen costimulatorische Moleküle gerichteten Antikörpern, bestimmt werden.

[0037] Bevorzugte allogene oder xenogene Zellen zum Hervorrufen von T-Zelltoleranz sind lymphoide Zellen, beispielsweise Lymphozyten des peripheren Bluts oder Milzzellen. Bevorzugte lymphoide Zellen zum Hervorrufen von T-Zelltoleranz sind B-Zellen. B-Zellen können ausgehend von einer gemischten Population von Zellen (z.B. von anderen Zellarten in peripherem Blut oder Milz) durch Standard-Zellauftrennungstechniken gereinigt werden. Beispielsweise können anhaftende Zellen entfernt werden, indem Milzzellen auf Plastikschalen kultiviert werden und die nicht-anhaftende Zellpopulation gewonnen wird. T-Zellen können aus einer gemischten Population von Zellen durch Behandlung mit einem anti-T-Zell-Antikörper (z.B. anti-Thy1.1 und/oder anti-Thy1.2) und Komplement entfernt werden. In einer Ausführungsform werden ruhende lymphoide Zellen, vorzugsweise ruhende B-Zellen, als Antigenpräsentierende Zellen verwendet. Ruhende lymphoide Zellen, wie ruhende B-Zellen, können durch Techniken, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, isoliert werden, beispielsweise basierend auf ihrer geringen Größe und Dichte. Ruhende lymphoide Zellen können beispielsweise durch Gegenstrom-Zentrifugalelutriation, wie in Beispiel 1 beschrieben, isoliert werden. Bei einer Verwendung einer Gegenstrom-Zentrifugalelutriation kann eine Population von kleinen ruhenden lymphoiden Zellen, die hinsichtlich Zellen, die T-Zellreaktionen aktivieren können, verarmt ist, erhalten werden, indem eine oder mehrere Fraktionen mit 14–19 ml/min, vorzugsweise 19 ml/min (bei 3200 Upm) gesammelt wird bzw. werden. Alternativ können kleine ruhende Lymphozyten (z.B. B-Zellen) durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation, beispielsweise unter Verwendung eines Ficoll- oder Percoll-Gradienten, isoliert werden und nach einer Zentrifugation kann eine Schicht, welche kleine ruhende Lymphozyten enthält, erhalten werden. Kleine ruhende B-Zellen können auch von aktivierten B-Zellen unterschieden werden, indem auf die Expression von costimulatorischen Molekülen, wie B7-1 und/oder B7-2, an der Oberfläche von aktivierten B-Zellen durch Standardtechniken (z.B. Immunfluoreszenz) getestet wird.

[0038] Die dem Empfänger verabreichten allogenen oder xenogenen Zellen entfalten, wenigstens teilweise, ihre Funktion, indem sie Spender-Antigene gegenüber Empfänger-T-Zellen präsentieren. Dementsprechend

exprimieren die Zellen Antigene, die ebenfalls durch das Spendergewebe oder -organ exprimiert werden. Dies kann typischerweise bewerkstelligt werden, indem allogene oder xenogene Zellen verwendet werden, die von dem Spender des Gewebeoder Organtransplantats erhalten worden sind. Beispielsweise können periphere lymphoide Zellen, B-Zellen oder Milzzellen aus dem Gewebe- oder Organspender isoliert und in den Verfahren der Erfindung verwendet werden. Alternativ können allogene oder xenogene Zellen von einer anderen Quelle als dem Spender des Gewebes oder Organs erhalten werden, solange die Zellen antigene Determinanten aufweisen, die gleichermaßen bei dem Gewebe- oder Organspender vorhanden sind. Es können beispielsweise allogene oder xenogene Zellen verwendet werden, die (den größten Teil oder die Gesamtmenge) eben jener Haupthistokompatibilitätskomplex-Antigene, die gleichfalls bei dem Spendergewebe oder -organ vorhanden sind, exprimieren. So können allogene oder xenogene Zellen aus einer Quelle, die hinsichtlich des MHC-Haplotyps mit dem Spender des Gewebes oder Organs übereinstimmt, (z.B. ein enger Verwandter des Transplantatspenders) verwendet werden.

III. Verabreichung von Zellen und gp39-Antagonisten

[0039] Eine T-Zelltoleranz gegenüber einem Organ- oder Gewebetransplantat kann gemäß der Erfindung durch Verabreichung eines gp39-Antagonisten in Verbindung mit einer allogenen oder xenogenen Zelle, die Spender-Antigene exprimiert und mit Empfänger-T-Zellen über gp39 interagiert, an den Transplantatempfänger hervorgerufen werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die allogene oder xenogene Zelle und der gp39-Antagonist dem Empfänger simultan oder gleichzeitig verabreicht. Alternativ kann der gp39-Antagonist vor der Verabreichung der allogenen oder xenogenen Zellen verabreicht werden, beispielsweise wenn der Antagonist ein Antikörper mit einer langen Halbwertszeit ist. In einer bevorzugten Ausführungsform werden der Antagonist und die allogenen oder xenogenen Zellen dem Empfänger vor der Transplantation des Organs oder Gewebes in den Empfänger verabreicht (d.h. der Empfänger wird mit dem Antagonisten und den Zellen vorbehandelt). Die Verabreichung der allogenen oder xenogenen Zellen und des Antagonisten kann beispielsweise mehrere Tage (z.B. fünf bis acht Tage) vor der Gewebe- oder Organtransplantation ausgeführt werden.

[0040] Eine Verabreichung einer einzigen Dosis von allogenen Zellen (in Kombination mit dem Antagonisten) hat sich als ausreichend für ein Hervorrufen von T-Zelltoleranz gegenüber einem Spendergewebe oder -organ erwiesen (siehe Beispiel 1). Die Anzahl von verabreichten Zellen kann abhängig von der verwendeten Zellart, der Art des Gewebe- oder Organtransplantats, dem Gewicht des Empfängers, dem Allgemeinzustand des Empfängers und von anderen Variablen, die den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind, variieren. Eine geeignete Anzahl von Zellen für eine Verwendung in dem Verfahren der Erfindung kann durch einen Fachmann auf diesem Gebiet durch herkömmliche Methoden (beispielsweise wie in Beispiel 1 beschrieben) bestimmt werden. Zellen werden in einer Form und über eine Route, die für das Hervorrufen von T-Zelltoleranz bei dem Empfänger geeignet ist, verabreicht. Zellen können in einer physiologisch verträglichen Lösung, wie einer gepufferten Kochsalzlösung oder einem ähnlichen Vehikel, verabreicht werden. Zellen werden bevorzugt intravenös verabreicht.

[0041] Ein Antagonist der Erfindung wird an ein Individuum in einer biologisch verträglichen Form, welche für eine pharmazeutische Verabreichung in vivo, um T-Zelltoleranz hervorzurufen, geeignet ist, verabreicht. Mit „biologisch verträgliche Form, welche für eine Verabreichung in vivo geeignet ist", wird eine Form des zu verabreichenden Antagonisten gemeint, bei welcher jegliche toxischen Wirkungen durch die therapeutischen Wirkungen der Verbindung überwogen werden. Der Begriff „Individuum" soll lebende Organismen, bei denen eine Immunantwort hervorgerufen werden kann, z.B. Säugetiere, umfassen. Beispiele von Individuen umfassen Menschen, Hunde, Katzen, Mäuse, Ratten und transgene Spezies davon. Ein gp39-Antagonist von kann in einer beliebigen pharmakologischen Form, gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, verabreicht werden. Eine Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge des Antagonisten ist als eine Menge definiert, die bei den erforderlichen Dosen und Zeitspannen wirksam ist, um das gewünschte Ergebnis (z.B. T-Zelltoleranz) zu erzielen. Beispielsweise kann eine therapeutisch wirksame Menge eines Antagonisten von gp39 abhängig von Faktoren, wie dem Krankheitsstadium, Alter, Geschlecht und Gewicht des Individuums und der Fähigkeit des Antagonisten, eine gewünschte Reaktion in dem Individuum hervorzurufen, variieren. Dosierungspläne können angepasst werden, um die optimale therapeutische Reaktion zu bewirken. Beispielsweise können mehrere aufgeteilte Dosen täglich verabreicht werden oder die Dosis kann proportional verringert werden, wie durch die Erfordernisse der therapeutischen Situation bestimmt wird. Wie in Beispiel 1 für eine Behandlung mit einem anti-gp39-Antikörper beschrieben, kann ein wirksamer Behandlungsplan ein Starten der Antikörperverabreichung vor der Gewebe- oder Organtransplantation (z.B. fünf bis acht Tage vor der Transplantation), gefolgt von einer erneuten Verabreichung des Antikörpers (z.B. jeden zweiten Tag) für mehrere Wochen (z.B. zwei bis sieben Wochen) nach der Transplantation umfassen.

[0042] Die aktive Verbindung (z.B. ein Antagonist, wie ein Antikörper) kann auf eine geeignete Weise, wie durch Injektion (subkutan, intravenös u.s.w.), orale Verabreichung, Inhalation, transdermale Anwendung oder rektale Verabreichung, verabreicht werden. Abhängig von der Verabreichungsroute kann die aktive Verbindung mit einem Material überzogen sein, um die Verbindung vor der Wirkung von Enzymen, Säuren und anderen natürlichen Zuständen, die die Verbindung inaktivieren könnten, zu schützen. Eine bevorzugte Verabreichungsroute ist durch intravenöse Injektion.

[0043] Um einen Antagonisten von gp39 auf andere Weise als eine parenterale Verabreichung zu verabreichen, kann es erforderlich sein, den Antagonisten mit einem Material, um dessen Inaktivierung zu verhindern, zu überziehen oder diesen gleichzeitig mit einem solchen Material zu verabreichen. Beispielsweise kann ein Antagonist an ein Individuum in einem geeigneten Träger oder Verdünnungsmittel in Form einer Coverabreichung mit Enzyminhibitoren oder in einem geeigneten Träger, wie Liposomen, verabreicht werden. Pharmazeutisch verträgliche Verdünnungsmittel umfassen Kochsalzlösung und wässrige Pufferlösungen. Enzyminhibitoren umfassen Pankreas-Trypsininhibitor, Diisopropylfluorphosphat (DEP) und Trasylol. Liposome umfassen Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsionen wie auch herkömmliche Liposome (Strejan et al., (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

[0044] Die aktive Verbindung kann auch parenteral oder intraperitoneal verabreicht werden. Dispersionen können auch in Glycerol, flüssigen Polyethylenglycolen und Mischungen davon und in Ölen hergestellt werden. Unter gewöhnlichen Bedingungen von Aufbewahrung und Verwendung können diese Zubereitungen ein Konservierungsmittel enthalten, um die Vermehrung von Mikroorganismen zu verhindern.

[0045] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die für eine Verwendung als injizierbare Formulierungen geeignet sind, umfassen sterile wässrige Lösungen (sofern wasserlöslich) oder Dispersionen und sterile Pulver für die unmittelbar vorher erfolgende Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen. In allen Fällen muss die Zusammensetzung steril sein und muss fluid sein in dem Ausmaß, dass eine leichte Verabreichbarkeit mittels einer Spritze vorliegt. Sie muss unter den Herstellungs- und Aufbewahrungsbedingungen stabil sein und muss gegen die verunreinigende Wirkung von Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilzen, geschützt sein. Der Träger kann ein Lösemittel oder ein Dispersionsmedium sein, welches beispielsweise Wasser, Ethanol, Polyol (beispielsweise Glycerol, Propylenglycol und flüssiges Polyethylenglycol und dergleichen) und geeignete Mischungen davon enthält. Die korrekte Fluidität kann beispielsweise durch die Verwendung eines Überzugs, wie Lecithin, durch die Aufrechterhaltung der erforderlichen Teilchengröße im Falle einer Dispersion und durch die Verwendung von grenzflächenaktiven Mitteln aufrechterhalten werden. Die Verhütung der Wirkung von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle Mittel und Antipilzmittel, beispielsweise Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Ascorbinsäure, Thimerosal und dergleichen erzielt werden. In vielen Fällen wird es bevorzugt sein, isotonische Mittel, beispielsweise Zucker, Polyalkohole, wie Mannitol, Sorbitol, Natriumchlorid, in die Zusammensetzung aufzunehmen. Eine länger andauernde Absorption der injizierbaren Zusammensetzungen kann durch Aufnahme eines Mittels, welches die Absorption verzögert, beispielsweise von Aluminiummonostearat und Gelatine, in die Zusammensetzung bewirkt werden.

[0046] Sterile injizierbare Lösungen können hergestellt werden, indem die aktive Verbindung (z.B. ein Antagonist von gp39) in der erforderlichen Menge mit einem oder einer Kombination der oben aufgezählten Bestandteile, wie erforderlich, in ein geeignetes Lösemittel eingebracht wird, gefolgt von Sterilfiltration. Im Allgemeinen werden Dispersionen hergestellt, indem die aktive Verbindung in einen sterilen Träger, der ein grundlegendes Dispersionsmedium und die benötigten anderen Bestandteile aus jenen, die oben aufgezählt worden sind, enthält, eingearbeitet wird. Im Falle von sterilen Pulvern für die Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen sind die bevorzugten Herstellungsverfahren Vakuumtrocknung und Gefriertrocknung, die ein Pulver des Wirkstoffs (z.B. Antagonisten) plus jeglicher zusätzlicher gewünschter Bestandteile aus einer zuvor sterilfiltrierten Lösung davon liefern.

[0047] Wenn die aktive Verbindung geeignet geschützt ist, wie oben beschrieben, kann das Protein oral verabreicht werden, beispielsweise mit einem inerten Verdünnungsmittel oder einem assimilierbaren essbaren Träger. Wie hier verwendet, umfasst „pharmazeutisch annehmbarer Träger" ein jegliches und alle Lösemittel, Dispersionsmedien, Überzüge, antibakterielle Mittel und Antipilzmittel, isotonische und absorptionsverzögernde Mittel und dergleichen. Die Verwendung von solchen Medien und Mitteln für pharmazeutisch wirksame Substanzen ist in diesem Fachgebiet wohlbekannt. Ausgenommen insoweit, als ein bestimmtes herkömmliches Medium oder Mittel mit der aktiven Verbindung unverträglich ist, wird eine Verwendung davon in den therapeutischen Zusammensetzungen mit in Betracht gezogen. In die Zusammensetzungen können auch ergänzende aktive Verbindungen oder Wirkstoffe mit eingearbeitet werden.

[0048] Es ist besonders vorteilhaft, parenterale Zusammensetzungen in Einheitsdosierungsform für eine leichte Verabreichung und Gleichförmigkeit der Dosierung zu formulieren. Eine Einheitsdosierungsform, wie sie hier verwendet wird, bezieht sich auf körperlich diskrete Einheiten, die als einheitliche Dosierungen für die zu behandelnden Säugetier-Individuen geeignet sind, wobei jede Einheit eine vorher festgelegte Menge an aktiver Verbindung, die so berechnet ist, dass die gewünschte therapeutische Wirkung hervorgerufen wird, in Verbindung mit dem erforderlichen pharmazeutischen Träger enthält. Die Spezifikation für die Einheitsdosierungsformen der Erfindung wird diktiert durch und ist direkt abhängig von (a) den einzigartigen Eigenschaften der aktiven Verbindung und der jeweiligen therapeutischen Wirkung, die erzielt werden soll, und (b) den auf dem Fachgebiet der Formulierung einer solchen aktiven Verbindung für die Behandlung von Empfindlichkeit bei Individuen inhärenten Einschränkungen.

[0049] Nachfolgend zu oder gleichzeitig mit dem hier beschriebenen Toleranzinduktionsbehandlungsplan wird ein Spendergewebe oder -organ durch herkömmliche Techniken in einen Transplantatempfänger transplantiert.

IV. Verwendungen der Verfahren der Erfindung

[0050] Die Verfahren der Erfindung sind auf eine große Vielzahl von Gewebe- und Organtransplantatsituationen anwendbar. Die Verfahren können verwendet werden, um T-Zelltoleranz bei einem Empfänger eines Transplantats eines Gewebes oder Organs, wie Langerhans-Inseln, Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen und Darm, hervorzurufen. Dementsprechend können die Verfahren der Erfindung bei Behandlungen von Erkrankungen oder Leiden, die eine Gewebe- oder Organtransplantation mit sich bringen (z.B. Lebertransplantation zur Behandlung von Hypercholesterolemie, Transplantation von Muskelzellen zur Behandlung von Muskeldystrophie, Transplantation von neuronalem Gewebe zur Behandlung von Chorea Huntington oder Parkinson'-Krankheit u.s.w.), angewendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das transplantierte Gewebe Langerhans-Inseln. Dementsprechend umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Diabetes durch die Transplantation von Langerhans-Inselzellen. Das Verfahren umfasst, einem Individuum, das einer Behandlung bedarf, zu verabreichen: 1) allogene oder xenogene Zellen, die Spender-Antigene exprimieren, 2) einen Antagonisten eines auf Empfänger-T-Zellen exprimierten Moleküls, welches kontaktabhängige Helfer-Effektorfunktionen vermittelt, wie einen gp39-Antagonisten (z.B. einen anti-gp39-Antikörper), und 3) Spender-Langerhans-Inselzellen. Die allogenen oder xenogenen Zellen und der Antagonist werden vorzugsweise an den Empfänger vor der Verabreichung der Langerhans-Inseln verabreicht.

[0051] Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel, das nicht als einschränkend aufgefasst werden sollte, weiter veranschaulicht. Der Inhalt aller Referenzen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen, die in dieser gesamten Anmeldung zitiert werden, werden hiermit unter Bezugnahme aufgenommen.

BEISPIEL 1: Induktion von Toleranz gegenüber Langerhans-Insel-Allotransplantaten durch Behandlung des Empfängers mit allogenen Zellen und anti-39

[0052] Gegenwärtige Allotransplantationsstudien hängen von einer generalisierten Immunsuppression, die Immuneffektorfunktionen nicht-spezifisch beseitigt, ab. Immunsuppressive Arzneimittel können jedoch signifikante Nebenwirkungen verursachen. Zusätzlich hat sich die Allotransplantation von Langerhans-Inseln für die Behandlung von Diabetes als diesem Ansatz nicht zugänglich erwiesen (siehe z.B. Robertson, R. P. (1992) N. Engl. J. Med. 327, 1861). Therapien mit gegen T-Zellen gerichteten Antikörpern können eine erfolgreiche Allotransplantierung von Inseln bei Nagetieren ermöglichen, aber dieser Ansatz führt zu gleichförmig zu einer generalisierten Immunsuppression (Carpenter, C. B. (1990) N. Engl. J. Med. 322, 1224; Roark, J. H., et al. (1992) Transplantation 54, 1098; Kahan, B. D. (1992) Curr. Opin. Immunol. 4, 553). In diesem Beispiel wurde Toleranz gegenüber Insel-Allotransplantaten bei einem Transplantatempfänger durch Manipulation der Präsentation von Alloantigenen gegenüber T-Zellen, so dass deren Aktivierung verhindert wurde, hervorgerufen. Das Überleben von Insel-Allotransplantaten bei C57BL/6 (H-2^b)-Mäusen mit chemisch induziertem Diabetes wurde unter Verwendung der folgenden Methodik untersucht.

Induktion von Diabetes

[0053] Männliche C57B1/6J (H-2^b)-Mäuse wurden durch die intravenöse Verabreichung von Streptozotocin (140 mg/kg) diabetisch gemacht. Permanenter Diabetes wurde durch den Nachweis einer Plasma-Glucosekonzentration ≥ 400 mg/dl bei drei Gelegenheiten über einen Zeitraum von einer Woche bestätigt.

Allogene Milzzell-Fraktionierung

[0054] Allogene Spenderzellen für eine Vorbehandlung von Transplantatempfängern wurden von hybriden (C57 × BALB/c)(H-$2^{6/d}$) F_1-Tieren erhalten, um eine Graft-versus-Host-Reaktion zu verhindern. Um kleine Lymphozytenzellen zu isolieren, wurden Milzzellsuspensionen von 8 Wochen alten weiblichen (C57 × BALB/c)-F_1-Mäusen hinsichtlich Erythrozyten verarmt und dann durch Elutriation hinsichtlich der Größe aufgetrennt, wie in Tony, H. P., et al. (1985) J. Exp. Med. 161, 223; und Gosselin, E. J., et al. (1988) J. Immunol. 140, 1408, beschrieben. Kurz zusammengefasst, werden kleine Lymphozyten durch Gegenstrom-Zentrifugalelutriation, beispielsweise unter Verwendung einer Modell J-6B-Zentrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) isoliert. Ungefähr 1–5 × 10^8 Zellen in 8 ml Kulturmedium oder balancierter Salzlösung mit 1,5% fötalem Rinderserum werden mit Desoxyribonuklease behandelt, in die Elutriationskammer eingefüllt mit einer Ausgangs-Gegenstromflussrate von 13,5 ml/min und bei 4°C mit einer konstanten Geschwindigkeit von 3200 Upm zentrifugiert. Eine kleinzellige Fraktion mit sehr wenigen verunreinigenden großen Zellen wird typischerweise bei 14–19 ml/min eluiert, obwohl die genaue Flussrate von dem Medium, in dem die Zellen suspendiert werden, abhängen kann. In den hier beschriebenen Experimenten wurde die kleinzellige Fraktion bei 19 ml/min gesammelt (bei 3200 Upm). Diese Fraktion war hinsichtlich strahlungsresistenter (3000 Rad) akzessorischer Zellfunktion vollständig verarmt, wenn mittels T-Zelllinien, die entweder für Kaninchen-IgG und $H2^d$ spezifisch (CDC35) oder gegenüber $H2^b$ alloreaktiv waren (D10.G4), getestet wurde. Kleine Zellen und unfraktionierte Zellen wurden zweimal in serumfreiem Medium vor einer Schwanzvenen-Injektion in Allotransplantat-Empfänger gewaschen. Es wurden ungefähr 40–100 × 10^6 unfraktionierte (C57 × BALB/c) F_1 (H-$2^{b/d}$)-Milzzellen oder 40–100 × 10^6 durch Elutriation gewonnene (C57 × BALB/c) F_1 (H-$2^{b/d}$)-Milzzellen verwendet.

Vorbehandlung von Transplantatempfängern

[0055] Transplantatempfänger wurden mit entweder unfraktionierten allogenen (C57 × BALB/c) F_1 (H-$2^{b/d}$)-Milzzellen, elutriierten Milzzellen mit kleinem Durchmesser der „Fraktion 19", die hinsichtlich der APC-Aktivität verarmt waren (isoliert, wie oben beschrieben), einem monoklonalen anti-gp39-Antikörper (MR1, siehe Beispiel 2, Experiment 3) oder einer Kombination von allogenen Zellen und anti-gp39-Antikörper vorbehandelt. Die Fraktion 19-Zellen wurden in zwei unterschiedlichen Dosisbereichen getestet, einer niedrigen Dosierung von 40–44 × 10^6 Zellen oder einer hohen Dosis von 77–88 × 10^6 Zellen. Kontrolltiere erhielten weder allogene Zellen noch eine Antikörperbehandlung. Allogene Zellen wurden an Transplantatempfänger durch Schwanzveneninjektion fünf bis acht Tage vor der Insel-Allotransplantat-Transplantation verabreicht. Eine Behandlung mit dem MR1-Antikörper erfolgte in einer Dosis von 250 µg/Maus zweimal wöchentlich beginnend 7 Tage vor der Insel-Transplantation und andauernd für 2 bis 7 Wochen oder bis zum Versagen des Transplantats. Die erste Injektion von Antikörper erfolgte typischerweise an dem gleichen Tag wie die erste Injektion von allogenen Spleenzellen.

Insel-Allotransplantat-Transplantation

[0056] Allogene BALB/c (H-2^d)-Inseln wurden durch eine modifizierte Collagenase-Verdau-Methode (Gottlieb, P. A., et al. (1990) Diabetes 39, 643) isoliert. Inseln wurden in einer Dosis von 30 Inseln/g Körpergewicht in die subrenale Kapsel der C57B1/6J (H-2^b)-Empfängermäuse unmittelbar nach der Isolierung implantiert. Das Überleben eines Transplantats wurde als die Aufrechterhaltung einer Plasma-Glucosekonzentration ≤ 200 mg/dl definiert.

Ergebnisse

[0057] In einer ersten Reihe von Experimenten wurden Insel-Allotransplantat-Empfänger mit entweder allogenen Milzzellen allein oder anti-gp39-Antikörper allein vorbehandelt. Wie in **Fig. 1** gezeigt, wurden in Abwesenheit einer Vorbehandlung mit Milzzellen alle Insel-Allotransplantate innerhalb von 13 Tagen nach der Transplantation (9 ± 2 Tage; Bereich 5–13 Tage; N = 23) abgestoßen. Ein schlechtes Überleben der Inseln wurde auch bei Tieren, die nur mit unfraktionierten Milzzellen, die normale APC-Aktivität enthielten (6 ± 3 Tage; Bereich 4–12 Tage; N = 7), oder niedrigen Dosen (40–44 × 10^6 Zellen) von APC-verarmten Fraktion 19– Milzzellen (7 ± 3 Tage; Bereich 3–14 Tage; N = 16) behandelt worden waren, beobachtet. Im Gegensatz dazu verlängerte die Injektion einer höheren Dosis von APC-verarmten, kleinen Fraktion 19-Milzzellen (75–88 × 10^6 Zellen) das Überleben der Allotransplantate (19 ± 10 Tage, Bereich 7–40 Tage; N = 16). Dieser Effekt auf die Dauer des Überlebens der Transplantate war statistisch signifikant ($F_{3,58}$ = 17,3 $p < 0{,}001$, verglichen mit Gruppen, die mit Nichts, Gesamt-Milz-Transfusionen oder der geringeren Dosis von Fraktion 19-Milzzellen behandelt worden waren), war aber nicht permanent. Das verlängerte, aber begrenzte Überleben von allogenen Inseln bei diabetischen Empfängern von APC-verarmten, kleinen Fraktion 19-Zellen legte nahe, dass diese Zellen allein das

Überleben der Allotransplantate nicht aufrecht erhalten können. Eine zusätzliche Gruppe von Transplantatempfängern wurde mit 77–88 × 10^6 Fraktion 20-Zellen behandelt. Diese Fraktion wurde ebenfalls in überwältigendem Ausmaß aus kleinen Lymphozyten gebildet, unterscheidet sich aber von der Fraktion 19-Population darin, dass sie messbare APC-Funktion enthält. Empfänger von diesen Zellen (N = 6) stießen allesamt ihre Transplantate unverzüglich ab (Mittelwert = 8,5 Tage; Bereich 6–12). Eine andere Gruppe von Transplantatempfängern wurde allein mit einem monoklonalen anti-gp39-Antikörper, MR1, behandelt. Fig. 1 veranschaulicht, dass Insel-Allotransplantate innerhalb von 15 Tagen bei 7/11 Mäusen, die nur mit dem anti-gp39-mAb behandelt worden waren, versagten. Die verbleibenden vier Mäuse wiesen funktionsfähige Transplantate bei Beendigung des Experiments am Tag 48 auf. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Verabreichung des anti-gp39-Antikörpers MR1 allein an den Empfänger das Überleben der Insel-Allotransplantate verlängern kann (Mittelwert 20 = 19 Tage; Bereich 9 unendlich; N = 5). Das Ausmaß der Verlängerung war statistisch ähnlich zu jenem, das unter Verwendung einer höheren Dosis von Fraktion 19-Milzzellen allein erzielt wurde, und signifikant länger als jenes, das bei den anderen drei Gruppen erzielt wurde ($p < 0,05$).

[0058] Die oben beschriebene Reihe von Experimenten zeigte, dass hohe Dosen von APC-verarmten Fraktion 19-Milzzellen oder eine anti-gp39-mAb-Behandlung allein das Überleben von Langerhans-Insel-Allotransplantaten verglichen mit keinerlei Behandlung verlängern können. Jedoch war keine der beiden Behandlungen allein wirksam, um eine Langzeittoleranz gegenüber den Insel-Transplantaten bei den Empfängern hervorzurufen. In der nächsten Reihe von Experimenten wurde eine Behandlung mit allogenen Milzzellen mit einer anti-gp39-Behandlung des Empfängers kombiniert. Die kombinierte Verabreichung von allogenen Milzzellen und anti-gp39 erwies sich als wirkungsvoller als jedes Reagens allein. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 2 gezeigt, wobei jede Kurve die Daten einer individuellen Maus repräsentiert. Leere Symbole identifizieren Empfänger, bei denen das Insel-Allotransplantat spontan versagte. Ausgefüllte Symbole geben Mäuse an, deren Insel-Transplantate bei Beendigung des Experiments funktionsfähig waren. **Fig.** 2 (Feld B) zeigt, dass bei allen Tieren, die 7 Wochen mit anti-gp39-mAb und einer einzelnen Injektion von APC-verarmten Fraktion 19-Milzzellen behandelt worden waren (N = 6), ein unbegrenztes Transplantatüberleben erzielt wurde. Eine Veränderung dieses Protokolls durch Verringerung der Dauer der anti-gp39-Behandlung schwächte, hob aber die günstige Wirkung auf das Transplantatüberleben nicht auf. Bei 6/8 Empfängern wurde ein unbegrenztes Transplantatüberleben erreicht, wenn anti-gp39-mAb für nur 2 Wochen in Kombination mit Fraktion 19-Milzzellen verabreicht wurde (**Fig.** 2, Feld A). Ein unbegrenztes Transplantatüberleben wurde auch bei Empfängern beobachtet, die 2 oder 7 Wochen mit anti-gp39 in Kombination mit einer Injektion von unfraktionierten allogenen Milzzellen behandelt worden waren.

[0059] Um die Inseltransplantat-Funktion und das Fehlen einer Insulinsekretion durch restliche native Inseln, die durch die Streptozotocin-Behandlung nicht zerstört worden waren, zu bestätigen, wurden die subrenale Implantate tragenden Nieren entfernt. In allen Fällen führte eine einseitige Nephrektomie zu dem erneuten Auftreten von Hyperglykämie (> 300 mg/dl) innerhalb von 3 Tagen.

[0060] Insel-Allotransplantate und der native Pankreas wurden bei allen Tieren histologisch untersucht, entweder wenn das Transplantat versagte oder am Ende des Experiments. Histologische Schnitte von Insel-Allotransplantaten in den Nieren von Empfängern von fraktionierten allogenen kleinen Lymphozyten und kontinuierlicher (7 Wochen) MRI-mAb-Behandlung zeigten überaus zahlreiche intakte Inseln, die unterhalb der Nierenkapsel sichtbar waren, die frei waren von einer Infiltration durch mononukleäre Zellen und gut granuliertes Insulin und Glucagon-positive Zellen enthielten. Im Gegensatz dazu zeigten histologische Schnitte von Insel-Allotransplantaten in den Nieren von mit anti-gp39-mAb allein behandelten Empfängern eine charakteristische intensive Entzündung durch mononukleäre Zellen und eine begleitende Inselzell-Zerstörung. In allen Wirts-Pankreas-Organen war die Insel-Morphologie gleichförmig konsistent mit Streptozotocin-Diabetes.

BEISPIEL 2: Produktion und Charakterisierung von anti-gp39-Antikörpern

Experiment 1 - Gegen humanes gp39 gerichtete Antikörper

[0061] Für das Hervorrufen von Antigen-spezifischer T-Zelltoleranz bei einem humanen Patienten ist es bevorzugt, einen gegen humanes gp39 gerichteten Antikörper zu verabreichen. Die folgende Methodik wurde verwendet, um monoklonale Mäuse-anti humanes gp39-Antikörper herzustellen. Balb/c-Mäuse wurden mit einem löslichen gp39-Fusionsprotein, gp39-CD8, in komplettem Freund'-Adjuvans (CFA) immunisiert. Mäuse wurden nachfolgend 6 Wochen später mit löslichem gp39-CD8 in nicht-komplettem Freund'-Adjuvans (IFA) provoziert („challenge"). Lösliches gp39-CD8 wurde in löslicher Form 4 Wochen nach der zweiten Immunisierung verabreicht. Mäuse wurden dann mit aktivierten humanen Lymphozyten des peripheren Bluts 2 Wochen später geboostet (re-immunisiert), gefolgt von einem abschließenden Boosten (Re-Immunisierung) mit lösli-

chem gp39-CD8 nach weiteren 2 Wochen. Milzzellen wurden mit dem NS-1-Fusionspartner am Tag 4 nach der abschließenden Immunisierung, wie in Standardprotokollen beschrieben, fusioniert.

[0062] Anti-humanes gp39-Antikörper produzierende Klone wurden basierend auf einem mehrfachen Screeningverfahren ausgewählt. Klone wurden anfänglich durch einen Plattenbindungsassay unter Verwendung von gp39-CD8 gescreent. Positive Klone wurden dann gegen ein Kontroll-CD8-Fusionsprotein, CD72-CD8, gescreent. Klone, die bei dem CD8-CD72-Plattenbindungsassay ein positives Ergebnis lieferten, wurden eliminiert. Die verbleibenden Klone wurden nachfolgend an ruhenden und 6 h aktivierten humanen Lymphozyten des peripheren Bluts (PBL) durch durchflusszytometrische Analyse gescreent. Hybridome, die aktivierte, nicht aber ruhende PBL anfärbten, wurden als positiv angesehen. Schließlich wurden die verbleibenden Klone hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Bindung von CD40Ig an an Platten gebundenes gp39 zu blockieren, getestet.

[0063] Anfänglich wurden ungefähr 300 Klone gegenüber gp39-CD8 und CD72-CD8 in den Plattenbindungsassays gescreent. Es wurde festgestellt, dass von diesen Klonen 30 an Platten gebundenes gp39 und nicht CD8 detektierten. Diese Klone wurden nachfolgend hinsichtlich einer Detektion von gp39 an aktivierten humanen PBL gescreent. Ungefähr 15 Klone detektierten ein Molekül an aktivierten PBL, nicht aber an ruhenden Zellen. Spezifität wurde weiter bestätigt, indem die Fähigkeit der Klone, die CD40Ig-Detektion von an Platten gebundenem gp39 zu blockieren, bestimmt wurde. 3 von 10 getesteten Klonen blockieren die CD40Ig-Bindung in diesem Assay. Diese Klone waren 3E4, 2H5 und 2H8. Solche Klone sind für eine Verwendung in den hier beschriebenen Verfahren bevorzugt. Klone, die bei aktivierten, aber nicht ruhenden PBL ein positives Ergebnis lieferten, wurden auch auf Reaktivität gegenüber einem aktivierten Ratten-T-Zellklon, POMC8, gescreent. Der Klon 2H8 exprimierte Kreuzreaktivität mit dieser Ratten-T-Zelllinie.

Experiment 2 – Gegen humanes gp39 gerichtete Antikörper

[0064] Es wurde eine ähnliche Immunisierungsprozedur wie jene, die in Experiment 1 beschrieben worden ist, verwendet, um zusätzliche, gegen humanes gp39 gerichtete Antikörper zu produzieren. Eine Balb/c-Maus wurde mit löslichem gp39-CD8 in CFA immunisiert, gefolgt von einer Provokation („challenge") mit 6 Stunden lang aktivierten humanen Lymphozyten des peripheren Bluts 4 Wochen später. Die Maus wurde nachfolgend mit löslichem gp39-CD8 4 Tage vor der Fusion von Milzzellen mit dem NS-1-Fusionspartner mittels Standardprotokollen geboostet (re-immunisiert). Das Screening von Hybridomklonen wurde durch durchflusszytometrische Anfärbung von 6 Stunden lang aktivierten humanen PBLs ausgeführt. Klone, die aktivierte, nicht aber ruhende humane PBLs anfärbten, wurden ausgewählt. Es wurden sechs Klone, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 und 89-79, für eine weitere Analyse ausgewählt.

[0065] Die Spezifität der ausgewählten Antikörper wurde durch mehrere Assays bestätigt. Zuerst zeigte eine durchflusszytometrische Analyse, dass alle sechs mAbs aktivierte, nicht aber ruhende T-Zellen des peripheren Bluts anfärbten (siehe **Fig. 3B** und **Fig. 3C** für ein repräsentatives Beispiel, welche die Anfärbung von aktivierten T-Zellen mit 4D9-8 bzw. 4D9-9 zeigen). Die Expression des durch jeden der sechs Antikörper erkannten Moleküls ist innerhalb von 4 Stunden Aktivierung detektierbar, ist zwischen 6 und 8 Stunden nach der Aktivierung maximal und ist 24 h nach der Aktivierung nicht mehr nachweisbar. Alle sechs mAbs erkennen ein auf aktivierten $CD3^+$-PBLs, hauptsächlich vom $CD4^+$-Phänotyp, exprimiertes Molekül, aber ein Teil der $CD8^+$-T-Zellen exprimiert das Molekül ebenfalls. Die Expression des durch die sechs mAbs erkannten Moleküls wird durch die Anwesenheit von Cyclosporin A im Kulturmedium gehemmt ebenso wie die Expression von gp39 (siehe **Fig. 4A** und **Fig. 4B** für ein repräsentatives Beispiel, welche die Anfärbung von mit Cyclosporin A behandelten T-Zellen mit 4D9-8 bzw. 4D9-9 zeigen). Die Kinetik und Verteilung der Expression des durch diese mAbs erkannten Moleküls sind identisch zu jenen von gp39, wie durch das Fusionsprotein von humanem CD40Ig detektiert wird. Zusätzlich blockieren alle sechs mAbs die Anfärbung von gp39 durch CD40Ig (siehe **Fig. 5A** und **Fig. 5B** für ein repräsentatives Beispiel, welche die Inhibition der gp39-Anfärbung durch CD40Ig in Gegenwart von 4D9-8 bzw. 4D9-9 zeigen). In einem ELISA-Assay erkennen alle sechs mAbs gp39-CD8, eine lösliche Fusionsform des gp39-Moleküls. Darüber hinaus immunpräzipitieren alle sechs mAbs ein Molekül von ungefähr 36 kd aus ^{35}S-Methionin-markierten aktivierten humanen PBLs. Das immunpräzipitierte Molekül ist identisch zu jenem, das durch das humane CD40Ig-Fusionsprotein präzipitiert wird.

[0066] Die funktionale Aktivität der sechs ausgewählten mAbs (4D9-8, 4D9-9, 24-32, 24-43, 89-76 und 89-79) wurde, wie folgt, bestimmt. Als erstes wurde die Fähigkeit der mAbs, die Proliferation von gereinigten humanen B-Zellen, die mit IL-4 und löslichem gp39 kultiviert wurden, zu hemmen, gemessen. Gereinigte humane B-Zellen wurden mit gp39 und IL-4 in Gegenwart oder Abwesenheit von gereinigten monoklonalen Antikörpern oder CD40Ig in Dosen zwischen 0 und 12,5 µg/ml kultiviert. Die B-Zellproliferation wurde nach 3 Tagen in Kultur durch Thymidin-Einbau bestimmt. Die Ergebnisse (in **Fig. 6** gezeigt) zeigen, dass alle sechs mAbs die durch

gp39 und IL-4 hervorgerufene B-Zellproliferation hemmen können. Die mAbs 89-76 und 24-31 waren am wirkungsvollsten, die hervorgerufene B-Zellproliferation zu hemmen.

[0067] Als nächstes wurde die Fähigkeit der mAbs, die B-Zelldifferenzierung zu hemmen, wie anhand der durch durch anti-CD3 aktivierte T-Zellen und IL-2 induzierten Ig-Produktion gemessen, untersucht. Gereinigte humane IgD^+-B-Zellen wurden durch positive Selektion mittels FACS hergestellt und dann mit durch anti-CD3 aktivierten humanen T-Zellen (mit Mitomycin C behandelt) und IL-2 6 Tage in Gegenwart oder Abwesenheit von gereinigten monoklonalen anti-gp39-Antikörpern in Dosen zwischen 0 und 10 µg/ml kultiviert. Die IgM-, IgG- und IgA-Produktion wurde durch ELISA am Tag 6 bestimmt. Die Ergebnisse (nachfolgend in Tabelle 1 gezeigt) zeigen, dass alle sechs Antikörper die T-Zell-abhängige B-Zelldifferenzierung hemmen können, wie anhand der IgM-, IgG- und IgA-Produktion gemessen wird.

Tabelle 1

		Produktion von Immunglobulin		
mAb	µg/ml	IgM	IgG	IgA
keiner	-	17,500	6710	4471
4D9-8	0.1	4813	2130	2819
	1.0	4394	2558	1519
	10.0	1081	389	396
4D9-9	0.1	3594	919	1731
	1.0	2659	1233	1606
	10.0	374	448	266
24-31	0.1	3863	981	344
	1.0	1287	314	165
	10.0	1120	596	23
24-43	0.1	6227	4132	432
	1.0	3193	2130	192
	10.0	7021	1232	1081
89-76	0.1	3783	1069	344
	1.0	2180	352	171
	10.0	818	551	19
89-79	0.1	9763	1924	3021
	1.0	2314	460	156
	10.0	183	135	434

[0068] Um die Wirkung der anti-gp39-mAbs auf die T-Zellreaktionen zu untersuchen, wurden die mAbs zu Standard-„gemischte Lymphozytenreaktionen" (MLR; „mixed lymphocyte reactions") hinzugesetzt. 300000 humane Lymphozyten des peripheren Bluts (Responder = R) wurden mit 100000 bestrahlten allogenen Lymphozyten des peripheren Bluts (Stimulatoren = S) in Gegenwart oder Abwesenheit von anti-gp39-mAbs (10 µg/ml) kultiviert. Die Kulturen wurden mit 3H-Thymidin am Tag 4, 5 oder 6 gepulst und 18 h später geerntet. Alle sechs anti-humanes gp39-mAbs hemmten allo-spezifische Reaktionen, wie anhand der MLR gemessen wurde (siehe **Fig. 7** für ein repräsentatives Beispiel, welche die Hemmung von allospezifischen Reaktionen zeigt, wenn R und S in Gegenwart von 24-31 oder 89-76 inkubiert werden; ein CTLA4-Immunglobulin-Fusionsprotein und ein anti-CD28-mAb wurden als Positivkontrollen verwendet).

[0069] Um zu bestimmen, ob die sechs mAbs unterschiedliche Epitope an dem humanen gp39-Molekül erkennen, wurden Kreuzblockierungsexperimenten ausgeführt. Aktivierte humane PBLs wurden zuerst mit jedem der sechs mAbs (25 µg/ml nicht-konjugierter Antikörper) blockiert. Die Zellen wurden gewaschen und

dann mit 10 µg/ml mit Biotin konjugiertem Antikörper angefärbt, gefolgt von der Reaktion mit mit Phytoerythrin konjugiertem Avidin (PE-Av). Die Anfärbung der Zellen mit PE-Av wurde durch FACS analysiert. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Blockierung	Anfärbungs-Antikörper					
Ab	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
keiner	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	ND	-	++++	++++	+++	+++
4D9-9	+++	ND	+++	++++	+++	+++
24-31	+	+	ND	+++	++	++
24-43	+	+	+++	ND	++	+
89-76	+	+	+++	+++	ND	+++
89-79	+	++	+++	+++	+++	ND

[0070] Die Intensität der Anfärbung und der Prozentsatz von positiven Zellen werden angegeben durch das Symbol + (++++ = MI > 200; +++ = MI > 125; ++ = MI > 50; + = MI > 25; – = keine Anfärbung über den Hintergrund). ND = nicht bestimmt.

[0071] Alle Antikörper blockierten die Bindung von CD40lg an aktivierte humane PBLs. Jedoch zeigen die in Tabelle 2 gezeigten Daten klar das Versagen von einigen Antikörper, die Bindung von anderen Antikörpern an aktivierte humane PBLs zu blockieren, was nahe legt, dass sie unterschiedliche Epitope an den humanen gp39-Molekülen erkennen.

[0072] Die 89-76- und 24-31-Hybridome, die die 89-76- bzw. 24-31-Antikörper produzieren, wurden nach den Maßgaben des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, MD, am 02. September 1994 hinterlegt. Dem 89-76-Hybridom wurde die ATCC Accession Number HB11713 zugewiesen und dem 24-31-Hybridom wurde die ATCC Accession Number HB11712 zugewiesen.

Experiment 3 – Gegen Mäuse-gp39 gerichtete Antikörper

[0073] In einer Ausführungsform der Erfindung ist der gp39-Antagonist ein monoklonaler anti-Mäuse-gp39-Antikörper, MR1. Das folgende Verfahren wurde verwendet, um den monoklonalen MR1-Antikörper herzustellen, und kann verwendet werden, um andere gegen gp39 gerichtete Antikörper zu erzeugen.

[0074] Hamster wurden intraperitoneal mit 5–10^6 aktivierten Th1-Zellen (d1,6) in wöchentlichen Zeitabständen sechs Wochen immunisiert. Wenn der Serumtiter hinsichtlich Mäuse-Th1 höher als ungefähr 1:10000 war, wurden Zellfusionen mit Polyethylenglycol unter Verwendung von Hamster-Immun-Milzzellen und NS-1 ausgeführt. Überstand aus Vertiefungen, die sich vermehrende Hybridome enthielten, wurde durch Durchflusszytometrie an ruhenden und aktivierten T_h1 gescreent. Ein besonderes Hybridom, welches einen Mab produzierte, der selektiv aktivierte T_h erkannte, wurde weiter getestet und subkloniert, um MR1 abzuleiten. MR1 wurde in Aszites produziert und durch Ionenaustausch-HPLC gereinigt. Ein MR1-Hybridom wurde bei der American Type Culture Collection hinterlegt und diesem wurde die Accession Number HB11048 zugewiesen.

ÄQUIVALENTE

[0075] Die Fachleute auf diesem Gebiet werden viele Äquivalente zu den speziellen Ausführungsformen der Erfindung, die hier beschrieben werden, erkennen oder in der Lage sein, solche bei Verwendung von nicht mehr als Routine-Experimenten zu ermitteln. Solche Äquivalente sollen durch die folgenden Ansprüche mit umfasst sein. Der Inhalt aller Referenzen und veröffentlichten Patentanmeldungen, die innerhalb dieser Anmeldung zitiert werden, wird hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Patentansprüche

1. Verwendung (a) einer allogenen oder xenogenen Zelle, die zumindest ein Spender-Antigen exprimiert und an einer Oberfläche von dieser einen Liganden aufweist, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert; und
(b) eines gp39-Antagonisten
zur Herstellung einer kombinierten Zubereitung für die gleichzeitige, separate oder aufeinanderfolgende Verwendung beim Hervorrufen einer T-Zelltoleranz gegenüber einem Spendergewebe oder -organ bei einem Empfänger des Gewebes oder Organs, mit der Maßgabe, dass das Spendergewebe oder -organ Langerhans-Inseln, Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen oder Darm umfasst, wenn die allogene oder xenogene Zelle eine allogene Zelle ist.

2. Verwendung (a) einer allogenen oder xenogenen Zelle, welche zumindest ein Spender-Antigen exprimiert und an einer Oberfläche von dieser einen Liganden aufweist, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert;
(b) eines gp39-Antagonisten; und
(c) von Langerhans-Inselzellen eines Spenders für die Herstellung einer kombinierten Zubereitung für die gleichzeitige, separate oder aufeinanderfolgende Verwendung bei der Behandlung von Diabetes.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der Antagonist ein anti-gp39-Antikörper ist.

4. Verwendung (a) einer allogenen Spender-Zelle, die zumindest ein Spender-Antigen exprimiert und an einer Oberfläche von dieser einen Liganden aufweist, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert; und
(b) eines anti-gp39-Antikörpers
zur Herstellung einer kombinierten Zubereitung für die gleichzeitige, separate oder aufeinanderfolgende Verwendung beim Hervorrufen einer T-Zelltoleranz gegenüber einem Spendergewebe oder -organ bei einem Empfänger des Gewebes oder Organs, wobei die allogene Spender-Zelle und der anti-gp39-Antikörper dem Empfänger vor der Transplantation des Gewebes oder Organs zu verabreichen sind, wobei das Spendergewebe oder -organ Langerhans-Inseln, Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen oder Darm umfasst.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die allogene oder xenogene Zelle eine lymphoide Zelle ist.

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die lymphoide Zelle eine B-Zelle ist.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die B-Zelle eine ruhende B-Zelle ist.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 5 bis 7, wobei die allogene oder xenogene Zelle und der Antagonist dem Empfänger vor der Transplantation des Gewebes oder Organs zu verabreichen sind.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 4 bis 8, wobei das Gewebe oder Organ Langerhans-Inseln umfasst.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 4 bis 8, wobei das Gewebe oder Organ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronalem Gewebe, Magen und Darm.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 10, wobei der anti-gp39-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der monoklonale Antikörper aus der als ATCC HB11048 hinterlegten Hybridom-Zelllinie MR1 erhalten werden kann.

13. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der monoklonale Antikörper ein chimärer monoklonaler Antikörper ist.

14. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der monoklonale Antikörper ein humanisierter monoklonaler Antikörper ist. 15, Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 14, wobei der anti-gp39-Antikörper ein anti-humanes gp39-Antikörper ist.

15. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der gp39-Antagonist eine lösliche Form eines gp39-Liganden ist.

16. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die lösliche Form eines gp39-Liganden ein CD40-Fusionsprotein ist.

17. Verwendung eines gp39-Antagonisten zur Herstellung einer Zubereitung zur Verwendung beim Hervorrufen einer T-Zelltoleranz gegenüber einem Spendergewebe oder -organ bei einem Empfänger, welcher Empfänger allogenen oder xenogenen Zellen auszusetzen ist, die zumindest das Spender-Antigen exprimieren und an einer Oberfläche von diesen einen Liganden aufweisen, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert, mit der Maßgabe, dass das Spendergewebe oder -organ Langerhans-Inseln, Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen oder Darm umfasst, wenn die allogenen oder xenogenen Zellen allogene Zellen sind.

18. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die allogenen oder xenogenen Zellen, die zumindest das Spender-Antigen exprimieren, lymphoide Zellen oder Antigen-präsentierende Zellen umfassen.

19. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die lymphoide Zelle ein B-Lymphozyt ist.

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Antigen-präsentierende Zelle ausgewählt ist aus Monozyten, dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen, Keratinozyten, Endothelzellen, Astrozyten, Fibroblasten und Oligodendrozyten.

21. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Antigen-präsentierende Zelle eine B-Zelle ist.

22. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das Spendergewebe oder -organ Leber, Niere, Herz, Lunge, Haut, Muskel, neuronales Gewebe, Magen oder Darm umfasst.

23. Verwendung eines gp39-Antagonisten zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung von Diabetes bei einem Individuum, welches Langerhans-Inselzellen eines Spenders und allogenen oder xenogenen Zellen, die zumindest ein Spender-Antigen exprimieren und die an einer Oberfläche von diesen einen Liganden aufweisen, der mit gp39 an Empfänger-T-Zellen interagiert, auszusetzen ist.

24. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die allogenen oder xenogenen Zellen, die zumindest ein Spender-Antigen exprimieren, lymphoide Zellen, wie z.B. B-Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten und Langerhans-Zellen, umfassen.

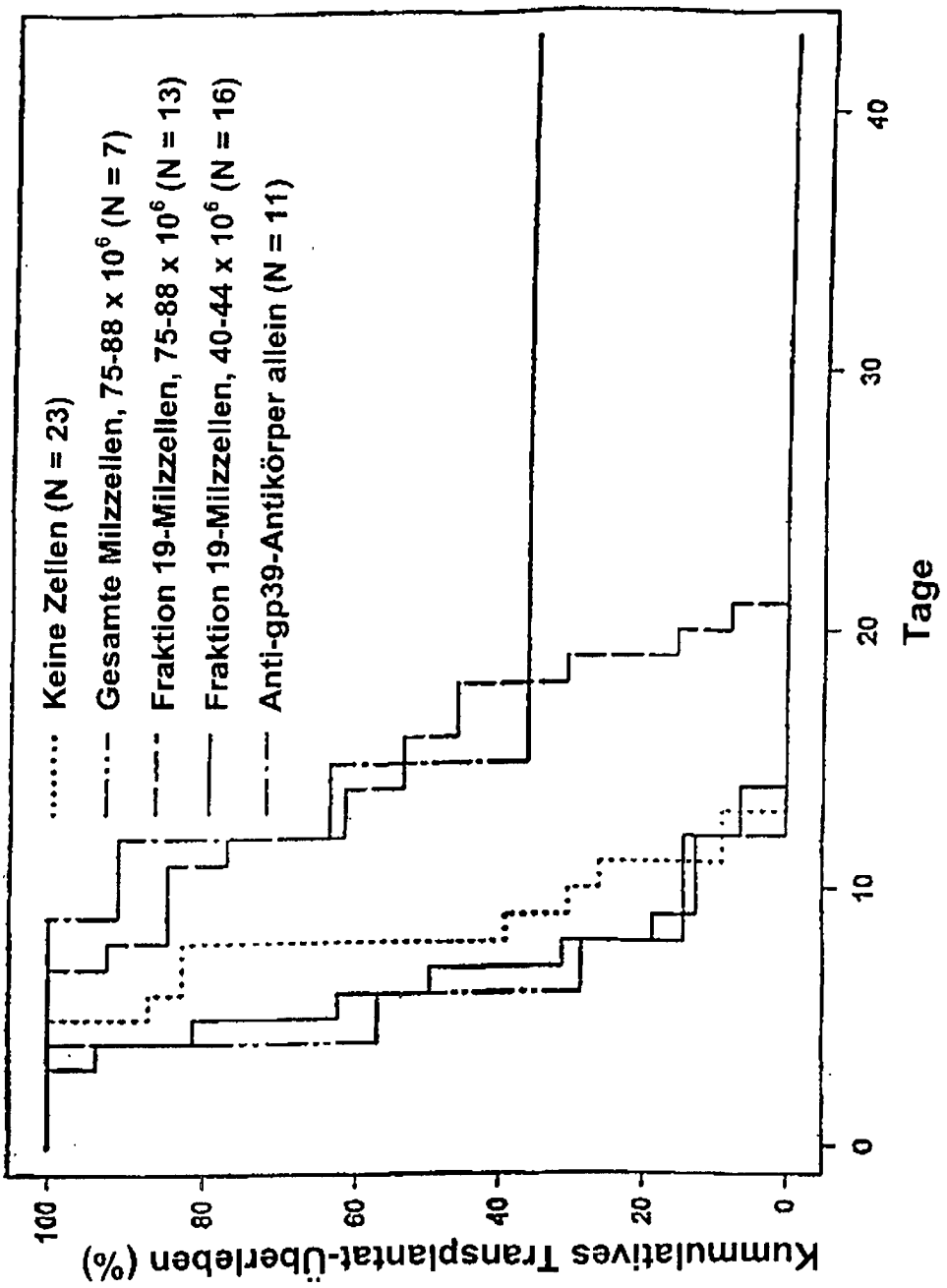
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 25, wobei der gp39-Antagonist ein anti-gp39-Antikörper oder ein lösliches CD40-Fusionsprotein ist.

26. Verwendung nach Anspruch 26, wobei der Antikörper ein monoklonaler anti-gp39-Antikörper ist.

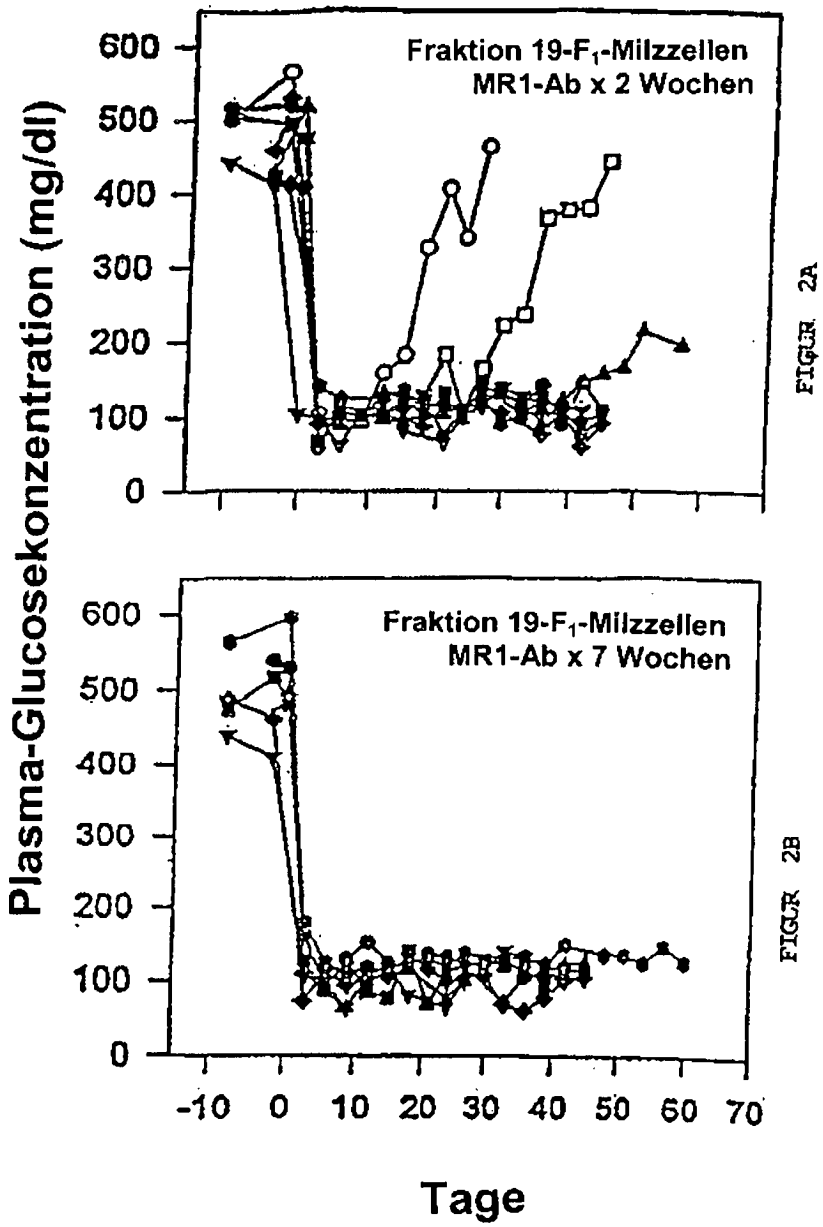
27. Verwendung nach Anspruch 27, wobei der monoklonale Antikörper ein chimärer Antikörper oder ein humanisierter monoklonaler Antikörper ist.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



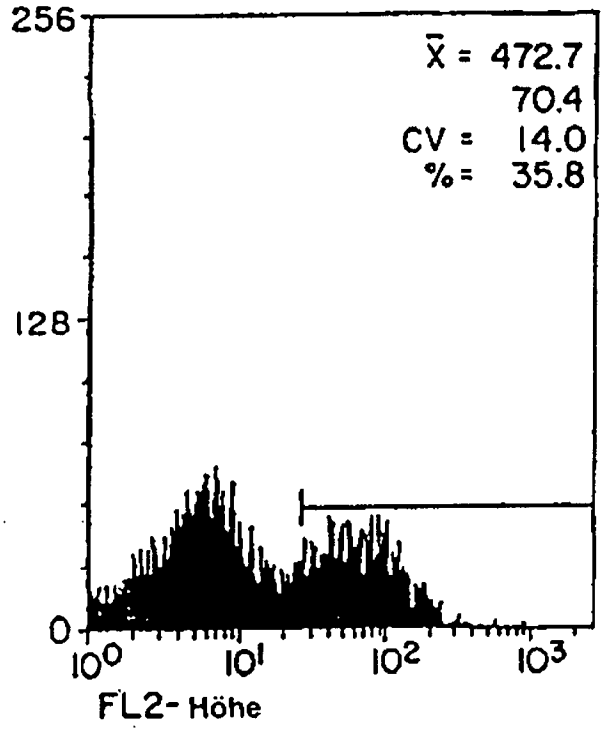
FIGUR 1



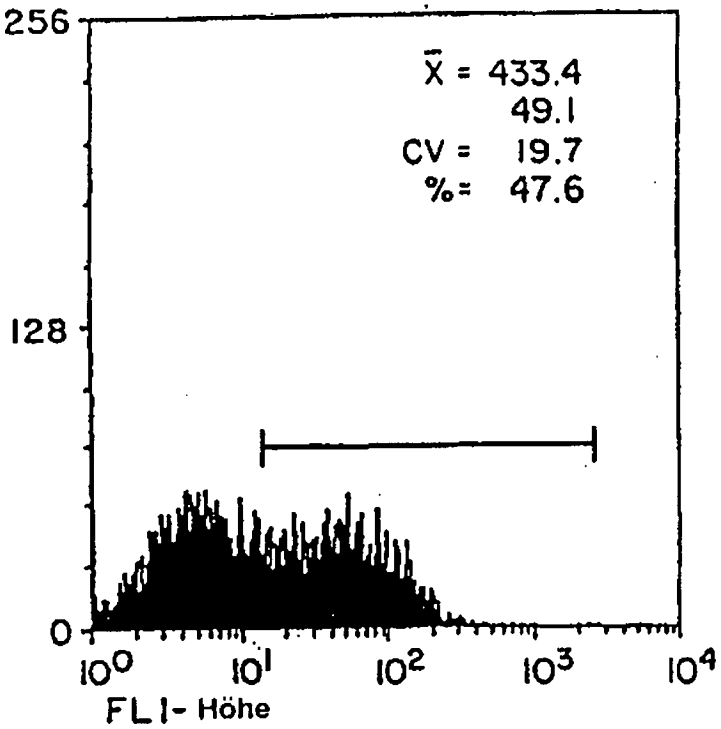
FIGUR 2A

FIGUR 2B

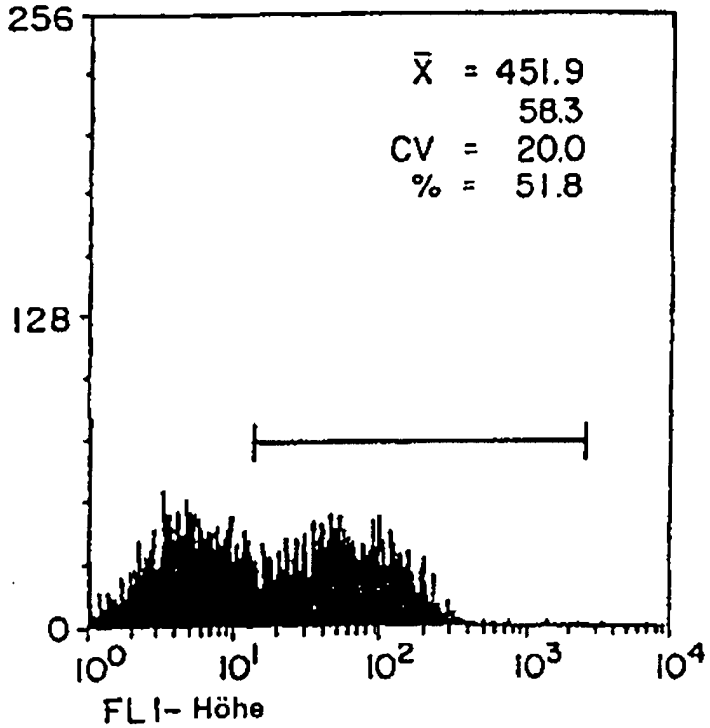
FIGUR 3A



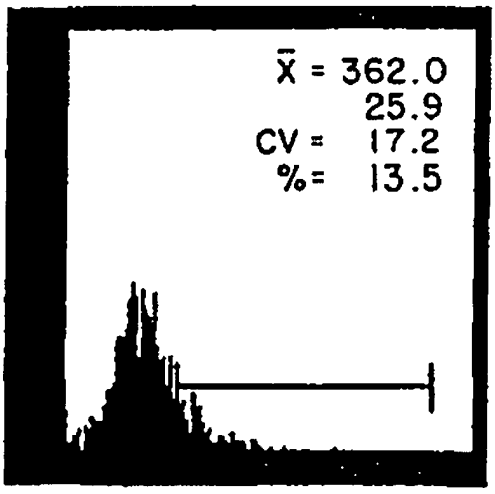
FIGUR 3B



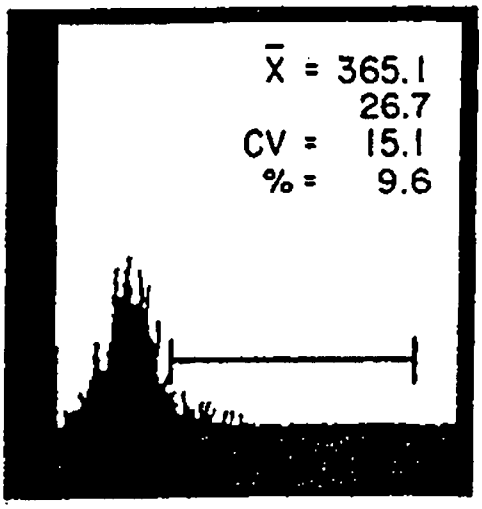
FIGUR 3C



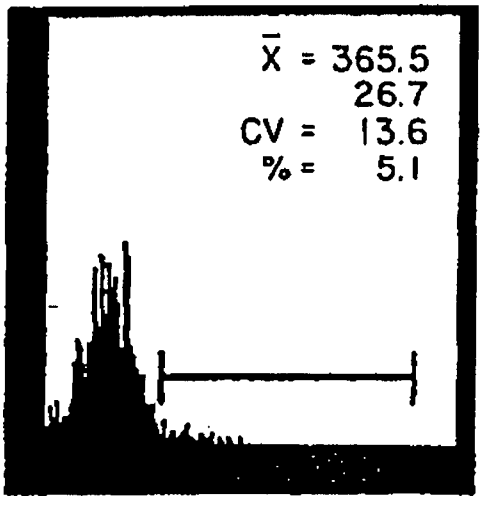
FIGUR 4A



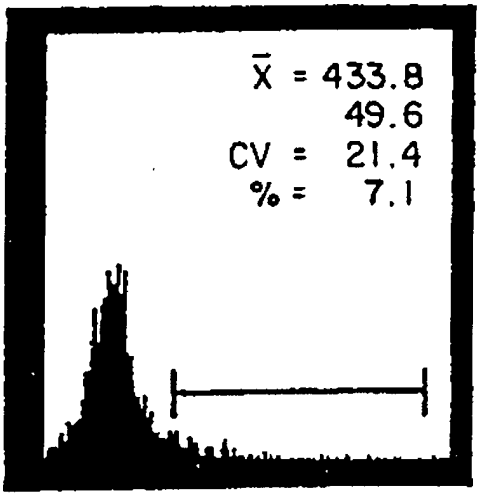
FIGUR 4B



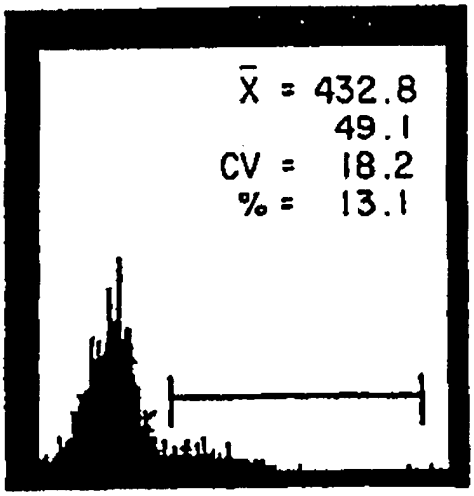
FIGUR 4C



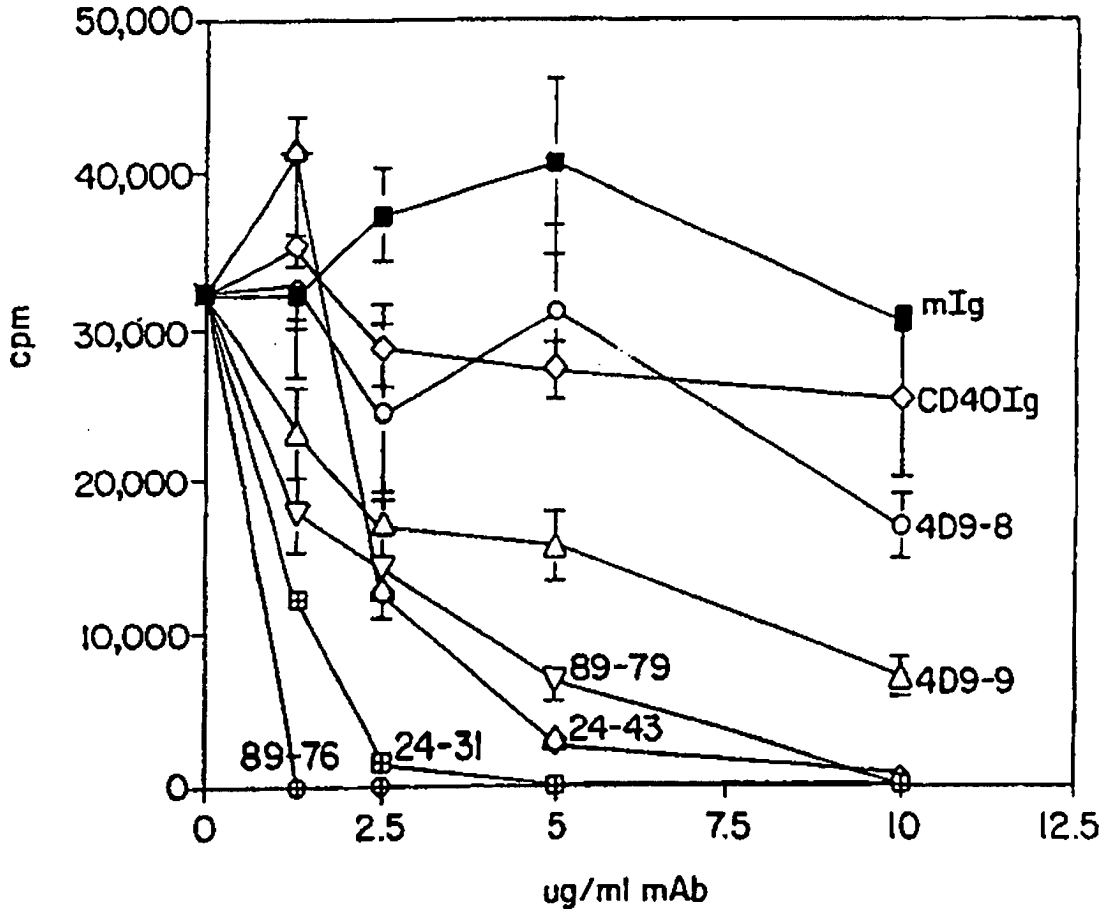
FIGUR 5A



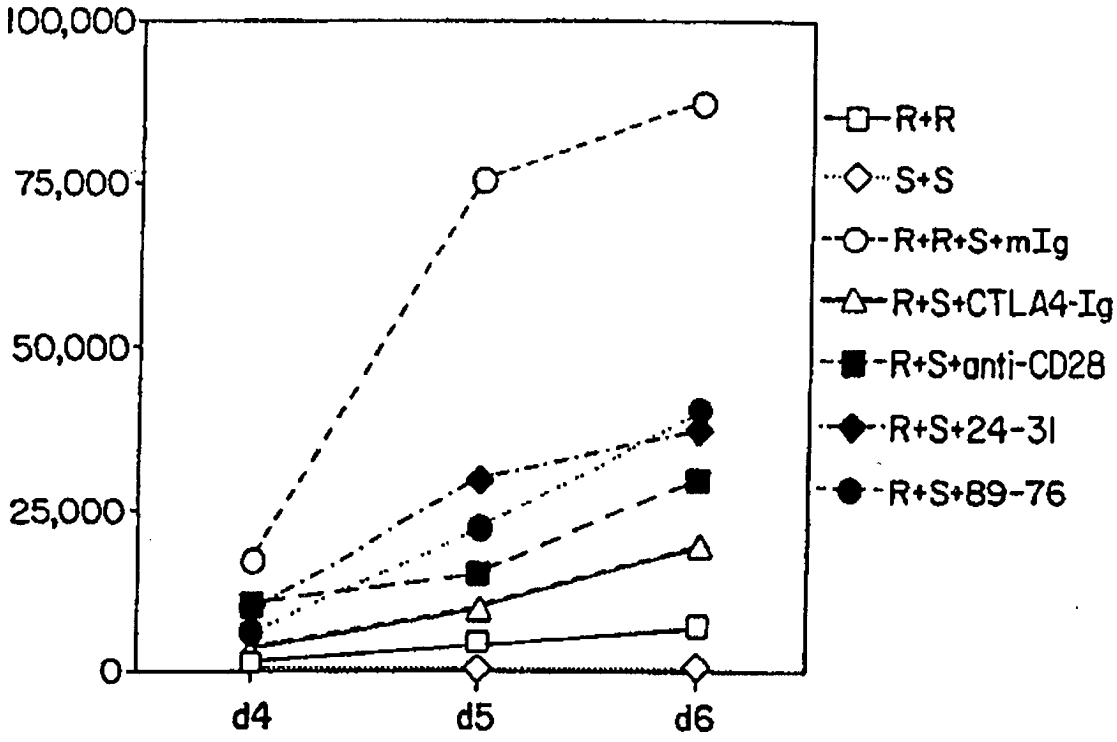
FIGUR 5B



FIGUR 6


50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
cpm
0
2.5
5
7.5
10
12.5
ug/ml mAb
mIg
CD40Ig
4D9-8
4D9-9
89-79
24-43
24-31
89-76

FIGUR 7


100,000
75,000
50,000
25,000
0
d4
d5
d6
R+R
S+S
R+R+S+mIg
R+S+CTLA4-Ig
R+S+anti-CD28
R+S+24-31
R+S+89-76